文章编号:1000-5404(2009)05-0391-03

论著

缺氧PC12细胞中JAK1/STAT1、STAT3介导的信号通路变化

赵吉清,林 海,吴 强,李云鹏,董兆君 (第三军医大学军事预防医学院防化医学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 研究缺氧后PC12细胞蛋白酪氨酸激酶1/信号转导子与转录激活子1(janus kinase 1/signal transducer and activator of transcription 1, JAK1/STAT1)、STAT3 mRNA和蛋白表达变化。**方法** 制备缺氧细胞模型。采用半定量RT-PCR技术和Western blot法检测缺氧PC12细胞的JAK1/STAT1、STAT3 mRNA和蛋白的表达水平,并对PCR产物进行测序。**结果** 与对照组比较,缺氧2 h PC12细胞JAK1/STAT1、STAT3 mRNA和蛋白表达水平显著升高($P<0.05$),在缺氧6 h达最高($P<0.01$),缺氧12 h的表达量降低($P<0.05$)。RT-PCR产物直接测序证实扩增产物片段与GenBank中相应序列相同。**结论** 缺氧能增强PC12细胞中JAK1/STAT1、STAT3基因的表达,在缺氧所致脑损伤中可能发挥重要作用。

关键词:缺氧;PC12细胞;Janus激酶1;信号的转录因子和活化子1、3
中图法分类号:R329.25;R394.2;R743.302 **文献标识码**:A

Hypoxia-induced changes of JAK1/STAT1, 3 signal transduction pathway in PC12 cells

ZHAO Ji-qing, LIN Hai, WU Qiang, LI Yun-peng, DONG Zhao-jun (Department of Chemical Defence, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of hypoxia on the expression of JAK1 and STAT1,3 in PC12 cell line. **Methods** PC12 cells were exposed to hypoxia and their mRNA and protein expression levels of JAK1 and STAT1,3 were detected by RT-PCR and Western blotting. The RT-PCR products were sequenced by Sanger's double strand DNA sequence determination. **Results** The mRNA and protein expression levels of JAK1, STAT1,3 were increased in PC12 cells, reached the highest level at 6 h and decreased at 12 h, but always higher than that of control group. The sequences of amplification products by RT-PCR were the same as that in GenBank by sequencing. **Conclusion** Hypoxia reinforces the expressions of JAK1 and STAT1,3 in PC12 cells. JAK1/STAT1,3 possibly plays an important action in brain injury.

Key words: hypoxia; PC12 cells; janus kinase/signal transducer and activator of transcription 1, 3

蛋白酪氨酸激酶/信号转导子与转录激活子(janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)信号通路,广泛参与细胞增殖、分化成熟、凋亡以及免疫调节等过程,是众多细胞因子信号转导的重要途径之一。关于JAK/STAT的研究目前大多集中在造血系统、淋巴系统、肿瘤、肝脏疾病和心脏疾病,对其在神经系统的研究报道较少。最新的研究表明,细胞因子及JAK/STAT途径不仅可能参与了脑的发育过程,而且参与了某些中枢神经系统疾病的病理过程,其中JAK1/STAT1、STAT3可能参与了脑缺血的病理过程[1-4]。本研究观察缺氧后PC12细胞中JAK1/STAT1、STAT3表达状况,以探讨JAK1/STAT1、STAT3基因在缺氧致脑损伤中的作用。

基金项目:国家自然科学基金(30671779)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30671779)
作者简介:赵吉清,男,山东省牟平县人,博士,副教授,主要从事神经毒理方面的研究,发表论文15篇。电话:(023)68752284
通信作者:董兆君,电话:(023)68752285
收稿日期:2008-06-25;**修回日期**:2008-07-28

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

RPMI1640培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、HBSS(HyClone公司),Tripure分离试剂、PCR产物纯化试剂盒(Roche公司),MMLV逆转录酶、Oligo(dT)$_{15}$、RNA酶抑制剂(Promega公司),*Taq* DNA酶、dNTP$_X$(上海博亚公司),p-JAK1、p-STAT3 Antibody(SANTA,USA),其他p-STAT1试剂均为国产分析纯。PTC-200 DNA扩增仪(MT Research公司,USA),SX-100凝胶成像分析系统(上海四星公司)。

1.2 细胞致伤模型的建立

PC12细胞悬浮于含10%马血清、5%胎牛血清及50 U/ml链霉素的RPMI1640培养液,在37 ℃、5% CO_2、95%空气的培养箱中培育。将PC12细胞悬液暴露于95% N_2、5% CO_2的混合气体中培养不同时间而造成缺氧。

