

- [J]. *Oncol Rep*, 2011 25(5):1439-1446
- 4 王雅平, 华鲁纯, 蒿汉坤, 等. 生物钟基因 hPer2 在人结直肠癌中的表达及其临床意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2009, 26(8):1034-1036
- 5 Badiu C. Genetic clock of biologic rhythms[J]. *J Cell Mol Med*, 2003, 71(4):408-416
- 6 Fu L, Pelicano H, Liu J, *et al.* The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response *in vivo* [J]. *Cell*, 2002, 111(1):41-50
- 7 Yang X, Wood PA, Oh EY, *et al.* Down regulation of circadian clock gene Period2 accelerates breast cancer growth by altering its daily growth rhythm[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 117(2):423-431
- 8 Zhou P, Jiang W, Weghorst CM, *et al.* Overexpression of cyclin D1 enhances gene amplification[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(1):36-39
- 9 Jin M, Inoue S, Umemura T, *et al.* Cyclin D1, p16 and retinoblastoma gene product expression as a predictor for prognosis in non-small cell lung cancer at stage I and II [J]. *Lung Cancer*, 2001, 34(2):207-218
- 10 宋鑫, 冀文茹, 夏养志, 等. p15、细胞周期蛋白 D1 和转移生长因子 $\beta 1$ 在非小细胞肺癌中的表达及其意义[J]. *中华病理学杂志*, 2001, 30(3):218-219
- (收稿:2011-11-26)
- (修回:2011-12-11)

JAK-STAT 通路参与 CTGF 诱导人胚肺成纤维细胞转分化的研究

黄晓燕 廉姜芳 金丽华 徐炜烽 杨 曦 张 珠

摘 要 **目的** 研究 JAK-STAT 信号通路在重组人结缔组织生长因子(recombinant human, CTGF)诱导人胚肺成纤维细胞(HFL-I)转分化过程中的作用。**方法** 将体外培养的 HFL-I 分为正常对照组、CTGF 组及 CTGF + JAK-STAT 特异性抑制剂通路抑制剂 AG490 组,选取不同时相点,Western blotting 测定平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、磷酸化蛋白(p-STAT3)和总蛋白 STAT3 的蛋白表达,RT-PCR 检测 STAT3 mRNA 表达。**结果** 正常体外培养的 HFL-I 有微量的 p-STAT3、 α -SMA 表达,加入 20ng/ml CTGF 诱导 15min 后 p-STAT3 水平明显升高($P < 0.05$),30min 时升至顶峰后逐渐减弱;诱导 24h 后 α -SMA 表达显著升高($P < 0.05$)。AG490 50 μ mol/L 预处理 60min, p-STAT3 和 α -SMA 表达明显抑制($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** CTGF 诱导 HFL-I 转分化为肌成纤维细胞, JAK-STAT 通路参与上述过程,其特异性抑制剂 AG490 可有效抑制该效应。

关键词 JAK-STAT 肺纤维化 人胚肺成纤维细胞 CTGF α -SMA

Involvement of JAK-STAT Signaling in CTGF Promoted Lung Fibroblast-myofibroblast Transdifferentiation. Huang Xiaoyan, Lian Jiangfang, Jin Lihua, *et al.* Key Laboratory of Organ Transplantation, Li Huili Hospital, Zhejiang 315041, China

Abstract Objective To investigate the effect of JAK-STAT signal transduction pathway in the transdifferentiation process of recombinant human CTGF-stimulated human embryonic lung fibroblasts(HFL-I). **Methods** The HFL-I were cultured *in vitro* and were divided into three equal groups: control group, CTGF group, CTGF and JAK-STAT inhibitor AG490 group. The expression levels of total-STAT3, phosphor-STAT3 and α -SMA in each group were detected by western blot, while RT-PCR was used to test the expression of STAT3 mRNA in each group. **Results** The levels of p-STAT3 and α -SMA were significantly increased in CTGF group compared with control group($P < 0.05$). And JAK-STAT inhibitor AG490 (50 μ mol/L) largely down-regulated α -SMA and p-STAT3 expression in response to CTGF($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** JAK-STAT is a upstream mediator in the lung fibroblast-myofibroblast process stimulated by CTGF, and JAK-STAT inhibitor AG490 can significantly abrogated the effect of CTGF.

