DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.14.001
第25卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 14
2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

文章编号:1000-5404(2003)14-1217-03

论著

梭曼中毒诱导 PC_{12} 细胞 JAKs 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 JAK1、JAK2、JAK3 基因 mRNA 和蛋白表达的变化。方法 采用半定量 RT-PCR 和 Western blotting 法检测梭曼中毒 2、6、12、24 h 的 PC_{12} 细胞的 JAK1、JAK2、JAK3 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 JAK1、JAK2、JAK3 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 JAKs 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;Janus 激酶
中图法分类号:R322.81;R345.5+7;R996 文献标识码:A

JAKs expressions in cell line PC_{12} induced by soman intoxication

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 investigate the effect of soman on the Janus kinases (JAKs) expression in cell line PC_{12}. **Methods** The PC_{12} cell was used in these experiments and treated with soman at a concentration of 20 μmol/L. RT-PCR and Western blotting were employed to detect the mRNA and protein expressions of JAK1, JAK2 and JAK3 at the time points of 0, 6, 12 and 24 h. The products were sequenced by Sanger's double strand DNA sequence determination. **Results** The expression levels of JAK1, JAK2 and JAK3 mRNAs and proteins increased at 2 h, reached the highest at 12 h and decreased at 24 h, but they were still higher than those of the control. It was shown that the sequences of amplification products by RT-PCR were the same to corresponding ones in GenBank. **Conclusion** Soman intoxication enhances the expression of Janus kinases in PC_{12} cells. JAKs genes may play an important role in brain injury due to soman intoxication.

Key words: soman; PC_{12} cells; JAKs

PC_{12} 细胞是一种从嗜铬细胞瘤分离的克隆细胞,因其在神经生长因子的存在下培养表现出神经细胞的生物学效应,是目前广泛用来研究神经细胞功能、分化发育和死亡的一种组织细胞培养模型[1]。梭曼是一种强有力的有机磷胆碱酯酶抑制剂,它具有毒性强、作用快以及难防难治等特点。战时使用可在短时间内造成大批人员中毒。研究显示,梭曼中毒可致 PC_{12} 细胞大量死亡。最新研究表明,Janus 激酶(Janus kinases, JAKs)可以作为酪氨酸激酶受体(Tyrosine kinase receptor, TKR)调节多种信号转导途径,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]。本研究观察梭曼中毒条件下 PC_{12} 细胞中 JAKs 基因表达状况,旨在为阐明梭曼中毒致脑损伤传导通道及其构成的分子基础,提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

梭曼由军事医学科学院六所提供,纯度为 96.4%;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),JAK1,JAK2,JAK3 抗体(SANTA, USA),其他试剂为国产分析纯。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 链霉

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:2003-05-25

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

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

当正常和中毒两种细胞传代至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。分成以下组：对照组、梭曼中毒2 h组、6 h组、12 h组及24 h组。

1.4 RT-PCR

采用Tripure试剂一步法提取细胞总RNA，1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定，紫外分光光度计测定纯度并定量。根据GenBank提供的mRNA序列，应用引物设计软件自行设计JAK1、JAK2和JAK3引物序列，序列见表1。先将RNA逆转录为cDNA，再进行PCR扩增。JAKs扩增条件为94 ℃ 1 min，55～65 ℃ 1 min，72 ℃ 2 min，进行35循环；再72 ℃延伸10 min。最后取6 μl PCR产物电泳后，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
JAK1	5′-CTG GTA GAT GGC TAC TTG-3′	5′-GGC TCA TAG AGT AGA CAG-3′
JAK2	5′-AGT AGA GTT GTG ACC GTC CA-3′	5′-AG AAA GCC GAA ACC TCC TGT-3′
JAK3	5′-CAT CCT GGA AGC GGA GTT-3′	5′-CAG CTC CTG TAG GCT TCT-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、JAK1、JAK2、JAK3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SPSS10.0程序进行 t 检验。

