

[文章编号] 1000-4718(2007)07-1422-06

JAK - STAT 通路调制 NF - κ B 介导 H₂O₂ 预处理的细胞保护作用*

廖新学¹, 孙胜楠², 郭瑞鲜², 张梅^{2,3}, 王艳丽², 陈培熹², 冯鉴强^{2,Δ}⁽¹⁾ 中山大学附属第一医院心血管内科, ⁽²⁾ 中山医学院生理教研室, 广东 广州 510080;⁽³⁾ 广州医学院广州蛇毒研究所, 广东 广州 510082)

[摘要] 目的: 探讨核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)在H₂O₂预处理诱导的适应性细胞保护作用中的作用及JAK-STAT通路对NF- κ B的调制。方法: 在PC12细胞建立H₂O₂预处理对抗氧化应激(300 μ mol/L H₂O₂)损伤细胞的实验模型。应用碘化丙啶(PI)染色流式细胞术检测细胞凋亡率, 免疫印迹法(Western blotting)测定NF- κ B和STAT3的表达水平。结果: 用100 μ mol/L H₂O₂预处理PC12细胞90 min可显著地抑制300 μ mol/L H₂O₂作用12 h引起的细胞凋亡, 并明显地上调NF- κ B和STAT3的表达, NF- κ B抑制剂MG-132(10 μ mol/L)和JAK2抑制剂AG-490(10 μ mol/L)均可抑制H₂O₂预处理引起的适应性细胞保护作用及上调NF- κ B表达的作用。结论: JAK-STAT通路调节NF- κ B介导的H₂O₂预处理的细胞保护作用。

[关键词] JAK-STAT通路; NF- κ B; 过氧化氢; 预处理; 细胞保护

[中图分类号] R-338.2

[文献标识码] A

JAK - STAT pathway modulates NF - κ B - mediated cytoprotection of H₂O₂ preconditioning

LIAO Xin - xue¹, SUN Sheng - nan², GUO Rui - xian², ZHANG Mei^{2,3}, WANG Yan - li², CHEN Pei - xi², FENG Jian - qiang²

⁽¹⁾ Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital; ⁽²⁾ Department of Physiology, Zhongshan Medical College, Sun Yat - sen University, Guangzhou 510080, China; ⁽³⁾ Guangzhou Institute of Snake Venom, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510082, China. E - mail: fengjq - sums@163.com

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the role of nuclear factor - kappa B (NF - κ B) in the adaptive cytoprotection of H₂O₂ preconditioning and modulation of NF - κ B expression by JAK - STAT pathway. **METHODS:** In PC 12 cells, the experimental model of cytoprotection of H₂O₂ preconditioning against oxidative stress - induced injury was set up. The apoptotic cells were measured by propidium iodide staining and flow cytometry (FCM). The levels of NF - κ B and STAT3 expression were detected by Western blotting. **RESULTS:** Preconditioning with 100 μ mol/L H₂O₂ for 90 min significantly inhibited apoptosis induced by 300 μ mol/L H₂O₂, and up - regulated expression of NF - κ B and STAT3. Both MG - 132 (10 μ mol/L, an inhibitor of NF - κ B) and AG - 490 (an inhibitor of JAK2) obviously blocked the expression of NF - κ B and cytoprotection induced by H₂O₂ preconditioning. **CONCLUSION:** JAK - STAT pathway modulates the cytoprotection of H₂O₂ preconditioning that is mediated by NF - κ B.

[KEY WORDS] JAK - STAT pathway; NF - kappa B; Hydrogen peroxide; Preconditioning; Cytoprotection

Janus 蛋白酪氨酸激酶(Janus protein tyrosine kinase, JAK)和信号转导子和转录激活子(signal transducer and activator of transcription, STATs)通路是氧化应激过程中的一条重要通路。STAT家族为JAK的重要底物,活化的JAK分子使STAT分子磷酸化,

后者形成同源或异源二聚体再转入细胞核内,与相应的靶基因启动子结合而激活相应的基因转录和表达而发挥生理生化功能。有报道指出,JAK-STAT通路在心肌缺血预处理的适应性细胞保护中发挥重要的作用^[1]。近年,本实验室证实JAK-STAT通路

[收稿日期] 2008-01-08 [修回日期] 2008-05-19

* [基金项目] 广东省科技计划资助项目(No. 2006B36004022)

Δ通讯作者 Tel: 020-87330637; E-mail: fengjq - sums@163.com

也参与 H_2O_2 预处理的细胞保护作用^[2]。另有证据表明,红细胞生成素介导的神经保护作用涉及 JAK2 和核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路之间的交互作用(crosstalking)^[3]。

