DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.02.008
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)02-0107-03

论著

低氧对大鼠肺动脉平滑肌细胞表达信号转导及转录激活因子基因表达的影响

钱 频[1],王关嵩[1],蒙伟宗[2],关 崧[1],陈维中 ([1]第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所 重庆 400037;[2]广西壮族自治区南宁市第四医院结三科,南宁 530023)

提 要:目的 研究低氧对肺动脉平滑肌细胞中信号转导及转录激活因子(STATs)基因表达的影响。方法 低氧处理培养的大鼠肺动脉平滑肌细胞,采用半定量RT-PCR方法检测常氧组、低氧2、6、12 h组的STAT3和STAT5基因的表达水平。结果 低氧培养2 h组肺动脉平滑肌细胞中STAT3、STAT5 mRNA表达水平升高,在低氧6 h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。结论 低氧增强培养的肺动脉平滑肌细胞中STATs基因的表达,在低氧所致的肺肺动脉收缩等疾病中可能发挥重要作用。

关键词:低氧;肺动脉;平滑肌细胞;信号转导与转录活化因子
中图法分类号:R322.121;R329.5;R392.2 文献标识码:A

Hypoxia enhancing expressions of signal transducers and activators of transcription in pulmonary arterial smooth muscle cells

QIAN Pin, WANG Guan-song, MENG Wei-zong, GUAN Song, CHEN Wei-zhong (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of hypoxia on the expressions of signal transducers and activators of transcription (STATs) in pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC). **Methods** Rat pulmonary smooth muscle cells were cocultured under hypoxic condition. The expressions of STAT3 mRNA and STAT5 mRNA were detected with semi-quantitative RT-PCR in PASMC, which were random divided into 5 groups: normal group (N), hypoxia 2 h (H2), hypoxia 6 h (H6), and hypoxia 12 h (H12). **Results** The expressions of STAT3 mRNA and STAT5 mRNA increased in H2 PASMC, came to the highest in H6, and decreased in H12, but still higher than those in N groups. They were expressed in normoxia PASMC. **Conclusion** Hypoxia enhances the expressions of STATs in PASMC, and the genes may play important roles in pulmonary artery contraction due to hypoxia.

Key words: hypoxia; pulmonary artery; smooth muscle cells; signal transducers and activators of transcription

肺血管收缩与舒张异常是临床多种疾病的重要病理学进程,肺动脉平滑肌细胞(Pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMC)的异常增生是其改变的主要细胞学基础[1,2]。既往研究表明,信号转导及转录激活因子(Signal transducers and activators of transcription, STATs)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[3]。本研究观察低氧状况下肺动脉平滑肌细胞中STATs基因表达状况,以探讨STATs基因在肺血管收缩中的作用。

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,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

大鼠肺动脉平滑肌细胞(PASMC)系的培养和鉴定 采用胶原酶法,0.1%胶原酶,消化处理12 h以后过网。见文献[4]。

1.3 细胞低氧处理和实验分组

利用自制的缺氧小室,将已配好的低氧气体置换进容器

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)
作者简介:钱 频(1976—),女,上海市人,实验师,主要从事肺心病等临床疾病的超声诊断和发病机制方面的研究,现在超声诊断科工作。电话:(023)68755320
通信作者:王关嵩,电话:(023)68755320;E-mail:songwg@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2002-03-15;修回日期:2002-07-11

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

内[5]。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。当细胞传代至 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：常氧组（N）、低氧 2 h 组（H2）、6 h 组（H6）、及 12 h 组（H12）。

1.4 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 STAT3 和 STAT5，阳性对照 HPRT 引物参见文献[6]，序列见表 1。先将 RNA 逆转录为 cDNA，再进行 PCR 扩增。STAT2 扩增条件为 94 ℃ 1 min，64 ℃ 1 min，72 ℃ 2 min，进行 35 循环；STAT3 扩增条件为 94 ℃ 1 min，67 ℃ 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 Sequences of PCR primers

Primer	Upper sequence	Lower sequence	Length
STAT3	5′- TGG GTC TGG CAT GAC AAT-3′	5′-CGT TGG TGT CAC ACA GAT-3′	465 bp
STAT5	5′- CAA CAG CAT GTC CGT GTC-3′	5′-ATC TGC GGC TTC ACG TAT -3′	468 bp
HPRT	5′-GCT GGT GAA AAG GAC CTC TCG-3′	5′-GCA GAT GGC CAC AGG ACT AGA-3′	248 bp