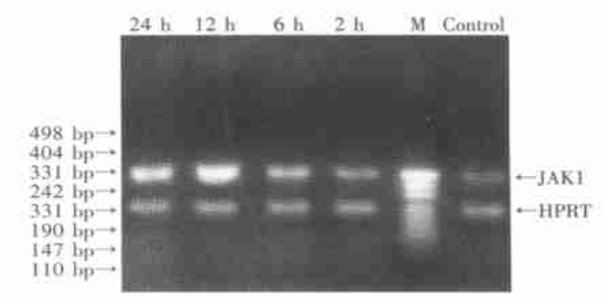
2 结果

2.1 梭曼中毒时PC_{12}细胞JAKs基因mRNA的表达

梭曼中毒2 h时JAK1、JAK2、JAK3基因mRNA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，仍明显高于对照组的表达水平（$P<0.05$），见图1～3。

2.2 梭曼中毒时PC_{12}细胞磷酸化JAKs蛋白的表达

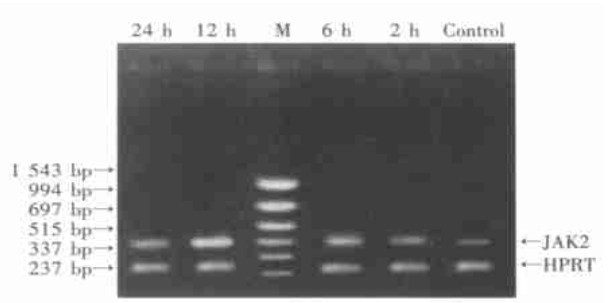
梭曼中毒2 h时磷酸化JAK1、JAK2、JAK3蛋白在PC_{12}细胞表达明显升高，中毒12 h时表达显著，至高峰，24 h虽有降低，仍明显高于对照组的表达水平（$P<0.05$），见图4～6。



M: Marker

图1 梭曼中毒对PC_{12}细胞表达JAK1 mRNA的影响

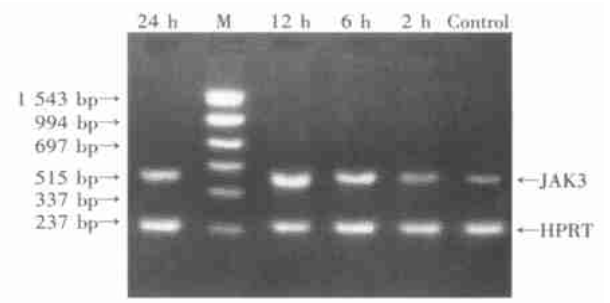
Fig 1 Effect of soman intoxication on JAK1 mRNA expression



M: Marker

图2 梭曼中毒对PC_{12}细胞表达JAK2 mRNA的影响

Fig 2 Effect of soman intoxication on JAK2 mRNA expression



M: Marker

图3 梭曼中毒对PC_{12}细胞表达JAK3 mRNA的影响

Fig 3 Effect of soman intoxication on JAK3 mRNA expression

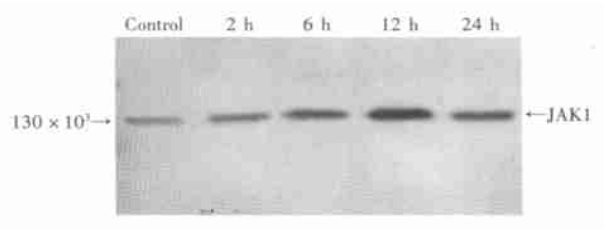


图4 梭曼中毒对PC_{12}细胞表达JAK1蛋白表达的影响

Fig 4 Effect of soman intoxication on JAK1 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 JAK2 蛋白表达的影响

