

• 基础研究 •

慢性重组人生长激素对小鼠肝脏 STAT5 的影响及其机制*

谭 微,陈小兰,王楚琼,姜 泊,何继满[△]
(南方医科大学附属南方医院消化内科,广州 510515)

摘 要:目的 研究慢性重组人生长激素(rhGH)刺激对幼鼠肝脏 STAT5 的影响及其分子机制。方法 将 32 只幼鼠共分为 4 组:磷酸盐缓冲液(PBS)组、PBS+single rhGH 组、chronic rhGH 组、chronic rhGH+single rhGH 组。慢性生长激素刺激组 chronic rhGH 和 chronic rhGH+single rhGH 两组共 16 只小鼠每天按照 1 μg/g 的剂量腹腔注射 rhGH,对照组和 PBS+single rhGH 组 16 只小鼠每天腹腔注射等体积 PBS 0.1 mol/L,共 3 周。注射完最后 1 次 rhGH 和 PBS 16 h 后次日 8:00,处死前 30 min PBS 组和 chronic rhGH 组小鼠注射 PBS 0.1 mol/L,PBS+single rhGH 和 chronic rhGH+single rhGH 组小鼠按 1 μg/g 注射单剂量 rhGH。**结果** 慢性生长激素刺激组小鼠(chronic rhGH 和 chronic rhGH+single rhGH)与对照组小鼠(PBS 组和 PBS+single rhGH)相比体质量明显增加;与 PBS 组相比,chronic rhGH 组小鼠肝脏 GH 信号通路内基础 p-STAT5 水平显著降低;凝胶迁移实验检测的 chronic rhGH 组小鼠肝脏内 STAT5 与 DNA 的结合能力显著低于 PBS 组;处死前 30 min 按 1 μg/g 单剂量注射 rhGH 的小鼠中,chronic rhGH+single rhGH 组较 PBS+single rhGH 组小鼠肝脏 p-STAT5 水平则明显降低;chronic rhGH 组与对照组相比,CIS 含量显著升高,而 SOCS-2 的含量则无明显差异。**结论** rhGH 慢性刺激可抑制幼鼠肝脏细胞内 STAT5 的磷酸化,其机制可能与 CIS 含量的升高有关。

关键词:肝脏;重组人生长激素;STAT5;CIS;SOCS
doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.26.025 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2013)26-3142-03

Effect of chronic rhGH stimulation on STAT5 in normal mouse liver and its molecular mechanism*

Tan Wei,Chen Xiaolan,Wang Chuqiong,Jiang Bo,He Jiman[△]

(Department of Gastroenterology,Nanfang Hospital,Southern Medical University,Guangzhou,Guangdong 510515,China)

Abstract: Objective To investigate the effect of chronic recombinant growth hormone(rhGH) stimulation on hepatic STAT5 in healthy young mouse and its molecular mechanism. **Methods** 32 normal young mice were divided into 4 groups:PBS,PBS+single rhGH,chronic rhGH,chronic rhGH+single rhGH groups. The mice in the treatment groups(chronic rhGH and chronic rhGH+single rhGH)received intraperitoneal injection of rhGH at 1 μg/g body weight once daily for three weeks;the mice in the control groups(PBS and PBS+single rhGH) were injected with sterile phosphate buffered saline(PBS,0.1 mol/L). At next day 8:00 after 16 h of injection of last rhGH and PBS,at 30 min before killing mouse,PBS 0.1 mol/L was injected in the PBS group and the chronic rhGH group,while the single dose of rhGH 1 μg/g was injected in the PBS+single rhGH and the chronic rhGH+single rhGH group. **Results** Compared with the control mice(PBS group and PBS+single rhGH group),the body mass in the rhGH stimulation mice(chronic rhGH group and the chronic rhGH+single rhGH group) was significantly increased; compared with the PBS group,the base p-STAT5 level within the hepatic GH signal pathway in the chronic rhGH was significantly decreased; the combining capacity of hepatic STAT5 and DNA detected by EMSA in the chronic rhGH group was significantly lower than that in the PBS group;in the mice injected by single dose of rhGH 1 μg/g at 30 min before killing mouse,the hepatic p-STAT5 level in the chronic rhGH+single rhGH was significantly decreased compared with the chronic rhGH+single rhGH; compared with the control group,the CIS content in the chronic rhGH was obviously increased,while the SOCS-2 content had no obvious difference. **Conclusion** Chronic rhGH stimulation can inhibit the phosphorylation of hepatic STAT5 in normal young mouse,which mechanism could be related with the increase of CIS content.

