

人胚肺成纤维细胞 WI-38 中 AngII 信号转导途径的研究

王小丹^{***} 陈香美^{****} 冯哲^{*} 傅博^{*} 周峰^{*} 洪权^{*} 樊代明^{**}

(* 解放军总医院肾科 全军肾病中心暨重点实验室 北京 100853

**第四军医大学西京医院消化科 西安 710032)

摘要 本文采用免疫荧光染色、凝胶阻滞电泳(EMSA)和 Western blot 等方法,观察 AngII 刺激人胚肺二倍体成纤维细胞 WI-38 细胞前后,细胞中信号转导子和转录激活子 STAT3、STAT1 的活化状态,进而了解 AngII 的信号转导通路。结果显示 AngII 通过其 AT₁ 受体诱导 WI-38 细胞中 STAT3、STAT1 的磷酸化,形成以磷酸化的 STAT3 同源二聚体 SIF-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;AngII 的作用存在量效及时效效应,10⁻³ mmol/L 的 AngII 刺激 60min 能最强诱导 WI-38 细胞 STAT3、STAT1 的活化。因此 JAK/STAT 途径参与介导了 AngII 在 WI-38 中的信号转导。

关键词: 人胚肺成纤维细胞 WI-38 血管紧张素 II 信号转导

血管紧张素 II(Angiotensin II, AngII)是肾素-血管紧张素系统(Renal-Angiotensin-System, RAS)的主要效应因子,通过 G-蛋白偶联的跨膜受体,即血管紧张素 I 型和 II 型(AT₁ 和 AT₂)受体参与调节血管舒缩、水盐平衡,对血管平滑肌细胞、心肌成纤维细胞等直接或间接作为一种生长因子来发挥作用。其中大部分生物学反应都是通过其 AT₁ 受体介导的。AngII 诱导活化的基因包括原癌基因 c-fos、c-jun、c-myc 和 egr-1,编码胞外基质如胶原、纤维蛋白、肌腱蛋白的基因,及 TGF-β₁、PDGF 等生长因子的基因等。AngII 作用多样性的原因是其活化了多种第二信使,协同诱导基因的表达。已阐明的信号途径有磷脂酶 C/Ca²⁺、磷脂酶 A、D 及 MAPK 途径^[1-3]。已有不少研究显示细胞因子 IL-6、INF-γ 和生长因子 PDGF、EGF 都可经一直接通道 JAKs (just another kinase, JAK)/STATs(signal transducers and activators of transcription, STAT)途径将信号从细胞表面受体转导至核,调控基因的转录,这一过程主要包括胞浆 JAKs、STATs 先后磷酸化, SIF(sis-inducing factor)复合物的形成、核转位及与 c-fos 启动区 SIE(sis-inducing element)的结合^[4,5]。人胚肺二倍体成纤维细胞 WI-38 细胞株是目前国际上公认的用于体外研究细胞复制衰老的模型,有证据表明衰老时心肌 AngII 合成增加,老年大鼠心肌 AT₁ 受体 mRNA 上调,左室心肌 AT₁、AT₂ 受体密度增

加,提示 AngII 的作用与衰老有关^[6]。而有关 AngII 是否能够诱导 WI-38 细胞 JAK/STAT 信号途径的报道较少,因此,本研究采用人胚肺二倍体成纤维细胞 WI-38 细胞,观察 AngII 诱导活化 STATs 信号通路的作用及意义。

材料和方法

1. 主要试剂

AngII、AT₂ 受体拮抗剂 CGP42112A 购自 Sigma 公司, AT₁ 受体拮抗剂 Valsartan 由 Merck Sharp & Dohme 公司惠赠;抗 STAT3、STAT1 多克隆抗体、抗 p-STAT3、p-STAT1 单克隆抗体和 Supershift 抗体购自 Santa Cruz 公司。γ-³²P-ATP 购自北京亚辉生物医学工程公司;用于凝胶阻滞电泳(EMSA)实验的寡核苷酸引物由上海生工生物工程公司合成;EMSA 试剂盒购自 Promega 公司。

