

siRNA 沉默 JAK/STAT 相关基因对 COPD 大鼠肺泡上皮细胞的影响*

史秋香¹, 王成阳², 吴艳峰³

(1. 吉林省消防总队医院, 吉林 长春 130000; 2. 安徽医科大学第一附属医院 呼吸科, 安徽 合肥 230001; 3. 吉林大学白求恩第二医院 呼吸与危重症医学科, 吉林 长春 130000)

[摘要] 目的: 观察 JAK/STAT 基因表达对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠肺泡上皮细胞增殖和炎症反应的影响。方法: 实验分为对照组、模型组及实验组, 提取正常肺泡上皮细胞作为对照组, 构建 COPD 大鼠模型, 提取肺泡上皮细胞作为模型组, 实验组在模型组基础上利用 siRNA 体外沉默肺泡上皮细胞 JAK2/STAT3 基因转录, 24 h 后利用 Western blot 法检测细胞内 JAK2 和 STAT3 mRNA 和蛋白表达变化, MTT 法检测肺泡上皮细胞增殖情况, ELISA 法检测炎症因子 TNF- α 及 IL-1 β 表达。结果: 与对照组比较, 模型组与实验组肺泡上皮细胞 p-JAK2 和 p-STAT3 基因及蛋白表达升高, 细胞增殖能力降低, TNF- α 及 IL-1 β 表达上调($P < 0.05$); 与模型组比较, 实验组肺泡上皮细胞 p-JAK2 和 p-STAT3 基因及蛋白表达降低, 细胞增殖能力提高, TNF- α 及 IL-1 β 表达下调($P < 0.05$)。结论: 阻断 JAK/STAT 信号通路可促进 COPD 模型大鼠肺泡上皮细胞增殖, 抑制炎症反应, 从而发挥保护作用。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病; JAK/STAT 信号通路; 炎症反应; 大鼠, Sprague-Dawley

[中图分类号] R34-33; R5639 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)10-1148-05

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.10.007

Effects of siRNA Silenced JAK/STAT Relevant Gene on Alveolar Epithelial Cells of COPD Rats

SHI Qiuxiang¹, WANG Chengyang², WU Yanfeng³

(1. Jilin Provincial Fire Brigade Hospital, Changchun 130000, Jilin, China; 2. Department of Respiratory, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui, China; 3. Department of respiratory and critical care medicine, the Second Bethune Hospital of Jilin University, Changchun 130000, Jilin, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of JAK/STAT gene expression on the proliferation and inflammatory response of alveolar epithelial cells in COPD rats. **Methods:** The rat model of COPD was constructed, the alveolar epithelial cells were extracted and siRNA was used to silence COPD model alveolar epithelial cell gene transcription. After 24 h, Western blot and RT-PCR were adopted to detect mRNA and protein expression of JAK/STAT3 and ELISA method was used to detect the inflammatory factor TNF alpha, IL-1 beta expression. **Results:** The proliferation capacity of alveolar epithelial cells increased after blocking the JAK/STAT3 signaling pathway in the COPD model($P < 0.05$). RT-PCR method result showed that mRNA expression of JAK/STAT3 was inhibited after blocking the JAK/STAT3 signaling pathway and Western blot result also showed that p-JAK2 and p-ATST3 protein expression were inhibited($P < 0.05$). Simultaneously, the content of TNF- α and IL-1 β were down-regulated after blocking JAK/STAT signal pathway($P < 0.05$). **Conclusion:** Blocking the JAK/STAT signaling pathway may enhance the proliferation of alveolar epithelial cells in the COPD model, inhibit in-

*[基金项目] 国家自然科学基金(81573942)

网络出版时间: 2016-10-17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20161017.1445.042.html>

flammatory response, and thus play a protective role.
[**Key words**] chronic obstructive pulmonary disease; JAK/STAT signal pathway; inflammation; rats, Sprague-Dawley

