

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.17.003

缺氧调控 JAR 细胞 Stat3 表达及细胞凋亡的研究*

杜尚珂, 石 瑛, 岳 宁, 张琳琳, 于海洋, 贾莉婷, 张 展[△]

(郑州大学第三附属医院检验科 450052)

[摘要] 目的 探讨缺氧对 JAR 细胞信号转导子和转录激活子 3(Stat3)和磷酸化 Stat3(p-Stat3)蛋白表达及细胞凋亡的影响。方法 在缺氧条件下培养 JAR 细胞,通过蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Stat3 和 p-Stat3 在缺氧前后蛋白表达的差异,采用流式细胞术检测细胞凋亡水平。结果 缺氧培养 JAR 细胞 48 h 后,细胞形态发生异常改变,Stat3 和 p-Stat3 蛋白表达水平均明显降低($P < 0.05$),细胞凋亡水平明显增加($P < 0.05$)。结论 缺氧使 JAR 细胞 Stat3 和 p-Stat3 蛋白表达水平降低,凋亡增加。

[关键词] 细胞信号转导子和转录激活子 3;缺氧;滋养细胞;凋亡

[中图分类号] R446

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)17-2312-02

The effects of hypoxia on the expression of Stat3 and the cell apoptosis*

Du Shangke, Shi Ying, Yue Ning, Zhang Linlin, Yu Haiyang, Jia Liting, Zhang Zhan[△]

(Department of Clinical Laboratory, the Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of hypoxia on the expression of Stat3 and p-Stat3, and assessed the apoptosis ability of JAR cells in vitro. **Methods** JAR cells were cultured under hypoxic conditions. Western blot were used to determine the protein expression of Stat3 and p-Stat3. Cellular apoptosis was monitored by flow cytometry analysis. **Results** Abnormal morphology changes in trophoblast cells under low oxygen conditions. After 48 h hypoxic treatment, the protein of Stat3 and p-Stat3 were significantly decreased ($P < 0.05$); however, the level of apoptosis was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Stat3 and p-Stat3 protein levels were decreased under hypoxia circumstance, while the cell apoptosis ability was increased in JAR cells.

[Key words] signal transducer and activator of transcriptions 3; hypoxia; trophoblast; apoptosis

滋养细胞是母胎界面进行物质交换的主要场所,早期胚胎发育及胎盘形成是在相对缺氧环境中进行^[1]。自妊娠 11 周起,滋养细胞浸润能力增加,缺氧状态得到改善,若持续低氧会阻碍正常妊娠进行,许多妊娠期疾病与滋养细胞缺氧有关^[2-3],如子痫前期(preeclampsia, PE)和胎儿生长受限(fetal growth restriction, FGR)。信号转导子和转录激活子(signal transducer and activator of transcriptions, Stats)是介导细胞内信号转导的转录因子,包括 6 个亚型(Stat1~Stat6),其中 Stat3 研究最为广泛。Stat3 被激活时 C-端的酪氨酸残基(TryY705)和丝氨酸残基(Ser727)位点发生磷酸化,形成磷酸化 Stat3(p-Stat3)。p-Stat3 调控机体细胞多项生理功能的基因转录,如增殖、侵袭、迁移及凋亡。在某些病理状态下发生异常表达,如肿瘤和子痫前期。目前,尚未有研究报道缺氧能否改变滋养细胞 Stat3 的表达情况,本研究通过低氧培养 JAR 细胞,检测缺氧后 Stat3 和 p-Stat3 在 JAR 细胞中的表达及细胞凋亡水平,探讨滋养细胞缺氧与缺氧性妊娠期疾病之间的关系。

