

Janus 激酶/信号转导和转录激活因子 3 对重症急性胰腺炎大鼠肺泡 II 型上皮细胞损伤的体外作用研究

钟敦琛 赵晓晏 郝嘉 郭红

【摘要】 目的 探讨 Janus 激酶/信号转导和转录激活因子 3(JAK/STAT3)信号转导通路在重症急性胰腺炎(SAP)肺泡 II 型上皮细胞损伤中的作用。方法 用牛磺胆酸钠建立 SAP 大鼠模型,取血清备用。将经原代培养的肺泡 II 型上皮细胞随机分组,对照组加入不含 SAP 大鼠血清的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)培养液;SAP 组加入含 SAP 大鼠血清的 DMEM 培养液;SAP+AG490 组用 JAK 激酶抑制剂 AG490 预处理细胞,加入含 SAP 大鼠血清的 DMEM 培养液。用电泳迁移率改变分析法(EMSA)检测 STAT3 活化状态;逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 mRNA 表达;蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测蛋白水平;流式细胞技术检测肺泡表面活性物质相关蛋白 C(SP-C)表达和肺泡 II 型上皮细胞凋亡。结果 与对照组比较,SAP 组 STAT3 活性增强,STAT3 mRNA 和蛋白表达均增强,SP-C 蛋白表达下降(2 h SP-C 荧光指数 0.69 ± 0.02 比 1.02 ± 0.03 , $P < 0.01$),肺泡 II 型上皮细胞凋亡增加[(11.55 ± 1.10)%比(5.30 ± 0.36)%, $P < 0.05$];与 SAP 组比较,SAP+AG490 组 STAT3 活性减弱,STAT3 mRNA 和蛋白表达减弱,SP-C 蛋白表达下降(2 h SP-C 荧光指数 0.48 ± 0.10 比 0.69 ± 0.02 , $P < 0.01$),肺泡 II 型上皮细胞凋亡增加[(13.92 ± 0.82)%比(11.55 ± 1.10)%, $P < 0.05$]。结论 提示 JAK/STAT3 信号转导通路参与了 SAP 肺泡 II 型上皮细胞损伤的病理生理过程。

【关键词】 Janus 激酶/信号转导和转录激活因子 3; 胰腺炎,急性; 肺泡 II 型上皮细胞; 肺泡表面活性物质蛋白-C; 细胞凋亡

The role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 in injury of alveolar type II epithelial cells of rat with severe acute pancreatitis in vitro ZHONG Dun-jing*, ZHAO Xiao-yan, HAO Jia, GUO Hong. * Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China

Corresponding author: GUO Hong, Email: haojia2004@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To study the role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK/STAT3) in injury of alveolar type II epithelial cells (AT II) in severe acute pancreatitis (SAP). **Methods** The rat model of SAP was reproduced intraductal injection of sodium taurocholate. Serum was collected for examinations. AT II cells in primary culture were randomized to be treated with serum from rats with SAP (SAP group), or SAP serum + AG490 (JAK inhibitor, SAP + AG490 group), while the normal cell control was cultured with Dulbecco improved Eagle medium (DMEM). AT II cells were collected after the treatment to determine the activation of STAT3 by electrophoretic mobility shift assay (EMSA), STAT3 mRNA expression by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), STAT3 protein expression by Western blotting, surfactant protein C (SP-C) level in AT II and apoptosis of AT II with flow cytometry. **Results** Compared with control group, activation of STAT3 was enhanced in SAP group, and expression of STAT3 mRNA and protein was also enhanced, level of SP-C protein declined (2 hours SP-C fluorescence index 0.69 ± 0.02 vs. 1.02 ± 0.03 , $P < 0.01$), and apoptosis of AT II increased [(11.55 ± 1.10)% vs. (5.30 ± 0.36)%, $P < 0.05$]. Compared with SAP group, activation of STAT3 was attenuated in SAP + AG490 group, expression of STAT3 mRNA and protein was lowered, and level of SP-C protein declined (2 hours SP-C fluorescence index 0.48 ± 0.10 vs. 0.69 ± 0.02 , $P < 0.01$), and the apoptosis of AT II increased [(13.92 ± 0.82)% vs. (11.55 ± 1.10)%, $P < 0.05$]. **Conclusion** The results suggest that JAK/STAT3 pathway might be involved in the pathogenesis of injury to AT II in SAP.