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是我国中老年人最为常见的临床呼吸系统疾病,是由多种炎症因子参与的呼吸道、肺实质以及肺血管的慢性病变^[1]。JAK 激酶(janus activated kinase)是在细胞因子信号传递过程中起重要作用的非受体酪氨酸激酶之一。JAK 激酶可以在细胞因子受体与相应配基结合后活化,激活其下游信号蛋白分子——信号转导和转录激活因子(signal transducer activator of transcription, STAT),进行信号传递。近年来的研究发现 JAK/STAT 信号通路与细胞增殖、分化关系十分密切^[2],它的激活能介导炎性细胞因子大量积聚,促进 COPD 炎症反应复发,导致呼吸道、肺组织以及肺血管的损伤,并产生一系列呼吸系统的临床症状^[3]。本研究拟通过体外沉默 COPD 肺泡上皮细胞 JAK/STAT 信号通路,探讨对 COPD 肺泡上皮细胞增殖能力以及炎症反应的影响,为 COPD 的治疗寻找新的方向。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

健康清洁雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠 30 只(用于提取肺泡上皮细胞),体质量 250 ~ 270 g,由四川大学医学院实验动物中心提供; Lipofectamine 3000(thermo fisher scientific); 大鼠 TNF- α 、IL-1 β Elisa 试剂盒(上海歌凡); 1% 戊巴比妥, 10% 多聚甲醛、0.9% 氯化钠溶液(天津科密欧); 抗大鼠 p-JAK2 和 p-STAT3 单克隆抗体, DAB 显色试剂盒(Santa Cruz 公司,美国)。

1.2 COPD 大鼠模型制备

制备 COPD 大鼠模型参照文献[4]。利用香烟暴露法制作大鼠 COPD 模型, 1 ~ 8 周开始每天给予 200 L 密闭烟雾进入,并维持 4 周。实验动物连续 12 周暴露于烟雾中。依据症状、肺功能等确定模型成功与否。

1.3 细胞的提取和实验分组

参考文献[5],利用离心法和贴壁法获取大鼠肺泡上皮细胞。将大鼠肺泡上皮细胞分为对照组、模型组和实验组。正常对照组为正常的大鼠肺泡

上皮细胞,模型组为 COPD 模型大鼠的肺泡上皮细胞,实验组为 siRNA 干预后的 COPD 模型大鼠肺泡上皮细胞。实验组 siRNA 干预参考 Lipofectamine 3000 说明书,将 JAK/STAT-siRNA 转染 COPD 模型大鼠肺泡上皮细胞,转染 24 h 后,收集细胞用于后续研究。

1.4 JAK2 和 STAT3 基因表达检测

采用 RT-PCR 检测,利用 TRIzol 法提取各组细胞中的总 RNA,并按照逆转录试剂盒说明书进行操作,将提取的 RNA 逆转录为 cDNA,并放置在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用,参照 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒说明书进行 RT-PCR,以 GAPDH 作为实验内参,引物序列如表 1。

表 1 目的基因引物序列
Tab. 1 Target gene primer sequences

基因	引物序列	产物(bp)
JAK2	上游 5'-GCTAAGGAGAAGGACCAGAC-3'	257
	下游 5'-TGACTGAACTGCTGAATGAAC-3'	
STAT3	上游 5'-GTCAGATGCCAAATGC-3'	154
	下游 5'-TGATGTACCCCTTCGTTTC-3'	
GAPDH	上游 5'-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3'	252
	下游 5'-TTTGAGGCTGCAGCGAACTT-3'	

1.5 细胞增殖率检测

采用 MTT 法,将各组细胞制成密度为 $1.0 \times 10^4/\text{L}$ 细胞悬液,按照每孔 100 μL 接种于 96 孔板中,培养 24 h 后加入 MTT 试剂混匀后,向各组细胞内加入 100 μL 二甲基亚砷(DMSO),在波长为 460 nm 的酶标仪上检测吸光度值(OD 值)。

1.6 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达检测

采用 Western blot 法检测,细胞贴壁培养 24 h 后将各组细胞取出,充分研磨,3 mL/g 蛋白裂解液充分裂解后,以 10 000 r/min 离心 40 min。BCA 法测定总蛋白浓度后进行 SDS-PAGE 蛋白电泳、转膜、封闭、一抗(p-JAK2 和 p-STAT3 单克隆抗体)孵育过夜,二抗以 1:5 000 孵育 2.5 h,加入显色剂显色后,凝胶成像系统成像,Image J 软件计算灰度值,以 GAPDH 作为内参。相对灰度值 = (所测蛋白灰度值/内参 GAPDH 灰度值) $\times 100\%$ 。