Key words JAK-STAT; Pulmonary fibrosis; Human fetal lung fibroblasts; CTGF; α -SMA

基金项目:宁波市自然科学基金资助项目(2008A610081);宁波市医学科技项目(2008002)

作者单位:315041 宁波市医疗中心李惠利医院器官移植重点实验室(黄晓燕、杨曦);心内科(廉姜芳、张珠);科教科(金丽华);检验科(徐炜烽)

通讯作者:廉姜芳,电子信箱:hjmpin@163.com

酪氨酸蛋白激酶/信号转导子和转录激活子(janus protein tyrosine kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK-STAT)通路是细胞因子信号转导的重要通路之一,不仅参与炎症反应,同时也

与细胞增殖、分化、凋亡等密切相关。JAK 磷酸化后进而激活“信号转录子和转录激活子”(STAT),使之进入细胞核诱导目的基因表达。结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是近年发现的一种新的可刺激成纤维细胞增殖和分泌胶原的生长因子^[1]。生理状态下 CTGF 的表达水平较低,而在病理情况下,表达明显增高,其过度表达与纤维化或某些增生性疾病的发生发展密切相关,如:硬皮病、肺纤维化、恶性肿瘤等。有研究表明,JAK-STAT 通路参与了 CTGF 诱导的人增生性瘢痕成纤维细胞的增殖分化过程,而其是否参与肺成纤维细胞转分化过程少见报道^[2]。本实验通过 CTGF 刺激人胚肺成纤维细胞株(HFL-I),旨在研究 JAK-STAT 通路在 CTGF 致肺纤维化效应中所介导的作用。

材料与方法

1. 主要材料:人胚肺成纤维细胞株 HFL-I 购自上海中科院细胞库。Recombinant Human CTGF 购自美国 peprotech 公司。鼠抗人 α -SMA 抗体、兔抗人 STAT3 抗体、兔抗人 p-STAT3 抗体、抗 GAPDH 抗体、JAK-STAT 特异性抑制剂 AG490 购自 Biolegend 公司。碱磷酶标记山羊抗兔二抗、碱磷酶标记马抗小鼠二抗、碱磷酶底物 BCIP/NBT 显色浓缩液购自北京中杉金桥生物技术有限公司。蛋白 Marker 购自美国 Fermentas 公司。 α -MEM 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司。RNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司。RT-PCR 试剂盒购自美国 invitrogen 公司。根据 GenBank 序列设计引物,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。垂直式电泳仪、电转仪、凝胶成像系统、PCR 扩增仪均是美国 BIO-RAD 公司产品。

2. 方法:(1)细胞培养:HFL-I 细胞接种于含 10% FBS 的 α -MEM 培养基中常规培养。(2)实验分组:待细胞生长至 60%~70% 融合时,改用不含血清的培养基同步化饥饿 12h,加入 20ng/ml CTGF 分别作用 0、15、30、60、120min,检测 p-STAT3 和 STAT3 的蛋白表达;将 HFL-I 分为对照组、CTGF 刺激组、CTGF + AG490 组(50 μ mol/L AG490 预处理 60min),30min 时检测 p-STAT3 和 STAT3 的蛋白表达,24h 检测 α -SMA 表达。将 HFL-I 分为对照组和 CTGF 刺激组(20ng/ml 作用 30min),RT-PCR 检测 STAT3 mRNA 水平。(3)Western blotting 检测 HFL-I 中 α -SMA 以及 p-STAT3 和 STAT3 的蛋白表达:细胞按实验条件分组处理后,收集细胞,预冷 PBS 洗涤 2 次,加入 200 μ l RIPA 裂解液(每 1ml 裂解液中加 10 μ l PMSF),冰上裂解 30min,超声 5s $\times$ 3 次。4 $^{\circ}$ C, 12000r/min 离心 10min,取上清。Bradford 法测定蛋白含量。4:1 体积比加入上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 5min 变性。每孔上样等量总蛋白,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后取下凝胶,30V 转膜 150min,含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1h。TBST 洗膜 5 分/次 $\times$ 3 次,分别加入一抗 α -SMA(1:1000 稀释)、p-STAT3、STAT3

(1:500 稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜 5 分/次 $\times$ 3 次,加入对应二抗(1:500 稀释),室温孵育 1h。最后 BCIP/NBT 显色液暗处显色观察,凝胶成像系统扫描分析,磷酸化水平用磷酸化蛋白和总蛋白的相对密度表示, α -SMA 水平用 α -SMA 和内参蛋白的相对密度表示。(4)RT-PCR 检测 HFL-I 中 STAT3 mRNA 水平:将 HFL-I 分为对照组和 CTGF 刺激组,采用 TRIzol 试剂盒提取总 RNA。应用软件 Primer Premier5.0 设计扩增引物,STAT3 引物:Forward Primer 5'-TTGCCAGTTGTGGTGATC-3', Reverse Primer 5'-AGACCCAGAAGGAGAAGC-3',扩增产物大小为 316bp; β -actin 引物:Forward Primer 5'-CACTGTGTTGGCGTACAGGT-3', Reverse Primer 5'-TCATCACCATTGGCAATGAG-3',扩增产物大小为 155bp。PCR 扩增反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 2min;94 $^{\circ}$ C 变性 15s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1min,40 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统观察扫描并进行电泳条带分析,以目的条带与 β -actin 条带的比值作为检测目的片段的相对值。

