文章编号:1000-5404(2005)11-1093-04

论著

大鼠肺动脉平滑肌细胞缺氧后STAT3活性变化对细胞癌基因c-jun mRNA表达及细胞增殖的影响

白 莉[1],余祖滨[2],钱 频[3],钱桂生[1],关 崧[1] (第三军医大学新桥医院:[1]全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,[2]胸外科,[3]超声诊断科,重庆 400037)

提 要:目的 观察大鼠肺动脉平滑肌细胞缺氧后信号转导和转录活化因子3(STAT3)活性变化对细胞癌基因c-jun mRNA表达及细胞增殖的影响。**方法** 组织块法原代培养肺动脉平滑肌细胞(PASMCs),用AG490预孵育后进行缺氧处理,Western blot检测缺氧2、4、6、8、12 h组STAT3酪氨酸活性水平变化;半定量RT-PCR检测缺氧2、4、6、8、12 h组细胞中c-jun mRNA表达水平变化;流式细胞仪检测细胞周期变化。**结果** Western blot定量分析示缺氧培养6 h组STAT3酪氨酸磷酸化水平升高,12 h组达高峰;缺氧2 h细胞c-jun mRNA表达升高,6 h达高峰,8 h下降;细胞在缺氧6 h出现G_0/G_1期细胞比例明显减少,$S+G_2/M$期细胞比例明显增加,并随缺氧时间延长变化更显著。与对照组细胞相比,AG490处理组细胞在缺氧各时相点STAT3酪氨酸磷酸化水平及c-jun mRNA表达明显降低,同时G_0/G_1期细胞比例显著增加,$S+G_2/M$期细胞比例显著减少。**结论** ①STAT3活化和c-jun mRNA表达增加参与缺氧PASMCs增殖;②AG490可通过抑制STAT3活性下调c-jun mRNA表达,从而抑制缺氧诱导的PASMCs增殖。

关键词: 缺氧;信号传导;肺动脉;平滑肌细胞;细胞癌基因;增殖
中图法分类号: R322.121; R329.2; R394.2 **文献标识码:** A

Effects of activated STAT3 on c-jun mRNA expression and proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells under hypoxia in rats

BAI Li[1], YU Zu-bin[2], QIAN Pin[3], QIAN Gui-sheng[1], GUAN Song[1] ([1]Institute of Respiratory Diseases, [2]Department of Thoracic Surgery, [3]Department of Ultrasonic Diagnosis, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the effects of activated signal transduction and activators of transcription 3 (STAT3) on c-jun mRNA expression and proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs) under hypoxia in rats. **Methods** After PASMCs were cultured with AG490 and exposed to hypoxia, the tyrosin-phosphorylated STAT3 protein was determined in the 2nd, 4th, 6th, 8th and 12th hour after hypoxic exposure with Western blotting. The expression of c-jun mRNA was observed with sqRT-PCR. Flow cytometric DNA analysis was used to observe the cell cycles. **Results** The level of tyrosin-phosphorylated STAT3 began to increase in the 6th hour after hypoxic exposure and reached the peak of increase in the 12th hour. The level of tyrosine-phosphorylated STAT3 and c-jun expression mRNA in the AG490-treated PASMCs was significantly lower than that in the control group. The AG490-treated PASMCs were increased in G_1/G_0 phase and decreased in the $S+G_2/M$ phase under normoxic and hypoxic conditions. **Conclusion** The activated STAT3 and c-jun gene might play an important role in the early stage of hypoxia-induced proliferation of PASMCs. AG490 might inhibit c-jun expression through the lowering of the level of tyrosine phosphorylation of STAT3 which prevents the proliferation of hypoxia-induced proliferation of PASMCs.