1.7 TNF- α 、IL-1 β 炎症因子表达检测

利用 ELISA 法,转染 24 h 后将各组细胞取出,

标准稀释液进行稀释,按照 ELISA 试剂盒说明书操作,用酶标仪检测波长 450 nm 处的 OD 值,计算 TNF- α 、IL-1 β 活性。

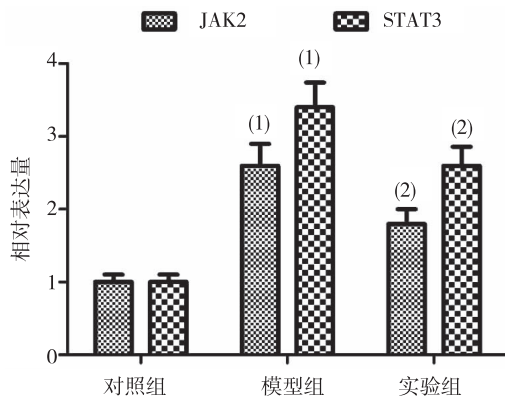
1.8 统计学分析

数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,数据比较采用配对组间单因素方差分析,两两比较采用 t 检验,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 JAK2 和 STAT3 基因在在大鼠肺泡上皮细胞中的表达

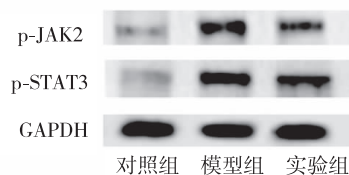
模型组 COPD 大鼠肺泡上皮细胞 p -JAK2 和 p -STAT3 mRNA 表达较对照组显著提高 ($P < 0.05$),而实验组 siRNA 沉默 JAK/STAT 信号通路后 p -JAK2 和 p -STAT3 mRNA 表达较模型组有显著下调,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。



⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与模型组比较, $P < 0.05$

图 1 各组细胞 p -JAK2 和 p -STAT3 mRNA 表达情况

Fig. 1 Expression of p -JAK2 and p -STAT3 mRNA gene in each group



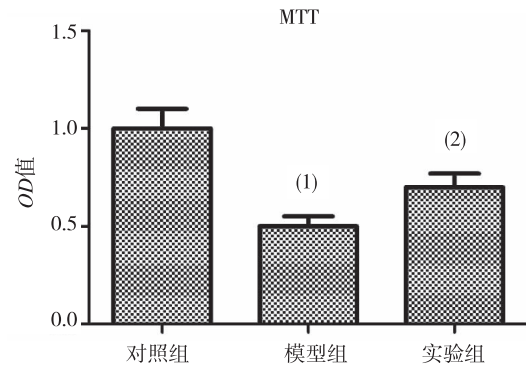
⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与模型组比较, $P < 0.05$

图 3 各组细胞 p -JAK2 和 p -STAT3 蛋白表达

Fig. 3 Protein expression of p -JAK2 and p -STAT3

2.2 siRNA 干扰对 COPD 大鼠肺泡上皮细胞增殖的影响

模型组细胞增殖率较对照组显著下降 ($P < 0.05$),而实验组 siRNA 沉默 JAK/STAT 信号通路后,细胞增殖率有所上调,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。



⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与模型组比较, $P < 0.05$

图 2 siRNA 干扰对 COPD 大鼠肺泡上皮细胞增殖的影响

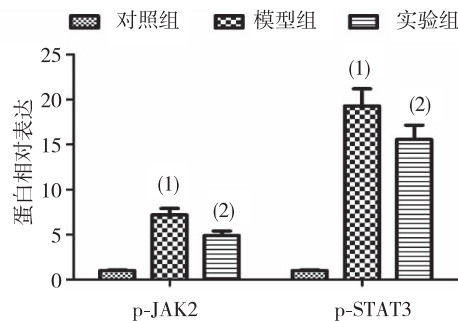
Fig. 2 Effect of siRNA interference on the proliferation of alveolar epithelial cells in COPD rats

2.3 siRNA 干扰对 p -JAK2 和 p -STAT3 蛋白表达的影响

模型组 p -JAK2 和 p -STAT3 蛋白表达较对照组显著提高 ($P < 0.05$),而实验组 siRNA 沉默 JAK/STAT 信号通路后, p -JAK2 和 p -STAT3 蛋白表达显著降低,与模型组比较,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 siRNA 干扰对 TNF- α 和 IL-1 β 的影响

