文章编号:1000-5404(2008)19-1807-03

论著

STAT3对大鼠重症急性胰腺炎血清体外作用AT-Ⅱ SP-C的影响

钟敦璟[1],郭 红[1],郝 嘉[2],赵晓晏[1] (第三军医大学新桥医院:[1]消化内科,[2]全军心血管外科中心,重庆 400037)

摘 要:目的 探讨信号转导-转录活化因子3(Stat3)信号通路在大鼠重症急性胰腺炎血清体外作用于肺泡Ⅱ型上皮细胞(AT-Ⅱ)的影响。**方法** 原代培养肺泡Ⅱ型上皮细胞分成:①对照组:加入不含大鼠胰腺炎血清的DMEM培养液的正常AT-Ⅱ;②SAP组:加入含大鼠胰腺炎血清的DMEM培养液的正常AT-Ⅱ;③SAP+AG490组:用AG490预处理细胞,加入含大鼠胰腺炎血清的DMEM培养液的正常AT-Ⅱ。EMSA法测STAT3活化状态;RT-PCR检测mRNA水平;流式细胞技术检测AT-Ⅱ SP-C表达。**结果** 与对照组比,SAP组STAT3活性增强,STAT3 mRNA表达增强($P<0.05$),SP-C蛋白表达下降($P<0.01$);与SAP组比,SAP+AG490组STAT3活性减弱,STAT3mRNA表达减弱($P<0.01$),SP-C蛋白表达下降($P<0.01$)。**结论** JAK激酶/转录信号传导和激活因子3(Stat3)信号传导通路参与重症急性胰腺炎中AT-Ⅱ的损伤的病理生理过程。

关键词: STAT3;重症急性胰腺炎;AT-Ⅱ;SP-C
中图法分类号: R-332; R329.25; R576.02 **文献标识码:** A

STAT3 participates in the injury of alveolar type Ⅱ epithelial cells during severe acute pancreatitis: an *in vitro* study

ZHONG Dun-jing[1], GUO Hong[1], HAO Jia[2], ZHAO Xiao-yan[1] ([1]Department of Gastroenterology, [2]Cardiovascular Disease Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the role of signal transducer and activator of transcription3 (Stat3) in alveolar type Ⅱ epithelial cells (AT-Ⅱ) treated with the serum from rat model of severe acute pancreatitis. **Methods** AT-Ⅱ cells of primary culture were treated with serum from rat model of severe acute pancreatitis (SAP group), or SAP serum + AG490 (JAK inhibitor), while the normal cell control was set. AT-Ⅱ cells after treatment were collected to determine activation of Stat3 by EMSA, Stat3 mRNA expression by RT-PCR, and surfactant protein C (SP-C) level in AT-Ⅱ cells by flow cytometry. **Results** Stat3 protein and mRNA levels were enhanced in SAP group ($P<0.05$), whereas SP-C protein level declined ($P<0.01$), compared with control cells. Compared with SAP group, Stat3 protein and mRNA levels decreased and SP-C protein level declined after the cells were treated with SAP serum + AG490 ($P<0.01$). **Conclusion** JAK/STAT pathway is involved in the pathogenesis of AT-Ⅱ cell injury in severe acute pancreatitis.

Key words: STAT3; severe acute pancreatitis; alveolar type Ⅱ epithelial cells; surfactant protein C

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis,SAP)发病凶险,死亡率居高不下,超过50%,肺是最早被累及的器官,在发病1周内死亡者多由于急性胰腺炎相关肺损伤(acute pancreatitis associated lung injury,APALI)[1]。近年来,随着对不同刺激因素导致急性肺损伤的研究日益加深,发现JAK激酶/信号转导-转录活化因子(Janus kinase/signal transducers and activators of transcription,JAK/STAT3)通路在各种不同原因导致的急性肺损伤中扮演着重要的作用,其通过核内转录作用,以发挥多种生物学效应,进而影响一系列炎症性病理生理过程[2]。

肺泡Ⅱ型上皮细胞(alveolar type Ⅱ epithelial cells,AT-Ⅱ)是肺泡表面一类重要的细胞群体,其合成和分泌肺表面活性物质蛋白C(surfactant protein C,

基金项目:重庆市自然科学基金(2006BB5358)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2006BB5358)
作者简介:钟敦璟,男,海南省万宁市人,硕士研究生,主治医师,主要从事急性胰腺炎发病机制方面的研究。电话:(023)68754304, E-mail:jingdunzhong@163.com
通信作者:赵晓晏,电话:(023)68755604
郭 红,电话:(023)68774304, E-mail:haojia2004@yahoo.com.cn
收稿日期:2008-06-22;修回日期:2008-07-04