1.5 统计学分析

所有结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 软件进行 F 检验和 q 检验。

2 结果

2.1 低氧时肺动脉平滑肌细胞 STAT3 基因的表达状况

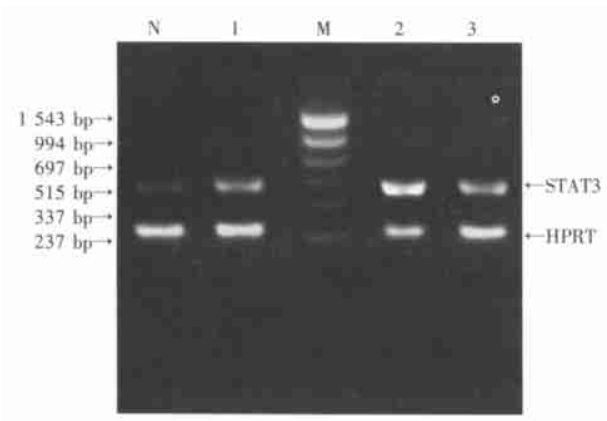
低氧 2 h 时 STAT3 和 STAT5 基因在 PASMC 表达明显升高，低氧 6 h 时表达显著，至高峰，12 h 已有降低，仍明显高于低氧 2 h 的表达水平。在正常状况下 PASMC 表达 STAT3 和 STAT5 的水平较低。见表 2，图 1、2。

表 2 低氧对 PASMC 表达 STAT3 mRNA 的影响（$n=4$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Effect of hypoxia on STAT3 mRNA expression in PASMC（$n=4$，$\bar{x}\pm s$）

	N	H2	H6	H12
STAT3	0.24±0.10	0.74±0.11 *△	1.18±0.13 *	0.81±0.08 *△
STAT5	0.54±0.06	0.88±0.09 *△	1.16±0.10 *	0.81±0.08 *△

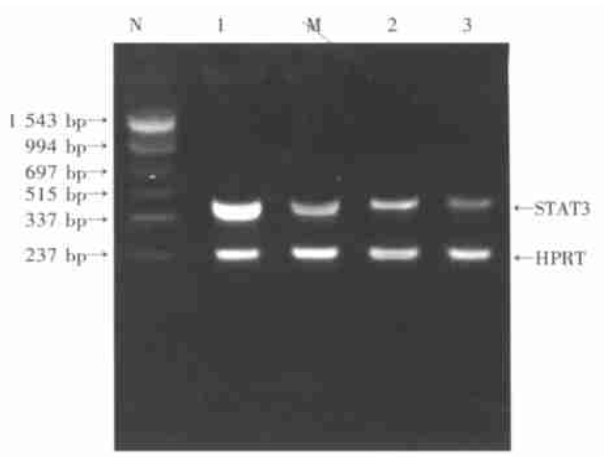
*：$P<0.01$ *vs* N group △：$P<0.01$ *vs* H6 group



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

图 1 低氧对 PASMC 表达 STAT3 mRNA 的影响

Fig 1 Effect of hypoxia on STAT3 mRNA expression



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

图 2 低氧对 PASMC 表达 STAT5 mRNA 的影响

Fig 2 Effect of hypoxia on STAT5 mRNA expression

3 讨论

自从研究干扰素（IFN）诱导基因转录时首次发现了信号转导及转录激活因子（Signal transducers and activators of transcription，STATs）是在研究干扰素（IFN）诱导基因转录时首次发现的[7]。以后在人和动物已发现有 8 个 STAT，其中 7 个在哺乳动物，分别为 STAT1，STAT2，STAT3，STAT4，STAT5a，STAT5b，STAT6，一个在 DrosDphila（果蝇纲）。研究发现，在小鼠发育早期，STAT3 存在于蜕膜和内脏内胚层，STAT5 存在于多种组织和髓类细胞中。STAT3，STAT5a，STAT5b 有 750～790 个氨基酸，分子量（84～113）× 10^3。其功能区包括：①SH2 结构域，核心序列为 GTFLLFSs（E/D），SH2 介导 STAT 与活化受体的酪氨酸残基相结合，并且 STAT

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

可形成二聚体; SH3 结构域, 能与富含 pro 位点结合。②C 末端: 为转录激活结构域, 其中的磷酸丝氨酸决定 STAT 的核转位, 其只见于 STAT1, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT6b。N 末端: 其 VTTE 保守序列存在于所有 STAT, 参与 DNA 结合, 如发生微小缺失, 会使 STAT 失去被磷酸化的能力。③DNA 结合区: 其决定 STAT 与 DNA 结合。④酪氨酸磷酸化位点, 位于所有 STAT 的 701 位氨基酸上, 当其磷酸化时, STAT 呈活化状态。已有文献提示, 在血管组织中 STAT3 和 STAT5 表达丰富, 可能在相关信号转导中起重要的作用。

