DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.14.002
第25卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 14
1220 2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)14-1220-03

梭曼中毒诱导 PC_{12} 细胞 STATs 表达

赵吉清[1],董兆君[1],恽榴红[2],阮金秀[2] ([1]第三军医大学预防医学系军事毒理学教研室,重庆 400038;[2]军事医学科学院,北京 100850)

提 要:目的 研究梭曼中毒 PC_{12} 细胞中 STATs 基因 mRNA 和蛋白表达的变化。方法 采用半定量 RT-PCR 技术和 Western blot 法检测梭曼中毒 2、6、12 及 24 h 的 PC_{12} 细胞的 STAT1、3、5 基因 mRNA 和蛋白质的表达水平,并对 PCR 产物进行测序。结果 梭曼中毒后 2 h 组 PC_{12} 细胞中 STAT1、3、5 mRNA 和蛋白质表达水平升高,在中毒后 12 h 组达最高,中毒后 24 h 组的表达量低于 12 h 组,与对照组比较均有明显差别。RT-PCR 产物直接测序证实扩增产物片断与 GenBank 中相应序列相同。结论 梭曼中毒增强 PC_{12} 细胞中 STATs 基因的表达,在梭曼中毒所致的脑损伤中可能发挥重要作用。

关键词:梭曼;PC_{12} 细胞;信号转导和转录激活因子
中图法分类号:R322.81;R394.2;R996 文献标识码:A

Soman-induced STATs expressions in cell line PC_{12}

ZHAO Ji-qing, DONG Zhao-jun, YUN Liu-hong, RUAN Jin-xiu (Department of Military Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To illustrate the features of soman-induced signal transducers and activators of transcription (STATs) gene and protein expressions in cell line PC_{12}. Methods The expression levels of STAT1, 3 and 5 mRNAs and protein in PC_{12} cells were detected by semi-quantitative RT-PCR and Western blotting. PC_{12} cells at 5~8 passages were randomly divided into 5 groups: control, intoxication groups for 2, 6, 12 and 24 h respectively. The products were sequenced by Sanger's double strand DNA sequence determination. Results The expression levels of STAT1, 3 and 5 mRNAs and proteins increased in PC_{12} cell at 2 h and reached the highest at 12 h, then decreased at 24 h, but they were still higher than those of the control. The sequences of amplification products by RT-PCR were the same to those in GenBank. Conclusion Soman intoxication can enhance the expression of STATs in PC_{12} cells. STAT genes may possibly play an important role in brain injury.

Key words: soman; PC_{12} cell; signal transducers and activators of transcription

一些细胞因子和生长因子与它们相应的细胞膜配体结合后能激活信号转导与转录激活因子(Signal transducers and activators of transcription, STAT),活性 STAT 形成同源或异源二聚体转移至核内,或直接与相应的靶基因结合,或间接地与其他 DNA 结合因子通过蛋白质与蛋白质之间的相互作用,调节靶基因的转录活性[1]。既往研究表明,STAT 可参与调节多种信号转导途径,与多种疾病的病理机制相关,很可能参与了脑的发育过程及其某些病理过程,但其中的具体机制尚未完全搞清[2]。本研究观察在梭曼中毒状况下一种从嗜铬细胞瘤分离的克隆细胞 PC_{12} 细胞中 STAT1、3、5 基因表达状况,以探讨 STAT 基因在低氧性脑损伤中的作用。

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),STAT3 抗体(SANTA, USA),其它试剂为国产分析纯。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)。PC_{12} 细胞由上海细胞所提供。

1.2 细胞致伤模型的建立

PC_{12} 细胞悬浮于含 10%马血清、5%胎牛血清及 50 U/ml 链

基金项目:全军"九五"重点课题(96L015)
作者简介:赵吉清(1970-),男,山东省牟平县人,硕士,讲师,主要从事缺氧生物学方面的研究。电话:(023)68752285
通信作者:董兆君,电话:(023)68752285
收稿日期:2003-03-12;修回日期:2003-05-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

霉素的 RPMI1640 培养液, 在 37 ℃、通以 5%CO_2、95%空气的培养箱中培育。通过加入培养液中 20 μmol/L 梭曼浓度引起中毒。

1.3　实验分组

当正常和中毒 PC_{12} 细胞传代至 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。随机分成以下组: 对照组、梭曼中毒 2、6、12 及 24 h 组。

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 STAT1、3、5 和阳性对照 HPRT 引物参见文献[3], 序列见表 1。先将 RNA 逆转录为 cDNA, 再进行 PCR 扩增。STATs 扩增条件为 94 ℃ 1 min, 55～65 ℃ 1 min, 72 ℃ 1.5 min, 进行 35 循环。再 72 ℃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

