

# Toll 样受体 2 介导的 JNK 信号分子在 小鼠支气管哮喘发病中的作用机制

沈佩婷, 方 磊, 吴惠梅, 沈启英, 何 芳, 刘荣玉

**摘要** 目的 探讨 Toll 样受体 2 (TLR2) 介导的 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 信号分子参与小鼠支气管哮喘发病的作用机制。方法 健康 SPF 级 C57 (TLR2 野生型) 鼠和 TLR2 基因缺失 (TLR2<sup>-/-</sup>) 鼠各 14 只, 按随机数字表法分为 4 组: C57 对照组、C57 哮喘组、TLR2<sup>-/-</sup> 对照组、TLR2<sup>-/-</sup> 哮喘组, 每组 7 只。哮喘组以卵清蛋白 (OVA) 腹腔注射联合雾化吸入致敏和激发建立哮喘模型, 对照组以生理盐水代替 OVA 致敏和激发。利用免疫组织化学染色技术 (ABC 法) 检测 TLR2 蛋白在 C57 对照组、C57 哮喘组肺内的表达差异, JNK 及磷酸化 JNK (P-JNK) 蛋白表达在各组肺内的表达差异。结果 HE 染色提示较其余 3 组, C57 哮喘组有较明显的炎症细胞浸润及呼吸道平滑肌增生。以平均吸光度 (mA) 衡量各组织蛋白相对表达量, 免疫组化结果提示 TLR2 蛋白在 C57 哮喘组表达显著高于 C57 对照组 ( $P < 0.01$ )。JNK 蛋白在各组的表达差异无统计学意义, P-JNK 蛋白在 C57 哮喘组肺组织的表达量显著高于 C57 对照组、TLR2<sup>-/-</sup> 哮喘组、TLR2<sup>-/-</sup> 对照组 ( $F = 43.261, P < 0.01$ )。结论 TLR2 介导的 JNK 信号分子通路可能参与了支气管哮喘的发病过程。

**关键词** 哮喘; TLR2; JNK; P-JNK; 免疫组化

中图分类号 R 562.2+5; Q 241; Q 74

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)05-0573-04

支气管哮喘 (简称哮喘) 是多基因参与的具有遗传易感性的慢性呼吸道变应性疾病, 其发病涉及多种炎症细胞、炎性介质和复杂的细胞因子网络。Toll 样受体家族 (Toll like receptors, TLRs) 是参与非特异性免疫 (天然免疫) 的一类重要蛋白质分子, 同时具有激活和调节特异性免疫系统的作用。TLR2 在调控哮喘的发病机制中扮演的角色备受争

议<sup>[1-2]</sup>。TLRs 的激活依赖于连接蛋白髓样分化蛋白 88 的结合, 将信号传至胞内 Toll/IL-1 受体同源结构域, 从而激活下游的信号转导通路, 如核转录因子 NF- $\kappa$ B 诱导激酶, 促丝裂原活化蛋白激酶, 通过 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun amino-terminal kinase, JNK) 激活活化蛋白-1 转录因子家族, 即可启动细胞内炎症因子的合成及释放<sup>[3-4]</sup>。但 TLR2 激活 JNK 信号分子通路参与哮喘的发病过程少见报道。基于以上研究背景, 该研究建立 TLR2<sup>-/-</sup> 小鼠哮喘模型, 拟从形态学角度探讨 TLR2 介导的 JNK 信号分子通路在哮喘发病中的可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 非特定病原体雌性小鼠, 6~8 周龄, SPF 级 C57 小鼠 (上海斯莱克实验动物有限责任公司) 及 TLR2<sup>-/-</sup> 小鼠 (中国科学技术大学生命科学院田志刚教授馈赠) 各 14 只, (25±2) g。饲养于中国科学技术大学生命科学学院实验动物中心, 饲养环境符合 SPF 实验动物级环境设施标准。

