

中波紫外线辐照对人脐静脉血管内皮细胞 JAK-STAT 信号通路和 IL-6、IL-8 表达的影响

喻晶 张宜 刁波

(广州军区武汉总医院医学实验科 武汉 430070)

摘要 为探究 JAK-STAT 信号通路与炎症因子白细胞介素 6、8(interleukin6、8, IL-6、IL-8)是否参与中波紫外线诱导人脐静脉血管内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)的辐射损伤, 使用不同剂量中波紫外线(10、20、40 J/m²)照射血管内皮细胞, 照射后 24 h 通过实时荧光定量 PCR 检测 IL-6 mRNA 和 IL-8 mRNA 的表达水平; Western-blot 检测 JAK1、JAK2、STAT1、STAT3 和 p-JAK1、p-JAK2、p-STAT1、p-STAT3 的表达情况。结果发现, 与对照组(0 J/m²)相比, 细胞经不同剂量紫外线(10、20、40 J/m²)照射 24 h 后, IL-6 mRNA 和 IL-8 mRNA 表达水平均升高, 且与受照剂量呈剂量依赖性; JAK1、STAT1、p-JAK1、p-STAT1、p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达均升高, 且上调程度与受照剂量呈剂量依赖性; JAK2 和 STAT3 蛋白表达变化不明显。结果提示, JAK-STAT 信号通路及炎症因子 IL-6、IL-8 参与中波紫外线照射 HUVECs 细胞损伤的调控。

关键词 中波紫外线, 人脐静脉血管内皮细胞, JAK-STAT 信号通路, IL-6, IL-8

中图分类号 TL7

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2016.rj.34.020204

Effect of UVB irradiation on JAK-STAT pathway and IL-6, IL-8 in Human umbilical vein endothelial cells

YU Jing ZHANG Yi DIAO Bo

(Department of Pharmacy, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command, Wuhan 430070, China)

ABSTRACT Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were irradiated with different doses (10, 20 and 40 J/m²) to investigate the role of JAK-STAT pathway and IL-6, IL-8 in UVB irradiation. After 24 h, the expression level of IL-6 mRNA and IL-8 mRNA was detected by real-time fluorescent quantitative PCR, and that of JAK1, JAK2, STAT1, STAT3, p-JAK1, p-JAK2, p-STAT1 and p-STAT3 was measured by Western-blot. Compared with the control group, the expression level of IL-6 mRNA and IL-8 mRNA increased, and that of JAK1, STAT1, p-JAK1, p-STAT1, p-JAK2 and p-STAT3 increased with the dose of UVB, except JAK2 and STAT3. It can be concluded that JAK-STAT pathway and IL-6 together with IL-8 play a role in HUVECs with UVB irradiation.

KEYWORDS UVB, Human umbilical vein endothelial cell, JAK-STAT pathway, IL-6, IL-8

CLC TL7

第一作者: 喻晶, 女, 1986 年 8 月出生, 2012 年于湖北中医药大学获得硕士学位, 现就职于广州军区武汉总医院

通讯作者: 张宜, 硕士研究生, 主任药师, E-mail: abcd1566@sina.com

收稿日期: 初稿 2015-12-03; 修回 2016-01-24

First author: YU Jing (female) was born in August 1986, and received her master degree from Hubei University of Chinese Medicine in 2012. Now she works in Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command

