

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.23.007

机械力刺激对人肺泡上皮 A549 细胞 JNK 蛋白表达的影响*

胡晓波¹, 张优仪², 程德云^{3△}

(1. 四川省成都市第一人民医院呼吸内科 610041; 2. 四川省人民医院放射科, 成都 610041;

3. 四川大学华西医院呼吸内科, 成都 610041)

[摘要] **目的** 探讨机械力刺激对人肺泡上皮 A549 细胞 c-Jun 氨基末端激酶/促分裂原活化蛋白激酶 (JNK/MAPK) 表达的影响。**方法** 建立离体的 A549 细胞机械刺激模型: 分别以大小为 1 000 μ strain 的张应力或压应力刺激细胞, 在刺激前和刺激后 0、5、15、30、60 min 时间点进行观察, 共 10 组, 每组 3 皿细胞。采用 Western blot 检测机械刺激后细胞内磷酸化 JNK/MAPK 蛋白、总 JNK/MAPK 蛋白的表达变化。**结果** A549 细胞经机械力刺激后, 磷酸化 JNK/MAPK 蛋白水平增加。张应力组在 30 min 时间点增加最明显, 压应力组在 15 min 时间点最明显。之后随着机械刺激时间延长, 张应力和压应力刺激组的磷酸化 JNK 蛋白水平均出现下降, 在 60 min 时下降至基线水平。**结论** 1 000 μ strain 张应力或压应力刺激, 均激活 A549 细胞 JNK/MAPK, 提示 JNK 通路可能参与了机械力诱导的 A549 细胞信号转导。

[关键词] 肺泡; 蛋白质类; 机械力; A549; JNK/MAPK; 张应力; 压应力

[中图分类号] R563.8; R34

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)23-3188-02

Expression of JNK/MAPK in A549 cells induced by mechanical force*

Hu Xiaobo¹, Zhang Youyi², Cheng Deyun^{3△}

(1. Department of Respiratory Medicine, the First People's Hospital of Chengdu City, Chengdu, Sichuan 610041, China;

2. Department of Radiology, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610041, China;

3. Department of Respiratory Medicine, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

[Abstract] **Objective** To explore whether the JNK/MAPK is involved in the mechanotransduction of the A549 cells induced by mechanical force. **Methods** Cells were divided into ten groups: tensile stress groups (0, 5, 15, 30, 60 min), and compressive stress groups (0, 5, 15, 30, 60 min), 3 replicate wells in each group. Cells were stimulated by tensile stress or compressive stress respectively at the magnitude of 1 000 μ strain for 5, 15, 30, 60 min. Then the protein level of JNK and phosphorylated JNK were tested by Western blot. **Results** After mechanical stimulation, the protein level of phosphorylated JNK/MAPK increased. These were most obviously at the 30 min time point in both tensile stress group and the 15 min time point in compressive stress group. However, the protein level of phosphorylated JNK/MAPK returned to the original level at the 60 min time point in tensile stress group and the compressive stress group. **Conclusion** Mechanical force activated the expression of JNK in A549 cells. JNK pathway might be involved in signal transduction in A549 cells induced by mechanical force.

[Key words] pulmonary alveoli; proteins; mechanical force; A549; JNK/MAPK; tensile stress; compressive stress

呼吸机诱导的肺损伤是机械通气最直接的危害。为了提高机械通气救治率, 减少患者死亡, 众多研究试图阐明呼吸机诱导肺损伤的相关机制^[1-5]。国外研究发现机械力可引起肺上皮细胞释放炎症介质, 产生活性氧簇, 引起细胞增殖, 导致细胞骨架蛋白改变等^[6-9], 而国内鲜有这方面的报道。c-Jun 氨基末端激酶/促分裂原活化蛋白激酶 (JNK/MAPK) 是有丝分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 家族中重要的信号传导因子, 是否参与了肺细胞力信号的转导并不清楚。因此, 本课题组在前期研究基础上^[10-11], 观察机械力刺激人肺泡上皮 A549 细胞 JNK/MAPK 蛋白的表达变化。