**1.1.2 实验器材和试剂** 超声雾化器 402AI (江苏鱼跃医疗设备股份有限公司); 卵清蛋白 (ovalbumin, OVA), 硫酸铝钾 (上海生工生物工程技术服务有限公司); 兔抗鼠 TLR2 多克隆抗体 (美国 Abcam 公司); 兔抗鼠 JNK、P-JNK 多克隆抗体 (美国 CST 公司); SP9000 免疫组化染色试剂盒、浓缩型 DAB 试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物分组及模型复制** 按照随机数字表法将 C57 及 TLR2<sup>-/-</sup> 小鼠各 14 只分成 4 组: C57 对照组、C57 哮喘组、TLR2<sup>-/-</sup> 对照组、TLR2<sup>-/-</sup> 哮喘组。哮喘组小鼠于第 0 天腹腔注射 10  $\mu$ g OVA 和含 1 mg 硫酸铝钾的生理盐水溶液 0.5 ml 致敏。第 14 天开始激发, 给予 1% OVA 生理盐水 50 ml 雾化吸入, 1 次/d, 30 min/次, 连续 7 d。对照组参照哮喘组方法, 只是致敏和激发时均以生理盐水代替 OVA。各组均于末次激发后 24 h 处死, 切下一半右肺组织经 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋切片, 用

2015-02-02 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81270082、81170030、81300027); 高等学校博士学科点专项科研基金 (编号: 20113420110006); 安徽省重点实验室计划项目 (编号: 1206c0805028); 安徽省科技攻关项目 (编号: 12010402135)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院干部呼吸科, 安徽省老年病研究所, 合肥 230022

作者简介: 沈佩婷, 女, 硕士研究生;

刘荣玉, 女, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: rongyuliu@gmail.com

于 HE 染色及免疫组化检测。

1.2.2 HE 染色检测肺组织病理变化 光镜(×10)下观察 HE 染色的支气管肺组织周围炎症细胞浸润、平滑肌增生情况。

1.2.3 免疫组织化学检测蛋白表达 切片常规脱蜡至水,采用高火微波修复抗原,柠檬酸缓冲液 pH=6.0。3% 过氧化氢抑制内源性过氧化物酶活性及 0.3% Triton-X 100 增加肺组织通透性,以 5% 山羊血清(A 液)封闭减少非特异性表达。滴加一抗,37℃ 孵育 1 h 后 4℃ 过夜(视抗体表达程度可适当予以延长),PBS 洗涤后,生物素标记的二抗(B 液)处理 30 min,辣根过氧化物酶标记的 C 液 37℃ 孵育 30 min,ABC 液均为 SP9000 检测试剂盒内容物,DAB 显色,镜下控制染色时间,含有粗细不一的棕黄色颗粒即为阳性细胞。苏木精轻度复染,脱水,透明,中性树胶封片。每张切片随机选择 4 个结构较完整的支气管(×20),应用 JD 801D 图像分析软件测定阳性部位的平均吸光度(mean absorbance, mA),代表各蛋白表达水平。

1.3 统计学处理 所有数据经 SPSS 16.0 软件分析,计量资料均符合正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示,两样本均数比较采用两独立样本 *t* 检验,多组样本均数采用单因素方差分析法,两两比较采用 Bonferroni 检验。

## 2 结果

2.1 小鼠行为学改变 哮喘组在激发时均出现不同程度的烦躁不安、呼吸急促、毛发竖立、大小便失禁等症状,严重者呼吸减慢,行动迟缓,而对照组无明显上述表现。

2.2 肺组织形态学改变 光镜示 C57 哮喘组支气管、血管周围大量炎症细胞浸润,嗜酸性粒细胞增多,呼吸道上皮黏液腺增生,支气管壁明显增厚、管腔狭窄,肺泡壁结构紊乱,而 C57 对照组及 TLR2<sup>-/-</sup>对照组支气管周围则有少量炎症细胞浸润,无明显平滑肌增生、支气管壁增厚,肺泡结构完整。TLR2<sup>-/-</sup>哮喘组炎症细胞浸润及平滑肌增生等较 C57 哮喘组有所减弱。见图 1。

