

网络出版时间: 2016-10-19 13:54:51 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20161019.1354.007.html>

rhEPO 对 BPD 模型肺组织中 JAK2、STAT5 表达的影响

晏 兰, 张 华

摘要 目的 探讨重组人促红细胞生成素(rhEPO)对支气管肺发育不良(BPD)模型肺组织中酪氨酸激酶-2(JAK2)、信号转导和转录活化因子-5(STAT5)蛋白和 mRNA 表达的影响。方法 将 48 只孕 15 d 的健康 SD 大鼠分别孕囊内注射脂多糖(LPS)或生理盐水,待其自然分娩后将新生大鼠随机分为对照组、高氧组、rhEPO 组。采用 Western blot 和 RT-PCR 法检测肺组织中 JAK2、STAT5 蛋白和 mRNA 的表达。结果 高氧组 JAK2、STAT5 蛋白和 mRNA 表达减少, rhEPO 组 JAK2、STAT5 蛋白和 mRNA 表达增加,高氧暴露第 1、7、14 天末,各组间 JAK2、STAT5 蛋白和 mRNA 表达的差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 高氧组肺组织凋亡显著增加, rhEPO 组肺组织凋亡减少, rhEPO 对 BPD 模型肺组织的保护机制可能与活化 JAK2/STAT5 通路,减轻肺组织凋亡相关。

关键词 支气管肺发育不良; 重组人促红细胞生成素; 凋亡; 酪氨酸激酶-2/信号转导和转录活化因子-5

中图分类号 R 332

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)12-1749-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.12.007

支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)是导致早产儿致死率的主要疾病之一,严重影响早产儿的远期预后。EPO/EPOR 信号通路是促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)发挥重要作用的起始通路, EPO 通过与 EPOR 受体结合后进一步激活下游的酪氨酸激酶-2(Janus activating kinase-2, JAK2)及其信号转导和转录活化因子(signal transducer and activator of transcription, STAT)基因家族,其中 JAK2/STAT5 信号转导通路是实现抗凋亡作用的重要通路^[1]。多数动物实验研究^[2]已证实重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rhEPO)对 BPD 的防治作用,但是否与活化 JAK2/STAT5 信号通路、减轻肺组织凋亡相关,有待进一步研究。该实验旨在探讨宫内炎性暴露和生后高氧环境下,观察 rhEPO 对 BPD 模型肺组织中

JAK2、STAT5 蛋白和 mRNA 的表达的影响,进一步证实 rhEPO 对 BPD 模型保护机制可能与活化 JAK2/STAT5 信号转导通路,上调其表达,减轻肺组织凋亡相关,为 rhEPO 广泛应用于治疗慢性肺疾病提供一定的实验基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器 SPF 级 SD 大鼠购自广西医科大学动物实验中心; 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)购自美国 Sigma 公司; rhEPO 购自协和发酵麒麟(中国)制药有限公司; WIP 组织细胞裂解液购自北京赛默生物科技有限公司; BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; JAK2 一抗购自武汉博士德生物工程有限公司; STAT5 一抗购自万类生物科技有限公司; β -actin 一抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、RT-PCR 试剂盒均购自北京康为世纪有限公司; JAK2、STAT5、 β -actin 引物均由上海生工生物有限公司设计合成。引物序列, JAK2 F: 5'-CAACCTCAGCGGACTAAGA-3', R: 5'-GGCAG-CATTTGGTAAACTGG-3'; STAT5 F: 5'-TCAACAT-CAGCAGCAACCAC-3', R: 5'-TCTTCAGCACCTC-CATCACC-3'; β -actin F: 5'-GTCCCTGTATGCCTCTG-GTC-3', R: 5'-ACCGCTCATTGCCGATAGT-3'。JS-780 SensiAnsys 凝胶图像分析系统购自上海培清科技有限公司; Tanon 4100 全自动数码凝胶成像分析系统购自上海天能公司。