【Key words】 Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3; acute pancreatitis; alveolar type II epithelial cell; surfactant protein C; apoptosis

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.02.016

基金项目:重庆市自然科学基金项目(2006BB5358)

作者单位:400037 重庆,第三军医大学附属新桥医院消化内科
(钟敦琛、赵晓晏、郭红),心血管外科(郝嘉)

通信作者:郭红,Email:haojia2004@yahoo.com.cn

重症急性胰腺炎(SAP)发病凶险,病死率居高不下,超过 50%,肺是最早被累及的器官,在发病 1 周内死亡者多是由于急性胰腺炎相关肺损伤(APALI)导致的^[1]。近年来,随着对不同刺激因素

导致急性肺损伤的研究日益加深,发现 Janus 激酶/信号转导和转录激活因子 3(JAK/STAT3)信号转导通路在各种不同原因导致的急性肺损伤中起重要作用,其通过核内转录作用,以发挥多种生物学效应,进而影响一系列炎症性病理生理过程^[2]。肺泡Ⅱ型上皮细胞是肺泡表面一类重要的细胞群体,其能合成和分泌肺表面活性物质相关蛋白 C(SP-C)。SP-C 是肺泡Ⅱ型上皮细胞的分化标志物,其在基因和蛋白水平表达异常可以引起肺脏功能异常,引发相关疾病^[3-4]。研究显示 STAT3 能促进肺表面活性物质蛋白的分泌,从而保证肺泡的稳定性^[5]。但在 SAP 导致的肺损伤时,该通路的变化及其与炎症的发生发展仍不清楚。本实验中我们采用牛磺胆酸钠建立大鼠 SAP 模型,用其血清作用于肺泡Ⅱ型上皮细胞,对此进行初步探讨,报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备:健康成年 SD 大鼠,体重 200~300 g,雌雄不限(由第三军医大学实验动物中心提供),参照文献^[6]方法制备 SAP 大鼠模型,2 h 后取静脉血备用。以大鼠腹腔及胸腔出现血性积液为标准定为 SAP,并取胰腺组织行苏木素-伊红(HE)染色后镜下观察证实。取 SAP 大鼠血清备实验用。

1.2 原代培养正常大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞及实验分组:参照文献^[7]方法原代培养大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞。按随机数字表法分组:①对照组:加不含 SAP 大鼠血清的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)培养液;②SAP 组:加含 SAP 大鼠血清的 DMEM 培养液;③SAP+AG490 组:用 JAK 激酶抑制剂 AG490 预处理细胞(终浓度为 30 mg/L),加含 SAP 大鼠血清的 DMEM 培养液。

1.3 STAT3 活性检测:采用电泳迁移率改变分析法(EMSA)进行实验。用生物素 3'末端标记法将选取核苷酸序列为 5'-GATCCTTCTGGGAATTCCTAGATC-3', 5'-GATCCTTCTGGGAATTCCTAGATC-3'(北京奥科公司合成)的 STAT3 探针进行标记。将 10 μg 细胞核提取的蛋白与生物素标记探针在 20 μl 缓冲液中充分结合,非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),用毛吸转移法转移至带正电荷的尼龙膜上,紫外线交联 15 min。生物素标记的探针与辣根过氧化物酶(HRP)标记的亲和本素相结合,用化学发光记录结果,Alpha Imager 2200 图像分析系统测定杂交带的吸光度(A)值。

1.4 STAT3 mRNA 表达测定:采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR),将收获的细胞提取总 RNA

(按说明书要求),用紫外分光光度计定量,取总 RNA 10 μg 逆转录为 cDNA,引物序列:STAT3 上游引物 5'-TTGCCAGTTGTGGTGATC-3',下游引物 5'-AGACCCAGAAGGAGCCGC-3';内参照 β-肌动蛋白(β-actin)上游引物 5'-AAGTACTCCGTGTGGATCGG-3';下游引物 5'-ATGCTATCACC TCCCCTGTG-3'(北京奥科公司合成)。PCR 条件:94 ℃ 3 min,94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,72 ℃ 5 min,30 个循环,25 μl 体系,PCR 扩增产物大小为 125 bp,凝胶电泳,溴化乙锭(EB)染色,应用天能 Gis 凝胶成像系统分析,PCR 产物量以 A/面积表示,以 STAT3 产物量/β-actin 产物量的比值为最终结果。实验重复 3 次。