2.3 肺组织 TLR2、JNK、P-JNK 蛋白表达 TLR2、JNK、P-JNK 蛋白主要表达定位在胞质和胞核,支气管上皮细胞、平滑肌细胞及浸润的炎症细胞均可见表达。TLR2 蛋白在 C57 哮喘组肺组织的表达量显著高于 C57 对照组(*P* < 0.01),见图 2、表 1。JNK 蛋白在各组中的表达差异无统计学意义,见图 3、

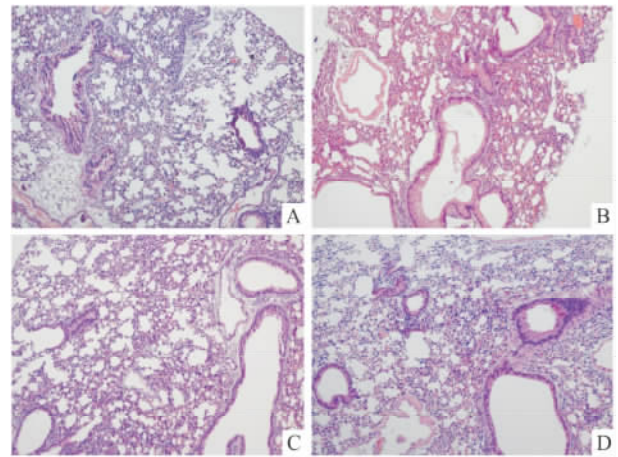


图 1 各组小鼠肺组织形态学改变 HE × 100

A: C57 对照组; B: C57 哮喘组; C: TLR2<sup>-/-</sup>对照组; D: TLR2<sup>-/-</sup>哮喘组

表 1. P-JNK 蛋白在 C57 哮喘组肺组织的表达量显著高于 C57 对照组、TLR2<sup>-/-</sup>哮喘组、TLR2<sup>-/-</sup>对照组(*F* = 43.261, *P* < 0.01),见图 3、表 1。

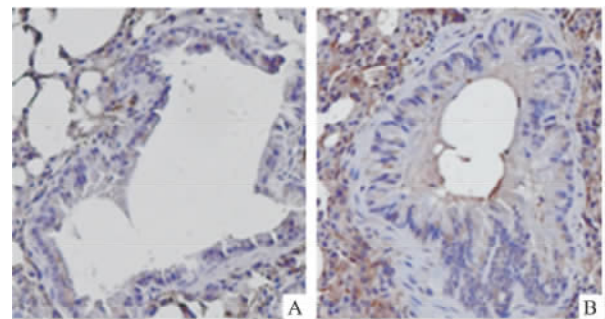


图 2 TLR2 蛋白表达 IHC × 200

A: C57 对照组; B: C57 哮喘组

表 1 TLR2、JNK、P-JNK 在各组小鼠肺组织 mA 比较(*n* = 7  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                     | TLR2 蛋白含量        | JNK 蛋白含量      | P-JNK 蛋白含量       |
|------------------------|------------------|---------------|------------------|
| C57 对照                 | 0.199 ± 0.014    | 0.385 ± 0.018 | 0.286 ± 0.024    |
| C57 哮喘                 | 0.448 ± 0.096 ** | 0.358 ± 0.050 | 0.534 ± 0.099 ## |
| TLR2 <sup>-/-</sup> 对照 | -                | 0.344 ± 0.076 | 0.205 ± 0.040    |
| TLR2 <sup>-/-</sup> 哮喘 | -                | 0.383 ± 0.076 | 0.322 ± 0.037    |

与 C57 对照组比较: \*\**P* < 0.01; 与其他 3 组比较: ##*P* < 0.01

## 3 讨论

TLRs 在参与哮喘气道炎症的不同细胞上均有表达,如上皮细胞、巨噬细胞、树突状细胞、肥大细胞<sup>[5]</sup>和气管平滑肌<sup>[6]</sup>。Ferreira et al<sup>[11]</sup>收集 24 例致命性哮喘患者的临床标本,发现 TLR2 蛋白在气道上皮细胞的表达较对照组升高。Th2 细胞及其分泌的细胞因子的增多在哮喘的发病中起着重要的作用,Re-