Corresponding author: ZHANG Yi, chief pharmacist, E-mail: abcd1566@sina.com

Received 3 December 2015; accepted 24 January 2016

随着工业生产的不断扩大,排放的含氮气体和氟利昂等废气造成大气中臭氧层的破坏,以致到达地面的紫外强度日益增加。高强度的紫外照射可以对人体皮肤产生严重损伤,引起皮肤红肿、老化,产生水泡,甚至导致恶性皮肤癌。构成皮肤血管壁的血管内皮细胞是辐射相对敏感的细胞,其具有维护血管壁结构完整和介导炎症等功能,在辐射损伤发生、发展及愈合过程中起着重要作用,其功能和结构的改变是照射后组织损伤反应的关键步骤。Janus 激酶-信号转导子与转录激活子(Janus kinases-signal transducers and activators of transcription, JAK-STAT)信号通路可被诸多细胞因子(如白细胞介素家族^[1])及细胞生长因子^[2](如表皮生长因子、成纤维生长因子)诱导激活,在细胞的增殖、分化或凋亡、免疫功能调节、造血细胞生成、肿瘤发生等过程中发挥着特异且多效性的生物学功能^[3-5]。炎症因子白细胞介素 6、8(IL-6、IL-8)和 JAK-STAT 信号通路在血管内皮细胞辐照损伤中的调控作用未见报道。本研究模拟紫外辐照 HUVECs (Human umbilical vein endothelial cells)细胞损伤,观察辐照后细胞炎症因子 IL-6、IL-8 和 JAK-STAT 信号通路的变化情况,探讨血管内皮细胞辐照损伤的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂

DMEM 高糖培养基购自 Hyclone 公司;胎牛血清(FBS)购自 NQBB 公司;胰蛋白酶购自 Amersco 公司;ReverTra Ace qPCR RT kit 购自 TOYOBO 公司;SYBR Green realtime PCR master mix plus 购自 Takara 公司;二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量测定试剂盒购自碧云天生物公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)鼠抗人多克隆抗体购自杭州贤至生物有限公司;IL-6、IL-8 及 β -actin 引物由上海生工生物

工程技术服务有限公司合成;JAK1、JAK2、STAT1、STAT3、p-JAK1、p-JAK2、p-STAT1、p-STAT3 抗体购自 abcam 公司;辣根过氧化物(HRP)标记羊抗兔抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;Trizol 试剂购自 Gibicol 公司;其他试剂购于国药试剂,均为分析纯。

1.1.2 仪器

实时荧光定量 PCR 仪(ABI7900,美国 ABI);荧光化学成像系统(Tanon-5200,上海天能科技有限公司);紫外分光光度计(QPTIZEN 2120 UV,韩国);超纯水系统(Milipore FOMN23167H,美国密理博公司);紫外线强度测量仪(TLC-340,杭州汇尔仪器设备有限公司);电泳仪(DYCZ-40,北京六一仪器厂);垂直电泳槽(DYCZ-24DN,北京六一仪器厂);水平摇床(TS-1,江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

HUVECs 细胞由本院医学实验科保存。细胞用含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 高糖培养液,以 1.0×10^5 /mL 密度接种于培养瓶中,置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的恒温培养箱内常规培养。取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 照射条件

采用 UVB 紫外灯管照射,紫外线强度测量仪监测紫外强度为 33.5 μ W/cm²,受照剂量分别为 10、20、40 J/m²。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测

实验分 4 组,设对照组,照射组(细胞受照剂量分别为 10、20、40 J/m²)。各组细胞经紫外线照射 24 h 后弃去培养液,PBS 洗 3 次,加入 1 mL 的 Trizol 试剂,按 Trizol 说明书提取总 RNA;cDNA 合成,参照 ReverTra Ace qPCR RT kit 说明书进行合成,引物序列见表 1。

表 1 IL-6、IL-8 和 β -actin 引物的序列和扩增片段长度
Table 1 Sequence and amplified fragment length of IL-6, IL-8 and β -actin

名称 Name	引物 Primer	序列 Sequence	长度 Size / bp
β -actin	Forward	5'- AGCGAGCATCCCCAAAGTT -3'	285
	Reverse	5'- GGGCACGAAGGCTCATCATT -3'	
IL-6	Forward	5'- TAGTGAGGAACAAGCCAGAG -3'	234
	Reverse	5'- TACATTTGCCGAAGAGCC -3'	
IL-8	Forward	5'- CATACTCCAAACCTTTCCACC -3'	161
	Reverse	5'- AAACCTTCTCCACAACCCTCTG -3'	

逆转录反应条件 42℃ 60 min, 94℃ 4 min, 1 个循环; PCR 条件 94℃ 30 s, 退火 30 s, 72℃ 25 s, 30 个循环。IL-6、IL-8 及 β -actin 退火温度分别为 60、60、6℃。