1.5 STAT3 蛋白表达测定:采用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测。提取细胞蛋白(按试剂盒说明书)。BCA 蛋白浓度检测试剂盒测定总蛋白量。每孔加样量为 20 μg,将上样缓冲液加入所制备的样本中,混匀,煮 5 min,离心 10 min,等量上样,于十二烷基硫酸钠(SDS)-PAGE 后,用电转移法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,用新配制的含 3%脱脂奶粉的磷酸盐缓冲液(PBS)封闭,加 STAT3 鼠单克隆抗体(1:1 000)及抗磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH,1:500)抗体,一抗在新配制的含 3%脱脂奶粉的 PBS 中稀释,4 ℃反应过夜。将膜再用 PBS 洗涤 3 次,加 HRP 标记的二抗(山羊抗兔 IgG)孵育,用化学发光法记录结果。Alpha Imager 2200 图像分析系统测定杂交带的 A 值。

1.6 肺泡Ⅱ型上皮细胞 SP-C 表达测定:采用流式细胞技术检测。取 40 μl 细胞悬液加入预先有 SP-C 单克隆抗体(10 μl)的离心管,再加 50 μl[1:20,用 Dulbecco PBS 缓冲液(DPBS)稀释]灭活正常兔血清,4 ℃孵育 30 min,洗涤液洗 2 次,离心 5 min,弃上清液,加入 50 μl 工作浓度的羊抗鼠荧光标记 IgG,充分振荡,4 ℃孵育 30 min,洗涤液洗 2 次,离心 5 min,加 1 ml 固定液,Epics-XL 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)检测 SP-C 蛋白表达;应用 Muticycle AV 软件进行数据分析,以蛋白荧光指数(FI)表示 SP-C 蛋白表达量。

1.7 肺泡Ⅱ型上皮细胞凋亡检测:用流式细胞技术检测。收获细胞用冷的 0.01 mol/L PBS 0.5 ml 洗 3 次,加入体积分数为 75%的冷乙醇固定后(-20 ℃冰箱保存待测),离心 5 min,弃上清液,PBS 洗 2 次,加 RN 酶 100 mg/L 孵育 20 min,加碘化丙啶(PI)染色避光孵育 30 min,上流式细胞仪于波长 488 nm

处检测 PI 荧光强度,资料用 Multicycle AV 细胞周期(包括 G1、G0/G1、S、G2/M)分析。

1.8 统计学处理:用 SPSS 13.0 统计软件处理分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析和 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 STAT3 蛋白 DNA 结合活性水平(图 1):与对照组比较,SAP 组 STAT3 活性增强;SAP+AG490 组 STAT3 活性较 SAP 组减弱。

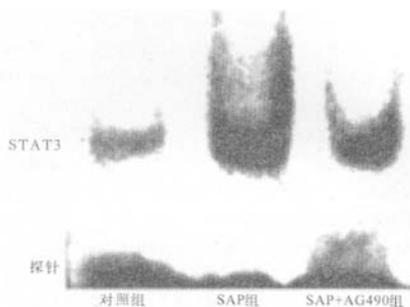


图 1 EMSA 检测各组大鼠 STAT3 蛋白 DNA 结合活性

2.2 各组 STAT3 mRNA 表达(图 2):与对照组比较,SAP 组 STAT3 mRNA 表达增强;与 SAP 组比较,SAP+AG490 组 STAT3 mRNA 表达减弱。

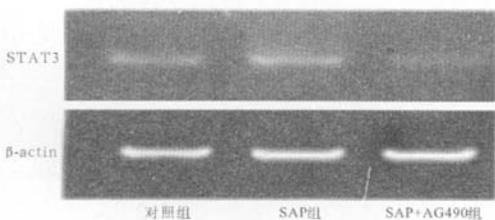


图 2 各组大鼠 STAT3 mRNA 表达

2.3 各组 STAT3 蛋白表达(图 3):与对照组比较,SAP 组 STAT3 蛋白表达增强;与 SAP 组比较,SAP+AG490 组 STAT3 蛋白表达减弱。

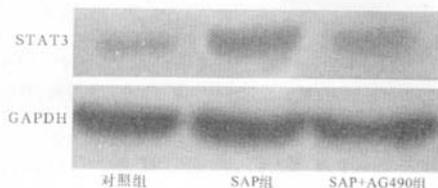


图 3 各组大鼠 STAT3 蛋白表达

2.4 各组 SP-C 蛋白表达(表 1):与对照组比较,SAP 组 SP-C 蛋白表达下降($P < 0.01$);与 SAP 组比较,SP-C 蛋白表达下降($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠肺泡 II 型上皮细胞培养不同时间点 SP-C 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	SP-C 蛋白表达(FI)		
	0.5 h	1 h	2 h
对照组	1.01±0.06	0.98±0.14	1.02±0.03
SAP 组	0.99±0.08	0.92±0.16	0.69±0.02 ^b
SAP+AG490 组	0.87±0.12	0.83±0.08	0.48±0.01 ^d