SP-C),SP- C 在基因和蛋白质水平表达异常可以引起肺脏功能异常,引发相关疾病[3,4]。研究显示 STAT3 能促进肺表面活性物质蛋白的分泌,从而维持肺泡的稳定性[5]。但在重症急性胰腺炎导致的肺损伤时该通路的变化及其与 AT-Ⅱ损伤的发生、发展的仍然不清楚。本实验中采用0.5%牛磺胆酸钠液建立大鼠重症急性胰腺炎模型,用其血清作用 AT-Ⅱ,对此进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

胰蛋白酶购自 Genview 公司;Dnase 1 购自北京鼎国生物技术有限责任公司。胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;DMEM 、D-Hanks 由第三军医大学试剂中心提供;生物素标记探针、PCR 引物均由北京奥科公司合成;琼脂糖购自 Sigma 公司;JAK 激酶抑制剂 AG490 购自 Calbiochem 公司;细胞蛋白抽提试剂盒、BCA 蛋白浓度检测试剂盒和 EMSA 试剂盒均购自 Pierce 公司;总 RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒、DNA Marker 均购自北京天根公司;SP-C 单克隆抗体、羊抗鼠荧光标记 IgG 购自 Santa Cruz。

1.2 动物模型

健康成年 SD 大鼠,体质量 200 ~ 300 g,雌雄不限(第三军医大学实验动物中心提供),模型制备方法见文献[6]。2 h 后抽取静脉血备用,以大鼠腹腔及胸腔出现血性积液为标准评价为重症急性胰腺炎,并取胰腺组织 HE 染色镜下观察证实。选大鼠重症胰腺炎血清为实验用。

1.3 原代培养正常大鼠的 AT-Ⅱ及实验分组

原代培养 SD 大鼠 AT-Ⅱ,具体培养方法见文献[7]。按以下分组:①对照组:加入不含大鼠胰腺炎血清的 DMEM 培养液的正常 AT-Ⅱ;②SAP 组:加入终浓度为 10% 大鼠胰腺炎血清的 DMEM 培养液的正常 AT-Ⅱ;③SAP + AG490 组:用 AG490(JAK 激酶抑制剂)预处理 DMEM 培养液的正常 AT-Ⅱ细胞(终浓度为 30 mg/L)6 h 后,再加入终浓度为 10% 大鼠重症胰腺炎血清。

1.4 EMSA 法检测 STAT3 的活性水平

采用生物素 3′末端标记法将选取核苷酸序列为 5′-GATC-CTTCTGGGAATTCCTAGATC-3′, 3′-CTAGATCCTTAAGGGTCT-TCCTAG-5′(北京奥科公司合成)的 STAT3 探针进行标记。将细胞核提取物 10 μg 与生物素标记的探针在 20 μl 的缓冲液中充分结合,行 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后,采用电转移法转移至带正电荷的尼龙膜上,紫外线交联 15 min,增强与膜的结合。生物素标记的探针与 HRP 标记的亲和素之间相结合,通过化学发光记录结果,结果扫描存盘,AlPha Imager2200 图像分析系统测定杂交带的吸光度值。实验重复 3 次。

1.5 RT-PCR 法检测 STAT3 mRNA 水平

收获的细胞按完成总 RNA 的提取(按说明书),紫外分光光度计法定量后取总 RNA 10 μg 逆转录为 cDNA,引物序列:STAT3:上游引物:5′-TTGCCAGTTGTGGTGATC-3′,下游引物 5′-AGACCCAGAAGGAGCCGC-3′;β-actin:上游引物 5′-AAG-TACTCCGTGTGGATCGG-3′;下游引物 5′-ATGCTATCACCTC-CCCTGTG-3′(北京奥科公司合成)。PCR 条件:94℃,3 min;94℃,30 s;56℃,30 s;72℃,40 s;72℃,5 min,30 个循环,25 μl 体系,以 β-actin 为内参,PCR 产物为 125 bp,凝胶电泳,EB 染色,应用天能 Gis 凝胶成像系统分析,PCR 产物量以 STAT3 产物量/β-actin 产物量的比值为最终结果。实验共重复 3 次。