以达到指数增加时的循环周期数(C_t)作为计算依据: mRNA 的相对表达 $E=2^{-\Delta\Delta C_t}$, $\Delta C_t=C_{t-测定}-C_{t-\beta-actin}$, $\Delta\Delta C_t=C_{t-处理}-C_{t-对照}$ 。

1.2.1 Western-blot 检测

将各组细胞分别经 0、10、20、40 J/m² 剂量辐照, 24 h 后弃去培养液, PBS 洗涤 3 次, 裂解液裂解细胞, 以 12 000 r/min 离心 15 min。收集细胞裂解物, 蛋白浓度用 BCA 法进行测定。取 40 μ g 总蛋白在十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS)缓冲液中煮 7 min, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)并电转移至硝酸纤维素膜上。硝酸纤维素膜用含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液室温封闭 90 min, 然后依次滴加(1:500~1:1 000)JAK1、JAK2、p-JAK1、p-JAK2、STAT1、STAT3、p-STAT1、p-STAT3 和 GAPDH 抗

体, 4℃ 过夜后 TBST 缓冲液洗涤 3 次, 每次 10 min。然后用 1:5 000 的 HRP-羊抗兔或鼠 IgG 孵育 2 h, 然后用 TBST 缓冲液洗涤 3 次, 每次 10 min。最后用增强化学发光液(Enhanced chemiluminescent, ECL)进行曝光显影, 荧光化学成像系统进行照相并用其附带的软件分析蛋白的相对表达量。

1.2.2 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS13.0 软件处理, 照射组与对照组比较采用 Dunnett-t 检验。p<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 中波紫外线辐照诱导 HUVECs 细胞 IL-6 mRNA 及 IL-8 mRNA 水平的表达

内参 β -actin 和目的基因 IL-6、IL-8 的溶解曲线均为单一峰, 扩增曲线重合正常, 说明引物设计正确, 无引物二聚体引起的非特异性扩增(图 1)。

