DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.02.005
第25卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 2
2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

文章编号:1000-5404(2003)02-0101-03

论著

低氧刺激复合培养的平滑肌细胞表达 Janus 激酶

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

提 要:目的 研究低氧对复合培养的平滑肌细胞中 Janus 激酶(JAK)基因表达的作用。方法 鼠肺微血管内皮细胞与肺动脉平滑肌细胞复合培养,采用半定量 RT-PCR 技术检测常氧组、低氧 2、6、12 h 组的 JAK1、JAK2 和 JAK3 基因的表达水平,并对 PCR 产物进行测序。结果 低氧复合培养 2 h 组肺动脉平滑肌细胞中 JAK1、JAK2、JAK3 mRNA 表达水平升高,在低氧 6h 组达最高,与正常组比较均有明显差别。低氧 12 h 组的表达量低于 6 h 组,但高于正常组。RT-PCR 产物直接测序证实扩增产物片断与 Genebank 中相应序列相同。结论 低氧增强复合培养的肺动脉平滑肌细胞中 JAK 基因的表达,而 JAK 基因在低氧所致的肺动脉收缩和低氧肺动脉高压的信号转导中可能发挥重要作用。

关键词:低氧;复合培养;肺动脉;平滑肌细胞;Janus 激酶
中图法分类号:R322.74;R394.2;R845.22 文献标识码:A

Expression of Janus kinase in co-cultured pulmonary arterial smooth muscle cells by hypoxia

WANG Guan-song, CAI Wen-qin, QIAN Gui-sheng, ZHOU De-shan, GUAN Song (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of hypoxia on the expression of Janus kinases (JAK) mRNA in co-cultured cocuttured pulmonowy arterial smooth muscle cells. **Methods** Rat pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC) were co-cultured with rat lung microvascular endothelial cells, and then randomly divided into 5 groups: normal group (N), 2 h hypoxia (H2), 6 h hypoxia (H6), and 12 h hypoxia (H12). The expression levels of JAK1 mRNA, JAK2 mRNA and JAK3 mRNA in the PASMC were detected with semi-quantitative RT-PCR. The products were sequenced with Sanger's double strand DNA sequencing. **Results** The expression levels of JAK1 mRNA, JAK2 mRNA and JAK3 mRNA increased in the H2 PASMC, came to the highest in H6, decreased in H12, but still higher than that of N group. They were also expressed in co-cultured PASMC under normoxia. The sequences of RT-PCR products were consistent with those in Genbank. **Conclusion** Hypoxia reinforces the expression of Janus kinases in co-cultured PASMC, and their genes possibly play important roles in the signal transduction between pulmonary artery contraction and pulmonary hypertension.

Key words: hypoxia; co-culture; pulmonary artery; smooth muscle cells; Janus kinase

肺动脉高压是临床慢性阻塞性肺疾病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)不可逆化的重要病理学进程,肺动脉平滑肌细胞(Pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMC)的异常增生是其动脉改变的主要细胞学基础[1,2]。既往研究表明,Janus 激酶(Janus kinase, JAK)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,参与一些疾病的病理进展[3]。本研究观察低氧状况下肺动脉平滑肌细胞中 JAK 基因表达状况,以探讨 JAK 基因在低氧肺动脉高压中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

胶原酶Ⅰ型,弹性蛋白酶Ⅳ型,牛血清白蛋白(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

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 篇,现在附属新桥医院全军呼吸内科研究所工作,重庆 400037。电话:(023)68755320
通信作者:蔡文琴,电话:(023)68752233;E-mail:cwenqin@yzhoo.com
收稿日期:2002-03-15;修回日期:2002-07-18

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

酶，dNTP$_x$（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 细胞培养

PASMC 系的培养和鉴定，见文献[4]。大鼠肺微血管内皮细胞（Lung microvascular endothelial cells，LMVEC）系的培养，见文献[5]。