Key words: hypoxia; signal transduction; pulmonary artery; smooth muscle; cell-oncogen; proliferation

细胞因子对细胞的作用可通过信号转导和转录活化因子(signal transduction and activators of transcription, STATs)来实现[1]。STAT3是STATs家族重要成员之一,由于其广泛表达于不同的类型和组织中,并参与细胞的分化、增殖、凋亡等一系列生理功能的调控,因此关于STAT3在以血管平滑肌细胞增殖为主要病理基础的血管重塑性疾病(如缺氧肺动脉高压、高血压、动脉粥样硬化)发病过程中所起的作用引起了人们的广

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970329)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39970329)
作者简介:白 莉(1975-),女,山西省晋城市人,博士,主治医师,讲师,主要从事缺氧肺动脉高压分子机制的研究。电话:13996471857,E-mail:ybll@21cn.com
收稿日期:2004-06-14;修回日期:2004-09-19

泛关注[2]。本研究通过观察肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMCs)缺氧后STAT3活性变化对细胞癌基因c-jun表达及细胞增殖的影响,以期揭示STAT3在缺氧PASMCs增殖中的作用,为进一步阐明血管平滑肌细胞增殖相关疾病发生过程中的信号转导机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

DMEM(低糖)培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(Hyclone公司),tripure试剂(Roche公司),MMLV反转录酶(Promega公司),*Taq* DNA聚合酶、Oligo(dT)15、dNTP(北京鼎国生物技术发展公司),AG490(Sigma公司),兔抗大鼠anti-pTyr705-STAT3多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记马抗兔抗体IgG(Santa Cruz公司),α-SM actin单克隆抗体和S-P免疫组化试剂盒(北京中山公司),其余试剂为国产分析纯。自动常压缺氧孵箱(德国贺氏公司),PTC-200DNA扩增仪(美国MT research公司),AlphaImager凝胶成像分析系统(AlphaInnotech公司,USA)。

1.2 PASMCs培养与分组

取体质量150~200 g成年Wistar大鼠,无菌条件下开胸取出肺动脉干和左右肺动脉,组织块法培养PASMCs。培养液为含10%胎牛血清DMEM,取第5~8代细胞用于实验,并作α-SM-actin免疫细胞化学染色鉴定[3]。用0.25%胰酶将细胞消化传代,按是否加20 μmol/L AG490分为对照组和AG490处理组,AG490预孵育细胞2 h后进行缺氧处理。在常氧(21%O_2)(N)和缺氧(1%O_2)2 h(H2)、4 h(H4)、6 h(H6)、8 h(H8)、12 h(H12)进行各指标的检测。待细胞长至瓶底的70%~80%,换含0.4%胎牛血清DMEM培养基使PASMCs生长同步48 h。

1.3 Western blot检测STAT3活性

取生长在100 ml培养瓶中各时点细胞,弃培养液,0.01 mmol/L PBS液清洗,在0 ℃,用500 μl细胞裂解液(50 mmol/L pH 8.0 Tris·HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.02%叠氮钠,100 g/L苯甲基磺酰氟,1 mg/L aprotinin, 1% Triton)裂解细胞,15~30 min后,用细胞刮收获细胞,于4 ℃离心(12 000 r/mim)10 min,取上清,用紫外分光光度计进行蛋白定量,取40 μg总蛋白选择10%分离胶和5%浓缩胶进行SDS-PAGE电泳,完毕后将蛋白质电转印(15 V, 1 mA, 50 min)至PVDF膜,加封闭液(5%脱脂奶粉,0.05% Tween-20, TBS溶解)封闭1 h,加封闭液1∶1 000稀释的一抗anti-pTyr705-STAT3 37 ℃孵育1 h,4 ℃过夜后,含0.05% Tween-20 TBS洗膜3×5 min,然后加HRP标记的二抗(封闭液稀释至1∶1 000)孵育2 h,用含0.05% Tween-20 TBS洗膜3×5 min,再用TBS洗膜5 min。将膜放至DAB液中显色,直至洗出清晰条带。结果用AlphaImager图像分析仪进行灰度扫描,读取各带的吸光值(D)。

