DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.02.006
第25卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 2
104 2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)02-0104-03

大鼠肺动脉平滑肌细胞信号转导及转录激活因子亚型Ⅱ基因的克隆及序列分析

王关嵩[1],钱桂生[1],蔡文琴[2],周德山[2],关 崧[1] (第三军医大学:[1]附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037;[2]基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 克隆大鼠肺动脉平滑肌细胞信号传导与转录活化因子亚型Ⅱ基因(STAT2)并对此序列进行同源性分析。方法 单纯胶原酶法培养大鼠肺动脉平滑肌细胞,采用RT-PCR克隆大鼠肺动脉平滑肌细胞信号传导与转录活化因子亚型Ⅱ基因(STAT2)cDNA编码序列,应用PCR、四色荧光和双脱氧终止法测序;并对克隆序列进行同源性分析。结果 应用RT-PCR克隆出大鼠肺动脉平滑肌细胞STAT2 cDNA编码序列。大鼠肺动脉平滑肌细胞STAT2 cDNA编码序列与Genbank中小鼠STAT2 cDNA相应序列具有高度同源性。结论 正常培养的大鼠肺动脉平滑肌细胞表达信号传导与转录活化因子亚型Ⅱ基因(STAT2)。而克隆STAT2有利于探索大鼠血管性疾病信号转导的机制和防治。

关键词:信号传导与转录活化因子;RT-PCR;肺动脉;平滑肌细胞
中图法分类号:R322.121;R329.25;R392.2 文献标识码:A

Cloning and sequence analyses of signal transducers and activators of transcription in rat pulmonary arterial smooth muscle cells

WANG Guan-song, QIAN Gui-sheng, CAI Wen-qin, ZHOU De-shan, GUAN Song (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To clone the gene of isoforms Ⅱ of signal transducers and activators of transcription (STAT2) and analyze its homologous features. Methods The sequence of STAT2 from pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC) was cloned with RT-PCR, and sequenced with PCR, 4-color fluorescent testing and Sanger's method. The homologous features of the sequence were analyzed with the counterpart in Genbank database. Results The gene of STAT2 was cloned in the PASMC, and the sequence of the gene had high homogeneity with the code region of mouse STAT2. Conclusion There exists the gene of STAT2 in normal PASMC. This finding may be helpful in investigating the mechanism of signal transduction and the prevention and treatment of lung vascular diseases.

Key words: signal transducers and activators of transcription; RT-PCR; pulmonary artery; smooth muscle cells

目前在人和动物已发现有8个信号转导与转录激活因子(Signal transducers and activators of transcription, STAT)其中7个在哺乳动物,分别为STAT1,2,3,4,5a,5b,6。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[1]。研究多种疾病常选用大鼠作为动物模型,而大鼠STAT2的序列尚不清楚。本研究克隆肺动脉平滑肌细胞中STAT2基因并对其基因序列进行同源性分析,为进一步研究其功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

胶原酶Ⅰ型,(Sigma公司),DMEM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,dNTPX(上海博亚公司),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)。

1.2 大鼠肺动脉平滑肌细胞(PASMC)系的培养

采用复合胶原酶法,消化处理肺动脉[2]。

1.3 总RNA提取和电泳

RNA提取方法依Tripure试剂说明书的步骤进行。RNA沉淀后用20 μl灭RNA酶的三蒸水稀释,紫外分光光度计下测定吸光度A_{260}、A_{280}值并进行RNA纯度及含量计算。总RNA样本与5× RNA上样缓冲液以4∶1的比例混合,DNA加热仪65 ℃变性5 min后上样电泳。电泳1.5 h后凝胶成像仪照相。加样前

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970329);中国博士后科学基金资助项目(2001);第三军医大学基础部科研经费资助项目(2000)
作者简介:王关嵩(1967—),男,河南省平顶山市人,博士,副教授,主要从事慢性阻塞性肺病低氧肺动脉高压发病机制,血管内皮细胞和平滑肌细胞信号传导方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68755320
通信作者:钱桂生,电话:(023)68755603;E-mail:gs-qian2002@yahoo.com.cn
收稿日期:2002-03-12;修回日期:2002-07-16