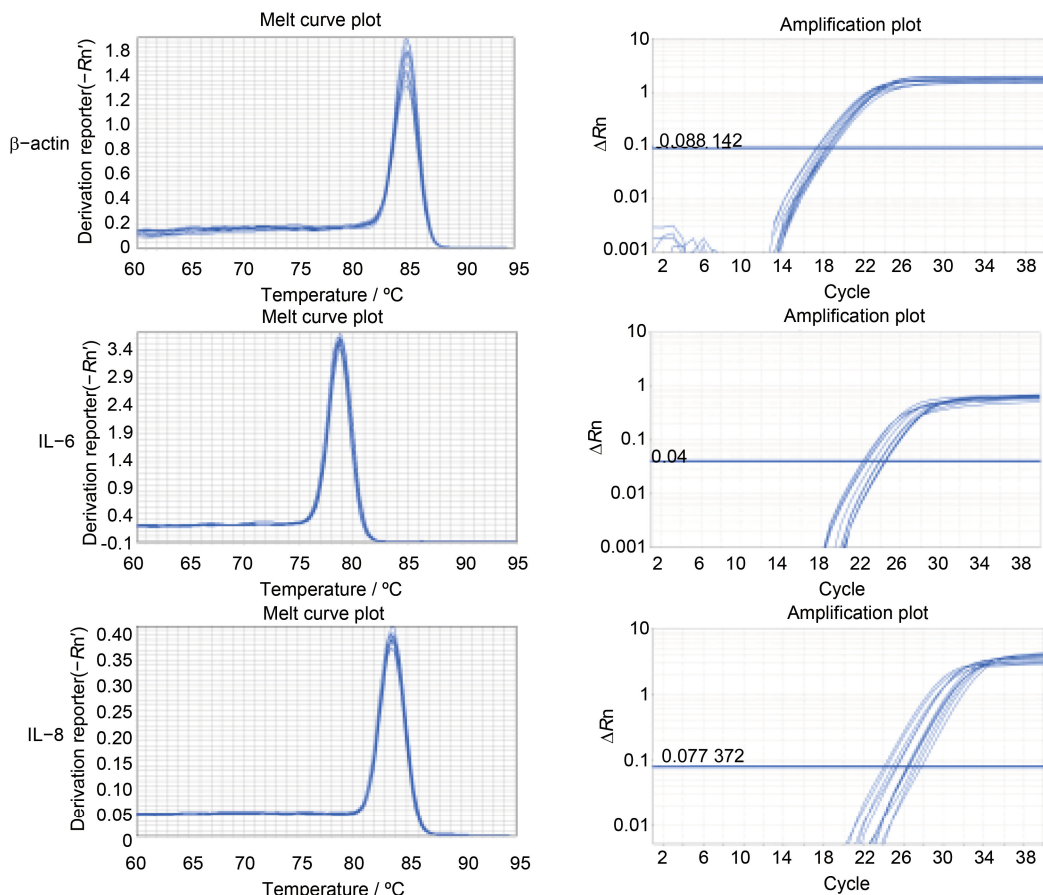


图 1 基因的溶解曲线和扩增曲线
Fig.1 Melt curve plot and amplification plot of genes

HUVECs 细胞经 10、20、40 J/m² 紫外照射后, 与对照组比较, IL-6 mRNA 表达水平分别升高到 1.292 ± 0.359 、 1.988 ± 0.743 、 2.712 ± 0.801 ($p<0.01$) (图 2(a)); IL-8 mRNA 的表达水平分别升高到 1.511 ± 0.483 、 2.896 ± 1.700 、 5.333 ± 1.997

($p<0.01$) (图 2(b))。IL-6 mRNA 和 IL-8 mRNA 的表达水平随着受照剂量的增加逐步增高, 且与对照组比较, 细胞经照射后 IL-6 mRNA 和 IL-8 mRNA 的表达水平升高均有统计学意义。

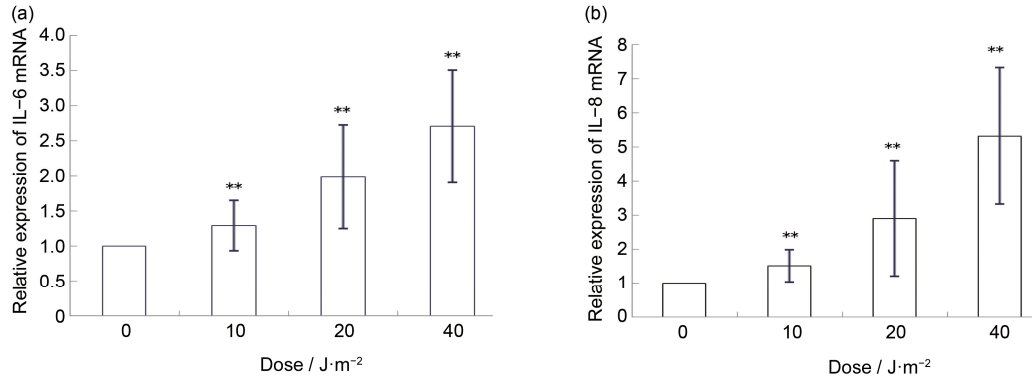


图 2 UVB 辐照诱导 HUVECs 细胞(a)IL-6 mRNA 和(b)IL-8 mRNA 表达水平的变化 (与对照组比较, ** $p<0.01$)

Fig.2 Effect of (a) IL-6 mRNA and (b)IL-8 mRNA expression level in HUVECs irradiated with UVB
** $p<0.01$, compared with the control group

2.2 中波紫外线辐照诱导 HUVECs 中 JAK1、p-JAK1、JAK2、p-JAK2、STAT1、p-STAT1、STAT3、p-STAT3 蛋白水平的表达

HUVECs 细胞经 40 J/m² 紫外照射后, JAK1 蛋白表达水平由对照组的 0.426 ± 0.009 升高至 0.880 ± 0.009 、p-JAK1 蛋白表达水平由对照组的 0.275 ± 0.008 升高至 0.774 ± 0.011 、STAT1 蛋白表达水平由对照组的 0.355 ± 0.009 升高至 0.898 ± 0.016 、p-STAT1 蛋白表达水平由对照组的 0.133 ± 0.006 升高至 0.554 ± 0.012 、p-JAK2 蛋白表达水平由对照组的