1 材料与与方法

1.1 材料 人绒毛膜癌细胞 JAR 细胞系(美国 ATCC 公司)。试剂与仪器:高糖完全培养基(美国 Geneview 公司),二氯化钴(CoCl_2 天津致远化工),RNA 提取试剂(美国 Invitrogen 公司),逆转录试剂盒(鼎国公司),蛋白浓度测定 BCA 试剂盒(康为公),Stat3 和 p-Stat3 兔抗人抗体(美国 CST 公司),Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(碧云天公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 培养 JAR 细胞至对数生长期,以 1×10^5 cell/L 细胞密度接种于 6 孔培养板至细胞融合至 80% 时,更换无血清培养基处理细胞 24 h,进行配对分组:正常组和缺氧处理组(加入 CoCl_2 使其终浓度为 $300 \mu\text{mol/L}$),培

养 48 h 后进行各项检测。

1.2.2 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测 Trizol 提取细胞总 RNA,紫外吸收法进行 RNA 定量检测,各组 RNA 的吸光度($A_{260/280}$)均在 $1.8 \sim 2.0$ 。cDNA 逆转录按照逆转录试剂盒说明书操作。每组设置 3 个复孔,进行 RT-PCR 扩增。扩增反应条件为 95°C 预变性 10 min, 95°C 15 s, 60°C 1 min 进行 40 个扩增循环, 72°C 延伸 10 min,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法计算 Stat3 mRNA 的相对表达量。引物由上海捷瑞生物有限公司合成, β -actin 为内参,引物序列,见表 1。

表 1 RT-PCR 扩增的引物序列及扩增片段的大小

检测基因	检测基因引物序列(5'-3')	扩增片段(bp)
Stat3	TCAGTGAAAGCAGCAAAGAAGG	197
	AGGATAGAGATAGACCAGTGGAGAC	
β -actin	GGGAAATCGTGCCTGACATTAAGG	185
	CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG	

1.2.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 6 孔板内细胞 $100 \mu\text{L}$ 蛋白裂解液(加入 1:100 的 PMSF 和磷酸酶抑制剂)。BCA 法测总蛋白浓度。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),TBST 清洗膜后,加 Stat3 和 p-Stat3 一抗抗体, 4°C 摇床孵育过夜。加入二抗(1:4000)。用 ODYSSEY Clx 检测与成像系统进行扫描,分析条带的灰度值。以目的蛋白条带与内参灰度值之比作为结果。

1.2.4 流式细胞术检测 消化细胞制成细胞悬液,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次,400 目筛子过滤,凋亡检测严格按照 Annexin V-FITC 凋亡试剂盒说明书进行操作,应用 FACSCALL-

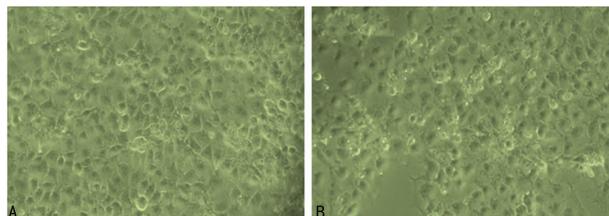
* 基金项目:河南省科技创新人才计划项目(124200510005)。 作者简介:杜尚珂(1989-),初级检验技师,硕士,主要从事生殖免疫研究工作。 [△] 通讯作者, Tel:18790802060; E-mail:zhangzhanzdsfy@126.com。

BUR 流式细胞仪(美国 BD 公司)测定细胞荧光 LYSIS II 软件分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,RT-PCR 实验结果利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析,数据分析时运用配对设计定量资料的 *t* 检验及符号秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常和缺氧培养下 JAR 细胞形态观测 JAR 细胞缺氧培养 48 h 后,缺氧处理组细胞肉眼可见细胞凋亡增加,部分细胞形态发生改变,细胞由圆形或椭圆形变成纤维样或棘形样细胞,细胞胞质中出现黑色粗颗粒,见图 1。

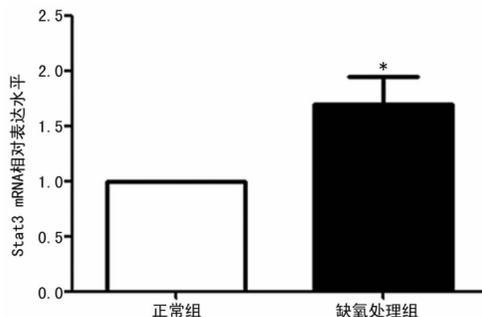


A: 正常组; B: 缺氧处理组。

图 1 缺氧处理 JAR 细胞形态图(×100)