NF- κ B 是一类重要的核转录因子,广泛存在于真核生物中。体内外的多种刺激,如缺氧、缺血^[4]、氧化应激^[5]和 H_2O_2 ^[6]等均可激活 NF- κ B。在多种类型的细胞实验中,NF- κ B 表达增多能提高细胞存活率,抑制细胞凋亡^[7,8]。Maulik 等^[9]观察到缺血预处理可引起心肌细胞 NF- κ B 活性明显增强,应用 NF- κ B 抑制剂或抗氧化剂可阻断缺血或缺氧预适应的心肌保护作用。但是 H_2O_2 预处理能否激活 PC12 细胞内的 NF- κ B 及 NF- κ B 是否介导 H_2O_2 预处理的适应性细胞保护作用尚不清楚。为了进一步探讨 H_2O_2 预处理的适应性细胞保护作用机制,本文旨在研究:(1) H_2O_2 预处理能否影响 PC12 细胞 NF- κ B 活性?(2) NF- κ B 是否参与 H_2O_2 预处理的细胞保护作用?(3) JAK-STAT 通路与 NF- κ B 通路在 H_2O_2 预处理的细胞保护机制中是否存在通路间的交互作用?

材 料 和 方 法

1 试剂

30% H_2O_2 购自 Alfa Aesar; AG-490 购自 Calbiochem; MG-132 购自 Santa Cruz; 碘化丙啶(PI)、RNase A 购自 Sigma; RPMI-1640 培养基、马血清、胎牛血清购自 Gibco BRL。抗 NF- κ B p50、抗 NF- κ B p65 和抗 STAT3 抗体及 Western blotting 检测盒购自 Cell Signaling Technology Inc。

2 细胞培养和预处理

PC12 细胞由中山大学实验动物中心提供,培养于含 10% 马血清、5% 胎牛血清 RPMI-1640 培养基中。于 37 °C、5% CO_2 条件下培养,选取对数生长期细胞进行实验。

H_2O_2 预处理按如下程序实施:100 μ mol/L H_2O_2 作用 PC12 细胞 90 min 后,撤去 H_2O_2 ,继续常规培养 24 h,接着给予 300 μ mol/L H_2O_2 作用 12 h。NF- κ B 抑制剂 MG-132(10 μ mol/L)或 JAK2 抑制剂 AG-490(10 μ mol/L)在预处理前 20 min 加入培养液。

3 PI 染色流式细胞仪(FCM)检测细胞凋亡率

细胞按实验要求给以不同的因素处理后,离心收集细胞,PBS 洗 2 次,加入预冷的 70% 乙醇 4 °C 固定过夜。测定前离心弃去乙醇,细胞重悬于含有 100 mg/L 碘化丙啶(PI)和 2×10^4 U/L RNase A 的染色

液中,室温避光染色 30 min。流式细胞仪检测凋亡率(激发波长:488 nm;发射波长:610 nm)。每样本计数 12 000 个细胞,采用荧光强度值并以 Multicycle 软件处理结果,计算凋亡率。

4 免疫印记法(Western blotting)检测 NF- κ B 和 STAT3 的表达

4.1 胞浆蛋白的提取 细胞经实验因素处理后,离心收集。使用冰冷的 PBS 洗涤细胞 3 次,加入裂解缓冲液(50 mmol/L Tris·HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.2 g/L NaN_3 , 1 g/L SDS, 1.0 mmol/L PMSF, 1 mg/L aprotinin, 1.0 g/L NP40, 5.0 g/L Na_3VO_4 , 1 mg/L leupeptin, pH 8.0)振荡混匀,冰浴 30 min,4 °C 12 000 \times g 离心 10 min,取上清,即为胞浆蛋白。使用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。

4.2 胞核蛋白的提取 细胞经实验因素处理后,离心收集。使用冰冷的 PBS 洗涤细胞 3 次,加入低渗盐缓冲液(10 mmol/L Hepes, 10 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L Na_3VO_4 , 1 mmol/L $Na_4P_2O_7$, 20 mmol/L NaF, 1 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF, 1 mg/L chymostatin, 1 mg/L leupeptin, 1 mg/L antipain, 1 mg/L pepstatin, pH 7.9)振荡混匀,冰浴 30 min。剧烈振荡 1 min,4 °C 12 000 \times g 离心 10 min,弃去上清,在沉淀中加入高渗盐缓冲液(20 mmol/L Hepes, 420 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L MgCl, 25% glycerol, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L Na_3VO_4 , 1 mmol/L $Na_4P_2O_7$, 20 mmol/L NaF, 1 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF, 1 mg/L chymostatin, 1 mg/L leupeptin, 1 mg/L antipain, 1 mg/L pepstatin, pH 7.9),冰浴 30 min,4 °C 12 000 \times g 离心 10 min,取上清,即为核蛋白。使用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。