1.2 方法

1.2.1 BPD 动物模型的制备 健康 SD 大鼠(2~2.5 个月龄), 雌鼠 48 只(220~250 g), 雄鼠 16 只(250~300 g), 雌雄按 3:1 夜间合笼交配, 次晨取阴道分泌物涂片, 镜检见精子记为孕第 1 天。SD 大鼠于孕第 15 天予 10% 水合氯醛(0.3 ml/100 g)腹腔注射麻醉, 沿腹中线打开腹腔, 分别将 LPS(30 ng/ml)和生理盐水 5 μ l/孕囊注射到孕囊内。其待自然娩出后 24 h 内随机分为以下 3 组, 每组 18 只: 空气对照组、高氧组、rhEPO 组; 空气对照组则将新生大鼠置于自然空气下, 高氧组则生后第 1 天将新

2016-07-14 接收

基金项目: 广西医疗卫生重点科研课题(编号: 重 2011011)

作者单位: 桂林医学院附属医院新生儿科, 桂林 541001

作者简介: 晏 兰, 女, 硕士研究生;

张 华, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-

mail: zh4205@163.com

生大鼠置于氧浓度为 60% 的高氧舱内, rhEPO 组则从暴露于高氧第 1 天起, 予 rhEPO (1 400 IU/kg) 背部皮下注射, 隔天 1 次, 共 7 次。

1.2.2 高氧干预 空气对照组新生大鼠除外, 其他出生 24 h 内的新生大鼠与母鼠一起饲养于氧流量约 1.0 L/min、氧浓度为 60% 的氧箱内, 持续给氧并监测氧浓度, 用钠石灰及无水氯化钙以吸收水分和 CO₂, 每天定时开箱 1 h, 添加饲料和水, 定期更换垫料, 与空气对照组母鼠交换喂养, 以免喂养能力下降。

1.2.3 标本采集 于出生后高氧第 1、7、14 天末各组随机选 6 只新生大鼠, 10% 水合氯醛 (0.35 ml/100 g) 腹腔内注射麻醉, 断头放血处死动物, 予气管插管维持肺充气状态并迅速取下肺组织, 液氮速冻后存放于 -80 °C 冰箱备用。

1.2.4 RT-PCR 法检测肺组织 JAK2、STAT5 mRNA 表达 将肺组织取出置于用液氮预冷的研钵中, 研磨成粉末后移至 1.5 ml EP 管中, 按照总 RNA 试剂盒说明书提取 RNA, 取 5 μ l RNA 溶液置于含 EB 的 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳检测其完整性, 用紫外分光光度计检测其纯度和浓度, 根据第一链 cDNA Kit 说明书操作, 取肺组织总 RNA 3 μ g 逆转录合成相应的 cDNA, 以 β -actin 作内参照, cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应体系包括 cDNA 1 μ l, 2 $\times$ Taq MasterMix 12.5 μ l, 上下游引物各 1 μ l, RNase-Free Water 9.5 μ l, 共 25 μ l 体系。反应步骤如下: STAT5 和 β -actin 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55.6 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 31 个循环, 72 °C 终末延伸 2 min; JAK2 退火温度为 57.3 °C, 余 PCR 反应步骤同 STAT5。分别取 5 μ g 扩增产物加到含有 EB 的 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 自动凝胶图像分析仪显示结果, 用 SensiAnsys 凝胶图像分析软件检测图片中条带的光密度值, 然后计算 JAK2、STAT5 与 β -actin 光密度比值, 该值代表目的基因 mRNA 的相对表达水平, 各标本重复 3 次, 取其平均值。

1.2.5 Western blot 法检测肺组织 JAK2、STAT5 蛋白表达 将 -80 °C 冻存组织标本置于液氮预冷研钵中, 研磨成粉末转移到 1.5 ml EP 管中, 组织与 WIP 裂解液按 20 mg : 150 μ l 的比例加入震动摇匀, 冰上放置 30 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 取出上清液即为总蛋白组分。参考 BCA 蛋白浓度检测试剂盒说明书进行蛋白浓度定量, 设定浓度最低管为标准, 把样品调成同一浓度, 加入样品溶解液, 沸水浴加热 10 min 后置于冰上冷却, 每孔取