2. 细胞培养

人胚肺二倍体成纤维细胞株 WI-38 购自 ATCC 公司,用含有 10% 胎牛血清、1.5g/L NaHCO₃、0.1mmol/L 非必需氨基酸及 1.0mmol/L 丙酮酸钠的 EMEM 培养基传代培养。所用细胞为第 20-22 代。

3. Western blot

实验前将正常培养的 WI-38 细胞在无血清 EMEM 培养基中饥饿 12h,加入 AngII 后于 37℃ 孵箱中刺激不同时间,

本文 2002 年 5 月 6 日收到,11 月 18 日接受。

基金项目:国家 973 重点基础研究发展规划资助项目(G2000057002)。

^{***} 通讯作者。E-mail: xmchen@public.bta.net.cn

用 $1 \times$ SDS 加样缓冲液 (50mmol/L Tris-Cl pH6.8, 100mmol/L DTT, 2% SDS, 10% 甘油) 裂解细胞提取总蛋白, 核蛋白提取参见文献^[7], Micro BCA Protein Kit (Pierce) 测蛋白浓度。取等量样品经煮沸 5min 后进行 8% SDS-PAGE 电泳, 采用电转印方法将凝胶上的蛋白转移至硝酸纤维素膜, 膜在含 5% 脱脂奶粉或含 1% 脱脂奶粉和 1% BSA (测磷酸化蛋白时用) 的 TBST (0.05% Tween-20) 中 37°C 封闭 1h, 加 1:100 一抗 4°C 过夜, TBST 充分洗涤后加 1:1000 HRP 标记的二抗室温作用 45min, 洗膜后 ECL 系统显色。

4. 免疫荧光染色

将 WI-38 细胞接种于 8 孔板上, 待细胞生长融合达 80%, 无血清饥饿 12h, 加 AngII 刺激 30min, PBS 洗 2 次, 用 4% 甲醛固定 10min, PBS 洗 3×5 min 后, 在含 1% BSA, 0.3% Triton X-100 的 PBS 中室温封闭 20min, 按 $1 \mu\text{g}/1\text{ml}$ 加抗 p-STATs 单克隆抗体 (用含 0.1% BSA, 0.3% Triton X-100 的 PBS 稀释), 37°C 孵育 1h, PBS (含 0.3% Triton X-100) 洗 3×5 min, 加 FITC 标记的二抗 (稀释方法同一抗) 37°C 孵育 1h, PBS 洗后在激光共聚焦显微镜 (Bio-Rad Radiance 2000) 下观察免疫荧光染色的细胞^[8]。

5. 凝胶阻滞电泳 (EMSA)

1) 探针 用于本实验的 DNA 寡核苷酸探针为能够特异的与磷酸化的 STAT3 和 STAT1 形成的同源或异源二聚体 SIF 复合物结合的 sis 基序 (M67)^[9]。上游引物的核苷酸序列为: 5'-CATTTCGCCGTAAATC-3', 下游引物与上游引物互补。探针按 EMSA 试剂盒说明掺入 γ -³²P-ATP 标记, 终浓度为 1.75mmol/L。

2) 结合反应 根据蛋白浓度, 在同一实验中取等量的核蛋白样品。结合反应体系中包括: 核蛋白 $10 \mu\text{g}$; $5 \times$ 结合缓冲液 (20% 甘油, 5mmol/L MgCl₂, 2.5mmol/L EDTA, 2.5mmol/L DTT, 250mmol/L NaCl, 50mmol/L Tris-HCl pH7.5, 0.25mg/ml poly (dI-dC). poly (dI-dC))。Supershift 体系中取核蛋白 2.5 - 5 μg , 按 $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 加入抗体, 提前冰浴作用 60min。以上反应体系于室温 10min 后加入同位素标记的寡核苷酸探针 $1 \mu\text{l}$ (1.75pmol)/ $10 \mu\text{l}$, 室温作用 20min 后上样。