Key words: liver; recombinant human growth hormone;STAT5;CIS;SOCS

生长激素(GH)在机体的生长、发育、代谢和衰老等生命过程中起着重要作用;其靶器官包括肝脏、肺、肾脏、肌肉、骨骼等,其中肝脏是 GH 最重要的靶器官^[1-2]。GH 已广泛应用于临床,不再仅仅用于生长激素缺乏的治疗,新的应用已经推广到治疗人类免疫缺陷病毒(HIV)相关的消耗综合征和脂肪再分布综合征、胱氨酸蓄积症、炎症性疾病如炎症性肠病(IBD)、慢性肾脏疾病等^[3-6]。然而,长期应用 GH 会产生各种不良反应,在不同的动物模型中,长期 GH 刺激会导致 GH 不敏感,即 GH 抵抗,甚至肿瘤发生等,但其机制还有待进一步的研究,此领域的进步对 GH 的临床使用具有重要的指导意义。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81170743)。 作者简介:谭微(1987~),硕士,主要从事慢性生长激素抵抗机制的研究。
[△] 通讯作者,Tel:13710710413;E-mail:jiman_he@163.com。

GH 首先与膜蛋白受体 GHR 结合,启动 GHR 胞内区段与 JAK2 的结合,从而导致 GHR 磷酸化,进而 STAT5 与 GH-GHR-JAK2 的多聚体结合后磷酸化,磷酸化的 STAT5 转入细胞核内,与转录因子结合,调节基因的转录。对于该信号通路调节机制的研究具有重要意义,SOCS 家族蛋白是 GH 信号通路的重要调节因子。SOCS 家族共有 8 个蛋白,包括 SOCS 1~7 及 CIS。在组织培养和 GH 敲除的小鼠中,有过慢性 GH 刺激导致 STAT5 不敏感的报道^[7]。其机制包括下调 GHR 含量,增加 CIS 或者 SOCS-2 的含量及促使 SHP2 向胞膜移位。但是,这些潜在的受体和受体后水平的研究都还未在正常小鼠中得到验证。本文以正常幼鼠为模型,研究慢性生长激素可能的负面作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料 本研究使用 8 周龄 BALB/C 雄性小鼠 32 只,由广东省动物研究所提供,在南方医院动物房按 SPF 级标准饲养。重组人生长激素(北京默克药业咨询有限公司);Beckman CS-15R 高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司);Bio-Rad 200/2.0 电泳仪(美国 Bio-Rad);硝酸纤维素滤膜(美国 Millipore 公司);BCA 蛋白检测试剂盒(上海碧云天公司);化学发光增强剂(ECL)试剂盒(美国 millipore 公司);P-Stat5 (Tyr694) (D4E7);# 4322 (Cell Signaling 公司);STAT5 抗体(c-17) (sc-835)、CIS 抗体(N19) (sc-1529)、SOCS-2 (H-74) (sc-9022)、Actin(1-19)(sc-1616)均购自 santa cruz 公司;山羊抗小鼠-HRP IgG(101843)、山羊抗兔-HRP IgG(101964)及兔抗山羊-HRP IgG (104119)均购自北京中杉金桥公司。EMSA 试剂盒(#20148)购自 Thermo 公司。