25 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 转印至 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1.5 h 后分别加 JAK2、STAT5 一抗 (1 : 400 稀释), 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 5 次, 加 HRP 标记的二抗 (1 : 5 000 稀释) 室温摇动孵育 2 h, TBST 洗膜 5 次, 用 ECL 化学试剂发光, 结果通过全自动数码成像分析系统显示, SensiAnsys 凝胶图像软件检测图片中条带光密度值, 然后计算 JAK2、STAT5 与内参照 β -actin 的光密度比值, 该值代表目的蛋白的相对表达水平, 重复 3 次, 取其平均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织中 JAK2、STAT5 蛋白及 mRNA 的表达 JAK2、STAT5 和 β -actin 蛋白分子量分别为 200、92、43 ku (图 1)。PCR 扩增产物片段长度分别为 113、135、344 bp (图 2、3), 与引物设计相符。

2.2 实验第 1、7、14 天末各组肺组织中 JAK2、STAT5 蛋白及 mRNA 表达 与空气对照组比较, 高氧组 JAK2、STAT5 蛋白及 mRNA 表达显著减少 ($P < 0.05$); 与高氧组比较, rhEPO 组 JAK2、STAT5 蛋白及 mRNA 表达明显增加 ($P < 0.05$); 与 rhEPO 组比较, 空气对照组 JAK2、STAT5 蛋白及 mRNA 表达减少 ($P < 0.05$)。见表 1、2。

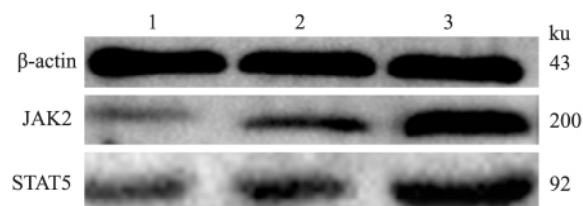


图 1 各实验组肺组织中 JAK2、STAT5 蛋白的表达水平
1: 高氧组; 2: 空气对照组; 3: rhEPO 组

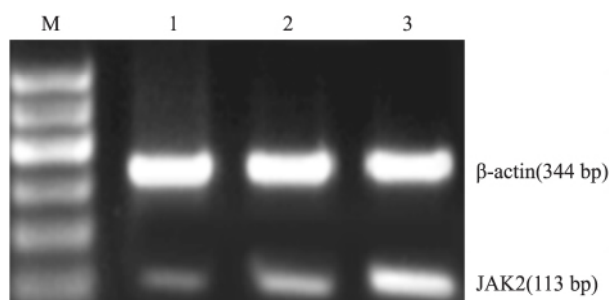


图 2 各实验组肺组织中 JAK2 mRNA 的表达水平
M: Marker; 1: 高氧组; 2: 空气对照组; 3: rhEPO 组

表1 不同时间段肺组织中 JAK2、STAT5 mRNA 的表达($n=6, \bar{x} \pm s$)

项目	第1天末	第7天末	第14天末	F 值	P 值
JAK2					
高氧组	0.27 ± 0.091 [*]	0.37 ± 0.034 [*]	0.52 ± 0.052 [*]	24.279	<0.001
空气对照组	0.39 ± 0.088 [#]	0.46 ± 0.055 [#]	0.58 ± 0.704 [#]	11.094	0.001
rhEPO 组	1.89 ± 0.369 [△]	2.47 ± 0.229 [△]	3.10 ± 0.558 [△]	12.415	0.001
STAT5					
高氧组	0.24 ± 0.098 [*]	0.33 ± 0.043 [*]	0.45 ± 0.052 [*]	13.317	<0.001
空气对照组	0.38 ± 0.063 [#]	0.49 ± 0.045 [#]	0.58 ± 0.051 [#]	20.920	<0.001
rhEPO 组	1.64 ± 0.521 [△]	2.33 ± 0.559 [△]	3.30 ± 0.558 [△]	13.922	<0.001

与空气对照组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 rhEPO 组比较: [#] $P < 0.05$; 与高氧组比较: [△] $P < 0.05$

表2 不同时间段肺组织中 JAK2、STAT5 蛋白的表达($n=6, \bar{x} \pm s$)

