DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.02.009
第25卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 2
110 2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)02-0110-03

脂多糖对复合培养的微血管内皮细胞Janus激酶表达的影响

王关嵩[1],钱桂生[1],周元国[2],关 崧[1],陈维中[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]重庆市大足县人民医院内科,重庆 402360)

提 要:目的 研究脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)对复合培养的微血管内皮细胞中Janus激酶(Janus kinase, JAK)基因表达的影响。方法 与肺动脉平滑肌细胞复合培养鼠肺微血管内皮细胞,采用半定量RT-PCR技术检测正常组、LPS 2、8、16 h组的JAK2和TYK2基因的表达水平。结果 LPS复合培养2 h组肺微血管内皮细胞中JAK2 mRNA表达水平升高,在LPS 8 h组达最高,与正常组比较均有明显差别。在正常组和LPS刺激组均未见肺微血管内皮细胞表达TYK2基因。结论 肺微血管内皮细胞不表达TYK2基因;LPS可使复合培养的肺微血管内皮细胞中JAK2基因的表达升高。

关键词:脂多糖;复合培养;肺微血管;内皮细胞;Janus激酶
中图法分类号:R322.13;R343.8;R394.2 文献标识码:A

Effect of lipopolysaccharide on Janus kinase expressions in cocultured lung microvascular endothelial cells

WANG Guan-song, QIAN Gui-sheng, ZHOU Yuan-guo, GUAN Song, CHEN Wei-zhong (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of lipopolysaccharide (LPS) on the expression of Janus Kinase (JAK) in cocultured lung microvascular endothelial cells. Methods After self-isolated rat lung microvascular endothelial cells (LMVEC) cocultured with pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC), LPS at different concentrations were added to the media for appropriate concentration, and then LPS at the obtained concentration was re-added to the fresh media. The expressions of JAK2 mRNA and TYK2 mRNA were detected with semi-quantitative RT-PCR in PASMC, which was randomly divided into 4 groups: normal group (N), hypoxia 2 h (H2), hypoxia 8 h (H8), and hypoxia 16 h (H16). Results The expression level of JAK2 mRNA increased in LMVEC in H2, reached the peak in H8, and decreased in H16, but still higher than that in N group. The expression of JAK2 in cocultured LMVEC was enhanced by LPS. No expression of TYK2 was found in the cocultured LMVEC. Conclusion TYK2 is not expressed in LMVEC, whenever the cells are treated by LPS or not. LPS enhances the expression of JAK2 in cocultured LMVEC.

Key words: lipopolysaccharide; coculture; lung microvessel; endothelial cells; Janus kinase

各种严重损伤引起全身广泛性炎症反应的临床过程就是全身炎症反应综合征(Systemic inflammatory response syndrome, SIRS)。由于解剖结构等原因,SIRS最容易且最早侵害肺脏;肺脏是失控的全身炎症反应损伤的主要靶器官,损伤结果是肺血管内皮和肺泡上皮等广泛破坏,表现为急性肺损伤(Acute lung injure, ALI)[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[3]。LPS是通过与内皮细胞作用进而制作肺损伤的经典药物,其本身的作用途径也比较复杂,推测可能与JAK表达有关。本研究观察LPS作用后鼠肺微血管内皮细胞(Lung microvascular endothelial cells, LMVEC)中JAK基因表达状况,以探讨JAK基因在急性肺损伤等肺部疾病中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

胶原酶I型,LPS,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

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970329);全军"十五"医学科研计划资助重点项目(01Z074);中国博士后科学基金资助项目(2001)
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:gsqian2002@yahoo.com.cn
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

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

大鼠肺微血管内皮细胞(Lung microvascular endothelial cells, LMVEC)系的培养, 采用贴块法, 见文献[4]。大鼠肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMC)系的培养和鉴定, 采用单纯胶原酶法, 见文献[5]。

1.3　细胞的复合培养和实验分组

采用套皿法进行复合培养, 即先将 PASMC 种植于滤膜上, PMVEC 培养在 6 孔板上, 然后将二者套接在一起[6]。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。加入不同浓度的 LPS(0.1、1、10、100 μg/ml)处理 PMVEC, 选择合适浓度 LPS 后再作用不同的时间。即随机分成以下各组: 正常组(N)、LPS 2 h 组(H2)、LPS 8 h 组(H8)和 LPS 16 h 组(H16)。

1.4　乳酸脱氢酶(LDH)活性的测定

收集各时相点细胞培养上清, 根据试剂盒的方法参考相关文献[7]进行测定。

1.5　逆转录 PCR

采用 Tripure 试剂一步法提取 LMVEC 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 JAK2 和 TYK2, 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, 66 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min, 进行 36 循环; TYK2 扩增条件为 94 ℃ 1 min, 55~68 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min, 进行 33~40 循环; HPRT 扩增条件为 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 进行 30 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。