4.3 Western blotting 检测 NF- κ B 和 STAT3 的表达

调整样品的蛋白量进行 SDS-PAGE,将电泳分离的蛋白转移到 PVDF 膜上。PBST 洗膜 5 min。室温下用 5% 脱脂奶粉(PBST 溶解)封闭 PVDF 膜 1 h。随后加入抗 NF- κ B p50(1:1 000)、或 NF- κ B p65(1:1 000)、或抗 STAT3(1:1 000)或抗 β -actin(1:5 000)4 °C 孵育过夜。PBST 洗脱 3 次,加入相应的 II 抗,孵育 1 h,漂洗 3 次。将 PVDF 膜用发光试剂 ECL 显色,暗室中曝光到 X 光片上。凝胶成像系统扫描分析结果。

5 统计学处理

SPSS 11.0 统计软件进行统计分析,数据用均数

± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 用 LSD 进行组间均数的比较。

结 果

1 H₂O₂ 预处理上调胞浆 NF-κB 的表达

图 1 显示, H₂O₂ 预处理能明显地上调胞浆 NF-κB p50 和 p65 的表达, 在 H₂O₂ 预处理后 60 min 的时间范围内, NF-κB p50 和 p65 表达增多呈时间依赖关系, 其中 H₂O₂ 预处理后 60 min, NF-κB 表达增多达最大值。

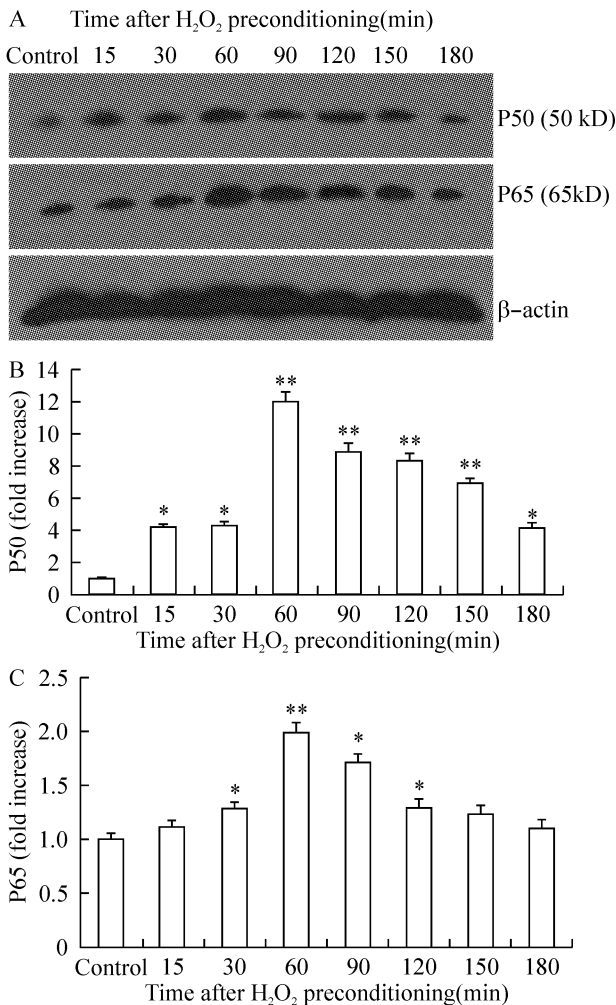


Fig 1 Influence of H₂O₂ preconditioning on cytoplasmic NF-κB expression. A: time courses of cytoplasmic NF-κB p50 and p65 expression after H₂O₂ preconditioning. B and C: densitometric analysis of NF-κB p50 and NF-κB p65 expression. $\bar{x} \pm s$. *n* = 3. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs control.

