

动态检测血管紧张素 II 刺激后 STAT3 信号核转位及其与衰老的关系

冯 哲, 陈香美*, 王建中, 吕 杨, 洪 权

(中国人民解放军总医院肾科, 全军肾病中心暨重点实验室, 北京 100853)

摘 要: 为了动态观察复制性衰老细胞中血管紧张素 II (Ang II) 激活人信号转导与转录活化因子 3(hSTAT3)信号转导途径的核转位情况及该途径在细胞衰老过程中的变化。将载体 pMS1-hSTAT3 上的目的基因 STAT3 序列亚克隆到 pEGFP-C3 报告载体中, 构建出 pEGFP-hSTAT3 质粒; 选择人胚肺二倍体成纤维细胞 WI-38 细胞株进行细胞培养, 通过脂质体(Efectene)转染的方法, 将 pEGFP-STAT3 质粒分别转染至 19 代, 42 代 WI-38 细胞中; 在激光共聚焦显微镜下动态观察血管紧张素 II 激活 STAT3 的核转位的变化及不同代数的差别。结果显示 Ang II 刺激细胞后, 出现活化的 STAT3 在胞核内聚集现象, 并且在 19 代细胞中 15 分钟开始出现, 30 - 45 分钟左右时达到高峰; 42 代细胞中 30 分钟左右开始出现, 50 - 60 分钟左右达到高峰。因此我们认为 Ang II 刺激 WI-38 细胞, 能出现 hSTAT3 信号转导的核内集聚现象; 并且随着 WI-38 细胞传代数的增加, STAT3 信号转导入核时间延迟。说明随着细胞的复制性衰老, 通过 STAT3 通路转导的信号活性逐渐降低, 最终影响细胞的增殖, 可能是促进细胞衰老的原因之一。

关键词: 血管紧张素 II; 衰老细胞; 信号转导与转录活化因子 3; 激光共聚焦显微镜
中图分类号: Q291 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)01-76-05

信号转导与转录活化因子 3 (signal transducers and activators of transcription, STAT3) 是一类脱氧核糖核酸(DNA)结合蛋白, 广泛表达于不同类型的细胞和组织, 参与细胞生长、恶性转化、凋亡等生理功能的调控^[1]。

血管紧张素 II (Angiotensin II, Ang II) 是肾素-血管紧张素系统(Renal-Angiotensin-System, RAS) 的主要效应因子, 通过跨膜的血管紧张素 II I 型和 II 型 (AT₁ 和 AT₂) 受体, 参与调节血管舒缩、水盐平衡, 细胞增殖、炎症反应、凋亡等生物学功能, 并以 AT₁ 受体为主。最近研究证明 Ang II 有生长因子和细胞因子样活性, 调节细胞的生长、凋亡、分化; 影响细胞的移动和细胞外基质的沉积^[2]。Ang II 通过 AT₁ 受体可以激活细胞内多种信号转导途径, 包括 DAG-PKC 途径、MAPKs 途径、JAK (Janus Kinase)/STAT 途径等^[2, 3], STAT 作为 JAK-STAT 途径中重要的 JAKs 底物, 可将细胞因子和生长因子等信号通过 JAKs/STATs 途径从细胞表面受体转导至核, 调控基因的转录^[4, 5], 其中以 STAT1, STAT3 尤为重要。这一调控的过程主要包括受体与配体的结

合, JAKs、STATs 先后磷酸化, STATs 复合物的形成, 核转位, 与 DNA 结合调控其表达^[6]。自从 1994 年 STAT3 发现以来, 由于其具有与 DNA 结合调控基因的重要作用, 学者们投入了大量研究, 而且并取得了极大的进展, 但我们对它的了解仍然有限, 尤其 STAT3 信号转导核转位在细胞复制衰老过程中的改变需要深入研究。

本研究采用国际公认的用于体外研究细胞复制衰老的人胚肺二倍体成纤维细胞 WI-38 为模型, 研究 Ang II 诱导活化 STATs 信号通路, STAT3 磷酸化后入核的过程及其与衰老的关系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Ang II 购自 Sigma 公司, 限制性内切酶、T4

收稿日期: 2003-05-16; 修回日期: 2003-09-10

基金项目: 国家 973 重点基础研究发展规划资助项目 (G2000057000); 国家自然科学基金创新研究群体项目资助 (No.30121005)。

* 通讯作者, E-mail: xmchen@public.bta.net.cn

DNA 连接酶、各种工具酶均购自 Promega 公司。GeneClean 纯化试剂盒购自 BIO 101 公司。质粒 DNA 提取试剂盒购自 Promega 公司; 1kb DNA marker 购自 Invitrogen 公司。