1.6　统计学分析

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 程序进行 F 检验和 q 检验。

表 1　PCR 引物序列

Tab 1　Sequences of PCR primers

Primer	Upper sequence	Lower sequence	Length(bp)
JAK2	5′-AGT AGA GTT GTG ACC GTC CA-3′	5′-ACA AAG CCG AAA CCT CCT GT-3′	500
TYK2	5′-GCC GAC TAG ATT CTG TGG-3′	5′-GCC TCT CAA CCT CAG TCA-3′	904
HPRT	5′-GCT GGT GAA AAG GAC CTC TCG-3′	5′-GCA GAT GGC CAC AGG ACT AGA-3′	284

2　结果

2.1　不同剂量 LPS 对 PMVEC 的形态学影响

倒置显微镜下可见, LPS 1、10 μg/ml 作用 16 h、100 μg/ml 作用 8 h 细胞脱落或破裂, 见图 1; 100 ng/ml 作用 24 h 仍未见有细胞脱落或破裂。

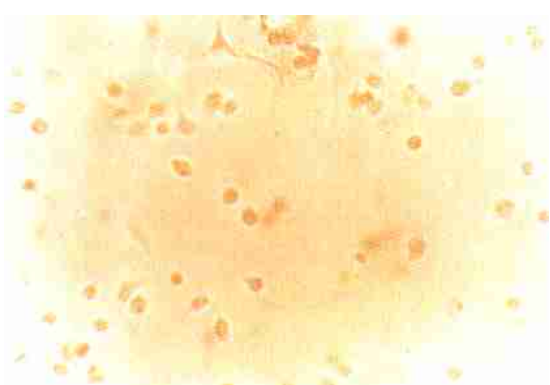


图 1　1 μg/ml LPS 作用 12 h 对 LMVEC 的倒置显微镜下形态学影响　(×200)

Fig 1　Morphology of LMVEC after treatment of 1 μg/ml LPS for 24 h under an inverted microscope　(×200)

2.2　LPS 诱导 PMVEC 损伤时 LDH 活性的变化

1 μg/ml LPS 作用 24 h, 培养液中的 LDH 较正常对照组显著增高 $P<0.05$; 8、16 h 两组无显著差异。见表 2。

表 2　LPS 对 PMVEC 培养液中 LDH 变化的影响($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Contents of lactate dehydrogenase in the supernatant of LMVEC after LPS treatment ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group	N	LPS
8 h	11.66±1.20	14.00±1.53
16 h	15.00±0.90	16.32±1.97
24 h	18.67±2.51	25.62±2.39*

*: $P<0.05$ *vs* N group

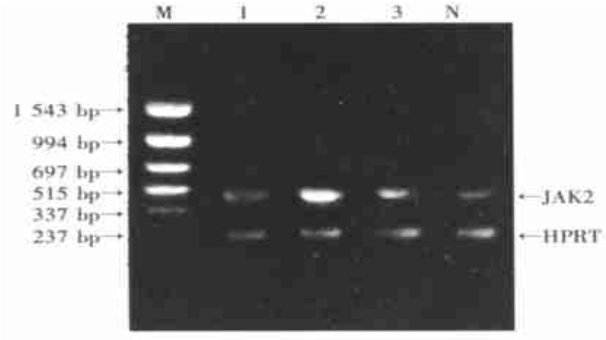
2.3　LPS 作用后复合培养的 PMVEC 中 JAK2 基因的表达状况

复合培养的 PASMC 在正常状况下表达 JAK2 基因, 目的片段长度 500 bp。1 μg/ml LPS 2 h 时表达(1.25±0.08)明显升高, LPS 8 h 时表达(1.75±0.12)至高峰, 16 h 时(1.16±0.09)有所降低, 仍明显高于正常水平(0.74±0.05)。见图 2。

2.4　LPS 作用对复合培养的 PMVEC 中 TYK2 基因的影响

RT-PCR 反复扩增, 更换退火条件(50~69 ℃)及其它条件, 比如改为 94 ℃ 2 min, 68 ℃ 5 min, 35 循环, 结果示, 无论 LPS 是否作用, 复合培养的 PMVEC 中无明确的 TYK2 基因表达。

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



M: PCR marker; 1—3: LMVFC treated by LPS for 16 8, and 2 h respectively; N: Normal control