3. 统计学方法:所有数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。结果用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析和 t 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

结 果

1. CTGF 激活 JAK-STAT 通路:RT-PCR 结果显示,20ng/ml CTGF 刺激 HFL-I 细胞 30min 后,与对照组比较,明显上调 STAT3 的 mRNA 水平($P < 0.05$),见图 1。Western blotting 结果显示,正常 HFL-I 细胞 p-STAT3 蛋白水平表达很弱,加入 20ng/ml CTGF 刺激 15min 后,p-STAT3 水平显著增加($P < 0.05$),30min 时升至顶峰,后 p-STAT3 水平随时相而逐渐下降,见图 2。

2. AG490 对 JAK-STAT 通路的影响:Western blotting 结果显示,正常 HFL-I 细胞经 20ng/ml CTGF 刺激后 p-STAT3 水平显著升高($P < 0.05$),但 AG490 50 μ mol/L 预处理 60min 后,p-STAT3 水平较单纯 CTGF 刺激组显著减弱,且差异具有统计学意义($P < 0.01$),见图 3。

3. α -SMA 蛋白水平的表达:Western blotting 结果显示,正常 HFL-I 少量表达 α -SMA,20ng/ml CTGF 作用 24h 后, α -SMA 表达量显著增加($P < 0.05$);用 JAK-STAT 抑制剂 AG490 50 μ mol/L 预处理 60min,CTGF 引起的 α -SMA 表达明显受到抑制($P < 0.05$),见图 4。

讨 论

肺纤维化是多种慢性肺疾病的共同结局,主要表现为肺部炎症引起肺泡持续性损伤以及细胞外基质的增生和降解失衡,最终导致正常肺结构的破坏和气

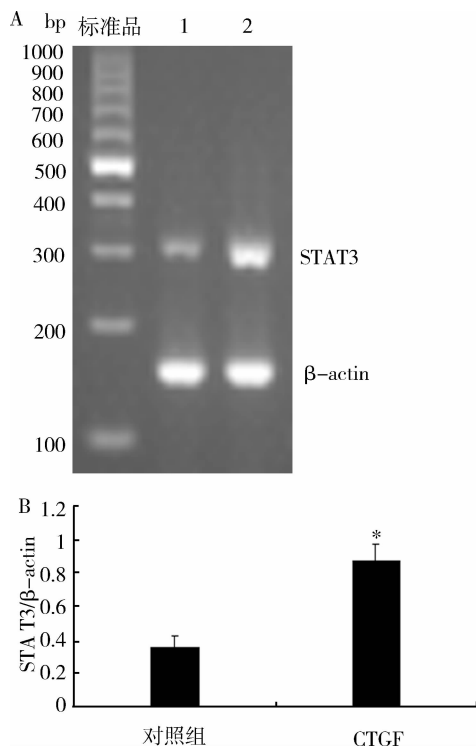


图1 CTGF对HFL-I STAT3 mRNA表达的影响

A. CTGF刺激HFL-I细胞30min后RT-PCR检测STAT3 mRNA水平。1. 对照组;2. CTGF 20ng/ml组。B. 各组细胞STAT3 mRNA相对密度分析。与对照组比较, * $P < 0.05$

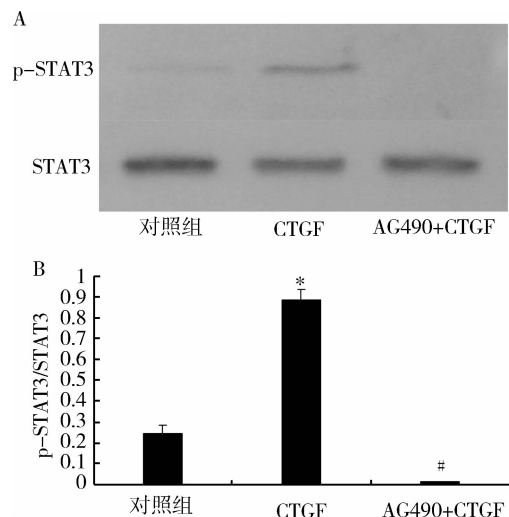


图3 CTGF和(或)JAK-STAT通路抑制剂AG490对(HFL-I)p-STAT3和STAT3蛋白表达的影响

A. CTGF和(或)JAK-STAT通路抑制剂AG490刺激HFL-I后, Western blotting检测p-STAT3和STAT3蛋白表达,依次为对照组、CTGF 20ng/ml组、AG490+CTGF组;B. 各组细胞p-STAT3相对密度分析。与对照组比较, * $P < 0.05$;与CTGF组比较, # $P < 0.01$