1.2 菌株、质粒、细胞株

人胚肺二倍体成纤维细胞株 WI-38 购自 ATCC 公司; 增强型绿色荧光蛋白基因质粒(pEGFP-C3)由本院内分泌实验室母义明博士馈赠; pMS1-hSTAT3 质粒来源于 Yale University 傅新元教授馈赠; pcDNA3.1 本室保存; 大肠杆菌 JM109 感受态购自北京博大公司。

1.3 细胞培养

WI-38 细胞(人胚肺二倍体成纤维细胞株)用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基(内含 100U/ml 青霉素和 100U/ml 链霉素), 在 37℃、5%CO₂、饱和湿度的温箱中传代培养, 所用年轻细胞为第 19 代, 衰老细胞为第 42 代。实验前细胞均在无血清的培养液中同步 16 小时。

1.4 β-半乳糖苷酶(β-gal)活性测定^[7]

将细胞培养融合达 70%, 用含 0.2% 戊二醛、2% 甲醛的 PBS 固定 5min, PBS 洗 2 次, 在含 1mg/ml 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷(X-gal)的染色液(150mmol/L NaCl, 2mmol/L MgCl₂, 5mmol/L K₃Fe(CN)₆, 5mmol/L K₄Fe(CN)₆, 40mmol/L 柠檬酸, 12mmol/L 磷酸钠, pH6.0) 中 37℃ 染色 24h, PBS 洗细胞, 显微镜下计数胞浆中有蓝色沉淀细胞的百分数。

1.5 pMS1-hSTAT3 质粒与 GFP 融合基因的构建

先将质粒 pMS1-hSTAT3 与 pcDNA3.1 均用 Xha I、Xba I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳分离所需片段, 按 GeneClean 纯化试剂盒纯化。利用 T4 DNA 连接酶使 hSTAT3 基因定向插入, 先构建出 pcDNA3-hSTAT3 质粒, 酶切、电泳鉴定; 再将 pcDNA-hSTAT3 与 pEGFP-C3 均用 Xho I、Apa I 双酶切, 电泳分离所需片段, 纯化试剂盒纯化, 利用 T4 DNA 连接酶使 hSTAT3 基因定向插入 pEGFP-C3 的羧基端中, 并使两者在阅读框架内融合。自行设计 pEGFP-C3 上的两个引物(上游: 5'-GC GAG CTC ATG GCC CAA TGG AAT CAG CTA CA-3', 下游 5'-GC CCG CGG TCA CAT GGG GGA GGT AGC GCA CT-3')进行测序(送华大公司进行测序), DNASTar 分析软件分析测序结果, 命名为 pEGFP-STAT3。

1.6 脂质体介导重组质粒转染细胞

将 WI-38 细胞接种于直径 35mm 特殊的玻璃底培养皿(MatTek Corporation 购买)中(5×10⁴ 细胞/

个), 用 10μl 脂质体 Effectene 转染试剂将 1μg 质粒 pEGFP-hSTAT3 转染到 WI-38 细胞中, 转染后 12 小时更换 DMEM 完全培养基, 转染后用无血清的 DMEM 同步 16 小时, 使用激光共聚焦显微镜观察融合蛋白荧光在 10⁻⁶mol/L 的 AngII 刺激下的变化。

1.7 共聚焦显微镜动态观察融合蛋白荧光的变化

用 Radiance 2000 型激光共聚焦显微镜(LSCM)(美国 Bio-Rad 公司)观察。

采用 49mW 的氩离子激光, 激发波长为 488nm, 选择 510nm 的滤光片进行接收, 倒置 60X 油镜下观察(每组平均 2~3 个细胞, 共六组)。19 代、42 代 WI-38 细胞用 10⁻⁶mol/L 的 AngII 刺激, 镜下观察, 每 5min 扫描一次, 连续扫描 24 次(2hours), 同时进行未转染组、转染 pEGFP-hSTAT3 而无 AngII 刺激组和转染 GFP-C3 空质粒组作为对照。扫描完毕后把图象数据输入 LaserPix4.0 软件进行细胞核内荧光强度变化的分析计算, 数据输入 EXCEL 进行处理, 所有数据用 M ± SD 表示, 并进行 t 检验做统计学处理。

