DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.02.010
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)02-0113-03

论著

低氧时复合培养的肺动脉平滑肌细胞 Janus 激酶蛋白表达的状况

陈德英,蔡文琴,王关嵩 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨低氧对复合培养的肺动脉平滑肌细胞(PASMC)中 Janus 激酶(Janus Kinase, JAK)蛋白表达的作用。方法 采用复合胶原酶法培养大鼠 PASMC,再与大鼠肺微血管内皮细胞(LMEC)进行复合培养,免疫细胞化学 SABC 法检测低氧状况下 PASMC 中 JAK 蛋白的表达情况。结果 与正常 PASMC 弱阳性(+)比较,低氧处理单独培养 PASMC 的 JAK1、JAK3 免疫组化染色,胞浆呈深紫蓝色,呈极强阳性(++++);低氧处理复合培养的 PASMC 的 JAK1、JAK3 免疫组化染色,胞浆呈强阳性(+++)。与对照的正常细胞呈弱阳性(+)比较,低氧 2 h 组 JAK1 和 JAK3 蛋白表达明显升高;低氧 6 h 组复合培养 PASMC 的 JAK1 和 JAK3 表达显著升高至高峰;12 h 组比低氧 6 h 组已有降低,仍高于 2 h 组的表达水平。结论 低氧在复合条件下可进一步激活 PASMC 中 JAK 蛋白的表达,从而高调多种信号通路,促进细胞增殖。

关键词:肺动脉;平滑肌细胞;Janus 激酶蛋白;免疫细胞化学
中图法分类号:R322.13;R394.2;R845.22 文献标识码:A

Expression of Janus kinase protein in cocultured PASMC in hypoxia

CHEN De-ying, CAI Wen-qin, WANG Guan-song (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of hypoxia on the expression of Janus kinase (JAK) in cocultured pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC). **Methods** Rat PASMC were cocultured with lung microvascular endothelial cells (LMVEC), the expression of JAK protein in PASMC was detected with Immunocytochemical method. **Results** Expressions of JAK1 and JAK3 Protein were seen excessive positive (++++) in the cytoplasm of simple PASMC in hypoxia, and better positive (+++) in cocultured PASMC in hypoxia. Compared with those of the control group, the expressions of JAK1 and JAK3 protein obviously increased in PASMC in hypoxia for 2 h, reached highest in those with hypoxia for 6 h, and decreased in those with hypoxia for 12 hours hypoxia, but still higher than those in hypoxia for 2 h. **Conclusion** Hypoxia modulates the signal pathways and improves cell proliferation by the enhancement of the expressions of JAK1 and JAK2 proteins in co-cultured PASMC.

Key words: pulmonary artery; smooth muscle cells; Janus kinase protein; immunocytochemistry

严重慢性阻塞性肺病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)患者缓解期仍有低氧血症。低氧血症不仅影响患者的躯体功能,而且还影响患者的心理情绪,继而严重影响患者的生命质量[1]。肺动脉平滑肌细胞(Pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMC)在低氧状况下异常增生的迁移是严重 COPD 的重要细胞学基础之一。我们研究表明,低氧可以促进与大鼠肺微血管内皮细胞(Lung microvascular endothelial cells, LMVEC)复合培养的 PASMC 的 Janus 激酶(Janus Kinase, JAK) mRNA 表达[2],但是否影响蛋白质表达尚不清楚,本研究的目的就是阐明低氧状况下复合培养的 PASMC 表达 JAK 蛋白的状况。

1 材料与方法

1.1 材料

胶原酶、弹性蛋白酶、牛血清白蛋白、荧光标记植物血凝素(Sigma)、胎牛血清、胰蛋白酶(HyClone)、兔抗鼠 JAK1、JAK3、TyK2 抗体(DAKO)、羊抗兔二抗(武汉博士德),其余试剂为国产分析纯,Wistar 大鼠(本校实验动物中心)。

1.2 细胞培养

大鼠肺微血管内皮细胞的培养和鉴定:采用贴块法[3]。大鼠肺动脉平滑肌细胞的培养和鉴定:采用复合胶原酶法[4]。

1.3 复合培养细胞

采用套皿法,上层为 LMVEC,下层为 PASMC[5]。

1.4 低氧处理细胞及分组

采用缺氧小室换气法处理细胞[6]。当两种细胞传代至 5~

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);第三军医大学基础医学部科研经费资助项目(2000)
作者简介:陈德英(1964-),女,重庆市人,实验师,主要从事组织学与神经生物学常规技术方面的研究,发表论文 10 余篇。电话:(023)68752229
通信作者:蔡文琴,电话:(023)68752233;E-mail:cwenqin@yahoo.com
收稿日期:2002-03-25;修回日期:2002-07-18