1.2 方法 32 只小鼠共分为 4 组:PBS 组、PBS+single rhGH、chronic rhGH、chronic rhGH+single rhGH,每组 8 只。慢性生长激素刺激组 chronic rhGH 和 chronic rhGH+single rhGH 两组共 16 只小鼠每天按 1 μg/g 剂量腹腔注射 rhGH,对照组 PBS 组和 PBS+single rhGH 组 16 只小鼠每天注射等量 PBS 0.1 mol/L,共 3 周。注射完最后 1 次 rhGH 和 PBS 16 h 后次日 8:00 处死,处死前 30 min PBS 组和 chronic rhGH 两组小鼠注射 PBS 0.1 mol/L,PBS+single rhGH 和 chronic rhGH+single rhGH 按 1 μg/g 腹腔注射单剂量 rhGH。处死前使用麻醉剂苯巴比妥充分麻醉,然后快速摘取肝脏液氮速冻,再移至-80℃冰箱长期保存。蛋白信号分子的测定中,肝组织在低温情况下用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 液匀浆,蛋白离心制取后,电泳分离,采用免疫印迹法检测小鼠肝组织总蛋白中 STAT5、p-STAT5、CIS、SOCS-2 的表达;凝胶迁移实验(EMSA)分析 STAT5 与 DNA 的黏附能力。

1.3 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 统计软件处理,两独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 慢性 rhGH 刺激增加小鼠体质量 rhGH 注射组和 PBS 对照组的小鼠相比,rhGH 组小鼠平均增加体质量比 PBS 对照组小鼠多 1.25 g,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 慢性 rhGH 刺激降低小鼠肝脏内基础的 p-STAT5 水平 完成最后 1 次 rhGH 腹腔内注射 16 h 后次日 8:00,PBS 组和 chronic rhGH 两组小鼠处死前 30 min 注射 PBS 0.1 mol/

L,chronic rhGH 组小鼠肝脏细胞稳定的 p-STAT5 水平(0.41 ± 0.03)显著低于 PBS 组(0.86 ± 0.07),差异有统计学意义($P < 0.05$);但肝脏内总 STAT5 蛋白水平无明显差异,见图 1。

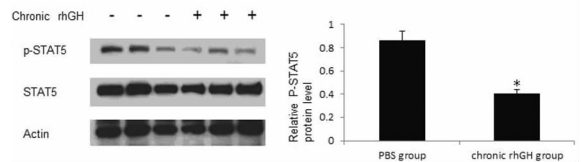


图 1 PBS 组与 chronic rhGH 组基础 p-STAT5 的表达

2.3 慢性 rhGH 刺激降低 STAT5 与 DNA 的结合能力 本实验采用 EMSA 方法检测细胞核 STAT5 与 DNA 黏附能力,chronic rhGH 组 STAT5 与 DNA 结合的水平(0.78 ± 0.03)显著低于 PBS 组(1.22 ± 0.04),差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

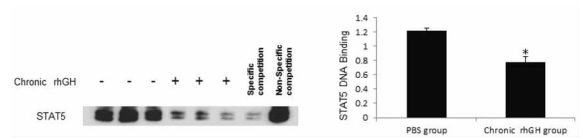


图 2 PBS 组与 chronic rhGH 组小鼠肝脏蛋白 STAT5 与 DNA 的结合能力

2.4 慢性 rhGH 刺激后单剂量 rhGH 刺激能显著提高 P-STAT5 水平 chronic rhGH 组与 chronic rhGH+single rhGH 组相比,chronic rhGH+single rhGH 组小鼠肝脏细胞 p-STAT5 水平明显高于 chronic rhGH 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。慢性 rhGH 刺激后,小鼠肝脏 STAT5 能对外源性单剂量 rhGH 产生应答,较处死前 30 min 无外源单剂量 rhGH 刺激组 chronic rhGH 组,STAT5 的磷酸化明显增多。

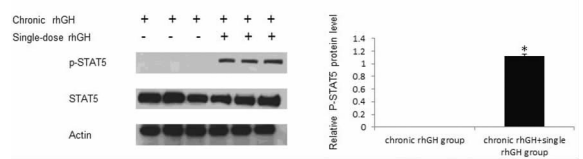


图 3 慢性 rhGH 刺激后单剂量的 rhGH 刺激可以诱导大量 STAT5 磷酸化

2.5 慢性 rhGH 刺激导致 STAT5 对外源性 rhGH 不敏感 PBS+single rhGH 组小鼠肝脏细胞 p-STAT5 水平(1.19 ± 0.04)显著高于 chronic rGH+single rhGH 组(0.88 ± 0.06),差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 4。