的 0.733 ± 0.010 升高至 1.173 ± 0.040 、p-STAT3 蛋白表达水平由对照组的 0.244 ± 0.006 升高至 0.918 ± 0.017 (表 2)。

细胞经 10、20、40 J/m² 紫外照射后, JAK1、p-JAK1、STAT1、p-STAT1、p-JAK2、p-STAT3 蛋白随受照剂量的增加蛋白表达水平均升高 (图 4), 与对照组比较差异有统计学意义($p<0.05$) (表 2)。

然而由图 3 可见, 细胞经 10、20、40 J/m² 紫外线照射后 JAK2 和 STAT3 的蛋白表达水平与对照组相比均无明显变化 (图 3), 差异无统计学意义 ($p>0.05$) (表 2)。

表 2 中波紫外线辐照诱导 HUVECs 细胞 JAK1、p-JAK1、JAK2、p-JAK2、STAT1、p-STAT1、STAT3、p-STAT3 蛋白水平的灰度值

Table 2 Expression of JAK1, p-JAK1, JAK2, p-JAK2, STAT1, p-STAT1, STAT3, p-STAT3 in HUVECs irradiated with UVB

蛋白 Protein	吸收剂量 Absorbed dose / J·m ⁻²			
	0	10	20	40
JAK1	0.426±0.009	0.516±0.011**	0.668±0.014**	0.880±0.009**
JAK2	0.451±0.008	0.433±0.006	0.406±0.007	0.401±0.019
STAT1	0.355±0.009	0.509±0.009**	0.712±0.007**	0.898±0.016**
STAT3	0.439±0.005	0.431±0.007	0.428±0.008	0.425±0.008
p-JAK1	0.275±0.008	0.546±0.010**	0.625±0.013**	0.774±0.011**
p-JAK2	0.733±0.010	0.834±0.013**	1.136±0.066**	1.173±0.040**
p-STAT1	0.133±0.006	0.364±0.010**	0.451±0.016**	0.554±0.012**
p-STAT3	0.244±0.006	0.315±0.012**	0.772±0.023**	0.918±0.017**

注: 与对照组比较, ** $p<0.01$ 。

Note: ** $p<0.01$, compared with the control group.

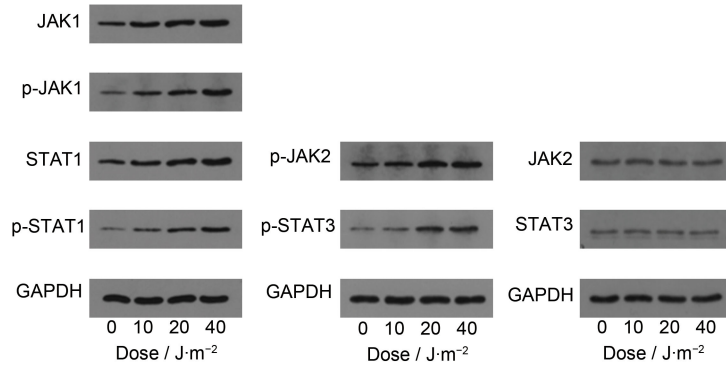


图3 JAK1、p-JAK1、JAK2、p-JAK2、STAT1、p-STAT1、STAT3、p-STAT3 蛋白水平的条带图
Fig.3 Bands of JAK1, p-JAK1, JAK2, p-JAK2, STAT1, p-STAT1, STAT3 and p-STAT3 protein expression level