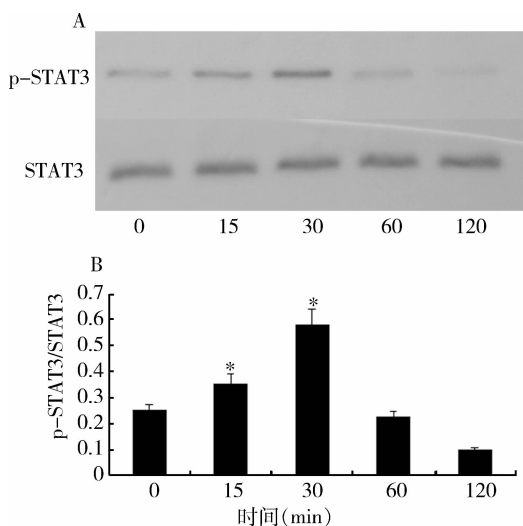


图2 CTGF对(HFL-I)p-STAT3和STAT3蛋白表达的影响

A. 20ng/ml CTGF刺激HFL-I细胞0、15、30、60、120min后, Western blotting检测各时相点p-STAT3和STAT3表达水平;B. 各组细胞p-STAT3相对密度分析。与对照组比较, * $P < 0.05$

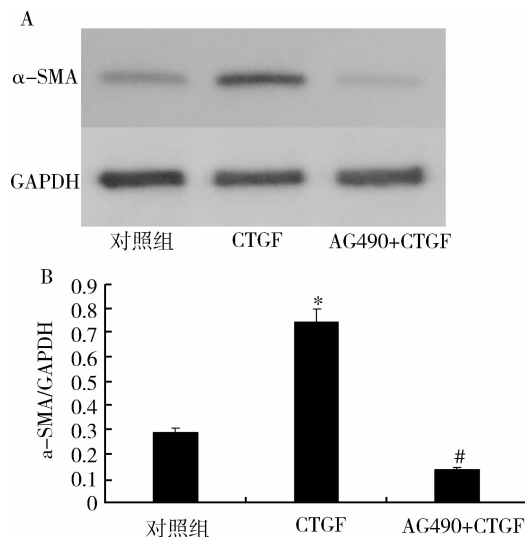


图4 CTGF和(或)JAK-STAT通路抑制剂AG490对人胚肺成纤维细胞(HFL-I)α-SMA蛋白表达的影响

A. CTGF刺激HFL-I细胞24h后Western blotting检测α-SMA蛋白表达,依次为对照组、CTGF 20ng/ml组、AG490+CTGF组;B. 各组细胞α-SMA相对密度分析。与对照组比较, * $P < 0.05$;与CTGF组比较, # $P < 0.05$

肌成纤维细胞(MF)是纤维化形成的主要效应细胞,主要由人肺成纤维细胞转分化而来,表达特异性蛋白α-SMA、收缩能力增强并分泌大量细胞外基质^[3]。

JAK-STAT通路是细胞因子信号转导的重要通路之一, JAK家族酪氨酸磷酸化后募集在胞质中的

体交换功能受损。已知TGF-β和CTGF是重要的促纤维化因子,在肺纤维化发生发展中起重要作用。

STATs 分子,使其发生磷酸化,形成异源性或同源性二聚体进入核内,介导细胞增殖、分化和凋亡等多种生理功能。哺乳动物细胞 STAT 家族成员主要包括 7 种亚型: STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5A、STAT5B 和 STAT6。其中 STAT3 是近年来研究异常活跃的核转录因子,其异常活化可导致细胞增殖和恶性化,在多种肿瘤组织和细胞中存在 STAT3 的异常活化和过表达^[4]。AG490 是一种选择性拮抗 JAK2 酪氨酸磷酸化的抑制剂,可有效抑制 JAK2 酪氨酸磷酸化并且阻断其下游的信号转导和 STAT3 的活化^[5,6]。