1 材料与方法

1.1 材料 A549 细胞株 (美国标准生物品收藏中心); DMEM 细胞培养基和 10% 的小牛血清 (美国 GIBCO 公司); 聚氟乙烯膜 (PVDF 膜, 美国 Millipore 公司); 兔抗人 JNK 多克隆抗体、兔抗人磷酸化 JNK 抗体、兔抗人 β -actin 多克隆抗体 (美国 Cell signaling 公司); 蛋白定量试剂盒、发光底物试剂盒 (美国 Pierce 公司); 4 点弯曲细胞力学加载仪 (成都电子科技大学研制)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 A549 细胞培养于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中, 置于 CO₂ 孵箱 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 95% 空气)。当细胞生长密度约 80% 时, 用胰酶消化传代。按 2×10^5 /L 的细胞密度接种于加力板上, 然后放入培养皿, 于孵箱中继续培养 24~48 h。加力前用无血清培养基孵育细胞过夜, 使细胞同步化。

1.2.2 试验分组 根据机械力的不同, 试验分张应力试验和压应力试验。张应力试验设 0、5、15、30、60 min 刺激共 5 组。压应力试验设 0、5、15、30、60 min 刺激也是 5 组。每组 3 皿细胞。

1.2.3 建立离体细胞刺激力学模型 分别以大小为 1 000 μ strain 的张应力和压应力刺激 A549 细胞, 在刺激后 5、15、30、60 min 时间点进行观察; 0 min 刺激组行伪暴露。

1.2.4 Western blot 法检测蛋白表达 按文献^[10-11]方法提取细胞总蛋白、蛋白定量, Western blot 法检测蛋白表达。弃上清液, 加入细胞裂解液后再用超声裂解仪破碎, 4 $^{\circ}$ C 低温离

心分装样本,然后蛋白浓度测定。10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,上样前加变性剂。电泳完毕后切胶,蛋白电泳转移到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭,过夜。以三羟甲基氨基甲烷(TBST)缓冲液漂洗,加一抗 1:1 000,37℃孵育 1 h,如前漂洗。再加入辣根过氧化物酶标记的二抗(抗兔 1:5 000),再孵育 60 min,再 TBST 漂洗 3 次。加入显色剂,暗室曝光,见到显色后终止反应,清水冲洗。用 Bio-Image 分析系统对条带灰度值测定。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较用 SNK 法,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

0 min 时经机械应力伪刺激有低水平的 JNK 磷酸化阳性反应,张应力组 0 min 时为 0.56 ± 0.12 ,压应力组 0 min 时 0.62 ± 0.22 。随着应力刺激开始,JNK/MAPK 蛋白磷酸化出现变化趋势。张应力刺激 5 min 时为 0.71 ± 0.17 ,JNK/MAPK 蛋白磷酸化表达增多,但和 0 min 时间点相比较差异无统计学意义($P>0.05$)。随着时间的延长,JNK/MAPK 蛋白磷酸化表达呈上升趋势。张应力组 15 min 时为 1.03 ± 0.21 ,磷酸化 JNK 和 0 min 时(0.56 ± 0.12)比较差异有统计学意义($P<0.05$)。张应力组 30 min 时间点磷酸化 JNK 条带灰度值最高,至 60 min 磷酸化水平又明显减少,接近刺激前水平。压应力组刺激 5 min 时为 0.98 ± 0.30 ,JNK/MAPK 蛋白磷酸化表达增多和 0 min 时(0.62 ± 0.22)比较差异有统计学意义($P<0.05$)。压应力组 15 min 时为 1.47 ± 0.52 ,磷酸化 JNK 水平表达最高,和 0 min 时比较差异有统计学意义($P<0.05$)。压应力组 30 min 时磷酸化 JNK 水平开始下降,在压应力组 60 min 时磷酸化 JNK 水平接近机械刺激前水平,见图 1。