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

甲醛变性凝胶应在 1× MOPS 缓冲液中预电泳 30 min。

1.4　RT-PCR

逆转录步骤参照试剂盒说明书并进行改进。取总 RNA 1 μl(1 μg/μl)、Oligo(dT)$_{15}$ 1 μl、RNA 酶抑制剂 20U (0.5 μl) 加灭 RAN 酶三蒸水至 10 μl 于 250 μl 的 PCR 管内。PCR 仪中 65 ℃、10 min 后, 冰上冷却至 0℃, 分别加入 5× 缓冲液 4 μl、100 mmol/L DTT2 μl、10 mmol/L dNTP、Pfu DNA 聚合酶(50 U/μl) 1 μl、最后用灭 RNA 酶三蒸水补足体积至 20 μl。PCR 仪中 42 ℃ 80 min、65 ℃ 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳初步确定逆转录产物的状况。PCR 上下游引物根据 Genbank 中小鼠的 STAT2 cDNA 序列, 应用 Primer Primer Design 软件设计。分别如下: 上游引物(Upper sequence, 1 807 ~ 1 825): 5′- TGG GTC TGG CAT GAC AAT-3′, 下游引物(Lower sequence, 2 121-2 139): 5′-CGT TGG TGT CAC ACA GAT -3′; 阳性对照 HPRT 引物参见文献[3], 上游引物为 5′-GCT GGT GAA AAG GAC CTC TCG-3′; 下游序列为 5′-GCA GAT GGC CAC AGG ACT AGA-3′。PCR 操作步骤按照常规进行, 反应条件如下: 95 ℃预变性 3 min; 94 ℃、50 s, 65 ℃、50 s, 72 ℃、1.5 min, 35 个循环; 72 ℃、10 min。PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶上电泳并于 PCR Marker 比较判断 PCR 产物大小。

1.5　PCR 产物回收及测序

采用"V" 型槽电泳仪纯化回收 PCR 产物。PCR 产物先于 1% 琼脂糖凝胶上电泳后, 长波紫外灯下切下目的片段, 将目的片段凝胶条置于"V" 电泳槽的加样台上。"V" 电泳槽回收 DNA 的操作按照文献[4] 的方法进行。测序应用 PE 公司的 PC377 全自动 DNA 测序仪(上海博亚公司); 应用 PCR、四色荧光、双脱氧终止法进行测序, 反应操作按仪器说明进行。

2　结果

2.1　总 RNA 提取和电泳结果

10% 胎牛血清 DMEM 培养基培养的 PASMC 生长良好。提取的 RNA 的 A_{260}/A_{280} 比值为 1.96, 表明其纯度高。甲醛变性凝胶电泳显示, 提取的 RNA 有明确的 3 条带, 即 5S、18S 和 28S, 说明其质量也高。见图 1。

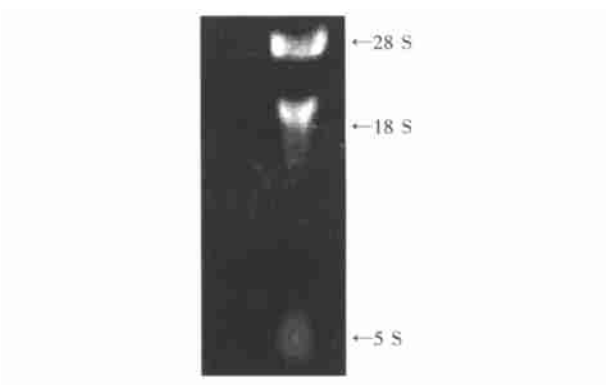
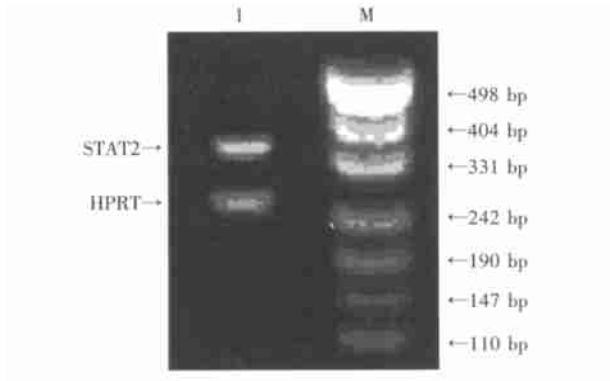


图 1　PASMC 的 RNA 电泳结果

Fig 1　Electrophoresis of PASMC RNA

2.2　RT-PCR 结果

RT-PCR 结果见图 2。扩增的目的产物与 PCR Marker 比较位于 331 bp 与 404 bp 之间, 与设计的预扩增的目的片段 333 bp 相一致。初步判定为大鼠的 STAT2。