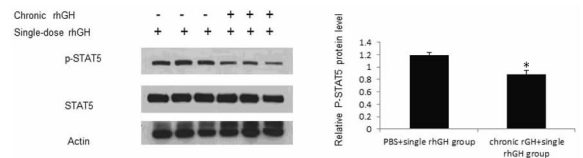


图 4 慢性 rhGH 刺激抑制外源性 rhGH 引起的 STAT5 的磷酸化

2.6 慢性 rhGH 刺激升高 CIS 含量,SOCS-2 的含量无明显改变 慢性生长激素刺激组(1.53 ± 0.47)小鼠肝脏细胞 CIS 蛋白含量较对照组(0.52 ± 0.01)明显升高,差异有统计学意义

($P<0.05$),但 SOCS-2 的含量未见明显差异(图 5)。

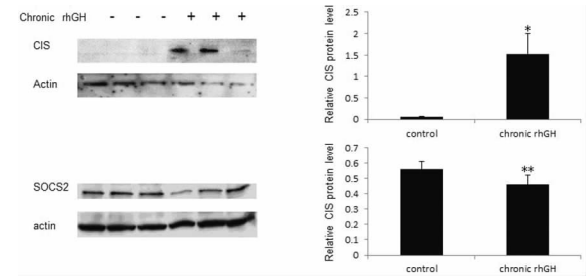


图 5 慢性 rhGH 刺激升高 CIS 含量,SOCS-2 的含量无明显改变

3 讨 论

GH 是机体成长、代谢等生命活动的重要调节因子, GH 信号的内稳态在健康和疾病中都是很重要的。本研究显示,正常小鼠,当接受慢性 rhGH 刺激以后,机体同样产生对 rhGH 的抵抗效应。这提示了, GH 抵抗的形成可能是机体对抗过量外源 GH 的一种普遍机制。

本研究中, GH 刺激导致的小鼠肝脏内基础 p-STAT5 水平、由外源 rhGH 刺激诱导产生的 p-STAT5 水平以及 STAT5 与 DNA 的结合能力均降低。这与以前报道的在肝脏 CWSV-1 细胞系、雌性大鼠以及基因工程小鼠中的结果具有一致性^[8-10]。

本课题组前期研究发现慢性 rhGH 刺激对内源性 GH 的分泌无影响^[11]。这和以前报道的病理机制下的 GH 不敏感的情况不一样。在慢性肾脏疾病和心脏衰竭的患者中,其血液中 GH 浓度较健康人更高^[12-13]。GH 基因工程小鼠血浆中的 GH 浓度亦是增高^[14]。

在白细胞介素-10(IL-10)结肠炎小鼠模型中发现,肝脏 GHR 水平下调可能与 STAT5 磷酸化水平的抑制有关^[15]。而在本研究在正常小鼠中,当慢性生长激素刺激后, GHR 水平却没有变化^[11]。

当敲除 SOCS-2 基因后,小鼠发育异常,获得性的巨大症^[16]。在尿毒症的 GH 抵抗模型中,部分 SOCS 基因的表达增加,其骨骼肌和肝脏的 SOCS-2 mRNA 的表达大量增多,从而与 GH 信号通路的不敏感相联系^[17-19]。然而,本研究的健康小鼠的模型中, SOCS-2 的含量与对照组相比,没有明显差异。

在转基因鼠和共转染的模型中发现 CIS 的增加与 GH 信号通路不敏感相联系^[20-22]。这和本研究在健康小鼠模型中的结论相一致。在健康小鼠中,慢性 rhGH 刺激导致的 STAT5 磷酸化降低是通过增加 CIS 的含量完成的,但 CIS 的作用位点和具体作用机制还有待下一步研究。

健康小鼠对慢性生长激素刺激同样产生抵抗,但其生理背景和其他病理情况不一样。相对应的,生长激素不敏感的机制也各不相同。这可能说明了,生长激素慢性刺激可以导致机体信号稳态的紊乱。也可能说明了这种生长激素不敏感是机体对抗生长激素过度刺激的一种负反馈机制。不同病理和生理情况的不敏感机制各不相同,这说明了细胞信号稳态调节的多态性。

参考文献:

[1] Kopchick JJ, Andry JM. Growth hormone(GH), GH re-

ceptor, and signal transduction[J]. Mol Genet Metab, 2000,71(2):293-314.