1.4 半定量RT-PCR法检测c-jun mRNA表达

Tripure试剂盒提取总RNA。取2 μg总RNA进行逆转录后各取5 μl行PCR反应。根据大鼠c-jun mRNA序列,设计引物;HPRT为内参照。c-jun引物序列如下:上游引物:5′-AATGGGCACATCACCACTACAC-3′,下游引物:5′-CGTCTGCGGCTCTTCCTTCA-3′;产物长度:450 bp。HPRT引物序列如下:上游引物:5′-GCTGGTGAAAAGGACCTCTCG-3′,下游引物:5′-GCAGATGGCCACAGGACTAGA-3′。反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 40 s,64 ℃ 50 s,72 ℃ 90 s,35个循环;72 ℃延伸10 min。循环完成后,取10 μl PCR产物1.5%琼脂糖凝胶进行电泳,AlphaImager图像分析仪进行灰度扫描,读取各带的吸光值(D),结果以c-jun/HPRT的吸光值之比($D_{c\text{-}jun}/D_{HPRT}$)进行半定量分析,以此反映c-jun mRNA的表达程度。

1.5 流式细胞仪检测细胞周期

胰蛋白酶消化液消化细胞呈悬浮状,HBSS液冲洗2次,离心(1 000 r/min),弃上清,沉淀用少量HBSS液反复吹散成单一细胞,将单细胞悬液滴入4 ℃预冷的70%乙醇中固定12 h以上,加RNA酶37 ℃反应30 min,冰浴终止反应,碘化丙啶4 ℃闭光染色30 min,在300目尼龙网过滤后用流式细胞仪以480 nmol/L的红色荧光测定1×10^4个细胞的DNA含量和G_1/G_0、S及G_2/M各期的细胞比例。

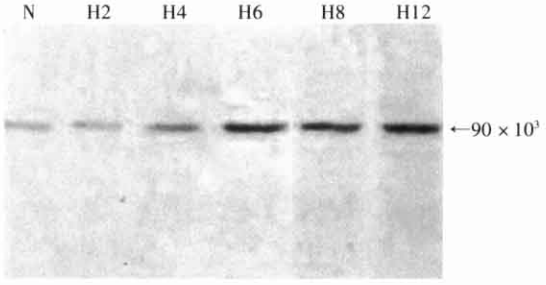
1.6 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0软件行F检验和q检验。

2 结果

2.1 PASMCs酪氨酸磷酸化STAT3表达定量分析结果

pTyr705-STAT3蛋白分子量为90×10^3。Western blot结果显示(图1,表1),与同组未缺氧细胞比较,对照组细胞pTyr 705-STAT3在缺氧4、6、8、12 h条带光密度值显著升高($P<0.01$);AG490处理组细胞在各时相点pTyr 705-STAT3条带光密度值无显著差异($P>0.05$),且各时相点pTyr 705-STAT3条带光密度值显著低于同时相点对照组细胞($P<0.01$)。



N: Normal; H2: Hypoxia 2 h; H4: Hypoxia 4 h; H6: Hypoxia 6 h; H8: Hypoxia 8 h; H12: Hypoxia 12 h

图1 缺氧PASMCs中STAT3酪氨酸磷酸化水平的变化

Fig 1 Changes of Tyrosine-phosphorylated STAT3 level in PASMCs exposed to hypoxia

2.2 PASMCs c-jun mRNA表达半定量分析结果

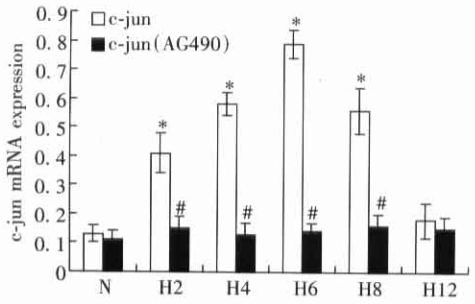
结果显示,与同组未缺氧细胞比较,对照组细胞在缺氧2 h c-jun mRNA表达升高,6 h达高峰,8 h下降;AG490处理组细胞c-jun mRNA水平在常氧和缺氧各时相点无显著差异;且其c-jun mRNA水平在缺氧2、4、6、8 h各时相点均显著低于同时相点对照组细胞($P<0.01$),在常氧及缺氧12 h c-jun mRNA水平与同时相点对照组细胞无显著差异($P>0.05$)(图2)。