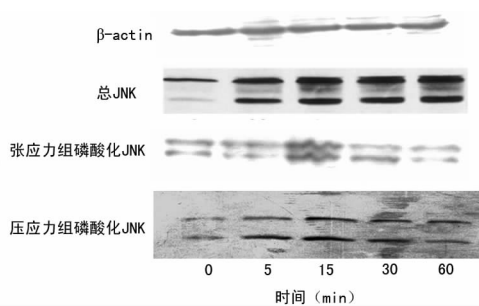


图 1 机械张应力和压应力刺激 A549 细胞后不同时间点磷酸化 JNK、总 JNK、内参 β -actin 的表达

3 讨 论

体外培养细胞然后施加机械应力刺激的力学模型是目前较为新颖的研究方式,已经应用于呼吸领域^[12]。肺泡上皮细胞在受到机械力刺激后,胞内钙离子浓度出现变化,肌动蛋白丝聚合等,并引发了后续细胞内一系列信号转导^[13]。JNK 广泛存在于真核细胞中,介导机体细胞的生长、分化、分裂、死亡等多种生物学行为,是细胞信息传递的枢纽。JNK 位于细胞质,相对分子质量为 46×10^3 和 54×10^3 ,通过苏氨酸和酪氨酸残基羟基侧链的双重磷酸化而被激活。JNK 蛋白激酶有 3 个基因编码:JNK1、JNK2 和 JNK3。JNK1 和 JNK2 基因在全身广泛表达,主要在生物学和病理过程中发挥作用。多种细胞外信号如热损伤、紫外线、渗透压改变、放射线、炎症信号因子、氧自由基、休克等均可激活 JNK/MAPK 信号通路^[14]。研究发现机械牵拉刺激可活化 JNK/MAPK 信号通路,促进心肌细胞

增生^[15]。而关于机械牵拉刺激肺上皮细胞是否能激活其 JNK MAPK 信号通路目前尚未见详细研究。

本课题组应用 4 点加力装置,通过免疫印迹法观察机械应力刺激肺上皮 A549 细胞内 JNK 信号通路的活化情况。该 4 点加力装置,可以分别提供张应力和压应力。本研究观察到 0 min 时经机械应力伪刺激仍然有低水平的 JNK 磷酸化阳性反应,说明正常情况下的 A549 细胞有一定量的 JNK 磷酸化本底。通过不同类型的应力刺激,观察细胞内的信号因子的变化情况。本研究发现,不论哪种应力刺激,A549 细胞受到机械应力作用后,细胞内的磷酸化 JNK 水平均有增高,并有一定的时间变化规律,提示 JNK 可能参与了 A549 细胞内的机械应力信号转导。研究观察到,随时间进一步推移,JNK 磷酸化程度反而有所下降。推测产生上述变化的原因可能是由于刺激时间过长以后,力传导因子如离子通道或细胞骨架产生耐受,在一定不应期内对持续的应力不再起反应,使得细胞内后续生物化学反应停止,中断了机械力信号向胞内传导,而原本激活的 JNK 已被磷酸酯酶去磷酸化失活所致。

总之,本试验对机械力刺激肺 A549 细胞的 JNK 蛋白表达变化进行了初步研究,探讨了不同种类的应力对 A549 细胞内重要信号因子表达的影响,提示机械应力对 A549 细胞 JNK 蛋白的磷酸化有着重要作用。这为后续研究肺细胞机械力信号转导机制打下了基础。