M: Marker; 1: PCR products

图 2　PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳结果

Fig 2　Electrophoresis of PCR products in 2% agar gel

2.3　测序及同源性分析结果

大鼠的 STAT2 cDNA 克隆的基因测序的结果如下:

CAGGTATTTC CTCCGTTCTT CCAAGTTAAC TTTTTCCTGG TAGTAACACC CAAAGGCTTC GTCCCGAGGG ACGCGGGGAT AGAGGAAGCG GAGTGGGTTC TCAGGAGCAT TCTCTTCGGC GAGAACCTGG TAGTGGCGGA TGATTTCTGT CAGTGGGAGT GACT-GTAGCA CTTCCTTGGT GTAGGGCTGC ACAGAGTAGA TGAG-GACTTT ATCATCATCCT GGTGCTCCAC CCAAGAGCAG GTAATGC-CCC CTTCAGAAGT CTCACTGAAG CGCAGTAGGA AGGTGCCAGA

调取 Genbank DNA 序列数据库中小鼠的 STAT2 cDNA 的碱基序列并与扩增片段序列比较分析, 其差异性如下(黑体为引物; 下划线为变异; 多少已标明)。

以测序 cDNA 结果为例: **TCTGGCACCT TCCTACTG** CG CTTC AGTGAG ACTTCTGAAG GGGGCATTAC CTGCTCTTGG GTG-GAGCACC AGGATGATGA**T** AAA GTCA TCT ACTCTGT GCAGC-CCTAC ACC AAGGAAG TGCTACAGTC ACT CCCACTG ACA GAAATCA TCC GCCACTA CCA GGTTCTC GCC GAAGAGA ATGC TCCTGA GAA CCCACTC CGC TTCCTCT ATC CCCGCGT CCC TCGGGAC GAA GCCTTTG GGT GTTACTA CCA GGAAAAA GTT AACTTGG AAG AAC 少 GGAG GA A(多)ATA CCTC

以 Genebank 中小鼠的 cDNA 序列为例(黑体为引物, 下划线为变异, 斜体为缺失区):

1801　tct ggc acc ttc cta ctg cgcttc agtgaa(1837)actt ctgaaggggg cattac t(1858)tgt(1860)

1861　tcttgggtgg agcaccagga tgatc(1886)ataaa gtcgaa(1894 ~ 1896)atct actca(1905)gtgca gccctac acc

1921　aaggaagtgt(1930)tacagtcact cccactgaca gag(1953)atcatcc gccac-tacca ggttctt(1977)gcc

1981　gaagagaaca tc(1989 ~ 1992)ccc(1995)gagaa cccactccgc ttcctc-tatc cccgaa(2015 ~ 2016)tccc tcgggacgaa

2041　gcttttgggt gttactacca ggaaaaagtt aat(2073)ttggaag aaca(2084)ggagga atatttg(2094 ~ 2097) *aaa*

2101　*cataaactca ttgtgatctc t* **aac aga cag gtg gac gag**

上述比较结果提示, 所扩增的大鼠 PASMC 的 STAT2 的基

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

因片段与小鼠 STAT2 cDNA 序列基本相同。其中在小鼠的 STAT2 cDNA 序列的第 1837、1858、1860、1886、1894～1896、1905、1930、1953、1977、1989～1992、1995、2015～2016、2073、2084、2094～2097 碱基处出现碱基序列的变异，初步推定其与大鼠的 STAT2 cDNA 的同源性为 93.44%（286/309），而且判断在 1894～1896 碱基、1989～1992 碱基、2015～2016 碱基和 2094～2097 碱基处编码的相应的氨基酸序列也可能发生改变。说明所扩增的大鼠 PASMC 的 STAT2 的 cDNA 序列与小鼠的 STAT2 cDNA 具有高度的同源性。

3 讨论

自从在研究干扰素（IFN）诱导基因转录时首次发现了 STAT 1 以来，在人和动物已发现有 8 个 STAT，其中 7 个在哺乳动物，一个在 DrosDphila（果蝇纲）。STAT 分布于多种类型的组织和细胞，在小鼠发育早期，STAT 1 存在于蜕膜内，STAT 3 存在于蜕膜和内脏内胚层，STAT 2、STAT 6 分布广泛，STAT 4 主要分布于骨髓细胞，睾丸和淋巴细胞，STAT 5 存在于其他组织和髓类细胞等。种类较多且分布广泛预示着其有重要的作用。但在大鼠组织中 STAT 2、STAT 4、STAT 6 的表达状况尚不清楚，在 PASMC 细胞中是否表达 STAT 也是未知数。所以克隆 STAT 2 的基因对研究与 PASMC 相关的血管性疾病，比如肺动脉高压、肺损伤的机制具有重要意义。