1.6 流式细胞技术检测 AT-Ⅱ细胞 SP-C 表达

取 40 μl 细胞悬液加入预先有 SP-C 单克隆抗体(10 μl)离心管,再加 50 μl 1∶20(用 PBS 稀释)灭活正常兔血清 4℃孵育 30 min,用洗涤液洗涤 2 次,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 50 μl 工作浓度的羊抗鼠荧光标记 IgG,充分振摇 4℃孵育 30 min,用洗涤液洗涤 2 次,1 000 r/min 离心 5 min,加入 1 ml 固定液,流式细胞仪(EPics- XL 型,美国 Beckman Coulter 公司)检测 SP- C 蛋白质表达;应用 MuticycleAV 软件进行数据分析,以蛋白质荧光指数(FI)表示 SP-C 蛋白质表达量。

1.7 结果分析和统计学处理

用 SPSS 13.0 统计软件处理分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和 LSD 检验进行组间差别统计学处理。

2 结果

2.1 大鼠重症急性胰腺炎模型

大鼠重症急性胰腺炎胰腺组织 HE 染色 400 倍镜下观察示,见胰泡细胞水肿、局灶性坏死(图 1);大鼠重症急性胰腺炎血清淀粉酶水平(2 978.64 ± 75.53)μl/L 均高于正常组(826.25 ± 52.41)μl/L 3 倍以上。

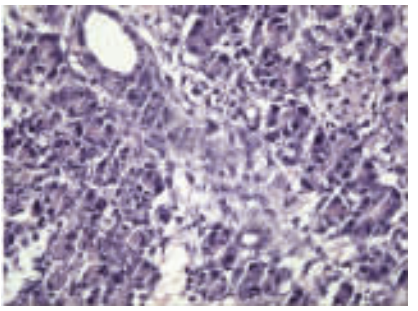
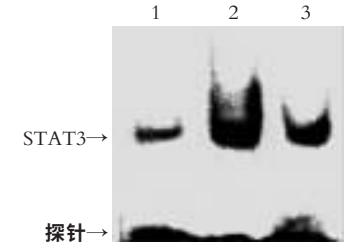


图 1 大鼠重症急性胰腺炎胰腺光镜观察 (HE ×400)

2.2 各组的 STAT3 结合 DNA 活性水平

对照组比,SAP 组 STAT3 活性增强;与 SAP 组比,SAP + AG490 组 STAT3 活性减弱(图 2)。

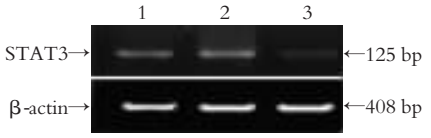


1:对照组;2:SAP 组;3:SAP + AG490 组

图 2 EMSA 法检测各组 STAT3 蛋白 DNA 结合活性

2.3　各组 STAT3 mRNA 的表达

与对照组(36.532)比,SAP 组(46.824)STAT3 mRNA 表达增强($P<0.05$);与 SAP 组比,SAP + AG490 组(21.116)STAT3 mRNA 表达减弱($P<0.01$)(图 3)。



1: 对照组;2: SAP 组;3: SAP + AG490 组

图 3　各组 STAT3 mRNA 的表达

2.4　各组 SP-C 蛋白表达

与对照组比,SAP 组 SP-C 蛋白表达下降($P<0.01$);与 SAP 组比,SP-C 蛋白表达下降($P<0.01$)(表 1)。

表 1　各组 AT-Ⅱ不同时段 SP-C 蛋白水平($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	SP-C 荧光指数		
	0.5 h	1 h	2 h
对照组	1.01 ±0.06	0.98 ±0.14	1.02 ±0.03
SAP 组	0.99 ±0.08	0.92 ±0.16	0.69 ±0.02[a]
SAP + AG490 组	0.87 ±0.12	0.83 ±0.08	0.48 ±0.01[b]

a: 与对照组比 $P<0.01$; b:与 SAP 组比 $P<0.01$

3　讨论

STAT3 是 STAT 家族的重要成员,广泛表达于多种类型的细胞和组织中,可被 JAKs 激酶通过酪氨酸磷酸化激活。白介素-6(IL-6)、肝细胞生长因子、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)等细胞因子通过活化 STAT3 通路调控着细胞的增生、凋亡、炎症等重要的生理功能和病理过程[8]。Gao 等[9]在建立的 IgG 免疫复合物诱导的肺损伤中发现,STAT3 在肺泡巨噬细胞和肺里 IgG 免疫复合物沉积的组织中均有激活,但是有不同的时间框;并且在肺部炎症反应过程中,活化的巨噬细胞和中性粒细胞释放 IL-6、IL-10 和 C5a 等炎症介质来实现 STAT3 的激活。Horvath 等[10]在急性胰腺炎模型所致肺损伤的初步研究中也发现,STAT3 在蛙皮素作用后 6 h 即被激活,并继而出现肺损伤表现。但是其活化后如何影响急性肺损伤的炎症过程,均未能得到阐明。我们在实验中用重症急性胰腺炎血清作用于 AT-Ⅱ,也发现 STAT3 在该细胞中能被激活,而且还表现较强的与 DAN 结合活性,其 mRNA 的表达均明显升高,而且在用 AG490 预处理细胞加入含大鼠胰腺炎血清的正常 AT-Ⅱ的 STAT3 的蛋白活性及 mRAN 表达均被明显的抑制。这说明了 JAK/STAT3 通路参与了重症急性胰腺炎肺损伤中的 AT-Ⅱ损伤过程。