1.3 细胞的复合培养和低氧培养

采用套皿法进行复合培养，即先将 PMVEC 种植于滤膜上，PASMC 培养在 6 孔板上，然后将二者套接在一起。详见参考文献[6]。利用自制的缺氧小室，将已配好的低氧气体置换进容器内[7]。并间断抽气后用血气分析仪监测容器内的氧分压，保持在 3% 左右。

1.4 实验分组

当两种细胞传代至 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：常氧组（N）、低氧 2 h 组（H2）、6 h 组（H6）、及 12 h 组（H12）。

1.5 逆转录 PCR

采用 Tripure 试剂一步法提取 PASMC 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，阳性对照 HPRT 引物参见文献[8]，序列见表 1。先将 RNA 逆转录为 cDNA，再进行 PCR 扩增。JAK2 扩增条件为 94 ℃ 1 min，55 ℃ 1 min，72 ℃ 2 min，进行 35 循环；JAK3 扩增条件为 94 ℃ 1 min，55 ℃ 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 的吸光度比值作为目的片段 mRNA 的相对含量。

表 1 PCR 引物序列

Tab 1 Sequences of PCR primers

Primer	Upper sequence	Lower sequence
JAK1	5′-CTG GTA GAT GGC TAC TTC-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 CGA AGC GGA GTF-3′	5′-CAG CTC CTG TAG GCT TCT-3′
HPRT	5′-GCT GGT GAA AAG GAC CTC TCG-3′	5′-GCA GAT GGC CAC AGG ACT AGA-3′

1.6 测序

采用 PCR 产物纯化试剂盒纯化 PCR 产物，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。

1.7 统计学分析

所有结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPPS10.0 软件 F 检验和 q 检验进行统计学检验。

2 结果

2.1 低氧时复合培养的 PASMC JAKs 基因的表达状况

低氧 2 h 时 JAK1、JAK2、JAK3 mRNA 在 PASMC 表达明显升高，低氧 6 h 时达高峰，12 h 已有降低，仍明显高于低氧 2 h 的表达水平。复合培养的 PASMC 在正常状况下表达 JAK1、JAK2 和 JAK3。见表 2，图 1～3。

表 2 低氧对复合培养 PASMC 表达 JAKs mRNA 的影响（$n=4$，$\bar{x}\pm s$）

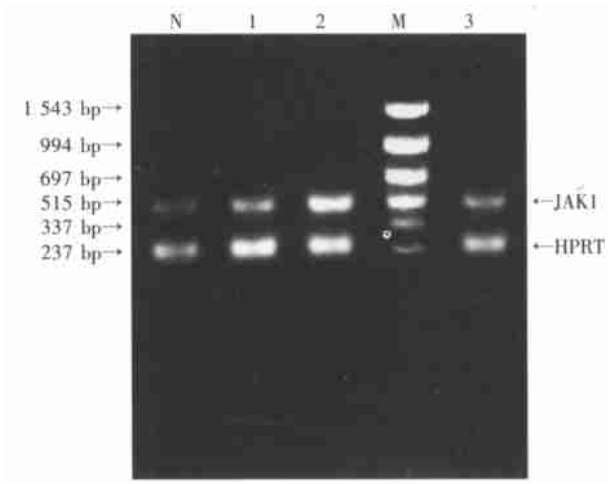
Tab 2 Effect of hypoxia on JAKs mRNA expressions in cocultured PASMC（$n=4$，$\bar{x}\pm s$）

	N	H2	H6	HI2
JAK1 mRNA	0.54±0.12	0.70±0.11 *△	1.07±0.10 *	0.77±0.12 *△
JAK2 mRNA	0.29±0.05	0.64±0.08 *△	1.28±0.12 *	0.70±0.06 *△
JAK3 mRNA	0.26±0.09	0.46±0.12 *△	1.12±0.11 *	0.50±0.14 *△