2 结果与讨论

2.1 细胞衰老过程中 β-gal 活性的变化

β-gal 是体内鉴别衰老细胞的生物学标志^[7]。β-gal 染色结果显示, 随着细胞传代数的增加, 胞浆中兰色沉淀逐渐增多, 说明 β-gal 染色阳性的细胞数逐渐增加, 19 代(P₁₉)时 2% ± 1% 细胞 β-gal 染色阳性, 42 代(P₄₂)时 92% ± 4% 细胞 β-gal 染色阳性。表明细胞传到 42 代时已进入衰老状态, 绝大多数细胞已经为衰老细胞。(图 1)

2.2 pEGFP-C3-hSTAT3 重组质粒构建及酶切鉴定

用内切酶 XhoI 和 XbaI 将 hSTAT3 基因片段从质粒 pMS1-hSTAT3 切下, 先连接到载体 pcDNA3 上(图 2), 得到重组质粒 pcDNA3-hSTAT3, 再用内切酶 Xho I 和 ApaI 将 hSTAT3 基因片段从质粒 pCDNA-hSTAT3 切下, 连接到载体 pEGFP-C3 上,

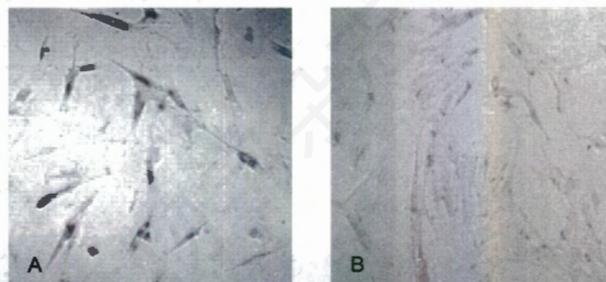


图 1 19 代(图 A)、42 代(图 B)WI-38 细胞 β-gal 活性的变化

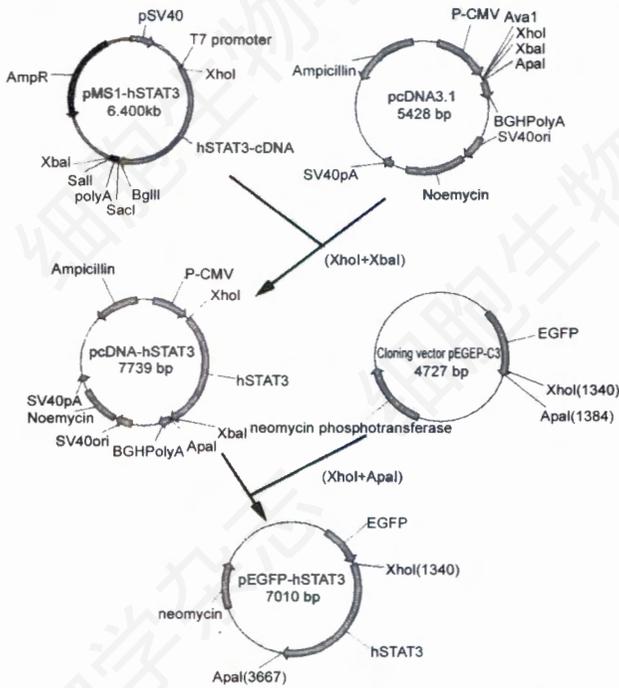


图2 pEGFP-C3-hSTAT3 重组质粒构建

酶切鉴定(图3)并送测序公司测序鉴定。

2.3 共聚焦显微镜动态观察细胞内融合蛋白荧光随刺激时间和细胞增龄的变化

同步后的19代、42代WI-38细胞分别用 10^{-6} mol/L的Ang II刺激后,可观察到细胞核内的荧光强度先增强,后减弱(图4,5);说明带GFP的hSTAT3在Ang II的刺激下逐渐入核,之后又出核的过程,而未转染组无荧光表达,无Ang II刺激组和转染GFP-C3空质粒组无核聚集现象(图未给出)。19代WI-38细胞Ang II刺激后hSTAT3核转位发生在15min左右,30min左右转位达到高峰;42代WI-38细胞AngII刺激