2.2 RT-PCR 检测结果 RT-PCR 实验显示,JAR 细胞经缺

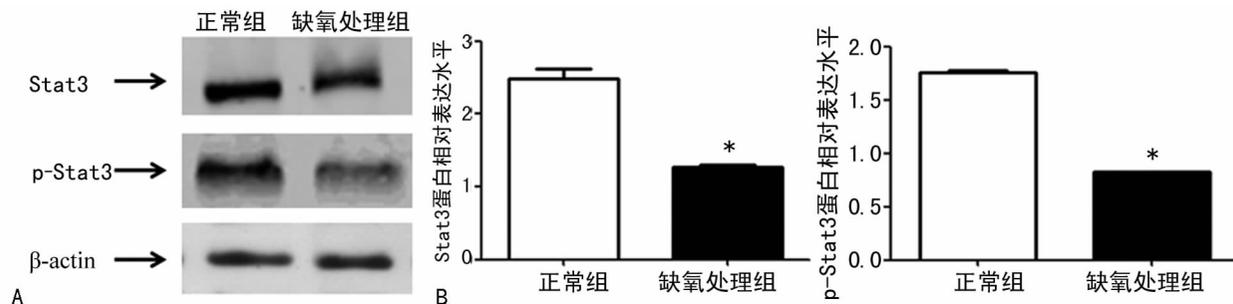
氧处理缺氧处理 48 h 后, Stat3 mRNA 的相对表达水平为 1.699 ± 0.243 ,与正常组相比明显升高,差异有统计学意义($t = -2.871, P < 0.05$),见图 2。



*: $P < 0.05$,与正常组比较。

图 2 缺氧培养 JAR 细胞 48 h 后 Stat3 mRNA 的表达水平

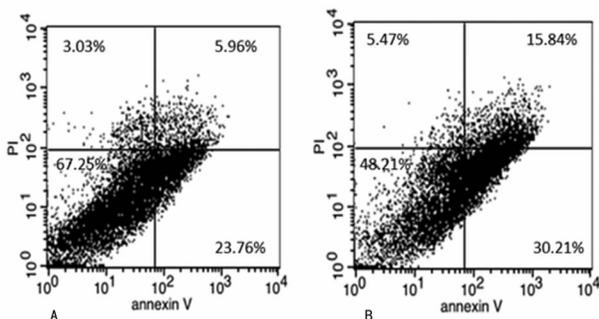
2.3 Western blot 检测结果 Western blot 检测显示,JAR 细胞经缺氧处理 48 h 后,与正常组比较,Stat3 和 p-Stat3 蛋白表达均明显降低,差异均有统计学意义($t = -11.260, -42.784, P < 0.05$),见图 3。



A: Stat3 和 p-Stat3 蛋白相对表达结果; B: Stat3 蛋白相对表达水平; C: p-Stat3 蛋白相对表达水平。*: $P < 0.05$,与正常组比较。

图 3 缺氧培养 JAR 细胞 48 h 后 Stat3 和 p-Stat3 蛋白的表达结果

2.4 流式细胞术检测结果 通过流式细胞术检测凋亡实验结果可见,缺氧处理组的细胞凋亡率为 $(4.02 \pm 1.24)\%$,明显高于对照组 $(17.83 \pm 2.04)\%$,差异有统计学意义($t = 6.692, P < 0.05$),见图 4。



A: 正常组; B: 缺氧处理组。

图 4 缺氧培养 JAR 细胞 48 h 后细胞凋亡水平

3 讨论

氧气对滋养细胞增殖、分化和凋亡至关重要^[4]。子痫前期胎盘滋养细胞及体外缺氧培养滋养细胞细胞凋亡均增加^[5]。本研究采用 $CoCl_2$ 化学方法建立 JAR 细胞缺氧模型,JAR 细胞为人绒毛膜癌的转化细胞,系滋养细胞来源,可提供滋养细胞功能方面研究;适当浓度的 $CoCl_2$ 能在正常氧分压下与