表 1　AG490 对缺氧 PASMCs 中 STAT3 酪氨酸磷酸化水平的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effects of AG490 on the level of pTyr705-STAT3 in PASMCs under hypoxia condition ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Group	N	Time of hypoxia				
		H2	H4	H6	H8	H12
Control group	90.25 ± 10.03	88.36 ± 8.97	156.85 ± 15.78*	209.93 ± 14.92*	228.49 ± 16.98*	312.22 ± 10.98*
AG490-treated group	43.22 ± 7.69	52.86 ± 7.18	54.58 ± 6.19	59.74 ± 6.23	56.99 ± 6.84	59.74 ± 6.23

*: $P<0.01$, *vs* N



*: $P<0.01$ *vs*; #: $P<0.01$, *vs* C-jun

图 2　AG490 对缺氧 PASMCs 中 c-jun mRNA 表达的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Fig 2　Effects of AG490 on the expression of c-jun mRNA in PASMCs under hypoxia conditions ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

2.3　细胞周期测定结果

对照组细胞在缺氧 6 h 出现 G_0/G_1 细胞比例减少,$S+G_2/M$ 期细胞比例增加,至 12 h 变化最显著($P<0.01$)。AG490 处理组细胞缺氧各时相点 G_0/G_1、$S+G_2/M$ 期细胞比例与同组未缺氧细胞无显著差异($P>0.05$)。与同时相点对照组相比,AG490 处理组细胞在常氧及缺氧各时相点 G_0/G_1 期细胞比例显著增加,$S+G_2/M$ 期细胞比例显著降低($P<0.01$)(表 2)。

表 2　缺氧及 AG490 对 PASMCs 细胞周期变化的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effects of AG490 on PASMCs cycle under hypoxia conditions ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Cycle	Control group	Group treated with AG490
N	G_1/G_0	67.18 ± 4.14	80.32 ± 7.65*
	$S+G_2/M$	31.82 ± 1.95	19.53 ± 1.87*
H2	G_1/G_0	69.34 ± 5.56	81.87 ± 7.50*
	$S+G_2/M$	32.02 ± 2.23	20.48 ± 1.86*
H4	G_1/G_0	62.34 ± 3.61	83.56 ± 7.65*
	$S+G_2/M$	34.56 ± 1.98	21.09 ± 1.87*
H6	G_1/G_0	53.28 ± 3.02#	83.04 ± 7.09*
	$S+G_2/M$	40.22 ± 1.45#	17.03 ± 1.65*
H8	G_1/G_0	50.77 ± 3.66#	80.32 ± 5.59*
	$S+G_2/M$	49.22 ± 2.35#	20.66 ± 2.12*
H12	G_1/G_0	47.00 ± 5.17#	74.34 ± 5.36*
	$S+G_2/M$	50.84 ± 2.58#	28.76 ± 2.84*

*: $P<0.01$, *vs* control group; #: $P<0.01$, *vs* N

3　讨论

信号转导与转录激活因子(signal transduction and activators of transcription, STATs)是一类由细胞因子、生长因子等多肽类配体激活的转录因子。配体依赖的 STATs 持续激活,和细胞的分化、生长、增殖紧密相关。STAT3 作为 STATs 家族成员之一,是 1994 年作为 IL-6 信号传递中的急性期反应因子被纯化的[4]。STAT3 广泛表达于不同类型的组织和细胞中,其蛋白由 750 ~ 795 个氨基酸组成,分子量(89 ~ 92) × 10^3,STAT3 的活化依赖于其 Y705 磷酸化,活化的 STAT3 通过分子间 SH2 区与酪氨酸磷酸化位点相互作用,形成同源或异源二聚体,转位入核,结合在特定基因的启动子上,参与细胞的分化、增殖、凋亡等一系列生理功能的调控[5]。