3) 电泳 制备 5% 甘油-聚丙烯酰胺凝胶用于 EMSA 分析, 电泳缓冲液为 $0.5 \times$ TBE, 电压 300V, 4°C 电泳 2 - 3h 后干胶仪 (Bid-Rad) 干胶, 压片, -70°C 曝光 24 - 72h 后显影。

结 果

1. AngII 对 WI-38 细胞 STAT3、STAT1 磷酸化的诱导作用

Western blot 显示基础状态下 STAT3 以非磷酸化 (STAT3 表示) 和磷酸化 (p-STAT3) 两种形式存在, AngII 刺激细胞后, p-STAT3 明显增多, 随 AngII 作用时间延长胞浆及胞核中 p-STAT3 逐渐增多 (图 1)。Western blot 检测 p-STAT1 表达较弱, 提示 AngII 诱导 WI-38 细胞 STAT 活化以 STAT3 为

主 (每次实验重复三次)。

2. AngII 对 STAT1 和 STAT3 活化后核转位的诱导作用

为了证实 AngII 刺激细胞后, 活化的 STATs 转位入核。我们用抗 p-STAT1、p-STAT3 单克隆抗体, 采用免疫荧光染色, 观察 p-STAT1、p-STAT3 在细胞内的分布。结果显示对照组细胞, 荧光强度弱, 胞浆、胞核分布基本一致 (图 2A、3A); AngII 刺激细胞 30min, 细胞核中荧光强度增加, 核聚集现象明显, 且 STAT3 组荧光强于 STAT1 组, 提示 SIF 复合物中可能 p-STAT3 占优势, 即以 p-STAT3 形成的同源二聚体 SIF-A 为主 (图 2B、3B); 在刺激前加入 AT₁ 受体阻断剂 Valsartan, 核中荧光强度明显减弱 (图 2C、3C), 而与 AT₂ 受体阻断剂 CGP42112A 共同孵育对荧光强弱和分布影响不大 (图 2D、3D), 表明 AngII 诱导 WI-38 细胞 STAT1、STAT3 核转位是通过其 AT₁ 受体介导的。

3. AngII 诱导 WI-38 细胞 SIF-DNA 结合的量-效作用、时-效作用及特异性

EMSA 结果显示刺激前, WI-38 细胞中 SIF-DNA 结合活性处于基础状态, 刺激后 SIF-DNA 结合明显增加, 并且随着 AngII 剂量的增加, 诱导活化信号逐渐增强, 但当 AngII 浓度高于 10^{-3} mmol/L 后, SIF-DNA 活化信号不再增强。选择能够最强诱导 SIF 活化的 10^{-3} mmol/L AngII 刺激细胞, 观察其时-效作用, 结果 AngII 作用 15min 后, SIF 已开始活化, 60min 左右时活化达高峰, 120min 后渐减弱。由于细胞核蛋白中所含有的转录因子只能与它所对

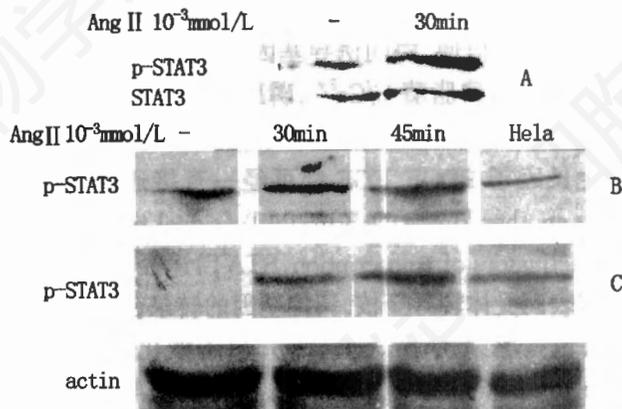


图 1 AngII 诱导 WI-38 细胞 STAT3 磷酸化

A. 样品为细胞总蛋白 (50 μg), 一抗为 STAT3 多克隆抗体。B. 样品为细胞总蛋白 (50 μg), 一抗为抗 p-STAT3 单克隆抗体。C. 样品为细胞核蛋白 (20 μg), 一抗为抗 p-STAT3 单克隆抗体。Hela. 阳性对照, 为 INF 刺激 HeLa 细胞后提取的样品。