Fe^{2+} 竞争性结合氧分子,从而达到细胞缺氧的目的。不同细胞系^[6]造成细胞缺氧环境所需 $CoCl_2$ 的浓度不同,当 $CoCl_2$ 终浓度为 $300 \mu mol/L$ 时,JAR 细胞内 HIF-1 α 表达水平显著升高,细胞生长抑制显著且无明显细胞毒性作用。多项研究以此类细胞系作为滋养细胞的缺氧模型^[7]。

本研究缺氧处理 JAR 细胞 48 h 后检测 Stat3 的 mRNA 水平,以及 Stat3 和 p-Stat3 的蛋白表达水平,得出缺氧后 Stat3 mRNA 水平的变化与蛋白质水平变化不一致,Stat3 的 mRNA 水平代表其基因转录时状态,但由于基因转录后存在更为复杂的翻译调控作用,因此 mRNA 水平并不能准确代表其蛋白质的表达水平,两者表达之间不完全成一致性;此外,基因在不同组织、细胞和时间中所受的各种调控不同也使两者之间不相关或负相关。缺氧环境下 JAR 细胞 p-Stat3 蛋白表达降低,且细胞发生明显凋亡。有研究发现恶性外周神经鞘瘤细胞中 Stat3 可通过 HIF-1 α 信号通路对细胞发挥作用^[8],在缺血大鼠的肾脏和缺氧肾癌细胞中 p-Stat3 可通过阻碍 HIF-1 α 蛋白降解或增加缺氧环境中 HIF-1 α 的合成来促进细胞内 HIF-1 α 水平升高,由此推测在缺氧 JAR 细胞中 p-Stat3 可能参与低氧调控的信号通路,进而参与细胞凋亡的发生。

细胞凋亡是细胞发生程序性死亡,在维持正常细胞生理功能中发挥重要作用,主要包括两条重要通路:膜受体凋亡通路和线粒体凋亡通路。Stat3 作为细胞内重要的转录因子^[9],可调控多种凋亡蛋白(p53、Bax)和抗凋亡蛋白(下转第 2318 页)

T 淋巴细胞进行了共培养,发现抑制 KCs 中 IRE1-XBP1 通路,T 淋巴细胞活化增殖能力被削弱,凋亡水平明显上升,且促炎细胞因子分泌受抑制,抑炎因子分泌上调。提示 KCs 提呈抗原激活 T 细胞的能力明显减弱,表现出类似于 M2 型 KCs 的生物学效应。而上调该通路,则表现出类似于 M1 型 KCs 的生物学效应。

综上所述,抑制 KCs 中 IRE1-XBP1 通路的活性,可以诱导 M1 样极化的 KCs 呈 M2 样转化,并表现出对炎症反应的负性调控效用。为进一步明确 KCs 中 IRE1-XBP1 通路在炎症反应亦或肝移植术后急性排斥反应中的作用积累一定的理论基础。

参考文献

- [1] Wang FS, Fan JG, Zhang Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China[J]. *Hepatology*, 2014, 60(6): 2099-2108.
- [2] Germani G, Rodriguez-Castro K, Russo FP, et al. Markers of acute rejection and graft acceptance in liver transplantation[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(4): 1061-1068.
- [3] Chen Y, Liu Z, Liang S, et al. Role of kupffer cells in the induction of tolerance of orthotopic liver transplantation in rats[J]. *Liver Transpl*, 2008, 14(6): 823-836.
- [4] Liu YM, Chen Y, Li JZ, et al. Up-regulation of Galectin-9 in vivo results in immunosuppressive effects and prolongs

survival of liver allograft in rats[J]. *Immunol Lett*, 2014, 162(1 Pt A): 217-222.