项目	第1天末	第7天末	第14天末	F 值	P 值
JAK2					
高氧组	0.56 ± 0.191 [*]	1.36 ± 1.180 [*]	2.06 ± 0.472 [*]	34.855	<0.001
空气对照组	0.95 ± 0.350 [#]	1.59 ± 0.269 [#]	2.37 ± 0.428 [#]	24.785	<0.001
rhEPO 组	1.45 ± 0.746 [△]	3.36 ± 0.523 [△]	5.00 ± 1.005 [△]	30.898	<0.001
STAT5					
高氧组	0.54 ± 0.121 [*]	0.89 ± 0.074 [*]	1.26 ± 0.203 [*]	37.098	<0.001
空气对照组	1.16 ± 0.353 [#]	1.64 ± 0.207 [#]	2.14 ± 0.381 [#]	13.810	<0.001
rhEPO 组	2.39 ± 0.387 [△]	3.33 ± 0.166 [△]	4.21 ± 0.618 [△]	26.858	<0.001

与空气对照组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 rhEPO 组比较: [#] $P < 0.05$; 与高氧组比较: [△] $P < 0.05$

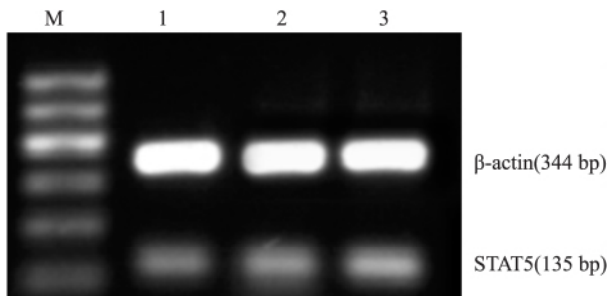


图3 各实验组肺组织中 STAT5 mRNA 的表达水平

M: Marker; 1: 高氧组; 2: 空气对照组; 3: rhEPO 组

3 讨论

BPD 是由多种因素综合作用所致的慢性肺疾病,随着围产医学技术的改进,早产儿存活率的提高亦加剧 BPD 的发生。其中机械通气时间、宫内感染、吸氧浓度大于 40% 时间为 BPD 发生的独立危险因素,研究^[9]证实新生小鼠暴露于 90% 高氧的环境下,肺组织凋亡数量与高氧暴露的时间呈正比,高氧暴露时间越长,肺组织凋亡越严重。研究^[10]显示 LPS 孕囊内注射可诱发宫内感染,使胚胎早期肺组织过度凋亡,最后导致 BPD 的发生,然而宫内炎性暴露和生后高氧两者协同效应恰好说明了 BPD 模型建立的可行性与实践性,由于新生大鼠与早产儿的肺部发育时期的相似性,以及本课题组前期的动

物研究均为本次动物实验 BPD 模型的构造打下了坚实的基础。

rhEPO 减少肺损伤的机制有抗炎、抗凋亡、促血管生成等,肺泡 II 型上皮细胞作为肺损伤修复的主要干细胞,也有 EPOR 表达,EPO 可减少博来霉素诱导的急性肺损伤模型中干细胞的损伤和凋亡^[11],推测用 rhEPO 干预 BPD 模型亦有很好的疗效。rhEPO 与 EPO 有同样的生物学效应,EPO 与特定的 EPOR 结合抑制组织细胞凋亡主要通过激活 PI3K/AKT 和 JAK2/STAT5 信号通路。本课题组前期动物实验^[12]已经证实 rhEPO 对 BPD 模型肺组织的保护作用与活化 PI3K/AKT 通路发挥抗肺组织凋亡作用相关;另外在创伤性脑损伤的肺组织^[13]、Lewis 肺癌细胞^[14]、心肌组织^[15]实验中,提示给予外源的 rhEPO 亦可促进组织中 JAK2/STAT5 活化,上调其表达,减少组织细胞的凋亡。因此推测 rhEPO 对 BPD 模型的保护作用可能与活化 JAK2/STAT5 信号通路、减少肺组织凋亡有关。本实验结果显示生后高氧第 1、7、14 天末,观察 rhEPO 对 BPD 模型新生大鼠肺组织 JAK2、STAT5 蛋白和 mRNA 表达,高氧组与空气对照组比较表达显著减少,推测与高氧暴露时间的延长,肺组织凋亡越严重有关。而 rhEPO 组与高氧组比较表达显著增加,因此推测 rhEPO 可减少肺组织的凋亡,考虑与 EPOR 结合活化下游 JAK2/