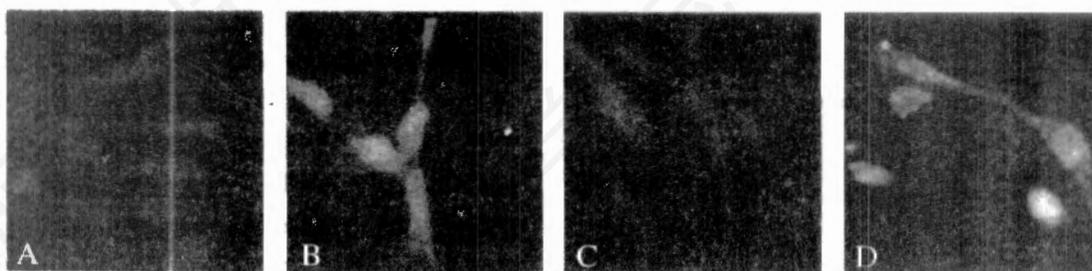


图2 AngII 诱导 WI-38 细胞 STAT1 的核转位,用抗 p-STAT1 的单克隆抗体进行免疫荧光染色
A. 对照;B. AngII 10^{-3} mmol/L 刺激 30min;C. Valsartan 10^{-2} mmol/L 作用 30min 后;AngII 10^{-3} mmol/L 刺激 30min;D. CGP42112A 10^{-3} mmol/L 作用 30min 后;AngII 10^{-3} mmol/L 刺激 30min。



图3 AngII 诱导 WI-38 细胞 STAT3 的核转位(用抗 p-STAT3 的单克隆抗体进行免疫荧光染色)
A. 对照;B. AngII 10^{-3} mmol/L 刺激 30min;C. Valsartan 10^{-2} mmol/L 作用 30min 后,AngII 10^{-3} mmol/L 刺激 30min;D. CGP42112A 10^{-3} mmol/L 作用 30min 后,AngII 10^{-3} mmol/L 刺激 30min。