[2] Beyea JA, Sawicki G, Olson DM, et al. Hormone(GH) receptor knockout mice reveal actions of GH in lung development[J]. Proteomics, 2006,6(3):341-348.

[3] Spinola-Castro AM, Siviero-Miachon AA, da Silva MT, et al. The use of growth hormone to treat endocrine-metabolic disturbances in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients[J]. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2008, 52(5):818-832.

[4] Grunfeld C, Thompson M, Brown SJ, et al. Recombinant human growth hormone to treat HIV associated adipose redistribution syndrome 12 week induction and 24 week maintenance therapy[J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2007,45(3):286-297.

[5] Gupta V, Lee M. Growth hormone in chronic renal disease[J]. Indian J Endocrinol Metab, 2012,16(2):195-203.

[6] Youssef DM. Results of recombinant growth hormone treatment in children with end-stage renal disease on regular hemodialysis[J]. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2012, 23(4):755-764.

[7] Gebert CA, Park SH, Waxman DJ. Regulation of signal transducer and activator of transcription(STAT) 5b activation by the temporal pattern of growth hormone stimulation[J]. Mol Endocrinol, 1997,11(4):400-414.

[8] Gebert CA, Park SH, Waxman DJ. Down-regulation of liver JAK2-STAT5b signaling by the female plasma pattern of continuous GH stimulation[J]. Mol Endocrinol, 1999,13(2):213-227.

[9] Choi HK, Waxman DJ. Growth hormone, but not prolactin, maintains low-level activation of STAT5a and STAT5b in female rat liver[J]. Endocrinol, 1999, 140(11):5126-5135.

[10] Choi HK, Waxman DJ. Pulsatility of growth hormone (GH) signaling in liver cells: role of the JAK2/STAT5 pathway in GH action[J]. Growth Horm IGF Res, 2000, 10(1):1-8.

[11] 王娟,高原,谭薇,等.人生长激素慢性刺激对小鼠肝细胞 JAK/STAT5 信号通路的影响[J]. 现代消化及介入诊疗, 2011,16(1):28-31.

[12] Cicoira M, Kalra PR, Anker SD. Growth hormone resistance in chronic heart failure and its therapeutic implications[J]. J Card Fail, 2003,9(3):219-226.

[13] Rabkin R, Sun DF, Chen Y, et al. Growth hormone resistance in uremia, a role for impaired JAK/STAT signaling[J]. Pediatr Nephrol, 2005,20(3):313-318.

[14] Zhou Y, Xu BC, Maheshwari HG, et al. A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse) [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997,94(24):13215-13220. (下转第 3148 页)

增殖的过程,且更明确表明了三氧化二砷在治疗肾癌中的潜在临床价值。

另外,三氧化二砷虽然可通过抑制 PI3K-Akt 信号途径来发挥抑制人肾癌细胞增殖,但本研究仅在细胞水平进行了研究。有关三氧化二砷对肾癌的临床疗效,还需要通过动物实验进行进一步证实,并要比较不同浓度下三氧化二砷的效果以及对动物泌尿系统的毒性作用。

参考文献:

[1] 苏镇军,郭莉莉,刘晓霞,等. 宝藜苷-I 联合三氧化二砷对食管癌 Eca-109 细胞增殖的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2012,21(6):593-595.

[2] 吴文娟,邹英华,南月敏,等. 三氧化二砷碘油栓塞对兔 VX2 肝癌凋亡、增殖及肝功能的影响[J]. 实用放射学杂志,2006,22(1):1-4.

[3] 李红,邵海波,徐克. 经导管肝动脉三氧化二砷治疗兔 VX2 移植性肝肿瘤[J]. 中国医学影像技术,2009,25(5):878-880.