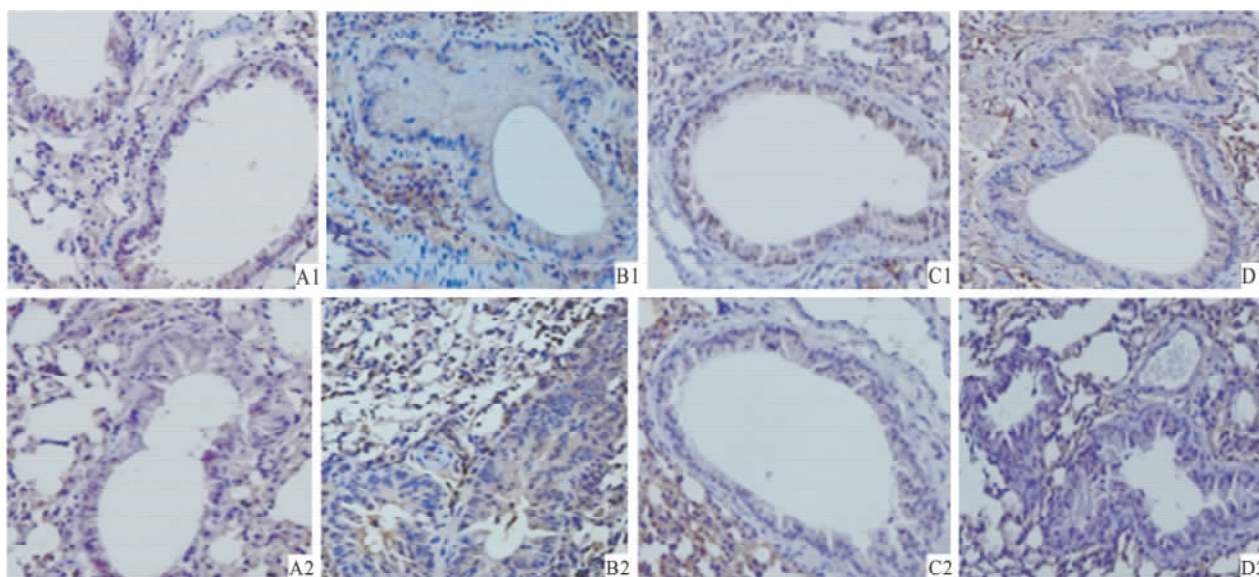


图3 JNK、P-JNK 蛋白表达 IHC × 200

A: C57 对照组; B: C57 哮喘组; C: TLR2<sup>-/-</sup> 对照组; D: TLR2<sup>-/-</sup> 哮喘组; 1: JNK 蛋白; 2: P-JNK 蛋白

decke et al<sup>[7]</sup> 发现 TLR2 的配体 Pam3Cys 通过持续性诱导 Th2 反应, 下调 Th1 因子, 从而使免疫反应向 Th2 优势的方向发展, 促进实验性哮喘的发生, 而另一项研究<sup>[2]</sup> 显示 TLR2 的配体 Pam3Cys 通过降低气道高反应性, 减弱肺内 Th2 型炎症反应及特异性 IgE 的分泌等抑制哮喘的发生。

有研究<sup>[8-9]</sup> 显示, TLR2 基因变异是哮喘易感性的主要决定因素。研究<sup>[10]</sup> 表明, TLR2<sup>-/-</sup> 时哮喘组小鼠气道炎症浸润程度显著降低, 且一种新型的晚期炎症介质即高迁移率族蛋白 1 信号分子在 BALF 及肺组织中的表达亦减少。本研究在前期工作基础上, 通过 OVA 致敏及激发小鼠成功建立哮喘模型, 进一步提出 TLR2 介导了 JNK 信号通路参与哮喘的发病机制。免疫组织化学直观地显示出 TLR2 蛋白在 C57 哮喘组的表达显著高于 C57 对照组, 与上述 TLR2 可能促进小鼠支气管哮喘发生的结论相符。