参考文献

- [1] Guerin C, Richard JC. Current ventilatory management of patients with acute lung injury/acute respiratory distress syndrome[J]. Expert Rev Respir Med, 2008, 2(1): 119-133.
- [2] Villar J. Ventilator or physician-induced lung injury? [J]. Minerva Anesthesiol, 2005, 71(6): 255-258.
- [3] Han B, Lodyga M, Liu M. Ventilator-induced lung injury: role of protein-protein interaction in mechanosensation [J]. Proc Am Thorac Soc, 2005, 2(3): 181-187.
- [4] Plataki M, Hubmayr RD. The physical basis of ventilator-induced lung injury [J]. Expert Rev Respir Med, 2010, 4(3): 373-385.
- [5] Letsiou E, Rizzo AN, Sammani S, et al. Differential and opposing effects of imatinib on LPS- and ventilator-induced lung injury [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015, 308(3): L259-269.
- [6] Dekker RJ, Van Soest S, Fontijn RD, et al. Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Krüppel-like factor (KLF2) [J]. Blood, 2002, 100(5): 1689-1698.
- [7] Wirtz HR, Dobbs LG. Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical stretch of lung epithelial cells[J]. Science, 1990, 250(4985): 1266-1269.
- [8] Roan E, Waters CM. What do we know about mechanical strain in lung alveoli? [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011, 301(5): L625-635.
- [9] Suki B, Stamenovic D, Hubmayr R. Lung Parenchymal Mechanics[J]. Compr Physiol, 2011, 1(3): 1317-1351.
- [10] 胡晓波, 张优仪, 程德云. 周期性机械牵拉诱导 A549 细胞 p38 MAPK 的表达 [J]. 国际呼吸杂志(下转第 3192 页)

技领域的热点之一^[10-11]。细胞自噬在维持细胞的正常生长、发育中起着重要作用,自噬过度或自噬不足会导致疾病的发生^[12]。

自噬性程序性细胞死亡的形态学特征主要表现为细胞质中出现大量包裹着细胞质和细胞器的空泡样结构,即自噬空泡,同时伴有溶酶体对空泡内成分的降解。LC-3 定位于前自噬泡和自噬泡膜表面,是细胞自噬泡膜的通用标记物^[13]。在自噬泡形成的早期阶段,LC-3 的主要形式是 LC3-I。在哺乳动物 E1 泛素样酶 Atg7 和 E2 泛素样酶 Atg3 的催化下,LC3-I 与位于自噬泡膜表面的磷脂酰乙醇胺(PE)结合形成 LC3-II。LC3-I 的相对分子质量为 16×10^3 ,LC3-II 的相对分子质量为 14×10^3 。LC3 从 LC3-I 到 LC3-II 的转变是自噬发生的标志之一,LC3-II 的水平或 LC3-II/LC3-I 的比例通常与细胞中自噬空泡的数量呈正相关^[14-15]。

Bif-1,又名 Endophilin B1,属于 Endophilin 蛋白家族,它首先在 Bax 的绑定蛋白中被发现。最近研究发现,Bif-1 介导 Bax 构象变化,激活 Bax 促凋亡功能,调控细胞凋亡通路^[16];另一方面,Bif-1 可通过 UVRAG 蛋白与 Beclin-1 结合,从而激活 VPS34 蛋白,参与调控细胞自噬的发生^[17-18]。

本研究用白藜芦醇处理脑胶质瘤 U87 细胞,电镜下可见明显的自噬空泡,且从 mRNA 及蛋白水平均检测到自噬相关基因 LC-3 和 Bif-1 表达水平的上调,表明白藜芦醇作用后可以引发自噬过程的发生,诱导细胞自噬也是白藜芦醇发挥肿瘤抑制作用的机制之一,有关白藜芦醇诱导凋亡及引发自噬的相关关系尚待进一步研究。

参考文献

[1] Raederstorff D,Kunz I,Schwager J. Resveratrol,from experimental data to nutritional evidence:the emergence of a new food ingredient[J]. Ann N Y Acad Sci,2013,1290(8):136-141.

[2] 吕林林,许丽娜,彭金咏. 抗脑胶质瘤中药的研究进展[J]. 中国现代应用药学,2014,31(8):1024-1031.

[3] Kanzawa T,Germano IM,Komata T,et al. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells[J]. Cell Death Differ,2004,11(4):448-457.