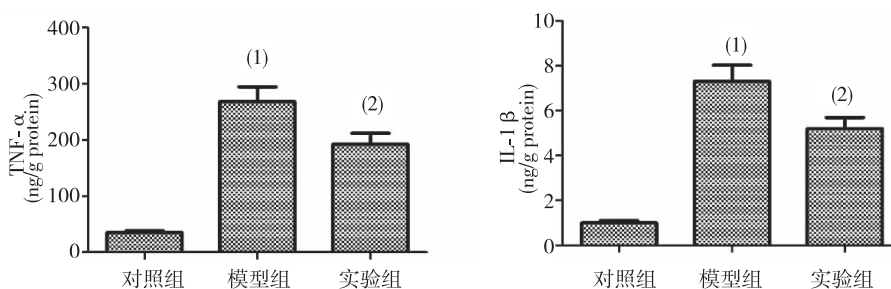
模型组 TNF- α 和 IL-1 β 含量表达较对照组显著提高 ($P < 0.05$),而实验组 siRNA 沉默 JAK/STAT 信号通路后 TNF- α 和 IL-1 β 含量显著降低,与模型组比较,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。



⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与模型组比较, $P < 0.05$

图 3 各组细胞 p -JAK2 和 p -STAT3 蛋白表达

Fig. 3 Protein expression of p -JAK2 and p -STAT3



⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与模型组比较, $P < 0.05$

图4 各组细胞炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 表达

Fig. 4 Expression of inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β in each group by ELISA

3 讨论

COPD 是以持续性气流受限为临床特点的呼吸系统疾病,研究证实 COPD 患者气流受限程度与机体内慢性炎症反应程度密切相关^[1,6]。中性粒细胞(neutrophils)、巨噬细胞(macrophages)等多种炎症细胞在 COPD 发生时可释放的炎症趋化因子(inflammatory chemokines)和炎症因子。

JAK/STAT 信号通路参与了细胞的增殖与分化、凋亡及炎症等多种病理生理学过程^[7]。JAK/STAT 通路主要由 JAK 和 STAT 构成,JAK 激酶是一种非受体型酪氨酸激酶,STAT 是 JAK 信号的转导子和转录激活子,机体内细胞因子与 STAT 受体结合后,可诱导并激活 JAK 激酶,使磷酸化的 STAT 与激活后的 JAK 激酶形成二聚体^[8]。在 JAK/STAT 信号通路中,细胞因子由胞膜向核内进行信号传递,发挥负性调控作用,调节 JAK/STAT 通路的活化^[9]。有研究报道,大鼠肺部感染的肺泡上皮细胞 p-JAK2、p-STAT1 及 p-STAT3 均高表达,同时上调血清中 TNF- α 的表达,说明通过抑制 JAK/STAT 信号转导通路可下调其介导的炎症损伤^[10]。研究还发现,IL-6 可介导 JAK/STAT 信号通路而引起 JAK 的活化,对炎症反应以及免疫应答产生调节作用^[11]。IL-6 还可使肺泡上皮细胞中 STAT1、STAT3 蛋白磷酸化,参与机体的炎症反应^[12-13]。而另有研究表明,STAT3 基因的过度表达可加重肺气肿或呼吸道炎症的程度^[14]。肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 是一种具有诱导细胞炎症反应以及凋亡、坏死等多种病理生理机制的细胞因子,体内主要由单核巨噬细胞分泌^[15],有研究显示 TNF- α 与 COPD 的炎症反应、肺组织凋亡蛋白表达增高等病理生理过程^[16]。另有研究表明,营养不

良骨骼肌萎缩 COPD 患者与体内细胞因子 TNF- α 代谢紊乱密切相关^[17]。白介素 1 β (IL-1 β) 是炎症介质的一种,在体内能激活巨噬细胞分泌炎症因子,在肺组织内可引起以中性粒细胞以及巨噬细胞浸润并引发特异性炎症反应^[18]。有研究发现,在抗激素型 COPD 模型中抑制 JAK2/STAT1 蛋白表达较泼尼松治疗效果更好,提示抑制 JAK/STAT 信号通路可更好的应用在在激素抵抗型 COPD 的治疗中^[19]。

本实验通过研究发现,siRNA 沉默 JAK/STAT 信号通路后 COPD 大鼠肺泡上皮细胞 p-JAK2 和 p-STAT3 mRNA 及蛋白表达显著降低,提示 JAK/STAT 信号通路可能是 COPD 治疗的新方向。