基因克隆方法虽多，但 RT-PCR 方法以其操作简便的优势及其可行性而被广泛采纳。Pfu DNA 聚合酶有很好的 3′-5′外切性能，错配率很低，保真性比普通的 *Taq* 酶高 100～1 000 倍，而且耐热性好，适用于高保真的 PCR。因此本试验克隆出的大鼠 STAT2 序列与 Genbank 中小鼠的 cDNA 序列的差异，不可能为错配所致，而是大鼠的基因变异。本实验初步提示正常培养的大鼠肺动脉平滑肌细胞表达信号转导和转录激活因子亚型Ⅱ（STAT2）基因。

克隆出 STAT 2 序列对研究与其相关的信号通道具有重要意义。一方面，可以明确在大鼠组织和细胞受刺激激活 Janus 激酶（JAK）后 STAT 2 是否参与下游信号传递，如研究发现，在大鼠主动脉 SMC 中 Jak2 与 AT1 受体共沉淀，血管紧张素Ⅱ升高 JAK2 的活性，诱导 Jak2 和 Tyk2 的磷酸化作用，进而使 STAT 1 和 STAT 2 磷酸化[5]。激活 AT2 可抑制 AT1 介导的 STAT 1、STAT 2、STAT 3，但不影响 Janus 激酶。另一方面，克隆产物可以作为探针，有助于深入了解相关疾病的发病机制，如在人血管 SMC 中尿激酶纤溶酶原激活剂诱导 Stat1-Stat2 等复合物的形成及激活，进而调节平滑肌细胞的迁移[6,7]。此外这些探针还可以用于探讨 STAT 2 组织表达及其变化状况。而研究 STAT 基因的表达和调控有利于探索大鼠血管性疾病信号转导的机制和防治。

参考文献：

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

[2] 王关嵩，钱桂生，杨晓静，等. 2 种酶消化法培养大鼠血管平滑肌细胞生长特性的比较[J]. 第三军医大学学报，1999, 21(10): 765－767.

[3] Osawa M, Handa K I, Hamada H, *et al*. Long－term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell[J]. Science, 1996, 273(12): 242－245.

[4] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京：高等教育出版社，1993. 128－129.

[5] Marrero M B, Schieffer B, Paxton W G, *et al*. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin Ⅱ AT1 receptor[J]. Nature, 1995, 375(6528): 247－250.

[6] Dumler I, Kopmann A, Wagner K, *et al*. Urokinase induces activation and formation of Stat4 and Stat1-Stat2 complexes in human vascular smooth muscle cells[J]. J Biol Chem, 1999, 274(34): 24059－24065.

[7] Kusch A, Tkachuk S, Haller H, *et al*. Urokinase stimulates human vascular smooth muscle cell migration *via* a phosphatidylinositol 3-kinase-Tyk2 interaction[J]. J Biol Chem, 2000, 275(50): 39466－39473

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)02-0106-01

眼眶结核 1 例

A Case Report of Orbital Tuberculosis

何春燕[1]，江 华[2]（[1] 第三军医大学附属西南医院眼科，重庆 400038；[2] 重庆江北区人民医院，重庆 400032）

患者，女，65 岁，发现右眼上睑外上方包块两周入院。既往高血压病史 10 年，血压现控制正常。10 年前行胆囊切除术。20 年前因子宫原位癌行子宫切除术，否认“肝炎、结核”等传染病史。眼部检查：右上睑轻度水肿，外上方眶缘可扪及花生米大小包块，表面光滑，边界清楚，质中，无压痛，与眶内相连。右眼球突出度 15 mm，左眼球突出度 14 mm。胸片：双肺纹理增粗，右肺门影略浓，肺内未见确切病灶。全身检查未见异常。CT 示：右眼外眦软组织结节灶，边界清楚，0.9 mm 大小，眼肌与视神经不粗，提示右眼眶泪腺混合瘤或者囊肿。初步诊断：

（下转 109 页）

作者简介：何春燕（1968－），女，四川省南充市人，硕士，主治医师，主要从事眼前节方面的研究，发表论文 6 篇。电话：（023）68754306

收稿日期：2002-07-11；修回日期：2002-12-16

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