JNK 是促丝裂原活化蛋白激酶超家族成员之一, 通过三级酶促级联反应, 完成 JNK 磷酸化, 从而在炎症反应的诸多方面发挥免疫调控作用<sup>[11]</sup>。Nath et al<sup>[12]</sup> 通过哮喘造模发现 JNK 信号通路在气道炎症、气道重塑及伴随的气道高反应性中发挥重要作用。Oltmanns et al<sup>[13]</sup> 研究证实, 在气道慢性炎症和重构过程中, JNK 是一个重要的信号分子, 可促进气道平滑肌细胞分泌炎症因子如活性调节蛋白、白介素-8 等。有研究<sup>[14]</sup> 表明 P-JNK 与哮喘气道重塑密切相关, 表现为蛋白表达量升高, 而 JNK 作为 P-JNK 的前体其表达量无显著差异。本研究免疫组

织化学检测 JNK 蛋白在各组之间的表达无明显差异, P-JNK 在哮喘组中表达升高与以上结论相符。

肺泡巨噬细胞主要通过吞噬病原体和协调炎症反应来调控天然免疫应答, 参与哮喘的发病, Fang et al<sup>[15]</sup> 通过金黄色葡萄球菌刺激 RAW264.7 肺泡巨噬细胞系, 发现 TLR2 基因沉默可以显著地降低 P-JNK 在巨噬细胞的表达, 推测 TLR2 可能活化并介导了 JNK 信号通路。Watanabe et al<sup>[16]</sup> 也有过类似的发现。本研究中免疫组织化学检测显示活化的 P-JNK 在 C57 哮喘组显著升高, TLR2<sup>-/-</sup> 时其表达量则明显降低。因此, 推测 TLR2 蛋白在诱发哮喘过程中占主导地位, 同时进一步激活并介导 JNK 信号分子参与小鼠支气管哮喘的发生, 但其确切的调控机制仍需深入探讨。

### 参考文献

- [1] Ferreira D S, Annoni R, Silva L F, et al. Toll-like receptors 2, 3 and 4 and thymic stromal lymphopoietin expression in fatal asthma [J]. *Clin Exp Allergy* 2012, 42(10): 1459-71.
- [2] Haapakoski R, Karisola P, Fyhrquist N, et al. Toll-like receptor activation during cutaneous allergen sensitization blocks development of asthma through IFN- $\gamma$ -dependent mechanisms [J]. *J Invest Dermatol* 2013, 133(4): 964-72.
- [3] Aderem A, Ulevitch R J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response [J]. *Nature* 2000, 406(6797): 782-7.
- [4] Kawai T, Akira S. TLR signaling [J]. *Cell Death Differ* 2006, 13(5): 816-25.
- [5] Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors [J]. *Annu Rev*