肺表面活性物质主要由脂质和蛋白质组成,具有降低肺泡气液界面表面张力,调节气道内液体平衡等功能。其中肺表面活性物质蛋白发挥着重要的作用。SP 主要分为 A、B、C 和 D 4 种。SP-C 是由 AT-Ⅱ分泌的重要的表面活性蛋白质,在肺组织中只由 AT-Ⅱ合成和分泌。SP-C 的主要功能是与磷脂构成肺表面活性物质黏附于肺泡腔表面,形成气- 液交换界面,在呼吸时减少肺表面张力。研究表明 SP-C 只存在于 AT-Ⅱ,是 AT-Ⅱ特异的分化标志物,其表达水平能较好的反应 AT-Ⅱ的功能[11,12]。本研究表明,在重症胰腺炎血清作用于 AT-Ⅱ 2 h 后,SP-C 水平下降明显,提示在 SAP 时炎症反应导致 AT-Ⅱ的功能受损,而且在用 AG490 预处理细胞,加入含大鼠胰腺炎血清的正常 AT-Ⅱ中,SP-C 水平更是显著下降。这表明在重症急性胰腺炎肺损伤时,损伤的 AT-Ⅱ导致 SP-C 表达下降, JAK/STAT3 通路可能有通过维持 AT-Ⅱ合成和分泌 SP-C 来实现维护肺泡稳定性的作用。但具体的作用和机制还尚未清楚,需要更多的研究来明确和证实。

参考文献:

[1] 胡文伟,刘庆森. 重症急性胰腺炎并发急性性肺损伤临床研究[J]. 中国误诊学杂志, 2008, 8(2):253 - 254.

[2] Severgnini M, Takahashi S, Rozo L M, *et al*. Activation of the STAT pathway in acute lung injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 286(6): L1282 - L1292.

[3] Erpenbeck V J, Schmidt R, Gunther A, *et al*. Surfactant protein levels in bronchoalveolar lavage after segmental allergen challenge in patients with asthma[J]. Allergy, 2006, 61(5): 598 - 604.

[4] Alzina-de-Aguilar V, Gaboli M, Bastero-Minon P, *et al*. Neonatal respiratory failure associated with mutation in the surfactant protein C gene[J]. An Pediatr (Barc), 2005, 62(3): 210 - 214.

[5] Yang L, Lian X, Cowen A, *et al*. Synergy between signal transducer and activator of transcription 3 and retinoic acid receptor-alpha in regulation of the surfactant Protein B gene in the lung[J]. Mol Endocrinol, 2004, 18(6): 1520 - 1532.

[6] 柏健鹰,郭　红,赵晓晏. 大鼠重症急性胰腺炎过程中 UTI 抑制 IL-6 表达的研究[J]. 第三军医大学学报,2003,25(12):1076 - 1078.

[7] 郝　嘉,李永旺,肖颖彬. 大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞体外培养和鉴定[J]. 第三军医大学学报,2000,22(5):500 - 501.

[8] 张　伟,吴　强,谭德明. STAT3 小干扰 RNA 的构建及其对胃癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(7): 603 - 605.

[9] Gao H, Guo R F, Speyer C L, *et al*. STAT3 activation in acute lung injury[J]. J Immunol, 2004, 172(12): 7703 - 7712.

[10] Horvath C M. The Jak-STAT pathway stimulated by interleukin 6[J]. Sci STKE, 2004, 2004(260): tr9.

[11] Mason R J, Kalina M, Nielsen L D, *et al*. Surfactant protein C expression in urethane-induced murine pulmonary tumors[J]. Am J Pathol, 2000, 156(1): 175 - 182.

[12] Seifart C, Clostermann U, Seifart U, *et al*. Cell-specific modulation of surfactant proteins by ambroxol treatment[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 203(1): 27 - 35.

(编辑　王　红)