STAT5 信号转导通路,上调其表达有关。

本实验亦证实了随着时间的推移,rhEPO 组 JAK2、STAT5 蛋白和 mRNA 表达也是增加的,推测外源 rhEPO 和 EPOR 结合,促进其下游 JAK2/STAT5 信号通路活化有时间依赖性。rhEPO 组与空气对照组比较表达也是增加的,因此推测外源给予 rhEPO 较机体内自身合成的 EPO 能更好地结合 EPOR,进而活化上调 JAK2/STAT5 信号通路的表达,减少肺组织的凋亡,对 BPD 模型肺组织起到保护作用。本动物实验为 BPD 的防治和外源 rhEPO 在临床上的应用,提供了一定的理论和实践基础,也为临床中治疗新生儿 BPD 提供参考。

参考文献

- [1] Sola A, Wen T C, Hamrick S E, et al. Potential for protection and repair following injury to the developing brain: a role for erythropoietin [J]. *Pediatr Res*, 2005, 57(5 Pt 2): 110R - 117R.
- [2] Kakavas S, Demestihia T, Vasileiou P, et al. Erythropoietin as a novel agent with pleiotropic effects against acute lung injury [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2011, 67(1): 1 - 9.
- [3] Dieperink H I, Blackwell T S, Prince L S, et al. Hyperoxia and apoptosis in developing mouse lung mesenchyme [J]. *Pediatr Res*, 2006, 59(2): 185 - 90.
- [4] 王伟, 罗向阳, 蔡丽霞, 等. 宫内炎性暴露对胎鼠及早产大鼠肺细胞凋亡及 Bax/Bcl-2 基因表达的影响 [J]. *中国妇幼保健*, 2014, 29(26): 4304 - 7.
- [5] Yoshimi M, Maeyama T, Yamada M, et al. Recombinant human erythropoietin reduces epithelial cell apoptosis and attenuates bleomycin-induced pneumonitis in mice [J]. *Respirology*, 2008, 13(5): 639 - 45.
- [6] 张华, 赵日红, 刘漫君. 等重组人促红细胞生成素对高氧肺损伤新生大鼠细胞凋亡及蛋白激酶 B 表达的影响 [J]. *医学研究生学报*, 2013, 26(5): 469 - 72.
- [7] Jin W, Wu J, Wang H, et al. Erythropoietin administration modulates pulmonary Nrf2 signaling pathway after traumatic brain injury in mice [J]. *J Trauma*, 2011, 71(3): 680 - 6.
- [8] 张宏方, 张程斐, 周雪宁, 等. Jak 激酶抑制剂 AG490 对 Lewis 肺癌细胞增殖及 Jak-Stat 信号通路的影响 [J]. *西北药学杂志*, 2013, 28(2): 154 - 8.
- [9] Ma B X, Li J, Li H, et al. Recombinant human erythropoietin protects myocardial cells from apoptosis via the Janus-activated kinase 2/signal transducer and activator of transcription 5 pathway in rats with epilepsy [J]. *Curr Ther Res Clin Exp*, 2015, 77: 90 - 8.

The effect of rhEPO to the expression of JAK2 and STAT5 in the BPD model's lung tissue

Yan Lan, Zhang Hua

(Dept of Newborn, The Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001)

Abstract Objective To explore the role of Janus activating kinase-2/signal transducer and activator of transcription-5(JAK2/STAT5) pathway in recombinant human erythropoietin(rhEPO) protecting BPD. **Methods** Injected LPS or NS to 48 sprague-dawley(SD) rats, gestational sacs on 15th day of gestation, the newborn rats were divided into three groups: control group, hyperoxia group, rhEPO group. To detect the expression of lung tissue JAK2 and STAT5 protein and mRNA by Western blot and RT-PCR. **Results** In the hyperoxia group JAK2 and STAT5 expression was decreased, while in the rhEPO group, JAK2 and STAT5 expression was increased. The differences between the two groups were statistically significant on 1st, 7th and 14th day of hyperoxia exposure($P < 0.05$). **Conclusion**

Intrauterine inflammatory exposure combined with hyperoxia after birth can cause lung cell apoptosis increases. While rhEPO has certain control effects on BPD, possibly by reducing the pulmonary apoptosis. The protection mechanism may be associated with JAK2/STAT5 signaling pathway.

Key words bronchopulmonary dysplasia; recombinant human erythropoietin; apoptosis; Janus activating kinase-2/signal transducer and activator of transcription-5