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

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）。

1.5 JAK1、JAK3、Tyk2 免疫细胞化学染色

依照蔡文琴等[7]方法，进行免疫细胞化学染色。先将细胞培养在盖玻片上，经处理后依次加入一抗、二抗和三抗，DAB 硫酸镍铵增强法显色。

1.6 图像分析和统计学处理

采用上海复旦大学四星软件和空军总医院的真彩灰度扫描软件进行 t 检验及 Tiger 图像分析仪对免疫组化染色细胞片进行定性和定量分析。

2 结果

2.1 JAK1、JAK3 蛋白定性分析情况

免疫细胞化学 SABC 法 JAK1 染色结果显示，低氧处理单独培养的 PASMC 为极强阳性（＋＋＋＋），复合培养的 PASMC 为强阳性（＋＋＋）；JAK3 染色结果显示，低氧处理单独培养的 PASMC 为极强阳性（＋＋＋＋），复合培养的 PASMC 为强阳性（＋＋＋）。Tyk2 不表达。见表 1。

表 1 不同条件的 **PASMC** 表达 **JAK1** 和 **JAK3** 蛋白的情况

Tab 1 Expression of JAK1 and JAK3 proteins in PASMC

Group	JAK1	JAK3	Tyk2
N	＋	＋	－
Hypoxia 6 h	＋＋＋＋	＋＋＋＋	－
Hypoxia cocultured 6 h	＋＋＋	＋＋＋	－

－：Negative，＋：Faint positive，＋＋：Weak positive，＋＋＋：Secondary positive，＋＋＋＋：Powerful positive

2.2 低氧对复合培养 PASMC 的 JAK 蛋白表达定量分析情况

在常氧组可见 JAK1、JAK3 蛋白表达。低氧 2 h 组表达明显升高，低氧 6 h 组在复合培养的 PASMC 中 JAK1、JAK3 表达显著升高，至高峰，高于其它组。低氧 12 h 组比 6 h 组已有降低，仍高于低氧 2 h 组的表达水平。见图 1、2、表 2。



图 1 低氧时复合培养的 **PASMC** 的 **Janus** 激酶 **1** 蛋白染色，可见胞浆呈紫蓝色 （SABC× 400）

Fig 1 Royal blue in the cytoplasm of cocultured PASMC under hypoxia, indicating the expression of Janus kinase 1 （SABC× 400）



图 2 低氧时复合培养的 **PASMC** 的 **Janus** 激酶 **3** 蛋白染色，可见胞浆呈紫蓝色 （SABC× 400）

Fig 2 Royal blue in the cytoplasm of cocultured PASMC under hypoxia indicating the expression of Janus kinase 3 （SABC× 400）

表 2 低氧对复合培养 **PASMC** 表达 **JAK** 蛋白的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Effect of hypoxia on the expression of JAK protein in cocultured PASMC（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

	N	H2	H6	H12
JAK1	0.39±0.05	0.64±0.11 *	1.13±0.05 **	0.86±0.09 *
JAK3	0.28±0.04	0.48±0.08 *△	0.91±0.11 *	0.59±0.10 *△

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* N cocultured group；△：$P<0.01$ *vs* H6 cocultured group

3 讨论

既往我们发现，低氧能刺激 PASMC 表达 JAK1、JAK2、JAK3 mRNA，但是只有表达 JAK 蛋白质才更有意义。为此对 PASMC 进行了 JAK 蛋白的免疫细胞化学染色。研究表明，低氧处理单独培养 PASMC 的 JAK1 和 JAK3 染色，胞浆呈深紫蓝色，呈极强阳性。低氧处理复合培养 PASMC 的 JAK1 和 JAK3 染色，胞浆呈强阳性。

此后对不同条件培养的 PASMC 进行 JAK 蛋白的免疫细胞化学染色观察。在复合培养细胞的处理和免疫细胞化学的染色过程中，要注意以下几个环节。贴片培养的细胞应该及时固定保存，固定时间不宜太长，且染色前应充分洗涤。进一抗的时间和条件应依据不同质地的试剂盒而有所不同：一抗 37 ℃ 1 h 后或－4 ℃冰箱过夜，或室温过夜，或 37 ℃温箱过夜，让其与抗原充分结合；如果时间过长，尤其是 37 ℃孵育时间过长，则会显示出非特异性结构，影响观察。由于复合培养的 PASMC 贴壁到载玻片上比较薄，且较疏散，采取硫酸镍铵增强法显色效果较好；必要时可在温箱中显色，但应严格控制显色时间。