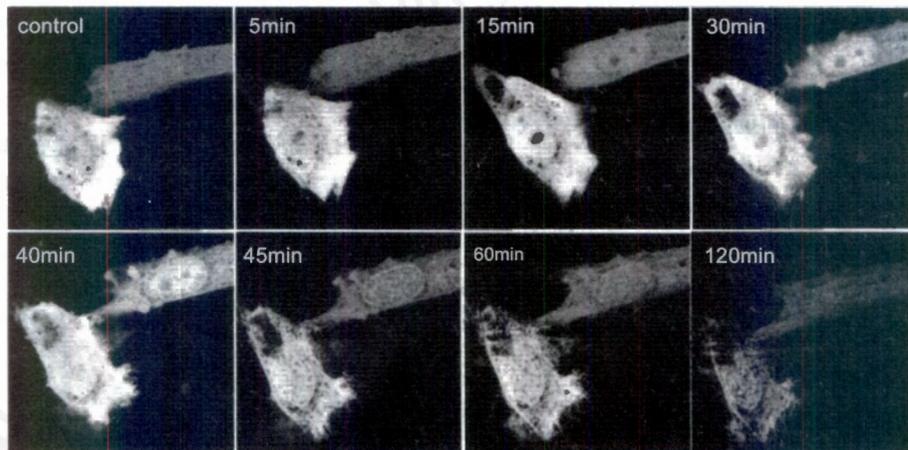


图4 GFP-hSTAT3 融合蛋白在WI-38细胞中的动态分布自发荧光在Ang II刺激后随着时间的变化(600×)

图中分别是control、5min、15min、30min、40min、45min、60min、120min的单细胞连续观察图像

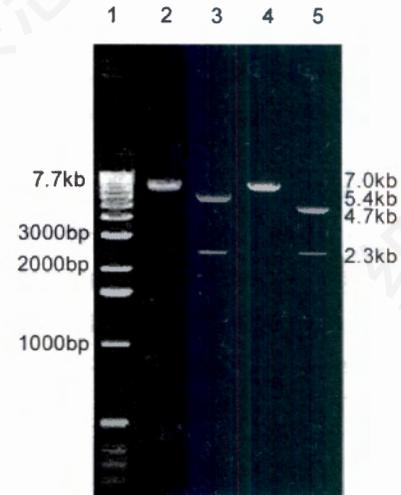


图3 pEGFP-C3-STAT3 酶切鉴定

1: 1kb Marker; 2: pcDNA3-STAT3 质粒; 3: pcDNA3-STAT3 质粒, Xho I+Xba I 双酶切; 4: pEGFP-C3-STAT3 质粒; 5: pEGFP-C3-STAT3, Xho I+Apa I 双酶切。

后hSTAT3核转位发生在30min左右,60min左右转位达到高峰(图6,7),说明随着细胞传代的增加hSTAT3信号转入核时间延迟。

绿色荧光蛋白(GFP)是一种生物发光物质,在细胞生物学中有广泛的应用,目前GFP融合蛋白主要应用于对细胞内迅速的生理反应的报告。其荧光的强弱取决于蛋白的含量,并且GFP对生活细胞基本无害,无光漂白现象,对于长时间光照也有很好的耐受性^[8],因此可通过激光共聚焦显微镜在活细胞内长时间动态观察所研究的蛋白质,并推测其生成、转运和代谢通路以及对细胞的影响。绿色荧光蛋白正广泛地应用于相关基因与蛋白的研究^[9]。

我室研究表明Ang II通过其AT₁受体诱导WI-38细胞中STAT3、STAT1的磷酸化,形成以磷酸



图5 实线为转染 GFP-hSTAT3 的 WI-38 细胞(19 代)胞核内荧光强度在 10^{-6} mol/l 的 Ang II 刺激后随时间的变化, 虚线为无 Ang II 刺激的对照组
横坐标示时间[分钟], 纵坐标示细胞核内平均荧光强度 *: $P < 0.05$; **: $P < 0.005$

化的 STAT3 同源二聚体 SIF-A(sis-inducing factor-A) 为主的复合物, 并转位入核与 DNA 结合, 参与调控基因的表达^[10]。

在本试验中, 我们构建了 GFP-hSTAT3 质粒, 动态观察了同一 WI-38 细胞在 Ang II 刺激 STAT3 信号的入核、出核的全过程; 并且观察到衰老细胞系随着增龄胞内 STAT3 入核时间出现延迟(图 6), 与我室用 STAT3 抗体, p-STAT3 抗体所做 western blot 得出的结果相一致^[11], 说明细胞复制衰老以后通过 STAT3 通路转导的信号活性逐渐降低, 生物学功能发生紊乱。Ang II /STAT3 的信号活性降低最终影响细胞的增殖, 可能是促进细胞衰老的原因之一。目前的观点, 细胞的复制性衰老可以由许多信号转导的减弱引起, 还能导致细胞本身的许多信号转导途径的衰退, 例如 Ras/MAPK、Ras/IP3K^[12] 转导通路的改变。细胞衰老后, 普遍存在着细胞内外信号转导障碍或转导异常; 细胞信号转导途径任何一个环节的短路、断路, 或激活异常都能使信号转导发生质和 / 或量的改变, 但是细胞信号转导的异常