Tab 1　PCR primer sequences

Primer	Upper sequence	Lower sequence
STAT 1	5′-TTC TGG CCT TGG ATT GAC -3′	5′-TCT CAG CAG CCA TGA CTT-3′
STAT 3	5′- TGG GTC TGG CAT GAC AAT-3′	5′-CGT TGG TGT CAC ACA GAT -3′
STAT 5	5′-CAA CAG CAT GTC CGT GTC -3′	5′- CGT TGG TGT CAV ACA GAT-3′
HPRT	5′-GCT CGT GAA AAG GAC CTC TCG-3′	5′-GCA GAT GGC CAC AGG ACT AGA-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 blotting 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 STAT1、3、5 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。

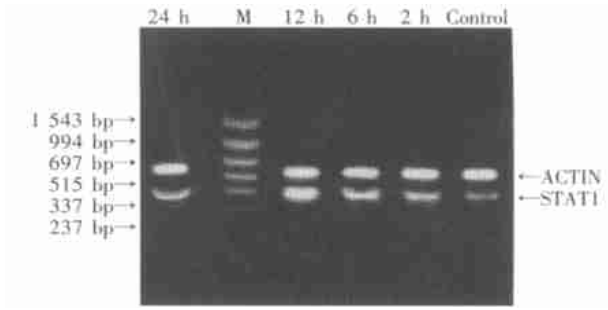
1.7　统计学分析

采用 Microsoft Excel 程序进行 t 检验。

2　结果

2.1　梭曼中毒时 PC_{12} 细胞 STATs 基因 mRNA 的表达

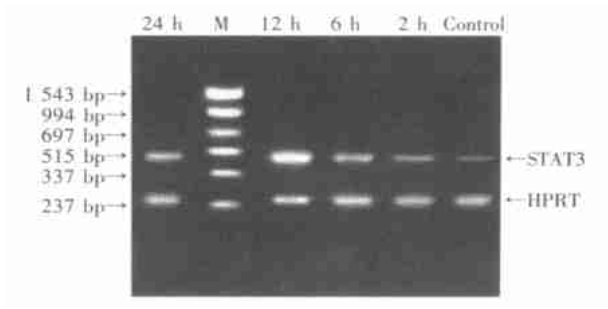
梭曼中毒 2 h 时 STAT1、3、5 基因 mRNA 在 PC_{12} 细胞表达开始升高, 中毒 12 h 时表达显著, 至高峰, 24 h 虽有降低, 仍明显高于对照组的表达水平($P<0.05$), 见图 1～3。



M: Marker

图 1　梭曼中毒对 PC_{12} 细胞表达 STAT1 mRNA 的影响

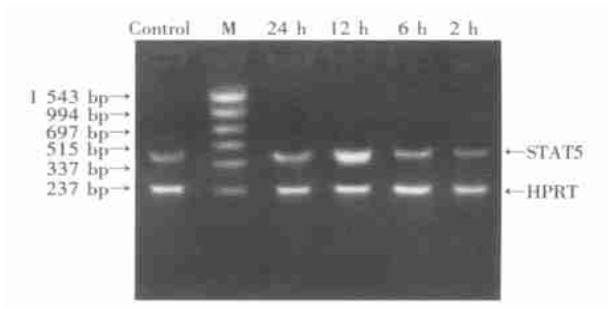
Fig 1　Effect of soman intoxication on STAT1 mRNA expression



M: Marker

图 2　梭曼中毒对 PC_{12} 细胞表达 STAT3 mRNA 的影响

Fig 2　Effect of soman intoxication on STAT3 mRNA expression



M: Marker

图 3　梭曼中毒对 PC_{12} 细胞表达 STAT5 mRNA 的影响

Fig 3　Effect of soman intoxication on STAT5 mRNA expression

2.2　梭曼中毒时 PC_{12} 细胞磷酸化 STATs 蛋白的表达

正常组未检测到磷酸化 STAT3 蛋白, 梭曼中毒 2 h 时磷酸化 STAT3 蛋白在 PC_{12} 细胞表达明显升高, 中毒 12 h 时表达显著, 至高峰, 24 h 虽有降低, 但仍高于对照组($P<0.05$), 见图 4～6。