- Immunol 2003 21: 335 – 76.
- [6] Sukkar M B ,Xie S ,Khorasani N M ,et al. Toll-like receptor 2 , 3 , and 4 expression and function in human airway smooth muscle [J]. *J Allergy Clin Immunol* 2006 ,118( 3) : 641 – 8.
- [7] Redecke V ,Häcker H ,Datta S K ,et al. Cutting edge: Activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma [J]. *J Immunol* ,2004 ,172( 5) : 2739 – 43.
- [8] Smit L A ,Bouzigon E ,Bousquet J ,et al. Mold allergen sensitization in adult asthma according to integrin beta3 polymorphisms and Toll-like receptor 2 / +596 genotype [J]. *J Allergy Clin Immunol* , 2011 ,128( 1) : 185 – 191. e7.
- [9] Eder W ,Klimecki W ,Yu L ,et al. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers [J]. *J Allergy Clin Immunol* 2004 ,113( 3) : 482 – 8.
- [10] 何芳 沈启英 方磊 等. Toll样受体2介导的高迁移率族蛋白1信号分子在小鼠支气管哮喘中的作用机制 [J]. *中华医学杂志* 2014 94( 16) : 1219 – 22.
- [11] Hommes D W ,Peppelenbosch M P ,van Deventer S J ,et al. Mitogen activated protein ( MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti – inflammatory targets [J]. *Signal Transduct* 2003 , 52( 1) : 144 – 51.
- [12] Nath P ,Eynott P ,Leung S Y ,et al. Potential role of c-Jun NH2-terminal kinase in allergic airway inflammation and remodelling: effects of SP600125 [J]. *Eur J Pharmacol* 2005 ,506( 3) : 273 – 83.
- [13] Oltmanns U ,Issa R ,Sukkar M B ,et al. Role of c-jun N-terminal kinase in the induced release of GM-CSF , RANTES and IL-8 from human airway smooth muscle cells [J]. *Br J Pharmacol* 2003 ,139 ( 6) : 1228 – 34.
- [14] 林立 管小俊 李昌崇 等. c-Jun 氨基末端激酶磷酸化在支气管哮喘大鼠气道重塑中的作用及糖皮质激素的影响 [J]. *中华结核和呼吸杂志* 2010 33( 3) : 188 – 92.
- [15] Fang L ,Wu H M ,Ding P S ,et al. TLR2 mediates phagocytosis and autophagy through JNK signaling pathway in Staphylococcus aureus-stimulated RAW264. 7 cells [J]. *Cell Signal* 2014 ,26( 4) : 806 – 14.
- [16] Watanabe I ,Ichiki M ,Shiratsuchi A ,et al. TLR2-mediated survival of Staphylococcus aureus in macrophages: a novel bacterial strategy against host innate immunity [J]. *J Immunol* ,2007 ,178 ( 8) : 4917 – 25.

## Mechanism of c-Jun N-terminal kinase mediated by Toll like receptor 2 in murine asthma

Shen Peiting , Fang Lei , Wu Huimei , et al

( Dept of Geriatric Pulmonary ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Geriatric Institute of Anhui Province ,Hefei 230022)

**Abstract Objective** To explore the mechanism of c-Jun N-terminal kinase mediated by Toll like receptor 2 in murine asthma. **Methods** 14 healthy SPF grade C57 wild-type mice and 14 TLR2 knockout ( TLR2<sup>-/-</sup>) mice were randomly divided into four groups: C57 control group , C57 asthma group , TLR2<sup>-/-</sup> control group , TLR2<sup>-/-</sup> asthma group ( n = 7) . We utilized intraperitoneal injection combined with inhalation of ovalbumin ( OVA) to sensitize and challenge the mice , thus establishing the experimental models of asthma. Meanwhile , the control group received normal saline instead of OVA. The protein expression of TLR2 was detected by immunohistochemistry ( ABC method) in C57 control group and C57 asthma group as well as JNK and phosphorylation c-Jun ( P-JNK) between each group. **Results** In C57 asthma group , HE-staining showed more obvious inflammatory cell infiltration around bronchi and airway smooth muscle hyperplasia than the other three groups. The relative protein expressions were measured by mean absorbance ( mA) . Immunohistochemistry indicated that mean absorbance values of TLR2 was significantly higher in C57 asthma group than those of C57 control group ( P < 0. 01) . There was no obvious difference of JNK protein expression between each group. The immunorexpression of P-JNK in C57 asthma group was notably higher than those of C57 control group , TLR2<sup>-/-</sup> asthma group , TLR2<sup>-/-</sup> control group ( F = 43. 261 P < 0. 01) . **Conclusion** TLR2-mediated JNK signaling molecules may be involved in the process of murine asthma. **Key words** asthma; Toll like receptor 2; c-Jun N-terminal kinase; phosphorylation c-Jun N-terminal kinase; immunohistochemistry