图 2 脂多糖对 **LMVEC** 表达 **JAK2 mRNA** 的影响

Fig 2 Effect of lipopolysaccharide on JAK2 mRNA expression in cocultured LMVEC

3 讨论

LPS 是内毒素的主要组分，LPS 存在于革兰阴性菌细胞壁的外膜，由类脂 A、核心多糖和 O 特异链组成。通常，内毒素和脂多糖的概念相通。LPS 的主要表现在激活单核巨噬细胞系统，介导多种炎症因子的产生分泌。Ulevitch 等[9] 认为，LPS 介导的细胞激活依赖机体血浆中的脂多糖结合蛋白（LPS binding protein， LBP）、膜 CD14（Membrane CD14， mCD14 ）和可溶性 CD14（Soluble CD14， sCD14 ）。当 LPS 与 LBP 结合后，经转运与单核巨噬细胞表面 mCD14 结合，通过 MAPKKK→MAPKK→MAPK 信号转导，转录因子发生磷酸化，启动或调节相关基因转录，最终实现 LPS 诱导的细胞活化反应，产生相应的细胞因子等活性产物。也有研究显示，LPS 可以和 CD14 直接发生结合。还有研究显示，血浆中存在可溶性的 sCD14，也可以与 LPS-LBP 结合，增强细胞对 LPS 的反应性。LPS 除了通过上述受体介导作用以外，还可以在高浓度情况下，直接刺激巨噬细胞活化，诱导 TNF-α 产生，而不需要 LBP 或 CD14 存在，提示在巨噬细胞膜表面可能存在其它 LPS 受体[10] 。

LPS 的靶细胞除了单核巨噬细胞以外，还包括中性粒细胞、内皮细胞等效应细胞。采用两种细胞复合培养的方式使研究更接近在体状况，LPS 作用单一种细胞后损害更严重，而在正常的肺脏和血管是多种细胞的相互作用结果。1994 年，Beal[11] 提出 SIRS 的最终结局是导致多器官功能障碍综合征（Multiple organ dysfunction syndrome， MODS），机体由于过度的炎症反应引起脏器损伤，在肺脏表现为 ALI，加重以后发展成为急性呼吸窘迫综合征（Acute respiratory distress syndrome， ARDS）。我们研究发现在 LPS 作用后 MVEC 表达 JAK2 的 mRNA 水平明显升高。研究表明，10 mg/ml LPS 减少微血管内皮细胞间的传导力，蛋白质酪氨酸激酶抑制剂（1.5 mmol/L Tyr A 9 和 10 nmol/L PP-2）可以阻止该作用[12] 。儿茶酚胺类上调 LPS 诱导的人细胞中 IL-6 的产生，使 IL-6 mRNA 和蛋白质水平升高[13] 。在正常培养条件下，牛 MVEC 表达 Jak1、Jak2 和 Tyk2，而且可以磷酸化，VEGF 刺激后特异促进 Tyk2 和信号转导与转录活化因子（Signal transducers and activators of transcription， STAT ）6 的磷酸化作用。提示在牛 MVEC 的 VEGF 信号通道包括 Tyk2/Stat6 通道[14] 。而内毒素可以时间和剂量依赖方式促进内皮细胞表达 VEGF mRNA[15] 。说明，LPS 对 MVEC 的作用可能通过至少两种途径（IL-6 或/和 VEGF）或更多，进而激活 JAK 基因，再通过 STAT 等多种信号转导机制调节细胞的生理或病理状态。JAK2 表达升高有可能通过激活多种信号途径，参与 ALI、SIRS、MODS 及 ARDS 发病机制。研究 JAK 基因的调控，可能对 ALI 等疾病的防治有启示意义。

参考文献：

[1] 钱桂生. 全身炎症反应综合征、急性肺损伤与急性呼吸窘迫综合征[J]. 解放军医学杂志，1999，24(5)：313—316.

[2] 毛宝龄. 深入探讨全身炎症反应的失控与调控[J]. 中华内科杂志，1997，36(1)：3—4.

[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，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.

[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，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.

[7] Nagashima T，Wu S，Ikeda K，*et al*. The role of nitric oxide in reoxygenation injury of brain micro-vascular endothelial cells[J]. Acta Neurochir Suppl，2000，76(1)：471—473.

[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] Ulevitch R J，Tobias P S. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin[J]. Annu Rev Immunol，1995，13(1)：437—457.

[10] John M L. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome[J]. Crit Care Med，1998，26(2)：316—318

[11] Beal A L，Cerra F B. Multiple organ failure syndrome in the 1990s. Systemic inflammatory response and organ dysfunction[J]. JAMA，1994，271(3)：226—233.

[12] Tyml K，Wang X，Lidington D，*et al*. Lipopolysaccharide reduces intercellular coupling *in vitro* and arteriolar conducted response *in vivo*[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol，2001，281(3)：H1397—1400

[13] Gornikiewicz A，Sautner T，Brostjan C，*et al*. Catecholamines up-regulate lipopolysaccharide-induced IL-6 production in human microvascular endothelial cells[J]. FASEB J，2000，14(9)：1093—1100

[14] Enaida H，Kabuyama Y，Oshima Y，*et al*. VEGF-dependent signaling in retinal microvascular endothelial cells[J]. Fukushima J Med Sci，1999，45(2)：77—91.

[15] Marx P T，Mulder A B，Van Den Bergh F A，*et al*. Apoptosis inducers endotoxin and Fas-ligation enhance the expression of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells[J]. Endothelium，1999，6(4)：335—340.

（编辑 冷怀明）

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