图 1 H₂O₂ 预处理对胞浆 NF-κB 表达的影响

2 H₂O₂ 预处理促进 NF-κB 的核转移

图 2 显示, 在 H₂O₂ 预处理后 90 min 的时间范围内, 核蛋白中 NF-κB p50 和 p65 的表达增多呈时间

依赖关系趋势, 提示 H₂O₂ 预处理促进胞浆的 NF-κB 向核内转移 (激活)。在 H₂O₂ 预处理后 90 min, NF-κB 的核转移达最高峰。

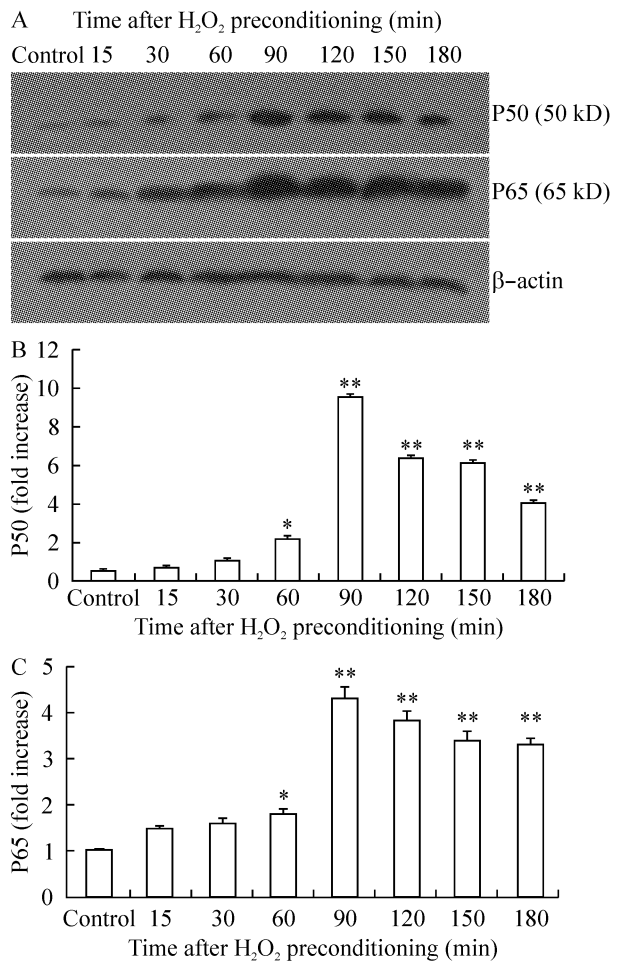


Fig 2 H₂O₂ preconditioning promotes nuclear translocation of NF-κB. A: Time courses of nuclear NF-κB p50 and p65 expression after H₂O₂ preconditioning. B and C: Densitometric analysis of nuclear NF-κB p50 and NF-κB p65 expression. $\bar{x} \pm s$. *n* = 3. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs control.

图 2 H₂O₂ 预处理促进 NF-κB 的核转移

3 JAK 抑制剂及 NF-κB 抑制剂对 H₂O₂ 预处理激活 NF-κB 的影响

在 H₂O₂ 预处理 PC12 细胞前 20 min, 应用 10 μmol/L NF-κB 抑制剂 MG-132 能显著地抑制 H₂O₂ 预处理后 60 min 引起的胞浆 NF-κB p50 和 p65 表达增多, 见图 3A, A-1 和 A-2, 及 H₂O₂ 预处理后 90 min 引起的核内 NF-κB p50 和 p65 表达增多 (核转移), 见图 3B, B-1 和 B-2。与 NF-κB 抑制剂 MG-132 作用相同, 在 H₂O₂ 预处理 PC12 细胞前 20 min 应用 JAK2 抑制剂 AG-490 (10 μmol/L) 也能明显地阻断 H₂O₂ 预处理引起的胞内及核内 NF-κB p50 和 p65 表达增多, 见图 3A, A-1、A-2 和

