文章编号:1000-5404(2009)12-1119-04

论著

JAK2/STAT3信号通路参与脂多糖诱导小胶质细胞活化的研究

郝玉通,陈纯海,杨学森,余争平 (第三军医大学军事预防医学院劳动卫生学教研室,电磁辐射医学防护教育部重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 研究蛋白酪氨酸激酶2/信号转导子与激活子3(Janus kinase signal transducers 2 and activator of transcription 3,JAK2/STAT3)信号通路参与脂多糖(LPS)诱导小胶质细胞(MG)活化的影响及其可能机制。**方法** 用细胞免疫组织化学的方法观察小胶质细胞特异性标志物OX-42的变化,用ELISA方法检测LPS刺激后肿瘤坏死因子(TNF-α)的表达变化。以及用Western blot方法检测JAK2和STAT3磷酸化变化水平。**结果** LPS刺激后OX-42阳性细胞数显著增强,分泌大量的细胞因子TNF-α,JAK2和STAT3磷酸化水平显著升高,并被抑制剂AG490有效抑制。**结论** JAK2-STAT3信号通路参与了LPS诱导的小胶质细胞活化。JAK2-STAT3通路激活与炎症因子分泌有关。

关键词: 脂多糖;小胶质细胞;肿瘤坏死因子;蛋白酪氨酸激酶2/信号转导子与激活子
中图法分类号: R322.81;R329.25;R392.3 **文献标识码:** A

Lipopolysaccharide-induced activation of microglia through JAK2-STAT3 pathway

HAO Yu-tong, CHEN Chun-hai, YANG Xue-sen, YU Zheng-ping (Department of Occupational Hygiene, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of JAK2-STAT3 signaling pathway on lipopolysaccharide (LPS)-induced activation of microglia and the possible mechanisms. Methods Immunohistochemistry and flow cytometry were applied to observe the changes in OX-42. Changes in TNF-α expression after stimulation with LPS were detected by ELISA. The phosphorylation levels of JAK2 and STAT3 were detected by Western-blot. Results LPS stimulation significantly increased the number of the positive cells of OX-42, enhanced TNF-α expression, and up-regulated the phosphorylation level of JAK2 and STAT3. Conclusion LPS may induce the microglia activation through the activation of the JAK2-STAT3 signaling pathway and promote the secretion of TNF-α, suggesting that activation of the JAK2-STAT3 signaling pathway may be associated with the secretion of the inflammatory factors.

Key words: LPS; microglia; TNF-α; JAK2-STAT3

小胶质细胞是中枢神经系统中重要的免疫细胞,参与神经免疫调节。OX-42是小胶质细胞表面补体Ⅲ型受体(CR3,CD11b),激活的小胶质细胞可导致OX-42的显著增加,OX-42是小胶质细胞活化的特异性标志物,OX-42的表达变化情况可以直观反应小胶质细胞活化[2]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性杆菌胞壁外膜层的重要组分,在体内和体外研究中被广泛地用于激活胶质细胞[3]。酪激酶-信号转导子与转录激活子JAK-STAT(Janus kinase signal transducers and activator of transcription)途径是近年来新发现的一条信号转导途径。该途径广泛参与细胞的增殖、分化以及免疫调节等过程,是众多细胞因子信号转导的重要途径[4]。研究表明,细胞因子及JAK-STAT途径很可能参与了脑的炎性反应病理过程,并可能在神经细胞分化、神经再生等方面起着非常重要的作用,但其中的具体机制尚未完全清楚。我们推测JAK-STAT途径可能参与到中枢神经系统的炎症过程。本研究检测LPS诱导小胶质细胞中活化的炎性模型,检测对

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30470418)
Supported by the General Program of the National Natural Science Foundation of China (30470418)
作者简介: 郝玉通,男,河北省张家口市人,博士研究生,主要从事微波生物效应与防护以及高压氧临床治疗方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)65463155,E-mail:tong0979@gmail.com
通信作者: 余争平,电话:(023)68752290,E-mail:yuzping@yahoo.com
杨学森,电话:(023)68752732
收稿日期: 2009-03-03;**修回日期:** 2009-03-31