1.3 实验分组

当2种细胞传至5~8代时,用0.25%胰蛋白酶(含0.02% EDTA)将满瓶的细胞消化传代,分设正常对照组和缺氧组。缺氧组分别在致伤后2、6、12、24 h不同时相点取材。

1.4 RT-PCR

根据 GenBank 提供的 mRNA 序列,应用引物设计软件自行设计 JAK1、STAT1、STAT3 和阳性对照 HPRT 引物(表 1)。先将 RNA 逆转录为 cDNA,再进行 PCR 扩增。JAK1/STAT1、STAT3 扩增条件为 94 ℃ 1 min,55 ℃、66 ℃ 1 min,72 ℃ 1.5 min,进行 35 次循环;72 ℃再延伸 10 min。最后取 6 μl 产物电泳后,保存在计算机里,进行图像分析,与阳性对照 HPRT 比较,进行半定量分析。以目的片段与 HPRT 的光密度比值作为目的片段 mRNA 的相对含量。

表 1 PCR 引物序列

引物	上游序列	下游序列
JAK1	5′-CTGGTAGATGGCTACTTC-3′	5′-GGCTCATAGAGTAGACAG-3′
STAT1	5′-TTCTGGCCTTGGATTGAC-3′	5′-TCTCAGCAGCCATGACTT-3′
STAT3	5′-TGGGTCTGGCTAGACAAT-3′	5′-CGTTGGTGTCACACAGAT-3′
HPRT	5′-GCTGGTGAAAAGGACCTCTCG-3′	5′-GCAGATGGCCACAGGACTAGA-3′

1.5 测序

采用 PCR 产物纯化试剂盒纯化 PCR 产物,而后用四色荧光法直接测序,由上海博亚生物技术公司协助完成。

1.6 Western blot 蛋白印迹检测

将收集的细胞加裂解缓冲液和 2 × SDS 凝胶加样缓冲液,100 ℃加热 10 min,依次上样,加入不连续垂直 SDS 聚丙烯酰胺凝胶中,在 180 V 电压下电泳。电泳结束后,取下凝胶,在转移缓冲液平衡 30 min。用水平半干式电泳印迹仪以 15 V 电压进行蛋白转移 25 min。转移结束后,取出硝酸纤维素膜,依次置于 PBS、兔抗 JAK1、STAT1 磷酸化抗体(2 μg/ml)、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体和 DAB 显色液中孵育,并用计算机生物图像分析系统对干燥后的 NC 膜进行分析,对各个条带的灰度值进行测定比较。

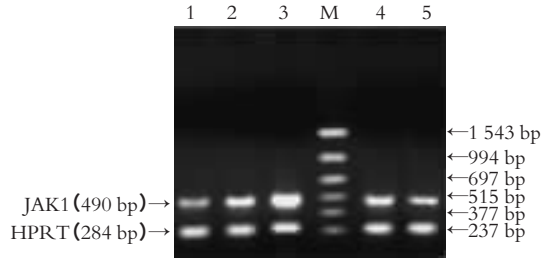
1.7 统计学分析

所有结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件对缺氧后各时相组间均数比较进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 缺氧对 PC12 细胞 JAK1 mRNA 表达的影响

RT-PCR 显示,低氧刺激 PC12 细胞表达 JAK1 mRNA;与对照组比较,低氧 2 h JAK1 mRNA 表达水平升高($P<0.01$),低氧 6 h 水平最高($P<0.01$),低氧 12 h 水平降低($P<0.01$),仍明显高于对应的对照组($P<0.01$);低氧其他组均低于低氧 6 h 组($P<0.01$),见图 1。

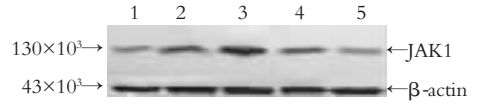


1:对照组;2: 缺氧 2 h 组;3:缺氧 6 h 组;M:DNA 标准;4:缺氧 12 h 组;5:缺氧 24 h 组

图 1 RT-PCR 检测 JAK1 mRNA 的表达

2.2 缺氧对 PC12 细胞 p-JAK1 蛋白表达的作用

Western blot 显示,缺氧刺激 PC12 细胞表达 p-JAK1(Tyr1022/1023)蛋白。与对照组比较,缺氧 2 h 蛋白含量开始升高($P<0.01$),缺氧 6 h 水平最高($P<0.01$),缺氧 12 h 水平降低($P<0.01$),缺氧 24 h 仍高于对照组($P<0.05$);低氧其他组均低于低氧 6 h 组($P<0.05$),见图 2。