B、B-1、B-2,显示 NF-κB 位于 JAK-STAT 通路的下游,后者对前者具有调制作用。10 μmol/L MG

-132 或 AG-490 本身对胞浆和胞核 NF-κB p50 和 p65 表达无明显影响。

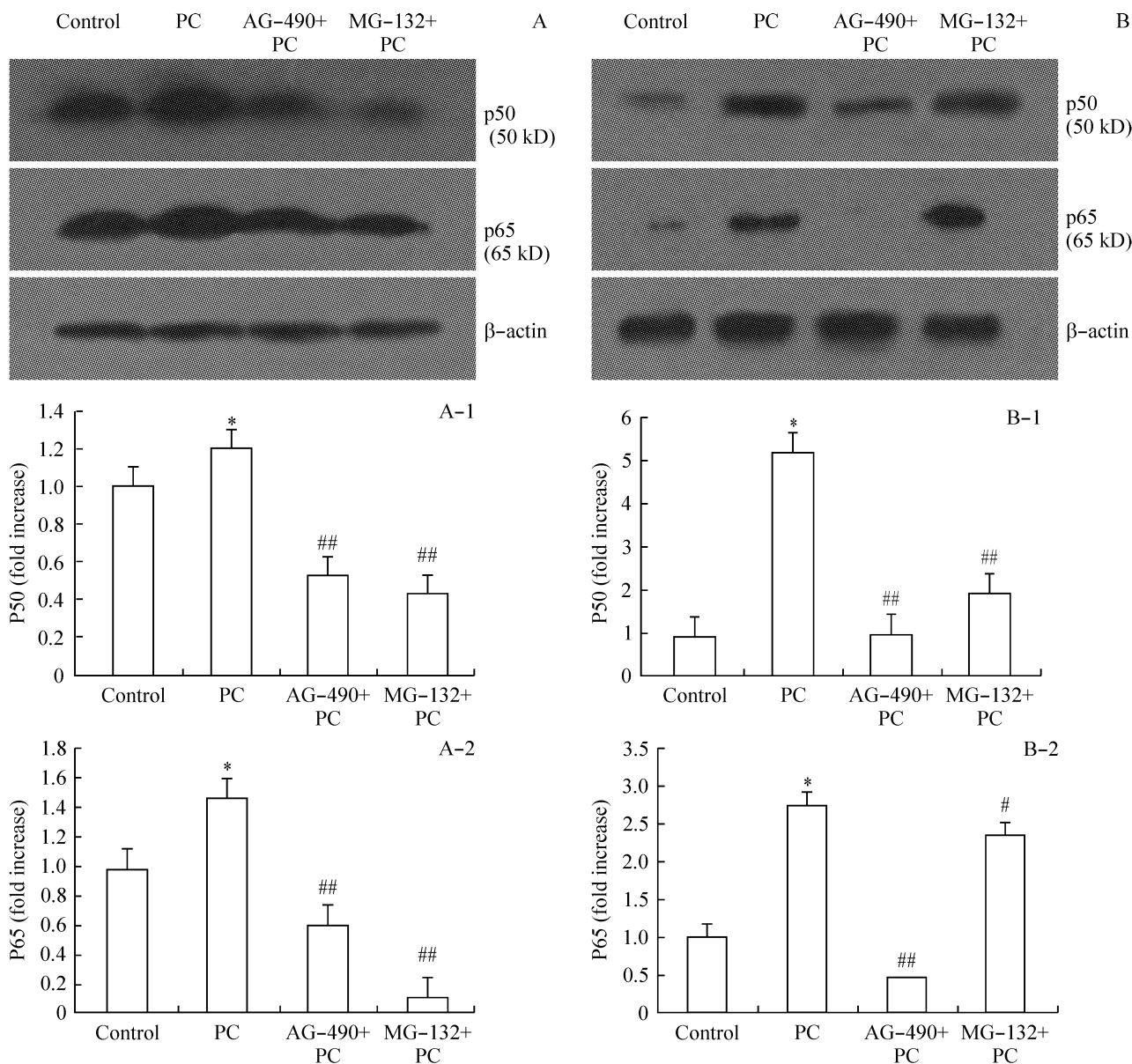


Fig 3 Inhibition of both JAK inhibitor(AG-490) and NF-κB inhibitor(MG-132) on activation of NF-κB induced by H₂O₂ preconditioning(PC). A and B: changes in cytoplasmic (A) and nuclear (B) NF-κB expression induced by H₂O₂ preconditioning; A-1 and A-2: densitometric analysis of cytosolic NF-κB expression in the indicated groups in 60 min after H₂O₂ preconditioning; B-1 and B-2: densitometric analysis of nuclear NF-κB expression in the indicated groups in 90 min after H₂O₂ preconditioning. $\bar{x} \pm s$. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs PC group.

图3 JAK抑制剂及NF-κB抑制剂抑制H₂O₂预处理对NF-κB的激活作用

4 H₂O₂ 预处理上调 STAT3 的表达

H₂O₂ 预处理后 15 min, PC12 细胞胞浆 STAT3 表达显著增多, JAK2 抑制剂 AG-490 (10 μmol/L) 明显地抑制 H₂O₂ 预处理对 STAT3 表达的上调作用, 见图 4。