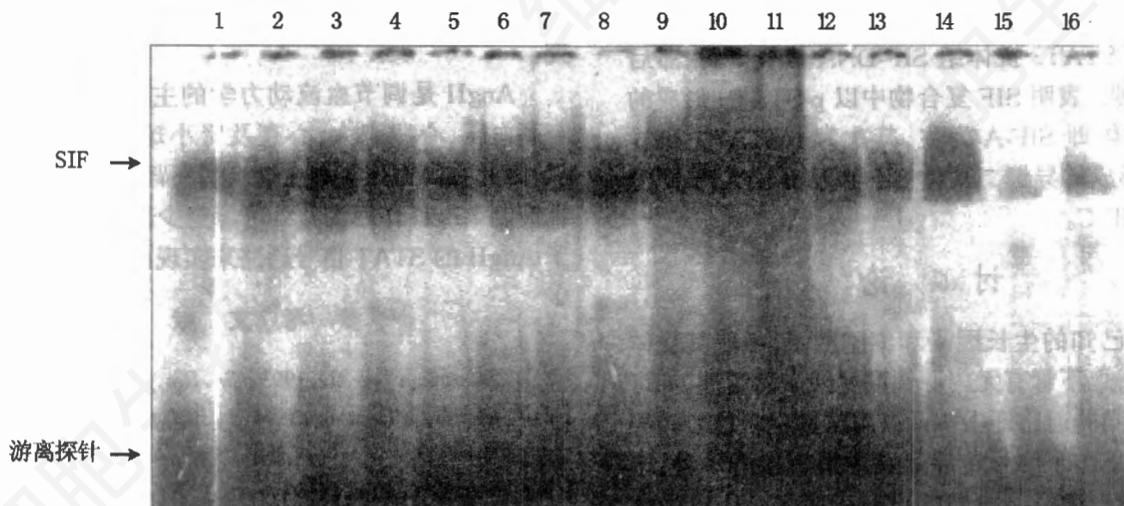


图4 EMSA 检测 AngII 诱导 WI-38 细胞 SIF-DNA 结合的量-效作用、时-效作用及特异性
不同浓度的 AngII 1)0mmol/L, 对照;2) 10^{-5} mmol/L;3) 10^{-4} mmol/L;4) 10^{-3} mmol/L;5) 10^{-2} mmol/L 作用于细胞 30min; 10^{-3} mmol/L 的 AngII 刺激细胞不同时间;6)0min, 对照;7)15min;8)30min;9)45min;10)60min;11)90min;12)120min;13) 10^{-2} mmol/L 的 AT_1 受体阻断剂 Valsartan 先作用于细胞 30min 后, 10^{-3} mmol/L 的 AngII 再刺激细胞 30min;14) 10^{-3} mmol/L 的 AT_2 受体阻断剂 CGP42112A 先作用于细胞 30min 后, 10^{-3} mmol/L AngII 再刺激细胞 30min;15)50 倍非标记特异探针竞争拮抗;16)非特异探针 NF- κ B。

应的 DNA 反应成分特异性的结合,在结合反应体系中预先加入 50 倍过量的非标记的 SIE 双链寡核苷酸,孵育 20min 后再加入同位素标记的探针可完全拮抗活化的 SIF 与标记探针的结合,而加同样数量的非特异的探针 NF- κ B 并无此影响,说明形成的

SIF 复合物与 DNA 探针之间的结合是特异的。并且 AngII 诱导的 SIF 活化,可被 AT_1 受体阻断剂 Valsartan 所阻断,但并不受 AT_2 受体阻断剂 CGP42112A 的影响,说明 AngII 诱导 WI-38 细胞 STAT 的活化是通过其 AT_1 受体介导的(图 4)。

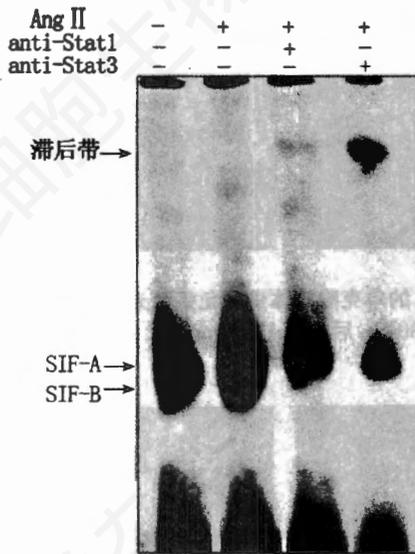


图5 AngII诱导WI-38细胞SIF复合物形成的Supershift实验

为了进一步证实AngII诱导的SIF复合物的组成,进行的Supershift实验结果显示在结合反应体系中提前加入抗STAT1、STAT3多克隆抗体,SIF-DNA结合信号减弱,在相应的泳道中出现滞后带,并且以加STAT3抗体组SIF-DNA信号更弱、滞后带信号更强,表明SIF复合物中以p-STAT3形成的同源二聚体即SIF-A为主,其次为p-STAT3和p-STAT1形成的异源二聚体SIF-B及p-STAT1同源二聚体SIF-C。