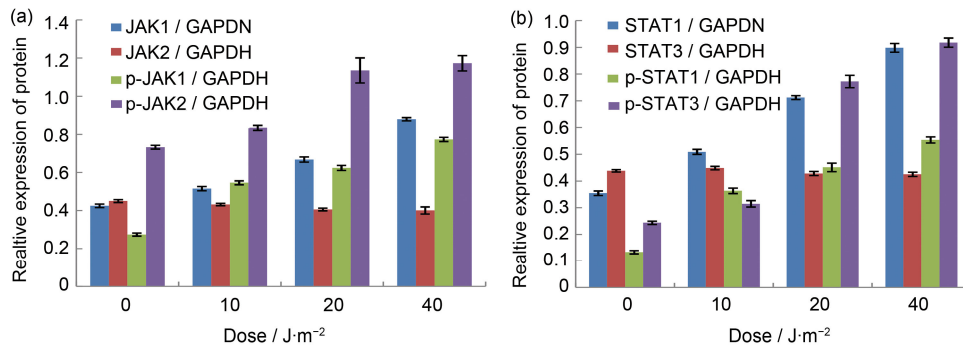


图4 UVB 辐照诱导 HUVECs 细胞(a)JAK1、JAK2、p-JAK1、p-JAK2 和(b)STAT1、STAT3、p-STAT1、p-STAT3 蛋白水平的柱状图

Fig.4 Histogram of (a) JAK1, JAK2, p-JAK1, p-JAK2 and (b) STAT1, STAT3, p-STAT1, p-STAT3 protein expression level

3 讨论

目前,紫外对血管内皮细胞的辐照损伤机制主要包括 DNA 损伤、氧化应激、细胞凋亡等,其中 TNF- α 、VCAM-1^[6]、NF- κ B、 γ -H2AX^[7]等分子可能参与损伤的调控作用。我们发现,紫外辐照引起血管内皮细胞 IL-6 mRNA 和 IL-8 mRNA 的表达上调,通过激活炎症因子诱导细胞的进一步损伤。研究显示,紫外辐射可以引起机体的炎症反应,这种炎症反应大部分是由于表皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞等细胞间的相互作用,通过自分泌或旁分泌产生的炎症细胞因子介导的。炎症因子是内皮细胞对外界损伤刺激产生正常免疫反应的产物^[8],其中 IL-6 是炎症反应和机体免疫的多向性细胞因子^[9],参与多种疾病的病理过程,在不同组织中通过复杂的细胞信号传导途径,调节细胞生长、分化、凋亡等^[10]。IL-8 的主要生物作用是激活中性粒细胞,参与氧化应激诱导的人血管内皮细胞衰老进程^[11]。

JAK-STAT 信号转导通路是近年来发现的一条应激反应通路,广泛参与细胞增殖、分化、成熟、凋亡以及免疫调节等过程^[12-15],是众多细胞因子信

号转导的重要途径之一。JAK-STAT 信号转导过程是细胞膜上的细胞因子受体与相应的配体结合,形成同源或异源二聚体,使得与受体偶联的 JAKs 相互接近并通过交互的酪氨酸磷酸化而活化,活化的 JAKs 催化受体本身的酪氨酸磷酸化并形成相应的 STATs 停靠位点,使 STATs 通过 SH2 结构域与受体结合并在 JAKs 作用下实现磷酸化活化,然后 STATs 形成同源或异源二聚体并入核,与相应的靶基因启动子结合而激活相应的基因转录和表达^[16]。我们发现,紫外照射血管内皮细胞诱导 JAK1 和 STAT1 的表达上调,同时激活磷酸化的 JAK1、JAK2、STAT1、STAT3,但对 JAK2 和 STAT3 蛋白的影响不明显。研究表明,IL-6 可激活 JAK-STAT 信号通路中的 STAT1 和 STAT3,引发慢性炎症^[17-18],导致机体生理病理改变。不是所有的炎症因子都激活相同的 STATs, JAKs 与 STATs 之间也并不存在一一对应关系,即一种细胞因子可激活多种胞内 JAK-STATs,或多种细胞因子同时激活相同 JAK-STATs,或是激活的程度有不同差异来发挥生物学效应^[2]。

细胞因子介导的信号传导是复杂的,由多条通路相互作用起效。本研究结果表明,紫外对血管内

皮细胞的辐照损伤可能是通过诱导炎症因子 IL-6 和 IL-8 的产生,进一步激活 JAK-STAT 信号通路来发挥辐照损伤的生物效应。然而, JAK-STAT 信号通路的下游调控基因或旁信号通路是否也参与辐照损伤的调控作用有待更深入的研究。