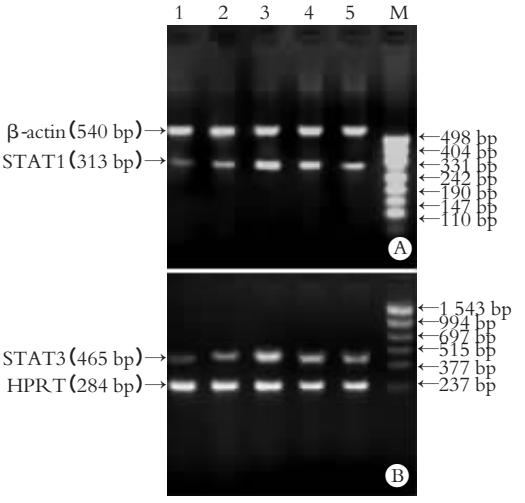


1:对照组;2: 缺氧 2 h 组;3:缺氧 6 h 组;4:缺氧 12 h 组;5:缺氧 24 h组

图 2 Western blot 检测 p-JAK1 蛋白的表达

2.3 缺氧对 STAT1、3 mRNA 表达的影响

RT-PCR 显示,缺氧刺激 PC12 细胞表达 STAT1、3 mRNA;与对照组比较,缺氧 2 h STAT1、3 mRNA 水平升高($P<0.05$),缺氧 6 h 水平最高($P<0.01$),缺氧 12 h 水平降低,仍明显高于对照组($P<0.01$);缺氧其他组均低于低氧 6 h 组($P<0.01$),见图 3。

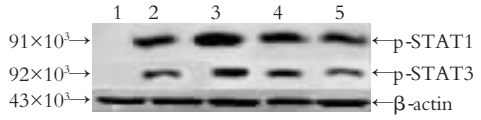


A:STAT1 mRNA;B:STAT3 mRNA 1:对照组; 2:缺氧 2 h 组; 3:缺氧 6 h 组; 4:缺氧 12 h 组; 5:缺氧 24 h; M:DNA 标准

图 3 RT-PCR 检测 STAT1、3 mRNA 的表达

2.4 缺氧对 p-STAT1、3 蛋白表达的影响

Western blot 显示,对照组不表达磷酸化的 STATs 蛋白,缺氧刺激 PC12 细胞表达 p-STAT1(Tyr701)、p-STAT3(Tyr705)蛋白;缺氧 6 h 表达水平明显高于缺氧 2、12、24 h($P<0.01$),见图 4。



1:对照组;2: 缺氧 2 h 组;3:缺氧 6 h 组;4:缺氧 12 h 组;5:缺氧 24 h 组

图 4 Western blot 检测 p-STAT1、p-STAT3 的蛋白表达

2.5 测序结果

PCR 扩增的产物 JAK1、STAT1、STAT 3 与大鼠 GenBank 中序列完全一致。表明 RT-PCR 扩增的确为相应产物。

3　讨论

Justicia[5]报道,大脑皮质缺血后,星形胶质细胞内的 JAK1 活化,并可诱导 STAT3 核转位,从而诱发了胶质细胞在缺血后的各种反应性变化。谢惠芳等[6]发现 JAK1 在脑缺血后栓塞侧梗死区神经元表达增加,说明 JAK1 可能参与了脑缺血神经细胞损伤与修复的病理过程。本实验结果显示缺氧作用 2 h 后 JAK1 mRNA 在 PC12 细胞的表达就有明显升高,6 h 达高峰,12 h 有所降低,但仍明显高于正常水平。缺氧刺激 PC12 细胞表达 p-JAK1(Tyr1022/1023),缺氧 2 h 蛋白表达开始升高,缺氧 6 h 水平最高,缺氧 12 h 水平降低,表明缺氧可以促进 JAK1 mRNA 在 PC12 细胞的表达,引起 p-JAK1(Tyr1022/1023)的磷酸化,从而激活下游分子,影响基因转录。提示缺氧引起 JAK1 的活化起着联系受体与胞内基因转录的纽带作用。