[4] 耿晓星,全丽娜,马荣,等. 三氧化二砷和全反式维甲酸对人宫颈癌 HeLa 细胞生长的影响[J]. 中华肿瘤杂志,2011,33(1):8-12.

[5] Xia H,Diebold D,Nho R,et al. Pathological integrin signaling enhances proliferation of primary lung fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. J Exp Med,2008,205(7):1659-1672.

[6] Meijerink J,Mandigers C,de Locht LV,et al. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR[J]. J Mol Diagn,2001,3(2):55-61.

[7] Yu J,Qian H,Li Y,et al. Therapeutic effect of arsenic trioxide(As_2O_3) on cervical cancer in vitro and in vivo through apoptosis induction[J]. Cancer Biol Ther,2007,6(4):580-586.

[8] Zhou C,Boggess JF,Bae-Jump V,et al. Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity by arsenic trioxide As_2O_3 in endometrial carcinoma cells[J]. Gynecol Oncol,2007,105(1):218-222.

[9] Yang L,Luo JM,Li Y,et al. As_2O_3 induces demethylation and up-regulates transcription of SHP-1 gene in human lymphoma cell line T2 cells[J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi,2009,31(6):423-427.

[10] Liu XM,Xiong XF,Song Y,et al. Possible roles of a tumor suppressor gene PIG11 in hepatocarcinogenesis and As_2O_3 -induced apoptosis in liver cancer cells[J]. J Gastroenterol,2009,44(5):460-469.

[11] Noh EK,Kim H,Park MJ,et al. Gefitinib enhances arsenic trioxide(As_2O_3)-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cell line[J]. Leuk Res,2010,34(11):1501-1505.

[12] 张德芳,赵洪国. ATRA 与三氧化二砷合并化疗药物治疗急性早幼粒细胞白血病患者效果[J]. 齐鲁医学杂志,2010,25(1):18-20,23.

[13] 王德林,米粲,陈在贤,等. 三氧化二砷抑制人肾癌 786-0 细胞血管生成及浸润转移机制的初步研究[J]. 重庆医科大学学报,2007,32(2):134-137.

(收稿日期:2013-03-15 修回日期:2013-05-28)

(上接第 3144 页)

[15] DiFedele LM,He J,Bonkowski EL,et al. Tumor necrosis factor alpha blockade restores growth hormone signaling in murine colitis [J]. Gastroenterology, 2005, 128 (5): 1278-1291.

[16] Greenhalgh CJ,Bertolino P,Asa SL,et al. Growth enhancement in suppressor of cytokine signaling 2(SOCS-2)-deficient mice is dependent on signal transducer and activator of transcription 5b(STAT5b)[J]. Mol Endocrinol,2002,16(6):1394-1406.

[17] Schaefer F,Chen Y,Tsao T,et al. Impaired JAK-STAT signal transduction contributes to growth hormone resistance in chronic uremia[J]. J Clin Invest,2001,108(3):467-475.

[18] Sun D,Zheng Z,Tummala P,et al. Chronic uremia attenuates growth hormone induced signal transduction in skeletal muscle[J]. J Am Soc Nephrol,2004,15(10):2630-2636.

[19] Woelfle J,Rotwein P. In vivo regulation of growth hormone-stimulated gene transcription by STAT5b[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab,2004,286(3):393-401.

[20] Karlsson H,Gustafsson JA,Mode A. Cis desensitizes GH induced Stat5 signaling in rat liver cells[J]. Mol Cell Endocrinol,1999,154(1/2):37-43.

[21] Morales O,Faulds MH,Lindgren UJ,et al. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits GH-induced expression of SOCS-3 and CIS and prolongs growth hormone signaling via JAK2/STAT5 system in osteoblast like cells[J]. J Biol Chem,2002,277(38):34879-34884.

[22] Tollet-Egnell P,Flores-Morales A,Stavr us-Evers A,et al. Growth hormone regulation of SOCS-2, SOCS-3, and CIS messenger ribonucleic acid expression in the rat[J]. Endocrinol,1999,140(8):3693-3704.

(收稿日期:2013-03-20 修回日期:2013-05-22)