有实验证实，培养的牛主动脉内皮细胞缓激肽激活 Tyk2，导致酪氨酸磷酸化及 STAT3 的核转位[8]。血

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

管紧张素 II 与 G 蛋白耦联的血管紧张素受体(AT1)结合通过 JAK 2/STAT 途径发挥促细胞增殖作用。实验表明,Src 同源性磷酸酯酶-1(SHP-1)抑制 JAK 2 激酶活性,负反馈调控上述信号通路。而 SHP-2 作为 JAK 2 和 AT1 受体的连接子促使二者结合,促进 JAK2 的活化,正性调控上述信号通路[9]。制瘤素 M(OSM)处理人 SMC 后,人 SMC 生长受到抑制,形态学结构发生改变,环氧合酶(COX)-2 mRNA 和蛋白表达增高。研究证实,OSM 和 OSM2 型受体结合后,通过 JAK1/STAT1 发挥上述效应[10]。已研究证实干扰素(IFN)γ 处理鼠成纤维细胞(R3T3)细胞后,IFN-γ 可导致 JAK 1、JAK 2 和 STAT1 磷酸化,调节 AT2 受体的表达,而 AT2 受体表达与 SMC 细胞增殖、分化和损伤密切相关[11]。这些研究结果说明,多种因素刺激平滑肌细胞及其相邻的内皮细胞和成纤维细胞可以表达 JAK 蛋白,从而影响平滑肌细胞的生长。

本研究意义在于表明低氧在复合培养条件下仍能激活 PASMC 中 JAK 蛋白表达,从而可能高调多种信号通路,促进细胞增殖,调节细胞的生长。但具体的信号通道及其调节尚待研究。

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,蔡文琴,钱桂生,等. 低氧刺激复合培养的平滑肌细胞表达 Janus 激酶[J]. 第三军医大学学报,2003,25(2):101—103.
[3] 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.
[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. 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.
[6] 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.
[7] 蔡文琴,王伯沄. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都:四川科学技术出版社,1994. 8—20.
[8] Ju H, Venema V J, Liang H, *et al*. Bradykinin activates the Janus-activated kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway in vascular endothelial cells: localization of JAK/STAT signalling proteins in plasmalemmal caveolae[J]. Biochem J, 2000, 351(Pt 1): 257—264.
[9] Marrero M B, Venema V J, Ju H, *et al*. Regulation of angiotensin II-induced JAK2 tyrosine phosphorylation: roles of SHP-1 and SHP-2[J]. Am J Physiol, 1998, 275(5 Pt 1): 1 216—1 223.
[10] Bernard C, Merval R, Lebret M, *et al*. Oncostatin M induces interleukin-6 and cyclooxygenase-2 expression in human vascular smooth muscle cells: synergy with interleukin-1beta[J]. Circ Res, 1999, 85(12): 1 124—1 131.
[11] Horiuchi M, Hayashida W, Akishita M, *et al*. Interferon-gamma induces AT(2) receptor expression in fibroblasts by Jak/STAT pathway and interferon regulatory factor-1[J]. Circ Res, 2000, 86(2): 233—240.

(编辑　冷怀明)

文章编号:1000-5404(2003)02-0115-01

个案与短篇

微波治疗腋臭 40 例疗效观察

Observation on therapeutic effects of microwave on 40 cases of underarm odour

李　军[1],王　珊[1],叶庆俏[2]　([1] 自贡市第四人民医院皮肤科,自贡 643000; [2] 第三军医大学附属西南医院皮肤科,重庆 400038)

我院从 1999 年 7 月至 2001 年 4 月使用成都锦江微波电器厂制造的 WB-100 型微波机治疗腋臭 40 例,取得较好疗效,现报告如下。

1　临床资料

1.1　一般资料

72 例腋臭病人为本科门诊病人。将其分成两组,治疗组 40 例,男 13 例,女 27 例,年龄 17～37 岁;对照组 32 例,男 10 例,女 22 例,年龄 18～34 岁。均为双侧发病,病程 3 月至 8 年。

1.2　治疗方法

治疗组应用微波机,患者取仰卧位,手上举并放在枕部后,使双腋窝充分暴露,剪腋毛,碘伏常规消毒,铺洞巾,2%利多卡因作腋部术区浸润麻醉,用量根据术区面积酌定,一般 1 例 1 次不超过 20 ml,然后开启微波机,选择单纹细短针状辐射器治疗探头,输出电流 20～30 mA,电压 220 V,输出功率 20～30 W,脚踏式启动定时器控制操作时间,时间限定 2 s。治疗探头垂直插入毛根部皮肤,深度 3～4 mm,皮肤凝固发白后,拔出探头,继续它处。用这种方法依次对每个毛孔都进行辐射,术后创面涂百多邦,无菌纱布覆盖,口服抗菌素,1 周内不作剧烈活动,局

(下转 122 页)

作者简介:李　军(1964—),女,四川省自贡市人,主治医师。电话:(0813)8106629
收稿日期:2002-04-25;修回日期:2002-06-25

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