有研究表明,JAK - STAT 通路特异性抑制剂能够有效降低 TGF - β_1 的高表达,从而对肾小管上皮细胞转分化及肾纤维化产生影响^[7]。然而,Jacoby 等^[8]发现敲除 STAT3 的成年小鼠对炎症反应和氧化应激的敏感性增加,更易发生心肌纤维化,且随年龄增长发生心力衰竭的可能性也增加。由此可见,JAK - STAT 通路在组织纤维化过程中的作用及其调控机制尚有异议,尤其是 JAK - STAT 通路在肺纤维化过程中的作用少有相关报道。本实验以人胚肺成纤维细胞为研究对象,探讨 CTGF 诱导的肺成纤维细胞 - 肌成纤维细胞转分化过程中 JAK - STAT 通路的活动状态。我们的研究发现,CTGF 刺激 30min 后,HFL - I 的 STAT3 mRNA 水平明显上调;其磷酸化蛋白水平呈一定的时间依赖性,诱导 15min 时明显增加,30min 时升至顶峰,后又随时相而逐渐下降。JAK - STAT 通路特异性抑制剂 AG490 预处理后,STAT3 磷酸化水平较单纯 CTGF 刺激组显著减弱,其差异具有统计学意义。这一结果说明,CTGF 可以激活 HFL - I 内的 JAK - STAT 通路,可被其特异性抑制剂 AG490 有效抑制。

在上述基础上,进一步探讨 JAK - STAT 通路是否参与了肺成纤维细胞 - 肌成纤维细胞转分化过程。我们的研究发现:CTGF 诱导 24h 后, α - SMA 表达量显著增加,其差异具有统计学意义,表明肺成纤维细胞向肌成纤维细胞转分化;JAK - STAT 抑制剂 AG490 预处理后,明显抑制 CTGF 引起的 α - SMA 表达。这一结果说明,CTGF 能诱导人胚肺成纤维细胞

向肌成纤维细胞转分化,并且是通过激活 JAK - STAT 通路来实现的。可见 JAK - STAT 通路不仅可以被 CTGF 激活,而且参与了其诱导的人胚肺成纤维细胞转分化过程,阻断 JAK - STAT 通路可以有效抑制 CTGF 诱导的肺成纤维细胞 - 肌成纤维细胞转分化过程。

研究肌成纤维细胞的转分化过程,是阐明组织纤维化发生机制的重要环节。本研究初步探讨了 JAK - STAT 通路在 CTGF 致肺纤维化效应中所介导的作用,随着后续研究的深入,期望将抑制 JAK - STAT 通路的激活作为一个新的治疗靶点,抑制成纤维细胞转分化和增殖,从而阻断纤维化进程,为临床抗纤维化治疗提供一定的理论和实践基础。

参考文献

- 1 Lasky JA, Ortiz LA, Tonthat B, *et al.* Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin - induced lung fibrosis [J]. *Am J Physiol*, 2008, 275(2):365 - 371
- 2 陶灵,李世荣,刘剑毅,等. JAK - STATs 通路在 CTGF 刺激人增生性瘢痕成纤维细胞增殖分化中的作用[J]. *中国美容医学*, 2008, 17(11):1641 - 1644
- 3 Shimo T, Nakanishi T, Nishida T, *et al.* Connective tissue growth factor induces the proliferation, migration, and tube formation of vascular endothelial cells *in vitro*, and angiogenesis *in vivo* [J]. *J Biochem Tokyo*, 2009, 126(1):137 - 145
- 4 Gallmeier E, Schafer C, Moubarak P. JAK and STAT proteins are expressed and activated by IFN - gamma in rat pancreatic acinar cells [J]. *J Cell Physiol*, 2005, 203(1):209 - 216
- 5 姚林方,叶章群,陈志强,等. AG490 在膀胱癌中的抗癌效应及机制 [J]. *肿瘤防治研究*, 2007, 34(3):195 - 198
- 6 Sriuranpong V, Park JJ, Amornphimoltham P, *et al.* Epidermal growth factor receptor - independent constitutive activation of STAT3 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated by the autocrine/paracrine stimulation of the interleukin6/gp130 cytokine system [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(11):2948 - 2956
- 7 赵松,史永红,段惠军. JAK/STAT 信号途径在高糖诱导肾小管上皮细胞转分化中的作用 [J]. *中国老年学杂志*, 2007, 27(2):217 - 220
- 8 Jacoby JJ, Kalinowski A, Liu MG, *et al.* Cardiomyocyte - restricted knockout of STAT3 results in higher sensitivity to inflammation, cardiac fibrosis, and heart failure with advanced age [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(22):12929 - 12934

(收稿:2011 - 08 - 10)