讨 论

目前已知的生长因子和细胞因子,虽然其受体结构不同,也不管有无内源性酪氨酸激酶活性,都可通过一共同的通路即JAKs/STATs途径将信号转导入核。这是迄今信号转导通路中最直接的一种,不同于MAPK途径。我们的研究表明AngII以受体特异性的方式诱导WI-38细胞中STAT3、STAT1酪氨酸磷酸化、SIF复合物核转位、与高度特异性的DNA寡核苷酸M67结合,直接活化细胞因子/生长因子典型的信号通道,诱导与生长相关基因的表达、促进与其他有丝分裂原或抗有丝分裂因子的协同作用。AngII不同的生理和病理作用都是通过特异的核转录因子活性的变化介导的,不同类型的细胞AngII诱导活化的STAT蛋白不同,形成的SIF复合物也不同。在培养的人胚肾系膜细胞中AngII通过不同的受体亚型分别诱导STAT1、STAT5活化^[8],本文中AngII通过其AT1受体诱导WI-38细

胞STAT3、STAT1活化。SIF复合物的组成是配体特异性的,典型的生长因子PDGF、EGF诱导形成3种SIF,即SIF-A、B和C,而IFN- γ 主要诱导SIF-C。相反,IL-6主要引起SIF-A的形成^[9-10]。在WI-38细胞中AngII诱导形成的主要是SIF-A,与在心肌成纤维细胞、T3CHO/AT1细胞中一致。生长因子和细胞因子诱导SIF活化的高峰时间多在30min内,而AngII诱导SIF活化的达峰时间在心肌成纤维细胞、T3CHO/AT1细胞为2-3h^[11],WI-38细胞中为1h左右。AngII诱导延迟活化的原因仍不清楚,但有研究表明这与AngII刺激细胞后是否有新蛋白的合成及受体的数目无关^[12]。这可能一方面提示AngII与JAK或其他激酶的亲和力较低,另一方面从AngII受体活化到STATs蛋白磷酸化的过程中可能有其他中间途径。由于AngII刺激SIF活化,STAT通路对c-fos的诱导起一定作用。但是,除了STATs调节SIF活性外,c-fos启动区还包含另外两个重要的调节基序:血清反应基序和cAMP/Ca²⁺反应基序,前者经MAPK级联活化,后者有蛋白激酶A参与。在AngII诱导c-fos或其他基因调控中,这三个基序之间的相互作用还有待进一步研究。

AngII是调节血流动力学的主要因子之一,参与高血压、心肌肥大、心衰及肾小球疾病的发生发展,因此在高血压等心血管疾病和肾脏疾病中,选择性抑制AngII作用的益处可能至少部分是通过作用于AngII的STAT信号通路来实现的。

参 考 文 献

- [1] Sadoshima J, et al., 1993, *Cir. Res.*, 73:424-438.
- [2] Marrero MB, et al., 1994, *J. Biol. Chem.*, 269:10935-10939.
- [3] Booz GW, et al., 1994, *Am. J. Physiol.*, 267:C1308-C1318.
- [4] Silvennoinen O, et al., 1993, *Science*, 261:1736-1739.
- [5] Belinda JW, et al., 1990, *EMBO. J.*, 9:4477-4484.
- [6] Heymes C, et al., 1994, *Circulation*, 90:1328-1333.
- [7] 宋伦等, 1999, *中国实验临床免疫学杂志*, 5:29-32.
- [8] Frank AS, et al., 2001, *Experimental and Molecular Pathology*, 70:265-273.
- [9] Darnell JE, et al., 1994, *Science*, 264:1415-1421.
- [10] Adowski HB, et al., 1993, *Science*, 261:1739-1744.
- [11] Ayarama BG, et al., 1994, *J. Biol. Chem.*, 269:31443-31449.
- [12] Thekkumkara TJ, et al., 1993, *FASEB, J.*, 7:A491.