[4] 占贞贞,陈思,叶艳,等. 自噬及自噬性细胞死亡抑制紫杉醇诱导的胃癌细胞凋亡[J]. 安徽医科大学学报,2007,42(2):123-127.

[5] 黄益玲,黄利鸣,尤程程,等. 内质网应激途径在天花粉蛋白诱导的 Hela 细胞凋亡中的作用[J]. 中国妇幼保健,2011,26(7):5423-5425.

[6] 黄强,董军. 王之敏主编神经肿瘤学[M]. 北京:人民卫生出版社,2011:215.

[7] Nakata R,Takahashi S,Inoue H. Recent advances in the study on resveratrol[J]. Biol Pharm Bull,2012,35(3):273-279.

[8] Liu YZ,Wu K,Huang J,et al. The PTEN/PI3K/Akt and Wnt/ β -catenin signaling pathways are involved in the inhibitory effect of resveratrol on human colon cancer cell proliferation[J]. Int J Oncol,2014,45(1):104-112.

[9] 李明新,李健,樊伟英. 白藜芦醇诱导人脉络膜恶性黑色素瘤细胞凋亡及其机制研究[J]. 中华实验外科杂志,2012,29(12):2566-2568.

[10] Sharma K,Le N,Alotaibi M,et al. Cytotoxic autophagy in cancer therapy[J]. Int J Mol Sci,2014,15(6):10034-10051.

[11] Meijer AJ,Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells[J]. Int J Biochem Cell Biol,2004,36(12):2445-2462.

[12] Shintani T,Klionsky DJ. Autophagy in health and disease;a double-edged sword[J]. Science,2004,306(5698):990-995.

[13] Kabeya Y,Mizushima N,Ueno T,et al. LC3,a mammalian homologue of yeast Apg8p,is localized in autophagosome membranes after processing[J]. EMBO J,2000,19(21):5720-5728.

[14] Kabeya Y,Mizushima N,Yamamoto A,et al. LC3,GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation[J]. J Cell Sci,2004,117(Pt 13):2805-2812.

[15] 夏立平,李凌云,费喜峰,等. 自噬参与 6-羟基多巴胺诱导多巴胺能神经元死亡的实验观察[J]. 南方医科大学学报,2010,30(12):2649-2651.

[16] Takahashi Y,Karbowski M,Yamaguchi H,et al. Loss of Bif-1 suppresses Bax/Bak conformational change and mitochondrial apoptosis[J]. Mol Cell Biol,2005,25(21):9369-9382.

[17] Takahashi Y,Coppola D,Matsushita N,et al. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis[J]. Nat Cell Biol,2007,9(10):1142-1151.

[18] Takahashi Y,Meyerkord CL,Wang HG. Bif-1/endophilin B1;a candidate for creseent driving force in autophagy[J]. Cell Death Differ,2009,16(7):947-955.

(收稿日期:2016-04-16 修回日期:2016-06-24)

(上接第 3189 页)

志,2012,32(10):745-748.

[11] 胡晓波,程德云,张优仪,等. 机械力对培养人肺泡 II 型上皮细胞黏附分子-1 表达的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志,2009,32(2):99-102.

[12] Waters CM,Roan E,Navajas D. Mechanobiology in lung epithelial cells:measurements, perturbations, and responses[J]. Compr Physiol,2012,2(1):1-29.

[13] Nayak PS,Wang Y,Najrana T,et al. Mechanotransduction via TRPV4 regulates inflammation and differentiation in fetal mouse distal lung epithelial cells[J]. Respir

Res,2015,16(1):60.

[14] Goldsmith CS,Bell-Pedersen D. Diverse roles for MAPK signaling in circadian clocks [J]. Adv Genet,2013,4:1-39.

[15] Cheng WP,Wang BW,Lo HM,et al. Mechanical stretch induces apoptosis regulator TRB3 in cultured cardiomyocytes and volume-overloaded heart [J]. PLoS One,2015,10(4):e0123235.

(收稿日期:2016-04-23 修回日期:2016-06-23)