Fig 5　Effect of soman intoxication on JAK2 protein expression

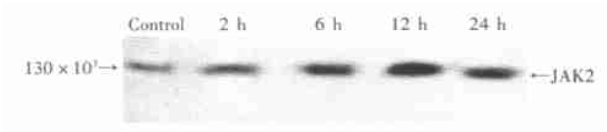


图 6　梭曼中毒对 PC_{12} 细胞表达 JAK3 蛋白表达的影响

Fig 6　Effect of soman intoxication on JAK3 protein expression

2.3　测序结果

测序显示，PCR 扩增的产物 JAK1、JAK3 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

近年来，PC_{12} 细胞成为神经科学工作者研究神经细胞递质合成，储存及释放，离子通道规律的细胞模型[3]。Kauffman 等[4] 曾用 PC_{12} 细胞来研究梭曼中毒损伤的机制。本实验利用 PC_{12} 细胞探索梭曼引起神经元损伤的信号传导机制。本室以前实验结果表明梭曼中毒能引起 PC_{12} 不同程度的损伤，细胞存活率下降。说明损伤后启动细胞某些生化、病理机制参与了细胞毒的作用[5] JAK 激酶家族是一族非受体型酪氨酸蛋白激酶，其包括 JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2 四个成员，分子量(120～130)×10^3，作用底物为 STAT 蛋白[6]。已有许多实验研究表明，在细胞因子与其受体结合后，其细胞内效应与 JAK 密切相关，大部分细胞因子受体虽无内在酪氨酸激酶活性，但 JAK 能加入受体复合物，并导致受体磷酸化。受体的酪氨酸磷酸化为胞内带有 SH_2 结构域的信号分子提供了锚定位点，使之被与受体相连的 JAK 磷酸化而活化，活化的 JAK 则使受体磷酸化并激活 STAT，从而影响基因的转录调节，最终导致细胞生长、分化和分裂。JAK 起着联系受体与胞内基因转录的纽带作用[7,8]。

目前梭曼中毒后 JAKs 基因诱导表达的机制和在细胞损伤的病理生理过程中的意义，尚未见报道。本结果显示，梭曼作用 2 h 后 JAK1、JAK2、JAK3 基因 mRNA 和蛋白表达在 PC_{12} 细胞就有明显升高，12 h 达高峰，24 h 有所降低，但仍明显高于对照组水平。表明梭曼可以促进 JAKs 基因在 PC_{12} 细胞的表达。Justicia 等[9] 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[10] 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。这些研究都说明缺血后 JAK-STAT 途径的确可被激活，而梭曼中毒性惊厥引起的缺血和缺氧是神经细胞死亡和凋亡的主要原因，除了由胆碱能系统参与外，非胆碱能系统也起了重要的作用。我们研究发现在梭曼中毒状况下 JAKs 基因 mRNA 和蛋白表达明显升高，提示梭曼中毒可以激活 JAKs 基因并使其在受损 PC_{12} 细胞内超量表达，推测 JAKs 基因的激活及超量表达可能参与了 Ca^{2+} 超载、c-fos 和 iNOS 的表达以及兴奋性氨基酸的神经毒性作用的调控过程。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非胆碱能机制，探讨防治方法，有极其重要的理论和实际意义。

参考文献：

[1] 徐广润，方思羽，张苏明，等. PC_{12} 细胞缺氧后细胞凋亡与 DNA 损伤相关基因表达关系的研究[J]. 卒中与神经疾病，2001，8(1)：5－7.

[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] 余争平，程天民，伊规须英辉. 缺氧和梭曼单一或复合作用对 PC_{12} 细胞的细胞毒效应[J]. 第三军医大学学报，1997，19(1)：1－3.

[4] Kauffman F C，Davis L H，Whittaker M. Activation of glycogen phosphorylase in rat pheochromocytoma PC_{12} cells and isolated hepatocytes by organophosphates[J]. Biochem Pharmacol，1990，39(2)：347－354.

[5] 赵吉清，吴　强，王仕丽. 缺氧复合梭曼中毒 PC_{12} 细胞中 Ca^{2+}、cAMP、CaM 和 Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ 的变化[J]. 第三军医大学学报，2001，23(2)：169－171.

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

[7] Leonard W J. Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction[J]. Int J Hematol，2001，73(3)：271－277.

[8] 张纪岩. JAK-STATs 信号转导通路的调控[J]. 国外医学免疫学分册，2000，23(2)：83－85.

[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] 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.

（编辑　汪勤俭）

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