JAK-STAT 途径表达的影响,为进一步揭示小胶质细胞的激活机制提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM 培养液,胎牛血清(HyClone 公司),小鼠抗大鼠 OX-42单克隆抗体(Sigma 公司),FITC 标记的 OX-42 单克隆荧光抗体(eBioscience 公司),S-P 试剂盒(北京中山生物制品公司),DAB 显色试剂、LPS、AG490(Sigma 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及 LPS 刺激 取冻存的 N9 小胶质细胞株(本校医学遗传学教研室馈赠),迅速放入 37 ℃水浴。溶解后立即消毒,开封,移到离心管中加 DMEM 培养基以 1 500 r/min。离心后去除冻存液将细胞移入 25 ml 培养瓶中,加入 4 ml DMEM 高糖培养基培养。N9 小胶质细胞株是来源于小鼠的细胞株,其表型与未活化状态下小鼠小胶质细胞一致,可很好模拟原代小胶质细胞的特性,该细胞株被广泛应用于研究小胶质细胞的实验模型。为此本实验采用离体培养的 N9 小胶质细胞模型。细胞以 3×10^6 个细胞传代培养,至第 3 天细胞铺满整个培养瓶的 50% ~60% 进行实验。以不同浓度 LPS(1、5、10 μg/ml)刺激,于刺激后 24 h 收集上清以及蛋白。以同时间未用 LPS 做处理的作为对照组。

1.2.2 ELISA 方法检测细胞因子表达 按 100 μl 每孔加捕获抗体,封板,4 ℃孵育过夜。清洗液洗 3 次,每孔加 1 × 测定稀释液 200 μl,室温孵育 1 h。每孔加 100 μl 标准品,按照最高浓度向下作倍比稀释。每孔加 100 μl 样本,封板后室温孵育 2 h 后吸干,洗 5 次。每孔加 100 μl 检测抗体后封板,室温孵育 1 h。吸干,洗 5 次。每孔加 100 μl 辣根酶标记链霉卵白素工作液封板,室温孵育 30 min。吸干洗 7 次。加 100 μl 显色底物室温孵育 15 min。每孔加 50 μl 终止液,在酶标仪上以 450 nm 读数。

1.2.3 细胞免疫组化以及流式细胞技术(FCM)检测 N9 细胞表面 OX-42 表达 将细胞培养于 6 孔细胞培养板中的盖玻片上,以丙酮固定 5 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min。0.3% 过氧化氢-甲醇阻断内源性过氧化物酶 10 min;正常山羊血清封闭 30 min,加生物素标记的抗小鼠 OX-42 单抗(1∶400),于 4 ℃湿盒中过夜。PBS 洗 3 次。加生物素标记的二抗工作液,置37 ℃湿盒中 1 h,PBS 洗 3 次,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,置 37 ℃湿盒中 1 h,PBS 洗 3 次。DAB 显色,加入双蒸水终止反应,脱水,封片;置于载玻片上,在荧光显微镜下观察并拍照。

FCM 检测 CD11b 的表达:取药物处理后的细胞悬液 1 000 r/min离心 5 min,PBS 洗涤 2 次,并用 PBS 重悬细胞,调整细胞数为 1×10^6/ml,取 100 μl 细胞悬液,加入 10 μl CD11b 单克隆抗体;另取 100 μl 细胞悬液,加入 10 μl IgG2a 作阴性对照,4 ℃避光孵育 30 min,PBS 洗涤 2 次,上机检测。

1.2.4 Western blot lowrry 法测定蛋白浓度后加入 5 × 上样缓冲液变性,8% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,蛋白上样量 80 μg。用湿转移法以 200 mA 电流转膜移至硝酸纤维素膜上后,以专用封闭液室温封闭 2 h,加羊抗多克隆抗体 JAK2(1∶2 000)、羊抗 p-JAK2(1∶200)、兔抗单克隆抗体 STAT3(1∶1 000)、兔抗磷酸化 Tyr-STAT3(1∶1 000)(Tyr705)及鼠抗 β-actin(1∶5 000,内参照)(以上抗体均来自 CellSignaling Technolog 公司),室温育 3 h。专用的二抗(1∶2 000)稀释,室温孵育0.5 h。最后在 ODDSEY(LICOR,美国)专用扫描仪器上扫描。本部分实验重复 3 次。