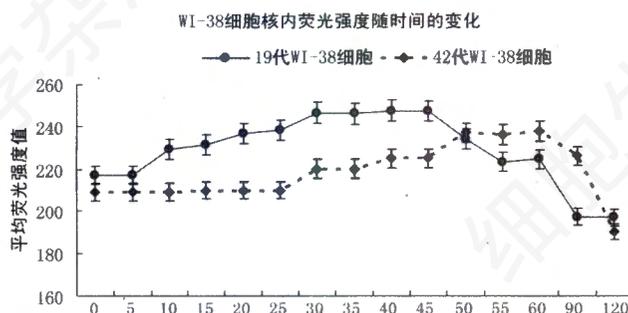


图7 转染 GFP-hSTAT3 的 WI-38 细胞(19 代、42 代)胞核内平均荧光强度在 10^{-6} mol/L 的 Ang II 刺激后随时间的变化(横坐标示时间[分钟], 纵坐标示胞核内平均荧光强度)

与衰老的因果关系, 还没有明确地阐明。

因此, 探讨 STAT3 入核延迟的机制对于研究衰老有着至关重要的意义。随着细胞的衰老, 虽然内源性 STAT3 可能产生不足, 但外源性的转染可以使其得到进入和补充, 以及我室前期工作证实衰老的 WI-38 细胞内总磷酸化的 STAT3(p-STAT3)多于年轻细胞, 而核蛋白中 p-STAT3 明显低于年轻细胞^[11], 提示细胞衰老后其入核时间的延迟是在 STAT3 转位入核的过程出现受阻。有报道磷酸化 STATs 信号入核是通过一种叫特异的可溶性穿梭受体(specific soluble shuttling receptor)家族(例如, NPI-1/importin,Ran/GTP, CAS)所介导, 已被证实 STAT1 是通过直接与 importin- α 5 穿梭受体结合转导入核, 而 STAT3 是通过一种类似的 NPI-1 途径转导入核^[13,14]。

通过我们的结果与国外的一些其他研究可以推测, 这种介导信号转导蛋白入核的穿梭受体在衰老细胞入核延迟的过程中扮演重要的角色, 2002 年 Pujol G 等^[15]发现介导信号入核的相关蛋白 CAS (apoptosis susceptibility protein)随着衰老在肾脏、肺脏、脾脏表达减少, 并认为这些随衰老而减少的入核调节子(importins)将影响它所介导的入核蛋白的转

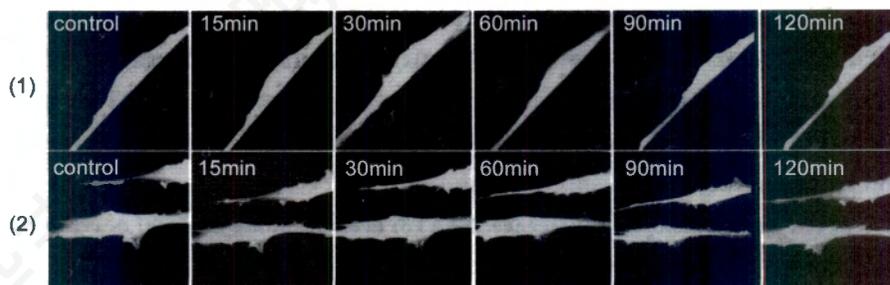


图6 GFP-hSTAT3 融合蛋白在年轻(19 代)和衰老(42 代)WI-38 细胞中的动态分布自发荧光随时间变化的比较(600 \times)