ANGIOTENSIN II SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAY IN NORMAL HUMAN FETAL LUNG DIPLOID FIBROBLAST CELL LINE-WI-38

WANG Xiao Dan^{***} CHENG Xiang Mei^{**} FEN Zhe^{*} FU Bo^{*} ZHOU Feng^{*} HONG Quan^{*} FAN Dai Ming

(*The Department of Nephrology, the PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

(**The Department of Digestion, the Forth Military Medical School, Xian 710032, China)

ABSTRACT To investigate the angiotensin II signal transduction pathway in cultured human fetal lung diploid fibroblast cell strain-WI-38, immunofluorescent staining and confocal microscopy, the electrophoretic mobility shift assay(EMSA) and western blot were used to detect the activities of signal transducers and activators of transcription-STAT3 and STAT1 in WI-38 cells stimulated by AngII. Results showed that AngII induced the phosphorylation of STAT3 and STAT1 by AT₁ receptor and the resulting complex dominated with SIF-A was formed, translocated to the nucleus and bound to DNA to regulate the transcription of related genes. It is suggested that the JAK/STAT pathway mediate AngII signal transduction in WI-38.

Key words: WI-38 cells AngiotensinII Signal transduction

白细胞介素-2对心肌负性肌力作用机制的探讨*

曹春梅* 夏强 张雄 张玮 陈君柱

(浙江大学医学院 杭州 310031)

摘要 为研究白细胞介素-2(IL-2)对心肌的负性肌力作用的可能机制,本文采用酶解分离成年大鼠心室肌细胞,用细胞内双波长荧光系统和膜片钳全细胞记录检测细胞膜钙离子通道和细胞内酸碱度(pHi)及钙水平的变化,分别以 fura-2/AM 和 BCECF/AM 作为细胞内钙离子和氢离子荧光指示剂。结果:(1)IL-2(2.5-200U/ml)浓度依赖性地降低单个心室肌细胞电刺激诱导的钙瞬变幅度,使舒张末钙水平升高,选择性 κ -阿片受体阻断剂 nor-BNI(10nmol/L)可阻断 IL-2 对心肌细胞内钙的作用;(2)用 200U/ml 的 IL-2 灌流 10min 后,与对照组相比膜片钳全细胞记录的 L-型钙电流无明显改变;(3)用 200U/ml 的 IL-2 灌流后,与对照组相比 Mn²⁺ 对 fura-2/AM 的淬灭率无明显改变。(4)IL-2(200U/ml)使大鼠心室肌细胞 pHi 降低,其作用可被选择性 κ -阿片受体阻断剂 nor-BNI(10nmol/L)所减弱。结论:IL-2 引起的心室肌细胞 pHi 降低可能是其负性肌力作用机制之一,细胞膜上 L-型钙离子通道可能不参与 IL-2 降低心肌收缩力的作用;细胞膜上的 κ -阿片受体可能介导 IL-2 对心肌的负性肌力作用。

关键词: 白细胞介素-2 心室肌细胞 钙通道 细胞内酸碱度 细胞内钙

本实验室发现,白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)可以抑制大鼠心室肌细胞收缩和降低心肌细胞内的游离钙离子浓度^[1-3]。为了探明与心肌负性肌力作用相伴的细胞内游离钙浓度的改变是否是通过影响细胞膜上的钙离子通道而引起的,在本研究中我们使用膜片钳全细胞记录和光学方法研究了 IL-2 对心肌细胞膜上钙离子通道的影响。

另一方面,有研究报道表明,细胞内的酸化可能是心肌细胞产生负性肌力效应的因素之一^[4]。如在缺血发生的最初几分钟内,细胞内酸化的程度就足以降低心肌收缩力^[5]。目前,有关细胞因子 IL-2 对细胞内酸碱度(pHi)的研究未见报道。本文选用成

年 Sprague-Dawley(SD)大鼠,酶解分离心室肌细胞,以细胞内双波长荧光检测技术,研究 IL-2 对大鼠心肌细胞 pHi 的影响,以探讨 IL-2 的负性肌力作用的可能机制。

材料和方法

1. 药品与溶液

本文 2002 年 7 月 26 日收到,11 月 22 日接受。
基金项目:浙江省自然科学基金青年人才专项基金资助(RC99038)。

* 浙江大学博士后研究人员。
Email: xiaqiang@zju.edu.cn