1.2.5 ELISA 法检测 TNF-α 表达 在 LPS 刺激后 24 h 收集细胞培养液,1 500 r 离心 5 min,分离上清,用 ELISA 法方法,具体过程按照说明书操作,采用 SUNRISE 酶标仪测定结果。

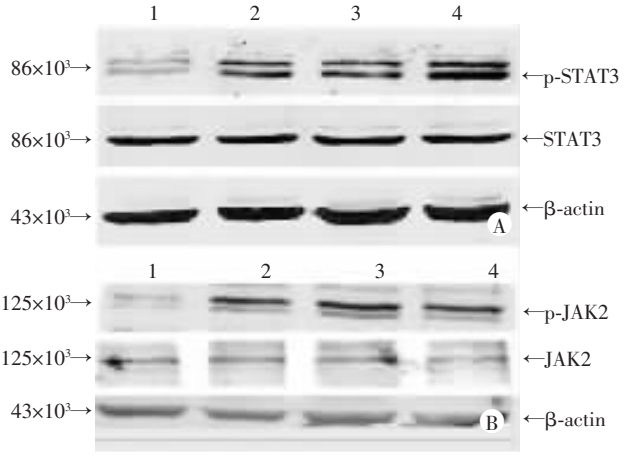
1.3 统计学分析

实验数据采用 Microsoft Excel 软件进行 t 检验,实验结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果

2.1 LPS 刺激后 JAK2 和 STAT3 磷酸化表达变化

在不同浓度 LPS 刺激后,我们可以看到 STAT3 磷酸化水平显著升高,且呈一定的剂量依赖关系。而总的 STAT3 蛋白表达水平保持不变(图 1A)。同时我们也发现上游的 JAK2 磷酸化水平在 LPS 刺激后显著增强,呈强磷酸化状态(图 1B)。说明 LPS 刺激可以持续激活 JAK2-STAT3 信号通路。



1:对照;2: LPS1 μmol/L;3: LPS5 μmol/L; 4: LPS 10 μmol/L

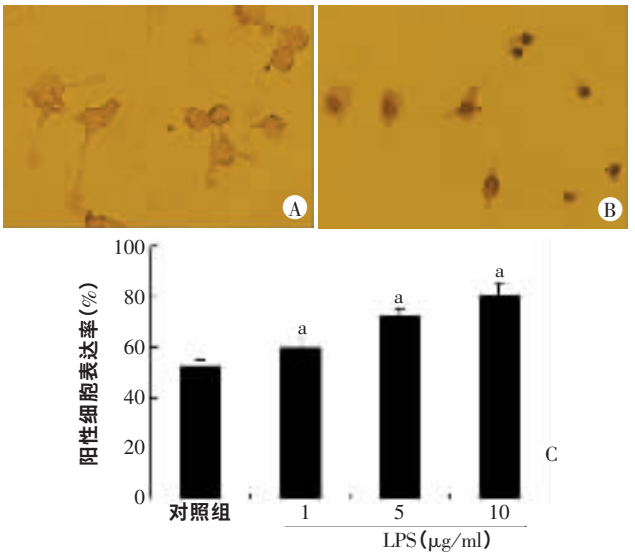
图 1 不同剂量 LPS 刺激后 JAK2 和 STAT3 的磷酸化变化

2.2 LPS 刺激后 N9 细胞 OX-42 的表达及变化

OX-42 在对照组胞体小、突起细且少,细胞轮廓不清晰,细胞膜表面着色不明显。LPS 刺激后 OX-42 阳性细胞数增加,可以看到细胞膜深染,OX-42 的特异性表达增强。染色加深呈现深褐色,胞体肥大,突起增粗,细胞呈蜘蛛状,见图 2A、B。从流式细胞的结果来看,不同浓度的 LPS 刺激后 OX-42 阳性细胞数目持续增强,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 2C)。

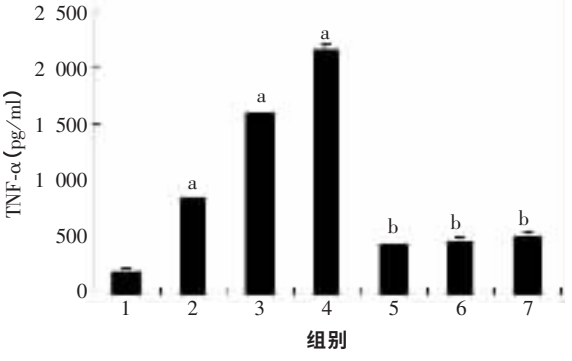
2.3 LPS 刺激及 AG490 预处理后 TNF-α 表达变化

用 ELISA 方法检测 TNF-α 的表达变化发现,LPS 刺激后可以增加 TNF-α 的表达上调,且呈剂量依赖关系。AG490 预处理小胶质细胞后 TNF-α 的表达发现,AG490 可以有效抑制 TNF-α 的表达。说明 LPS 可以刺激小胶质细胞分泌炎性刺激因子 TNF-α。而且能被 JAK-STAT 通路的抑制剂 AG490 减少,见图 3。