- [5] Engel A, Barton GM. Unfolding new roles for XBP1 in immunity[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(5): 365-367.
- [6] Martinon F, Chen X, Lee AH, et al. TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(5): 411-418.
- [7] Yang Q, Shi Y, He J, et al. The evolving story of macrophages in acute liver failure[J]. *Immunol Lett*, 2012, 147(1/2): 1-9.
- [8] Sood S, Testro AG. Immune monitoring post liver transplant[J]. *World J Transplant*, 2014, 4(1): 30-39.
- [9] Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(11): 750-761.
- [10] Sica A, Invernizzi P, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology[J]. *Hepatology*, 2014, 59(5): 2034-2042.
- [11] He Y, Sun S, Sha H, et al. Emerging roles for XBP1, a sUPeR transcription factor[J]. *Gene Expr*, 2010, 15(1): 13-25.

(收稿日期: 2015-11-15 修回日期: 2016-01-04)

(上接第 2313 页)

的基因转录,发挥抑制细胞凋亡、促进细胞生存的作用。缺氧处理 JAR 细胞后,随着 p-Stat3 蛋白表达降低,使其下游抗凋亡因子表达下降,从而导致细胞凋亡增加。有研究得出重度子痫前期胎盘滋养细胞中 Stat3 和 p-Stat3 的蛋白表达水平下降^[10],滋养细胞凋亡增加,与本课题研究结果一致。

综上所述,本研究结果表明缺氧可使 p-Stat3 蛋白表达降低,细胞凋亡增加。Stat3 作为细胞内参与基因转录的蛋白,可协同其他信号通路共同发挥作用,深入探索缺氧和 Stat3 的相互关系可对缺氧性妊娠期疾病的病因、发病机制及预测、治疗提供新思路。

参考文献

- [1] Kleppa MJ, Erlenwein SV, Darashchonak N, et al. Hypoxia and the anticoagulants dalteparin and acetylsalicylic acid affect human placental amino acid transport [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99217.
- [2] Zhou J, Xiao D, Hu Y, et al. Gestational hypoxia induces preeclampsia-like symptoms via heightened endothelin-1 signaling in pregnant rats[J]. *Hypertension*, 2013, 62(3): 599-607.
- [3] Akhilesh M, Mahalingam V, Nalliah S, et al. Participation of hypoxia-inducible factor-1 α in the pathogenesis of preeclampsia-related placental ischemia and its potential as a marker for preeclampsia[J]. *Biomarkers Genomic Med*, 2014, 6(3): 121-125.

[4] Can M, Guven B, Bektas S, et al. Oxidative stress and apoptosis in preeclampsia[J]. *Tissue Cell*, 2014, 46(6): 477-481.

- [5] Longtine MS, Chen B, Odibo AO, et al. Villous trophoblast apoptosis is elevated and restricted to cytotrophoblasts in pregnancies complicated by preeclampsia, IUGR, or preeclampsia with IUGR[J]. *Placenta*, 2012, 33(5): 352-359.
- [6] Hong KH, Yoo SA, Kang SS, et al. Hypoxia induces expression of connective tissue growth factor in scleroderma skin fibroblasts[J]. *Clin Exp Immunol*, 2006, 146(2): 362-370.
- [7] 夏俊霞, 乔福元, 吉琼梅, 等. 低氧对 BeWo 细胞骨桥蛋白表达的影响[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2014, 43(1): 48-52.
- [8] Rad E, Dodd K, Thomas L, et al. STAT3 and HIF1 α signaling drives oncogenic cellular phenotypes in malignant peripheral nerve sheath tumors [J]. *Mol Cancer Res*, 2015, 13(7): 1149-1160.
- [9] Siveen KS, Sikka S, Surana R, et al. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1845(2): 136-154.
- [10] Zhang Z, Yang X, Zhang L, et al. Decreased expression and activation of Stat3 in severe preeclampsia[J]. *J Mol Histol*, 2015, 46(2): 205-219.

(收稿日期: 2015-11-23 修回日期: 2016-03-09)