*：$P<0.05$ *vs* N co-cultured group；△：$P<0.05$ *vs* H6 co-cultured group

2.2 测序结果

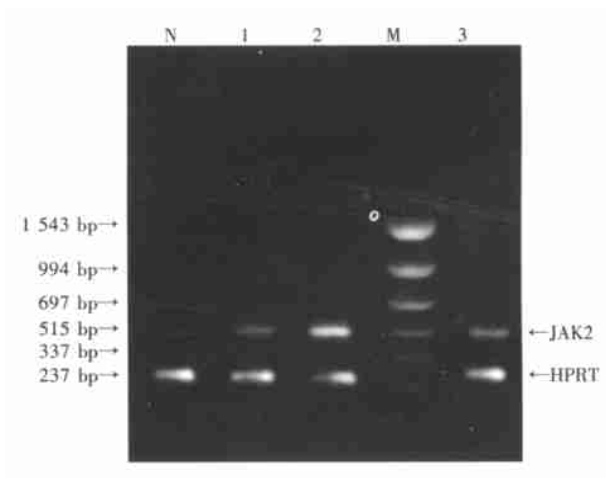
测序显示，PCR 扩增的产物 JAK1、JAK3 与大鼠 Genbank 中的序列完全一致，说明，RT-PCR 扩增的确为相应产物。



M：PCR marker；1—3：Hypoxia for 2，6，and 12 h respectively；N：Normal control

图 1 低氧对 PASMC 表达 JAK1 mRNA 的影响

Fig 1 Effect of hypoxia on JAK1 mRNA expression in cocultured PASMC

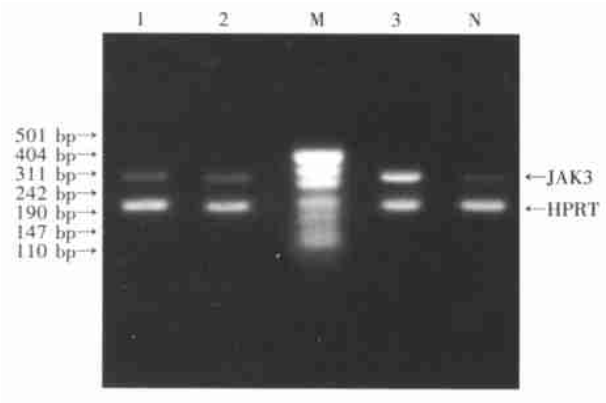


M：PCR marker；1—3：Hypoxia for 2，6，and 12 h respectively；N：Normal control

图 2 低氧对 PASMC 表达 JAK2 mRNA 的影响

Fig 2 Effect of hypoxia on JAK2 mRNA expression in cocultured PASMC

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



M: PCR marker; 1— 3: Hypoxia for 2, 12, and 6 h respectively; N: Normal control

图 3　低氧对 **PASMC** 表达 **JAK3 mRNA** 的影响

Fig 3　Effect of hypoxia on JAK3 mRNA expression in cocultured PASMC

3　讨论

JAK 蛋白酪氨酸激酶家族是仅次于 Src 和 Tec 的第三大非受体型 PTK 家族, 共包括 4 个成员: JAK2、JAK2、JAK3 和 Tyk2, 它们大小各异分子量在 (120 ~ 140)× 10^3。JAK 家族分子在结构上可分为两大部分: C 端是两个紧密连接的酪氨酸激酶活性样结构域, 其中最靠近 C 端的一个是 JAK 激酶的催化活性区; 而位于其 N 端的另一个激酶样结构域不具有酪氨酸激酶活性, 目前认为它可能在 JAK 激酶与其它信号蛋白分子的结合中起一定作用[9]。