5 JAK-STAT 通路调制 NF-κB 介导的 H₂O₂ 预处理的细胞保护作用

图 5 为 PI 染色 FCM 检测细胞凋亡率的结果。

当 PC12 细胞被 300 μmol/L H₂O₂ 作用 12 h 后, 其凋亡率从 (2.70 ± 1.14)% (对照值) 增加至 (65.80 ± 2.67)%, $P < 0.01$, 见图 5D。100 μmol/L H₂O₂ 预处理可使 300 μmol/L H₂O₂ 引起的 PC12 细胞凋亡率降低到 (32.10 ± 0.38)%, $P < 0.01$, 见图 5C。当在 H₂O₂ 预处理前 20 min 分别应用 NF-κB 抑制剂 MG-132 (10 μmol/L) 或 JAK 抑制剂 AG-490 (10 μmol/L) 均能拮抗 H₂O₂ 预处理引起的抗细胞凋亡

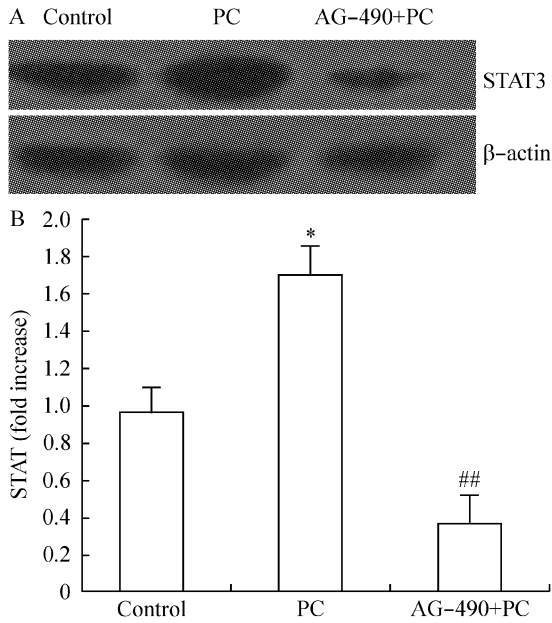


Fig 4 Effect of JAK2 inhibitor(AG-490) on overexpression of cytosolic STAT3 induced by H₂O₂ preconditioning(PC). A: effects of the indicated treatments on cytosolic STAT3 expression; B: densitometric analysis of the changes in cytosolic STAT3 expression in the indicated treatments. PC: 15 min after H₂O₂ preconditioning. $\bar{x} \pm s$. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control; ## $P < 0.01$ vs PC.