参考文献

- Subramaniam A, Shanmugam M K, Perumal E, *et al.* Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, **1835**(1): 46-60. DOI: 10.1016/j.bbcan.2012.10.002.
- Stark G R, Darnell J. The JAK-STAT pathway at twenty[J]. *Immunity*, 2012, **36**(4): 503-514. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.03.013.
- O'Shea J J, Plenge R. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease[J]. *Immunity*, 2012, **36**(4): 542-550. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.03.014.
- Lamy S, Akla N, Ouanouki A, *et al.* Diet-derived polyphenols inhibit angiogenesis by modulating the interleukin-6/STAT3 pathway[J]. *Experimental Cell Research*, 2012, **318**(13): 1586-1596. DOI: 10.1016/j.yexcr.2012.04.004.
- Denley S M, Jamieson N B, McCall P, *et al.* Activation of the IL-6R/JAK/STAT pathway is associated with a poor outcome in resected pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2013, **17**(5): 887-898. DOI: 10.1007/s11605-013-2168-7.
- Daniela L, Alla P, Maurelli R, *et al.* Anti-inflammatory effects of concentrated ethanol extracts of *Edelweiss (Leontopodium alpinum Cass.)* callus cultures towards human keratinocytes and endothelial cells[J]. *Mediators of Inflammation*, 2012, **2012**(4): 498373. DOI: 10.1155/2012/498373.
- Olteanu D, Baldea I, Clichici S, *et al.* *In vitro* studies on the mechanisms involved in chemoprevention using calluna vulgaris on vascular endothelial cells exposed to UVB[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 2014, **136**: 54-61. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2014.04.018.
- Mancilla-Herrera I, Alvarado-Moreno J A, C rbulo-Vázquez A, *et al.* Activated endothelial cells limit inflammatory response, but increase chemoattractant potential and bacterial clearance by human monocytes[J]. *Cell Biology International*, 2015, **39**(6): 721-732. DOI: 10.1002/cbin.10440.
- Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease[J]. *Cytokine Growth Factor Reviews*, 2002, **13**(4-5): 357-368. DOI: 10.1016/S1359-6101(02)00027-8.
- Klover P J, Zimmers T A, Koniaris L G, *et al.* Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice[J]. *Diabetes*, 2003, **52**(11): 2784-2789. DOI: 10.2337/diabetes.52.11.2784.
- Shen X H, Xu S J, Jin C Y, *et al.* Interleukin-8 prevents oxidative stress-induced human endothelial cell senescence via telomerase activation[J]. *International Immunopharmacology*, 2013, **16**(2): 261-267. DOI: 10.1016/j.intimp.2013.04.003.
- Matsui F, Meldrum K K. The role of the Janus kinase family/signal transducer and activator of transcription signaling pathway in fibrotic renal disease[J]. *Journal of Surgical Research*, 2012, **178**(1): 339-345. DOI: 10.1016/j.jss.2012.06.050.
- Bournazou E, Bromberg J. Targeting the tumor microenvironment: JAK-STAT3 signaling[J]. *JAKSTAT*, 2013, **2**(2): e23828. DOI: 10.4161/jkst.23828.
- Rajendran P, Li F, Shanmugam M K, *et al.* Celastrol suppresses growth and induces apoptosis of human hepatocellular cancer through the modulation of STAT3/JAK2 signaling cascade *in vitro* and *in vivo*[J]. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 2012, **5**(4): 631-643. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0420.
- Silver-Morse L, Li W X. JAK-STAT in heterochromatin and genome stability[J]. *JAKSTAT*, 2013, **2**(3): e26090. DOI: 10.4161/jkst.26090.
- Yan S, Li Z, Thiele C J. Inhibition of STAT3 with orally active JAK inhibitor, AZD1480, decreases tumor growth in Neuroblastoma and pediatric sarcomas *in vitro* and *in vivo*[J]. *Oncotarget*, 2013, **4**(3): 433-445. DOI: 10.18632/oncotarget.930.
- Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, *et al.* The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, **1813**(5): 878-888. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034.
- Aparicio-Siegmund S, Sommer J, Monhasery N, *et al.* Inhibition of protein kinase II (CK2) prevents induced signal transducer and activator of transcription (STAT)1/3 and constitutive STAT3 activation[J]. *Oncotarget*, 2014, **5**(8): 2131-2148. DOI: 10.18632/oncotarget.1852.