注:与对照组比较,^b $P < 0.01$;与 SAP 组比较,^d $P < 0.01$

2.5 肺泡 II 型上皮细胞凋亡检测(表 2):与对照组比较,G1 期时 SAP 组肺泡 II 型上皮细胞凋亡增加($P < 0.05$);与 SAP 组比较,G1 期时 SAP+AG490 组肺泡 II 型上皮细胞凋亡增加($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠肺泡 II 型上皮细胞不同细胞周期的凋亡率比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	不同细胞周期的凋亡率(%)			
	G1	G0/G1	S	G2/M
对照组	5.30±0.36	57.50±2.56	26.20±1.32	17.30±1.21
SAP 组	11.55±1.10 ^a	65.70±2.65	25.40±1.98	8.90±1.01
SAP+AG490 组	13.92±0.82 ^b	66.03±1.35	21.32±1.63	8.10±0.28

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 SAP 比较,^b $P < 0.05$

3 讨论

STAT3 是 STAT 家族的重要成员,广泛表达于多种类型的细胞和组织中,可以被 JAKs 激酶活化,是通过酪氨酸磷酸化实现的。STAT3 也可以被许多细胞因子活化,如白细胞介素-6(IL-6)、肝细胞生长因子、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)等。STAT3 作为主要的信号通路调控着细胞的增殖、凋亡、炎症等重要的生理功能和病理过程^[8-10]。Gao 等^[11]在建立的 IgG 免疫复合物诱导的肺损伤中发现,STAT3 在肺泡巨噬细胞和全肺有 IgG 免疫复合物的组织中均有激活,但是有不同的时间窗;STAT3 的激活依赖巨噬细胞和中性粒细胞,而且 STAT3 在有炎症反应的肺脏中激活是通过 IL-6、IL-10 和 C5a 来实现的。在 APALI 的初步研究中发现,STAT3 在蛙皮素作用后 6 h 即被激活,并继而出现肺损伤表现^[12]。但是其活化后如何影响急性肺损伤的炎症过程,均未能得到阐明。我们在实验中用 SAP 大鼠血清作用于肺泡 II 型上皮细胞,也发现 STAT3 在该细胞中能被激活,而且还表现出与 DNA 结合较强的活性,其 mRNA 和蛋白表达均明显增强,而且在使用 AG490 预处理的细胞中加入含 SAP 大鼠血清的正常肺泡 II 型上皮细胞,STAT3 蛋白活性及 mRNA 和蛋白表达均被明显抑制。说明

JAK/STAT3 通路参与了 SAP 肺损伤中肺泡 II 型上皮细胞的损伤过程。

肺表面活性物质主要由脂质和蛋白质组成,具有降低肺泡气液界面表面张力,调节气道内液体平衡等功能,其中 SP 蛋白发挥着重要的作用。SP 主要分为 A、B、C 和 D 4 种。SP-C 是由肺泡 II 型上皮细胞分泌的重要的表面活性蛋白质,在肺组织中只由肺泡 II 型上皮细胞合成和分泌。SP-C 的主要功能是与磷脂构成肺表面活性物质黏附于肺泡腔表面,形成气-液交换界面,在呼吸时减少肺表面张力。研究发现 SP-C 只存在于肺泡 II 型上皮细胞,是肺泡 II 型上皮细胞特异的分化标志物,其表达水平能较好地反映肺泡 II 型上皮细胞的功能^[13-14]。本研究中发现,用 SAP 大鼠血清作用于肺泡 II 型上皮细胞 2 h 后,SP-C 水平下降明显,表明在 SAP 时炎症反应导致肺泡 II 型上皮细胞的功能受损;而且在用 AG490 预处理细胞中加入含 SAP 大鼠血清的正常肺泡 II 型上皮细胞中,SP-C 水平更是显著下降,这表明 JAK/STAT3 通路可能有维持肺泡 II 型上皮细胞合成和分泌 SP-C 的功能。但具体的作用和机制需要更多的研究来证实。