图4 JAK2抑制剂对H₂O₂预处理增加STAT3表达的影响

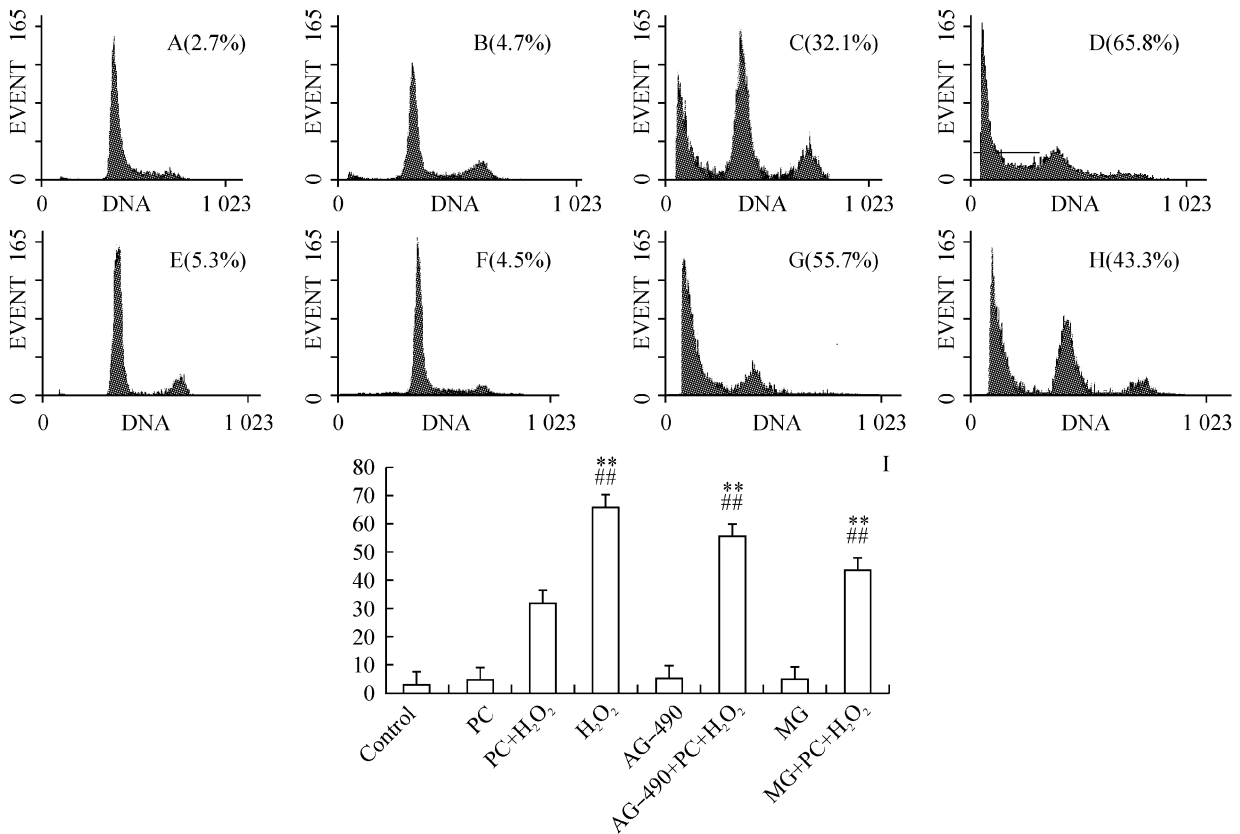


Fig 5 Influences of different treatments on apoptosis of PC12 cells. A - H: effects of different treatments on percentage of apoptosis PC 12 cells. I: the statistical analysis for the results of the indicated groups. PC: 100 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ preconditioning. H₂O₂: 300 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂; AG-490: JAK2 inhibitor; MG: NF- κ B inhibitor MG-132. $\bar{x} \pm s$. $n = 6$. ** $P < 0.01$ vs control; ## $P < 0.01$ vs PC + H₂O₂ group.

图5 不同处理因素对PC12细胞凋亡率的影响

作用,分别使细胞凋亡率从(32.10 ± 0.38)%增加至(43.30 ± 4.24)%, $P < 0.01$,见图5H和(55.70 ± 1.23)%, $P < 0.01$,图5G。AG-490(10 $\mu\text{mol/L}$,图5F)或MG-132(10 $\mu\text{mol/L}$,图5E)本身不引起PC12细胞凋亡。

讨 论

NF- κ B是细胞内一种重要的转录因子,广泛参与机体的免疫、炎症、应激反应等生理及病理过程^[10,11]。近年,有报道指出,心肌缺血预处理可增强NF- κ B表达^[9]。本文的研究结果证实,H₂O₂预处理也能激活NF- κ B p50和p65,使PC12细胞胞浆和胞核NF- κ B p50和p65表达增多。进一步的研究还观察到H₂O₂预处理对NF- κ B的激活具有一定的后作用,即在停止H₂O₂预处理后的一段时间范围内,NF- κ B的表达仍持续地增多,提示H₂O₂预处理如同心肌缺血预处理^[9]一样是激活NF- κ B的有效刺激。

为了探讨NF- κ B的激活是否与H₂O₂预处理的细胞保护作用有关,本文在H₂O₂预处理前20 min,应用NF- κ B抑制剂MG-132对PC12细胞进行处理。研究结果表明,MG-132在抑制H₂O₂预处理引起NF- κ B高表达的同时,还明显地拮抗H₂O₂

预处理的适应性细胞保护作用,使 PC12 细胞的凋亡率升高,提示 NF- κ B 介导 H₂O₂ 预处理的细胞保护作用。Maulik 等^[9]报道,NF- κ B 抑制剂能阻断缺血预处理的适应性保护作用。Ravati 等^[12]也指出,NF- κ B 参与黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶(Xanthine/Xanthine oxidase)预处理诱导的神经保护作用。结合这些研究报道和本文的实验结果,可以推测,NF- κ B 的激活可能是多种预处理的细胞保护机制之一,这为防治与氧化应激有关的疾病提供了新的作用靶点。