图中分别为 control、15min、30min、60min、90min、120min 的单细胞连续观察图像。1: 19 代年轻细胞; 2: 42 代衰老细胞

录活性,并继而影响其后续一系列的细胞生物学功能。所以我们推测在 STAT3 随衰老入核延迟的过程中 NPI-1 等 importins 可能起重要的调节作用。

因此,此项研究为进一步揭示细胞衰老与 STAT3 的关系提供了新的思路,也为进一步研究 STAT3 与衰老的关系提供了可能。

参 考 文 献

- [1] 李 玲,张平综述,张从杰,蔡美英审校. STAT3 研究近况[J]. 心血管病学进展, 2001, 22(2): 73 - 75.
- [2] TOUYZ R M, BERRY C. Recent advances in angiotensin II signaling[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2002, 35(9): 1001 - 1015.
- [3] AMIRI F, SHAW S, WANG X, *et al.* Angiotensin II activation of the JAK/STAT pathway in mesangial cells is altered by high glucose[J]. *Kidney Int*, 2002, 61(5): 1605 - 1616.
- [4] SILVENNOINEN O, SCHINDLER C, SCHLESSINGER J, *et al.* Ras-independent growth factor signaling by transcription factor tyrosine phosphorylation[J]. *Science*, 1993, 261: 1736 - 1739.
- [5] HEYMES C, SWYNGHEDAUW B, CHEVALIER B. Activation of angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme gene expression in the left ventricle of senescent rats[J]. *Circulation*, 1994, 90: 1328 - 1333.
- [6] JAMES E, DARNELL J R. STATs and Gene Regulation[J]. *Science*, 1997, 277: 1630 - 1635.
- [7] DIMIRI G P, LEE X, BASILE G, *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1995, 92: 9363 - 9367.
- [8] 吴春利,刘洁生,杨维东. 绿色荧光蛋白及其在细胞生物学研究中的应用[J]. 细胞生物学杂志, 2002, 24(4): 226 - 230.
- [9] 于志恒,陈香美,廖洪军等. 纤溶酶原激活物抑制物-1/绿色荧光蛋白融合基因表达载体的构建及在系膜细胞的表达[J]. 中华肾脏病杂志, 1999, 15(4): 236 - 240.
- [10] 王小丹,陈香美,冯 哲等. 人胚肺成纤维细胞 WI-38 中 Ang II 信号转导途径的研究[J]. 细胞生物学杂志, 2003, 25(1): 37 - 40.
- [11] 王小丹,陈香美,周 峰等. 细胞复制衰老过程中 STAT3 的变化及血管紧张素 II 对 STAT3 活性的影响[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(4): 324 - 327.
- [12] 李淑平,张宗玉,童坦君. 衰老细胞相关信号传递系统 [J]. 实用老年医学, 2002, 16(2): 60 - 64.
- [13] MCBRIDE K M, BANNINGER G, MCDONALD C, *et al.* Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin- α [J]. *EMBO J*, 2002, 21: 1754 - 1717.
- [14] BHATTACHARYA S, SCHINDLER C. Regulation of Stat3 nuclear export[J]. *J Clin Invest*, 2003, 111: 553 - 559.
- [15] PUJOL G, SODERQVIST H, RADU A. Age-associated reduction of nuclear protein import in human fibroblasts[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 294(2): 354 - 358.

Dynamic Observation of the Nucleus Translocation of STAT3 in Senescent Cells Stimulated with Angiotension II

FENG Zhe, CHEN Xiang Mei*, WANG Jian Zhong, LV Yang, HONG Quan

(Department of Nephrology, Kidney Center & Key Lab of PLA General Hospita, Beijing 10085, China)

Abstract: To investigate the dynamic nuclear-translocation change with aging of human signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in normal human fetal lung diploid fibroblast cell line, WI-38, stimulated with angiotensin II (10^{-6} mol/L), we constructed the plasmid pEGFP-hSTAT3 by subcloning of the hSTAT3 cDNA full sequence from pMS1-hSTAT3 into pEGFP-C3, following which transfections through the effectene were conducted into WI-38 cells of the 19th passage and 42nd passage, respectively, and then observed using the laser scanning confocal microscopy (LSCM). Our results revealed: (1) that after exposure to angiotensin II, WI-38 cells took on an accumulation of STAT3 in the nucleus from the cytoplasm; (2) that in cells of the 19th passage, STAT3 nuclear accumulation began 15 and peaked 30-45 minutes after addition of angiotensin II, while in the 42nd passage cells STAT3 nuclear accumulation began 30 and peaked 50-60 minutes after stimulation. Taken together, our results demonstrated that STAT3 nuclear translocation were delayed by cellular senescence in WI-38 cells, which may interfere with the cell proliferation and be one of the mechanisms of aging.

Key words: anigotensin II; senescence; STAT3; laser scanning confocal microscopy (LSCM)

Supported by National Key Basic Research Program of China (973 program) (G2000057002); creative research group fund from NSFC (No.30121005).

*Corresponding author, E-mail: xmchen@public.bta.net.cn