目前缺氧对平滑肌细胞作用后 JAK 基因变化及其作用的文献还甚少, 我们报道缺氧作用 2 h 后 JAK2、JAK3 基因在复合培养的 PASMC 中就有明显升高, 6 h 达高峰, 12 h 有所降低, 但仍明显高于正常水平。表明缺氧可以明确促进 JAK 基因在 PASMC 的表达。那么缺氧是如何刺激 JAK 基因的表达的? 或者是通过何种途径的? 我们有研究发现缺氧能够激活复合培养的 PASMC 中白细胞介素-6 等细胞因子, 可能是刺激 JAK 基因表达的一种途径, 具体有多少环节参加可能是复杂的[10]。即往对众多细胞因子的信号转导研究结果表明: 一种细胞因子的偏差号途径中可以有多种 JAK 激酶活化, 一种 JAK 激酶也可以分别参与多种细胞因子的信号转导过程。而且在某些情况下, JAK 也可以被表皮生长因子、血小板源生长因子等生长因子受体或血管紧张素 II 受体等 G 蛋白偶联的受体所活化[9]。

文献[11] 报道, H_2O_2 能迅速激活 VSMC 的 JAK2 酪氨酸磷酸化并转位到细胞核, AG-490 能部分抑制 JAK2 的活性。研究发现血管紧张素II处理鼠平滑肌细胞, JAK2 活性升高促进 Gβ 结合, pp60 激酶的活性也升高, 从而激活 pp60 与 Gβ 复合物的分离。Gβ 亚单位在 AT1 受体的信号转导中起主要的作用[12]。JAK2 特有的抑制剂、反义寡核苷酸抑制 IFNγ 和 LPS 诱导平滑肌细胞产生 iNOS, 但对于 RAW 264.7 巨噬细胞表达 iNOS 有促进作用[13]。Digicaylioglu[14] 发现低氧刺激神经细胞表达低氧诱导因子, 促进促红细胞生成素产生, 再诱导 JAK2 的磷酸化。我们研究发现在低氧状况下 JAK1、JAK2、JAK3 均明显升高, 有可能通过激活MAPK、信号传导与转录活化因子等多种途径, 参与低氧肺动脉高压、高血压、动脉粥样硬化等多种疾病的发病机制。

参考文献:

[1] 钱桂生, 吴国明. 肺心病的诊断与治疗[M]. 北京: 人民军医出版社, 1999. 17— 61.

[2] 王关嵩, 钱桂生, 杨晓静. 一氧化碳对肺动脉平滑肌细胞[Ca^{2+}]、cAMP、cGMP 的作用[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(5): 417— 419.

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

[4] 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.

[5] 王关嵩, 蔡文琴, 钱桂生, 等. 肺微血管内皮细胞系的建立及脂多糖作用后酪氨酸激酶受体活性的变化[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(2): 94— 97.

[6] 王关嵩, 蔡文琴, 钱桂生. 血管平滑肌细胞与微血管内皮细胞复合培养的方法及其对细胞增生的影响[J]. 解剖科学进展, 2001, 7(增刊): 44.

[7] 王关嵩, 钱桂生, 陈维中, 等. 低浓度 CO 和低氧气体处理培养细胞的容器的研制及其应用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2001, 16(1): 46— 50.

[8] 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.

[9] Du J, Brink M, Peng T, *et al*. Thrombin regulates insulin— like growth factor-1 receptor transcription in vascular smooth muscle: characterization of the signaling pathway[J]. Circ Res, 2001, 88(10): 1044— 1052.

[10] 黄春基, 周德山, 钱桂生, 等. 低氧对复合培养的平滑肌细胞中白细胞介素-6 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(2): 98— 100.

[11] Madamanchi N R, Li S, Patterson C, *et al*. Reactive oxygen species regulate heat-shock protein 70 *via* the JAK/STAT pathway[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21(3): 321— 326.

[12] Iuchtefeld M, Drexler H, Schieffer B. Role of G beta-subunit in angiotensin II-type 1 receptor signaling[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 280(3): 756— 760.

[13] Marrero M B, Venema V J, He H, *et al*. Inhibition by the JAK/STAT pathway of IFN gamma-and LPS-stimulated nitric oxide synthase induction in vascular smooth muscle cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 252(2): 508— 512.

[14] Digicayloglu M, Lipton S A. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades[J]. Nature, 2001, 412(6847): 641— 647.

（编辑　冷怀明）

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