此外,NF- κ B 还是多条信号转导通路的交汇点,可与其他应激反应性蛋白相互影响。例如,NF- κ B 可调节 COX-2(cyclooxygenase-2)表达及细胞增殖^[13]。在缺血后的心肌,抑制了 NF- κ B 就减少了炎症前细胞因子(proinflammatory cytokine)及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达^[14]。本实验室最近证实,iNOS、COX-2^[15]及 JAK-STAT 通路^[2]参与了 H₂O₂ 预处理的适应性细胞保护作用。Digicaylioglu 等^[3]观察到,JAK2 和 NF- κ B 两条信号通路之间的串话(crosstalk)参与了红细胞生成素介导的神经保护作用。因此,本文推测在 H₂O₂ 预处理过程中,JAK-STAT 通路与 NF- κ B 通路之间可能存在交互作用,而且也可能参与 H₂O₂ 预处理的适应性细胞保护作用。本研究结果证实,JAK2 抑制剂 AG-490 可显著地抑制 PC12 细胞 NF- κ B 的表达,并阻断 H₂O₂ 预处理的细胞保护作用,提示 NF- κ B 蛋白位于 JAK-STAT 通路的下游,被 H₂O₂ 预处理激活的 JAK-STAT 通路可通过调制 NF- κ B 通路从而参与 H₂O₂ 预处理的细胞保护作用。这与本文的推断相一致。有报道指出,短暂的心肌缺血再灌注可激活 JAK-STAT 通路,并引起 iNOS 和 COX-2 的转录调节。本文进一步证实,JAK-STAT 通路也可与 NF- κ B 通路交互作用,在 H₂O₂ 预处理细胞保护中发挥重要的作用。

综上所述,本研究证实 NF- κ B 介导 H₂O₂ 预处理的适应性细胞保护作用,JAK-STAT 通路可通过调节 NF- κ B 表达参与 H₂O₂ 预处理的细胞保护过程。本文为深入阐明 H₂O₂ 预处理的适应性细胞保护机制提供了新颖的实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] Xuan YT, Guo Y, Han H, et al. An essential role of JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning[J]. PANS, 2001, 98(16): 9050-9055.
- [2] Yu HM, Zhi JL, Cui Y, et al. Role of the JAK-STAT pathway in protection of hydrogen peroxide preconditioning against apoptosis induced by oxidative stress in PC12 cells[J]. Apoptosis, 2006, 11(6): 931-941.
- [3] Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF- κ B signaling cascades[J]. Nature, 2001, 412(6847): 641-647.
- [4] Li C, Browder W, Kao RL, et al. Early activation of transcription factor NF- κ B during ischemia in perfused rat heart[J]. Am J Physiol, 1999, 276(2 Pt 2): H543-H552.
- [5] Lezoualc'h F, Sagara Y, Holsboer F, et al. High constitutive NF- κ B activity mediates resistance to oxidative stress in neuronal cells[J]. J Neurosci, 1998, 18(9): 3224-3232.
- [6] Kim DK, Cho ES, Lee BR, et al. NF- κ B mediates the adaptation of human U937 cells to hydrogen peroxide[J]. Free Radic Bio Med, 2001, 30(5): 563-571.
- [7] Bian X, Opiari AW Jr, Ratanaproeaksa AB, et al. Constitutively active NF- κ B is required for the survival of S-type neuroblastoma[J]. J Biol Chem, 2002, 277(44): 42144-42150.
- [8] Giri DK, Aggarwal BB. Constitutive activation of NF- κ B causes resistance to apoptosis in human cutaneous T cell lymphoma Hu T-78 cells[J]. J Biol Chem, 1998, 273(22): 14008-14014.
- [9] Maulik N, Sato M, Price BD, et al. An essential role of NF- κ B in tyrosine kinase signaling of p38 kinase regulation of myocardial adaptation to ischemia[J]. FEBS Lett, 1998, 429(3): 365-369.
- [10] 廖伟, 钱桂生, 雷撼, 等. 脂多糖诱导人气道上皮细胞 hBD-2 表达及核转录因子 κ B 活性的变化[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(1): 71-75.
- [11] 沈凌鸿, 陈向东, 王占海, 等. 原花青素对大鼠急性坏死性胰腺炎肺损伤的治疗作用[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(3): 609-611.
- [12] Ravati A, Ahlemeyer B, Becker A, et al. Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species and activation of the transcription factor nuclear factor- κ B[J]. J Neurochem, 2000, 78(4): 909-919.
- [13] Lim JW, Kim H, Kim KH. Nuclear factor- κ B regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells[J]. Lab Invest, 2001, 81(3): 349-360.
- [14] Chandrasekar B, Streitman JE, Colston JT, et al. Inhibition of nuclear factor κ B attenuates proinflammatory cytokine and inducible nitric oxide synthase expression in postischemic myocardium[J]. Biochem Biophys Acta, 1998, 1406(1): 91-106.
- [15] Tang XQ, Yu HM, Zhi JL, et al. Inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 mediate protection of hydrogen peroxide preconditioning against apoptosis induced by oxidative stress in PC 12 cells[J]. Life Sci, 2006, 79(9): 870-876.