近年来关于 STAT3 在以血管平滑肌细胞增殖为主要病理基础的血管重塑性疾病(如缺氧肺动脉高压、高血压、动脉粥样硬化)发病过程中所起的作用受到广泛关注[2]。Tone 等[6]发现 STAT3 在 gp130 介导的心肌肥大和抗凋亡中起重要作用:STAT3 在白细胞抑制因子(leukocyte inhibition factor, LIF)作用于心肌细胞 15min 内迅速发生酪氨酸磷酸化,促进心肌细胞增生,抑制心肌细胞的凋亡。有研究表明大鼠颈动脉损伤后修复过程中,免疫组织化学染色证实损伤动脉中膜和新生内膜中 JAK2、STAT3 磷酸化水平表达明显升高,使用 AG490(酪氨酸激酶 JAK2 抑制剂可抑制 STAT3 Y705 酪氨酸磷酸化)后显著抑制血管的修复[7,8]。Madamanchi 等[9]报道凝血酶刺激血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)增殖的同时伴有 JAK2、STAT1、STAT3 的过度活化。Ang Ⅱ 通过 AT1 受体激活 VSMCs JAK2,进一步使 STAT3 活化,促进 VSMCs 增殖[10]。本研究表明在缺氧诱导 PASMCs 增殖过程中,酪氨酸磷酸化 STAT3 表达明显增加,使用 AG490,抑制 STAT3 活性后,缺氧 PASMCs 的增殖明显受到抑制。提示 STAT3 活化与缺氧 PASMCs 的增殖密切相关。

c-jun 产物是参与细胞增殖调控的主要转录因子

之一，其表达产物 jun 与 fos 形成异源二聚体，即具有较高活性的 AP-1(activated protein-1)，AP-1 通过与 DNA 的佛波酯反应元件(TPA-responsive element，TRE)结合，激活下游相关基因转录，致细胞增殖[11]。已证实，STAT3 信号分子参与 c-jun 基因表达的调控[1]。我们在实验中发现，使用 AG490 抑制缺氧 PASMCs 中 STAT3 活性后，c-jun mRNA 表达明显降低，同时缺氧诱导的 PASMCs 增殖明显受到抑制，提示 c-jun 可能作为 STAT3 的靶基因，参与 STAT3 介导的缺氧 PASMCs 增殖过程。但由于 STAT3 下游信号通路十分复杂，因此有必要进一步阐明参与 STAT3 介导缺氧 PASMCs 增殖过程中的关键环节，为今后缺氧肺动脉高压的防治提供理论依据。

参考文献：

[1] Darnell J E Jr. STATs and gene regulation[J]. Science, 1997, 277(5332): 1630 - 1635.

[2] Yamauchi Takihara K, Kishimoto T. A novel role for STAT3 in cardiac remodeling[J]. Trends Cardiovasc Med, 2000, 10(7): 298 - 303.

[3] 王关嵩，杨晓静，钱桂生，等. 大鼠血管平滑肌细胞分离培养的探讨[J]. 第三军医大学学报，1998，20(4)：348 - 350.

[4] Darnell J E Jr, Kerr I M, Stark G R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular proteins[J]. Science, 1994, 264(5164): 1415 - 1421.

[5] Takeda K, Akira S. STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2000, 11(3): 199 - 207.

[6] Tone E, Kunisada K, Kumanogoh A, *et al*. gp130-Dependent signalling pathway is not enhanced in gp130 transgenic heart after LIF stimulation [J]. Cytokine, 2000, 12(10): 1512 - 1518 .

[7] Seki Y, Kai H, Shibata R, *et al*. Role of the JAK/STAT pathway in rat carotid artery remodeling after vascular injury[J]. Circ Res, 2000, 87(1): 12 - 18.

[8] Garnovskaya M N, Mukhin Y V, Vlasova T M, *et al*. Hypertonicity activates Na^+/H^+ exchange through Janus kinase 2 and calmodulin[J]. J Biol Chem, 2003, 278(19): 16908 - 16915.