4 参考文献

- [1] Marks Konczalik J, Costa M, Robertson J, et al. A post-hoc subgroup analysis of data from a six month clinical trial comparing the efficacy and safety of losmapimod in moderate-severe COPD patients with $\leq 2\%$ and $> 2\%$ blood eosinophils[J]. *Respir Med*, 2015(7):860-869.
- [2] Zhong Y, Chen B, Feng J, et al. The associations of Janus kinase-2 (JAK2) A830G polymorphism and the treatment outcomes in patients with acute myeloid leukemia[J]. *Leuk Lymphoma*, 2010(6):1115-1120.
- [3] Higham A, Booth G, Lea S, et al. The effects of corticosteroids on COPD lung macrophages: a pooled analysis[J]. *Respir Res*, 2015(1):98.
- [4] Dumas de La Roque E, Savineau JP, Metivier AC, et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA) improves pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a pilot study[J]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2012(1):20-25.
- [5] Hall SE, Lim S, Witherden IR, et al. Lung type II cell and macrophage annexin I release: differential effects of

- two glucocorticoids[J]. Am J Physiol, 1999(2):114 - 121.
- [6] Narsingam S, Bozarth AL, Abdeljalil A. Updates in the management of stable chronic obstructive pulmonary disease[J]. Postgrad Med, 2015(7):758 - 770.
- [7] Jenkins BJ. Transcriptional regulation of pattern recognition receptors by Jak/STAT signaling, and the implications for disease pathogenesis[J]. J Interferon Cytokine Res, 2014(10):750 - 758.
- [8] Amoyel M, Anderson AM, Bach EA. JAK/STAT pathway dysregulation in tumors: a Drosophila perspective[J]. Semin Cell Dev Biol, 2014(1):96 - 103.
- [9] Uren RT, Turnley AM. Regulation of neurotrophin receptor (Trk) signaling: suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) is a new player[J]. Front Mol Neurosci, 2014(1):39.
- [10] Song CG, Yang X, Min LQ, et al. The effect of procyanidin on expression of STAT1 in type 2 diabetes mellitus SD rats with focal cerebral ischemia[J]. Neuro Endocrinol Lett, 2014(1):68 - 72.
- [11] Kolosenko I, Grandner D, Tamm KP. IL-6 activated JAK/STAT3 pathway and sensitivity to Hsp90 inhibitors in multiple myeloma[J]. Curr Med Chem, 2014(26):3042 - 3047.
- [12] Chen Q, Giedt M, Tang L, et al. Tools and methods for studying the drosophila JAK/STAT pathway[J]. Methods, 2014(1):160 - 172.
- [13] Lesina M, Wörmann SM, Neuhöfer P, et al. Interleukin-6 in inflammatory and malignant diseases of the pancreas[J]. Semin Immunol, 2014(1):80 - 87.
- [14] Burgel PR, Paillasseur JL, Roche N. Identification of clinical phenotypes using cluster analyses in COPD patients with multiple comorbidities[J]. Biomed Res Int, 2014(14):420134.
- [15] Sina M, Farajzadeh D, Dastmalchi S. Effects of environmental factors on soluble expression of a humanized Anti-TNF- α scFv antibody in escherichia coli[J]. Adv Pharm Bull, 2015(4):455 - 461.
- [16] Shaw JG, Vaughan A, Dent AG, et al. Biomarkers of progression of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [J]. J Thorac Dis, 2014(11):1532 - 1547.
- [17] Londhe P, Guttridge DC. Inflammation induced loss of skeletal muscle[J]. Bone, 2015(1):131 - 142.
- [18] Caramori G, Adcock IM, Di Stefano A, et al. Cytokine inhibition in the treatment of COPD[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2014(3):397 - 412.
- [19] Stevenson CS, Birrell MA. Moving towards a new generation of animal models for asthma and COPD with improved clinical relevance[J]. Pharmacol Ther, 2011(2):93 - 105.
- (2016-05-24 收稿, 2016-08-03 修回)
中文编辑: 刘平; 英文编辑: 刘华

《贵阳医学院学报》更名启事

经国家新闻出版广电总局(新广出审[2016]267号文)批准,原《贵阳医学院学报》更名为《贵州医科大学学报》,国内统一连续出版物号由 CN52-5012/R 更改为 CN52-1164/R,主管、主办单位变更为贵州医科大学,出版单位变更为《贵州医科大学学报》编辑部(为贵州医科大学内设机构)。其他登记项目不变。

特此公告

《贵州医科大学学报》编辑部