STAT1 在脑组织中广泛分布,在脑缺血过程中细胞凋亡是重要的细胞死亡机制,缺血性脑损伤引起大量细胞因子及生长因子的释放,如 IL-6、TNF-α 等。West 等[7]研究发现局灶性脑缺血能诱导 STAT1 的激活,活化的 STAT1 在脑缺血再灌注损伤神经细胞的死亡中起着重要的作用。Takagi 等[8]在研究脑缺血能诱导磷酸化 STAT1 蛋白活化及核转位,它们通过调节与凋亡和细胞死亡相关蛋白 Caspase-3 的转录与磷酸化参与了缺血性脑损伤的过程。谢惠芳等[9]报道,缺血和再灌注可诱发 STAT1 基因在受损神经元中超量表达。李洪春等[10]研究表明缺血性脑损伤诱导 STAT1 的激活可能参与缺血同侧皮层及纹状体神经元细胞的病理生理过程。近年来研究表明 STAT3 与应激反应密切相关,参与了心肌缺血、脑损害、炎性反应及肿瘤分化等病理过程。魏继鹏等[11]研究表明 AG490 可以下调 p-STAT3 的表达,抑制了谷氨酸诱导的 PC12 细胞凋亡,起神经保护作用。

本研究结果显示缺氧 2 h 后 PC12 细胞中的 STAT1、3 基因的 mRNA 表达开始升高,6 h 达高峰,12 h 有所降低,但仍明显高于正常水平。表明缺氧可以促进 STATs 基因 mRNA 在 PC12 细胞的表达。我们用 Western blot 观察到,正常 PC12 细胞中未见 p-STAT1、3 蛋白的阳性表达,可能与 STAT 蛋白在正常已发育成熟神经细胞中表达水平较低有关。本研究表明缺氧刺激 PC12 细胞表达 p-STAT1(Tyr701)、p-STAT3(Tyr705)蛋白,缺氧 6 h 表达水平最高,缺氧其他组含量均低于低氧 6 h 组。STAT1、3 在受损 PC12 细胞中的超量表达,提示缺氧可诱发 STAT1、3 的表达,至于缺氧后 STAT1、3 的活化及高表达的原因目前尚不太清楚,我们认为可能与缺氧时 PC12 细胞快速合成并诱导 IL-6 及 IL-6R 的表达,IL-6 与 PC12 细胞细胞表面的 IL-6R 结合后,激活 JAK/STAT 信号转导系统,从而导致 STAT1、3 的活化及高表达。STAT1、3 基因的激活及超量表达可能参与了 PC12 细胞生存和凋亡的信号转导与基因调控过程。揭示缺氧致脑神经元细胞损伤的信号传导途径,对于在分子与基因转录水平阐明缺氧致脑损伤机制,探讨防治途径,有极其重要的意义。

参考文献:

[1] 翟秀珍, 邹玉安. JAK/STAT 信号通路与脑损伤[J]. 河北医科大学学报, 2006, 27(5):458 – 460.

[2] Satriotomo I, Bowen K K, Vemuganti R. JAK2 and STAT3 activation contributes to neuronal damage following transient focal cerebral ischemia[J]. J Neurochem, 2006, 98(5): 1353 – 1368.

[3] 曹贵方, 杨期东. JAK-STAT 信号转导途径与脑缺血[J]. 国外医学:神经病学神经外科学分册, 2004,31(4):340 – 343.

[4] 杨　静, 黄　帆. 细胞因子信号转导抑制因子-3 在缺血性脑血管病中的研究进展[J]. 国际内科学杂志, 2007, 34 (10) :614 – 617.

[5] Justicia C, Gabriel C, Planas A M. Activation of the JAK/STAT pathway following transient focal cerebral ischemia: signaling through Jak1 and Stat3 in astrocytes[J]. Glia, 2000,30(3): 253 – 270.

[6] 谢惠芳, 刘振华, 田时雨. 大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后 Jak1 的表达[J]. 第一军医大学学报,1999,19(6): 537 – 539.

[7] West D A, Valentim L M, Lythgoe M F, *et al*. MR image-guided investigation of regional signal transducers and activators of transcription-1 activation in a rat model of focal cerebral ischemia[J]. Neuroscience, 2004,127(2):333 – 339.

[8] Takagi Y, Harada J, Chiarugi A, *et al*. STAT1 is activated in neurons after ischemia and contributes to ischemic brain injury[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22(11):1311 – 1318.

[9] 谢惠芳, 刘振华, 朱利元, 等. 大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后 $STAT_1$ 蛋白表达的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 1998,15(5): 265 – 267.

[10] 李洪春, 马　萍, 徐　凯, 等. 脑缺血/再灌注诱导大鼠信号转导与转录激活子-1 的变化[J]. 中华医学研究杂志, 2006, 6(5): 484 – 486.

[11] 魏继鹏, 刘振华, 谢惠芳, 等. AG490 对谷氨酸诱导 PC12 细胞磷酸化 STAT3 活性上调的抑制作用实用[J]. 实用预防医学, 2007, 14(3): 678 – 682.

(编辑　张　维)