[9] Madamanchi N R, Li S, Patterson C, *et al*. Thrombin regulates vascular smooth muscle cell growth and heat shock proteins *via* the JAK-STAT pathway[J]. J Biol Chem, 2001, 276(22): 18915 - 18924.

[10] Marrero M B, Schieffer B, Li B, *et al*. Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase cascades in angiotensin ii- and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation[J]. J Biol Chem, 1997, 272(39): 24684 - 24690.

[11] 金惠铭. 细胞癌基因在非肿瘤性疾病中的作用[A]. 见：汤 健，周爱如 主编. 细胞分子病理生理学[M]. 第2版. 北京：北京医科大学中国协和医科大学出版社，1990. 189 - 199.

(编辑 陈聪连)

(上接 1092 页)

临床开展少。也有人利用 CT 诊断脐静脉开放，陈宇等[3]对 100 例肝硬化患者行 CT 检查，脐静脉开放阳性率为 14%。

门脉高压时脐静脉及副脐静脉开放的临床意义尚不清楚。本研究通过对 58 例克鲍综合征患者与对照组比较表明，脐静脉是否开放与谷丙转氨酶、谷草转氨酶、白蛋白以及胆红素水平无关。肝硬化并发食管静脉曲张破裂出血的发生率一般认为在 20% ~ 30% 左右。Caturelli 等认为肝硬化伴有脐静脉开放患者由于脐静脉开放可降低食管静脉曲张静脉破裂出血的发生率。本组 58 例中有 27 例曾行胃镜检查，其中 25 例存在不同程度的食道静脉曲张，食道静脉曲张率为 92.6%，并发出血 11 例，出血发生率为 19.0%；脐静脉未开放组 58 例中 38 例行胃镜检查，其中 33 例存在不同程度的食道静脉曲张，食道静脉曲张率为 86.8%，并发出血 13 例，出血发生率为 22.4%，二者比较并无显著差异，提示脐静脉开放并不能减少食道静脉曲张的发生率，也不能降低出血的发生率。亦有作者报道肝硬化患者合并脐静脉开放有助于腹水消退，本组 58 例均有腹水，提示脐静脉或副脐静脉开放与腹水形成可能无关。Gupta 等[6]报道脐静脉开放能增加肝性脑病发生的可能性，但本组病例肝性脑病发生率与对照组相比并无明显不同。有人认为脐静脉开放是肝硬化预后不良的标志，他们总结发现克鲍综合征患者平均寿限为 38.2 岁。但本组 58 例患者就诊时多在 40 岁以上，平均年龄为 45.7 岁，而 58 例对照组的平均年龄为 45.8 岁，并未发现脐静脉开放对肝硬化患者的预后有明确影响。

关键词：肝硬化；脐静脉

中图法分类号：R657.310.2 文献标识码：B

参考文献：

[1] Morin C, Lafortune M, Pomier G, *et al*. Patent paraumbilical vein: anatomic and hemodynamic variants and their clinical importance[J]. Radiology, 1992, 375: 253 - 256.

[2] 汤治民，高继康. 肝硬化失代偿期超声征象与评价[J]. 中国超声诊断，2004，5(4)：260 - 263.

[3] 陈 宇，石木兰，蒋力明. 肝硬化肝内门 - 体循环交通的 CT 表现[J]. 临床放射杂志，2001，20(7)：507 - 509.

[4] Yeh H C, Stancato-Pasik A, Ramos R, *et al*. Paraumbilical venous collateral circulations: color Doppler ultrasound features[J]. J Clin Ultrasound, 1996, 24(7): 359 - 366.

[5] Palazon J M, Minguez M. Images in hepatology. Cruveilhier-Baumgarten syndrome[J]. J Hepatol, 1997, 26(6): 1413.

[6] Gupta D, Chawla Y K, Dhiman R K, *et al*. Clinical significance of patent paraumbilical vein in patients with liver cirrhosis[J]. Dig Dis Sci, 2000, 45(9): 1861 - 1864.

(编辑 陈聪连)