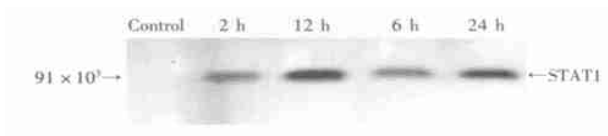


图 4　梭曼中毒对 PC_{12} 细胞表达 STAT1 蛋白表达的影响

Fig 4　Effect of soman intoxication on STAT1 protein expression

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

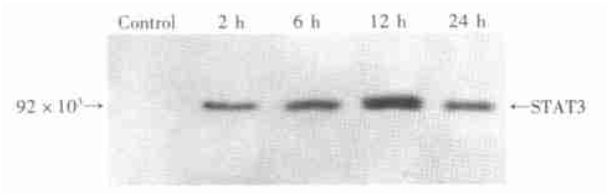


图5 梭曼中毒对 PC_{12}细胞表达 **STAT3** 蛋白表达的影响

Fig 5 Effect of soman intoxication on STAT3 protein expression



图6 梭曼中毒对 PC_{12}细胞表达 **STAT5** 蛋白表达的影响

Fig 6 Effect of soman intoxication on STAT5 protein expression

2.3 测序结果

测序显示,PCR 扩增的产物 STAT1、3、5 与大鼠 GenBank 中的序列完全一致。说明,RT-PCR 扩增的确为相应产物。

3 讨论

STAT 是一种能与 DNA 结合的蛋白独特家族,它与酪氨酸磷酸化信号通路偶联,发挥转录调控作用[4]。现已发现 6 个 STAT 家族成员(STAT1~STAT6),其编码基因在染色体上紧密连锁,它们可能由共同的原始基因进化而来,在早期胚胎发育和骨髓细胞的分化中发挥着不可缺少的重要作用,与中枢神经系统疾病、肿瘤、白血病、心血管系统疾病等多种病理生理过程有着密切的关系[5,6]。

本研究表明梭曼中毒 2 h 后 PC_{12}细胞中的STAT1、3、5 基因开始升高,12 h 达高峰,24 h 有所降低,但仍明显高于对照组水平。表明梭曼中毒可以促进 STAT1、3、5 基因在 PC_{12} 细胞的表达。Schwaiger 等[7] 报道,轴突横断再生面神经元中 STAT3 mRNA 和蛋白都明显升高。在暴露细胞毒、NMDA 的变性的皮质神经元同样显示STAT3 表达增加[8]。STAT3 在局灶脑缺血的同侧皮质、纹状体以及脑缺血/再灌注海马神经元中表达增加[9,10]。谢惠芳等[11] 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。这些研究均表明大脑缺血再灌注后 JAK-STAT 途径可被激活,在 JAK 的催化下,STAT 发生酪氨酸磷酸化而活化,激活后的 STAT 蛋白又可相互形成同性和异性二聚体并移向细胞核内。在活化后,STAT 才能与特定的DNA结合,促进靶基因的转录激活,可能参与了缺血导致的神经细胞死亡机制。我们研究发现在梭曼中毒状况下 STAT 基因 mRNA 和蛋白表达明显升高,提示梭曼中毒可诱发STAT1、3、5 的表达。梭曼中毒后 STAT1、3、5 的活化及高表达的原因尚不清楚,推测 STAT 基因的激活及超量表达可能是梭曼中毒引起神经细胞死亡的早期事件之一,与梭曼中毒性惊厥引起缺血和缺氧有关,参与了 PC_{12} 细胞内钙的超载、兴奋性氨基酸释放引起细胞死亡的调控过程。从而揭示梭曼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梭曼致脑损伤机制,探讨防治途径,有极其重要的理论和实际意义。

参考文献:

[1] Omura T, Yoshiyama M, Yoshikawa J. Signal transduction of JAK-STAT pathway[J]. Nippon Rinsho, 2000, 58(Suppl 1): 1206-1209.

[2] 刘 猛, 于恩华. JAK-STAT 信号传导途径与中枢神经系统[J]. 生理科学进展, 2002, 33(2): 151-153.

[3] Osawa M, Hanada K, Hamada H, *et al*. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell[J]. Science, 1996, 273(5272): 242-245.

[4] 王 红. 信号转导和转录激活因子STATs 研究进展[J]. 国外医学生理、病理科学与临床分册, 2000, 20(5): 354-357.

[5] Pellegrini S, Dusanter F I. The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs)[J]. Eur J Biochem, 1997, 248(3): 615-633.

[6] Jee Y, Kim G, Tanuma N, *et al*. STAT expression and localization in the central nervous system during autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats [J]. J Neuroimmunol, 2001, 114(1-2): 40-47.

[7] Schwaiger F W, Schmitt G H, Horvat A, *et al*. Peripheral but not central axotomy induces changes in Janus kinases (JAK) and signal transducers and activators of transcription (STAT) [J]. Eur J Neurosci, 2000, 12(4): 1165-1176.

[8] Acarin L, Gonzalez B, Castellano B. STAT3 and NFkappaB activation precedes glial reactivity in the excitotoxically injured young cortex but not in the corresponding distal thalamic nuclei[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2000, 59(2): 151-163.

[9] 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.

[10] 李洪春, 张光毅. 短暂性全脑缺血/再灌注信号转导与转录激活子-3表达的变化[J]. 徐州医学院学报, 2002, 22(1): 1-3.

[11] 谢惠芳, 刘振华, 朱利元, 等. 大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后STAT1蛋白表达的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 1998, 15(5): 265-267.

(编辑 汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net