我们在实验中发现,在用 AG490 预处理细胞中加入含 SAP 大鼠血清的正常肺泡 II 型上皮细胞中其细胞凋亡明显增加。既往研究发现,STAT3 通路的活化在肺成纤维细胞、肺血管内皮细胞有抗凋亡的作用,它是通过上调抗凋亡基因 bcl-2 的表达和下调促凋亡基因 bax 来对抗凋亡^[15-16]。因此我们可以推断,在 SAP 的肺泡 II 型上皮细胞中,JAK/STAT3 的活化可抑制肺泡 II 型上皮细胞的凋亡。

综上所述,在 SAP 急性肺损伤的过程中,尽管损伤作用明显,但同时也启动了自身保护性通路 JAK/STAT3 通路,它不仅具有维持肺泡 II 型上皮细胞合成和分泌 SP-C,进而维持肺泡稳定的作用,同时还起到一定的抗凋亡作用,从而对肺组织起到保护作用。这也为今后的科研和临床研究 SAP 急性肺损伤提供了一条新的思路,但是许多具体的作用和机制仍未清楚,需要更多的研究证实。

参考文献

- [1] 胡文伟,刘庆森.急性重症胰腺炎并发急性肺损伤的临床研究.中国误诊学杂志,2008(2):253-254.
- [2] Severgnini M, Takahashi S, Rozo LM, et al. Activation of the STAT pathway in acute lung injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 286(6):L1282-1292.
- [3] Erpenbeck VJ, Schmidt R, Günther A, et al. Surfactant protein levels in bronchoalveolar lavage after segmental allergen challenge in patients with asthma. Allergy, 2006, 61(5):598-604.
- [4] Alzina de Aguilar V, Gaboli M, Bastero P, et al. Neonatal respiratory failure associated with mutation in the surfactant protein C gene. An Pediatr (Barc), 2005, 62(3):210-214.
- [5] Yang L, Lian X, Cowen A, et al. Synergy between signal transducer and activator of transcription 3 and retinoic acid receptor-alpha in regulation of the surfactant protein B gene in the lung. Mol Endocrinol, 2004, 18(6):1520-1532.
- [6] 柏健鹰,郭红,赵晓晏.大鼠重症急性性胰腺炎过程中 UTI 抑制 IL-6 表达的研究.第三军医大学学报,2003,25(12):1076-1078.
- [7] 郝嘉,李永旺,肖颖彬.大鼠肺泡 II 型上皮细胞体外培养和鉴定.第三军医大学学报,2000,22(5):500-501.
- [8] Aaronson DS, Horvath CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. Science, 2002, 296(5573):1653-1655.
- [9] 张勉之,赵松,段建召,等.JAK/STAT 信号转导途径在糖尿病肾病肾小管上皮细胞中的表达.中国中西医结合急救杂志,2007,(5):309-312.
- [10] 李红云,姚咏明,姚胜,等.JAK/STAT 通路对烫伤脓毒症大鼠 Toll 样受体基因表达的调节作用.中国危重病急救医学,2003,15(3):139-142.
- [11] Gao H, Guo RF, Speyer CL, et al. STAT3 activation in acute lung injury. J Immunol, 2004, 172(12):7703-7712.
- [12] Horvath CM. The JAK-STAT pathway stimulated by interleukin-6. Sci STKE, 2004, 2004(260):tr9.
- [13] Mason RJ, Kalina M, Nielsen LD, et al. Surfactant protein C expression in urethane-induced murine pulmonary tumors. Am J Pathol, 2000, 156(1):175-182.
- [14] Seifart C, Clostermann U, Seifart U, et al. Cell-specific modulation of surfactant proteins by ambroxol treatment. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 203(1):27-35.
- [15] Moodley YP, Misso NL, Scaffidi AK, et al. Inverse effects of interleukin-6 on apoptosis of fibroblasts from pulmonary fibrosis and normal lungs. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003, 29(4):490-498.
- [16] Waxman AB, Mahboubi K, Knichelbein RG, et al. Interleukin-11 and interleukin-6 protect cultured human endothelial cells from H₂O₂-induced cell death. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003, 29(4):513-522.

(收稿日期:2008-07-03 修回日期:2009-01-02)

(本文编辑:李银平)

欢迎订阅《中国中西医结合急救杂志》

中文核心期刊 中国科技论文统计源期刊 中国精品科技期刊

全国各地邮局订阅,邮发代号:6-93,定价:每期9元,全年54元

2009年以前的刊物可在本刊社邮购部购买,电话:022-23042150