目前缺氧对平滑肌细胞作用后 STATs 基因变化及其作用的文献还缺乏, 我们首次报道缺氧作用 2 h 后 STAT3、STAT5 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 STATs 基因在 PASMC 的表达。至于缺氧是如何刺激 STATs 基因的表达? 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 STATs 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]。

在糖尿病合并血管病变患者中, 2 型 LDL 活化 STAT5B, 促进 p21(waf)的表达和增加处于 G_1 期细胞的比例。认为在糖尿病血管病变中, STAT5b 在转录水平影响血管病变的发生及发展[8]。而糖尿病血管病变的主要特征为 VSMC 的异常生长、增殖和迁移[9]。在鸡体内 JAK2、STAT3 在集落刺激因子(GM-CSF)刺激下激活并参与血管生成; 在小鸡尿囊绒膜(CAM)中, GM-CSF 使 JAK2 迅速磷酸化, 并持续至少 10 min, STAT3 磷酸化, 持续 10 min。JAK2 抑制剂 AG-490 可抑制上述反应。表明 JAK2/STAT3 参与 GM-CSF 诱导的血管生成[10]。我们研究发现在低氧状况下 STAT3、STAT5 均明显升高, 可能再进行核转位从而调节多种等多种信号途径, 参与肺血管收缩与舒张, 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 STATs/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, 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.

[6] 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.

[7] Shuai K, Ziemiecki A, Wilks, A F, *et al*. Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins[J]. Nature, 1993, 366(6455): 580—583.

[8] Brizzi M F, Dentelli P, Pavan M, *et al*. Diabetic LDL inhibits cell-cycle progression via STAT5B and p21(waf)[J]. J Clin Invest, 2002, 109(1): 111—119.

[9] Srivastava A K. High glucose-induced activation of protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells: A potential role in the pathogenesis of vascular dysfunction in diabetes (Review)[J]. Int J Mol Med, 2002, 9(1): 85—89.

[10] Valdembri D, Serini G, Vacca A, *et al*. *In vivo* activation of JAK2/STAT-3 pathway during angiogenesis induced by GM-CSF[J]. FASEB J. FASEB J, 2002, 16(2): 225—227.

(编辑　冷怀明)

(上接 106 页)

①右眼眶泪腺混合瘤; ②右眼眶囊肿; ③右眼眶转移癌。术中外上方前路开眶, 见肿块位于泪腺前面, 边界不规则, 下方和泪腺粘连。分离肿块并切除。送检泪腺组织镜下见结核结节, 其内有干酪样坏死, 周边有郎罕巨细胞、上皮样细胞及淋巴细胞。诊断: 右眼眶泪腺结核。

讨论

眼眶结核是一种罕见的眶内组织干酪坏死性肉芽肿, 西方国家少见, 在亚洲或非洲不发达国家中仍可见到该病。结核杆菌可通过血源性传播至眼眶或由眼眶周围软组织或骨结构直接侵犯眼眶, 结核杆菌常侵犯泪腺, 使泪腺肿大; 侵犯软组织引起无痛性进行性眼球突出; 眶骨可产生结核性骨髓炎, 经久不愈, 皮肤眶骨病变区窦道形成。眼眶结核诊断很困难, 有时因眶内肿块开眶手术取出肿块病理检查发现结核[1]。本病例患者表现为右眼眶泪腺区无痛性肿块, 全身检查未见结核病灶, 患者无确切的结核病史, 因此难以将泪腺包块与泪腺结核相联系。近年来, 结核病发病呈上升趋势[2], 因此在考虑眼眶包块的诊断和治疗时, 不可忽视这一罕见眼眶疾病。早期诊断、早期药物治疗, 可防止眼眶结核并发症的发生[3]。

关键词: 眼眶; 结核病
中图法分类号: R529.8　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 宋国祥. 眼眶病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 107—108.

[2] Nwachokor F N, Thomas J O. Tuberculosis in Ibadan, Nigeria-a 30 year review[J]. Cent Afr J Med, 2000, 46(11): 287—292.

[3] EL-Ghatit A M, EL-Deriny S M, Mahmoud A A, *et al*. Presumed periorbital lupus vulgaris with ocular extension[J]. Ophthalmology, 1999, 106(10): 1990—1993.

(编辑　薛国文)

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