A：对照组(S-P×200)；B：LPS 刺激组(S-P×100)；C：LPS 刺激后 OX-42 阳性细胞定量分析　a：$P<0.05$，与对照组比较

图 2　LPS 刺激后 N9 细胞组织化学观察及 OX-42 表达变化

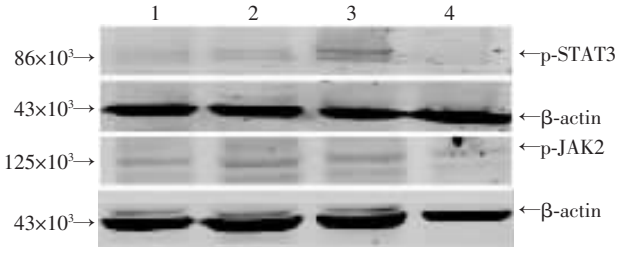


a：$P<0.05$，与对照组比较，b：$P<0.05$，与同浓度 LPS 刺激组比较；1：对照组；2：LPS 1 μmol/L；3：LPS 5 μmol/L；4：LPS 10 μmol/L；5：AG490 + LPS 1 μmol/L；6：AG490 + LPS 5 μmol/L；7：AG490 + LPS 10 μmol/L

图 3　LPS 刺激以及 AG490 预处理后细胞因子 TNF-α 表达变化

2.4　AG490 抑制 JAK-STAT 通路的激活

AG490 是近年来新发现的一种 Janus 酪氨酸激酶 2、3(Jak2、3)的阻断剂，可以和受体酪氨酸激酶竞争结合位点[5]。通过使用 AG490 我们发现，它可以有效阻断 JAK2 和 STAT3 的磷酸化作用，见图 4。并能够有效抑制炎性细胞因子 TNF-α 的分泌。这说明 JAK-STAT 通路参与了 LPS 诱导的小胶质细胞的活化分泌的炎性因子。



1：对照组；2：AG490 对照；3：LPS 刺激；4：AG490 + LPS 刺激

图 4　AG490 预处理后脂多糖诱导的 JAK2 和 STAT3 的磷酸化改变

3　讨论

小胶质细胞是脑内重要的免疫细胞，生理情况下占脑细胞总数的 10% 左右。小胶质细胞形态和功能具有多样性，在各种神经退形性疾病伴随的炎性反应过程中扮演着关键角色[6]。小胶质细胞最显著的特点之一是对外界环境刺激非常敏感。在许多微环境因子发生变化时，小胶质细胞可迅速做出反应，形态上表现为从带有分支的静息状态转化为体积较大、胞体变圆并具有变形和吞噬作用的激活状态。小胶质细胞进一步转化，胞体呈圆形，细胞突起消失，细胞表面表达抗原，并具有吞噬细胞功能，称为活化型或吞噬性小胶质细胞[7]。活化的小胶质细胞活化表现为细胞形态的变化，特异性标志物的改变以及分泌一些炎性因子。

从本实验中我们发现在不同剂量的 LPS 刺激后，OX-42 的阳性细胞数目以及在细胞的表达量都有明显的升高，说明 LPS 刺激可以诱导小胶质细胞活化。从而建立了一个比较合适的炎性刺激模型。OX-42 是小胶质细胞表面补体Ⅲ型受体(CR3，CD11b)，激活的小胶质细胞可导致 OX-42 的显著增加，因此 OX-42 单克隆抗体的免疫组织化学方法已经被广泛用于评价各个时期的小胶质细胞活化的特异性标志。OX-42 在中枢神经系统中的小胶质细胞中特异表达，故可以将 OX-42 阳性细胞按形态分为静止形小胶质细胞、激活形小胶质细胞、活化形小胶质细胞[8]。从实验结果可以发现小胶质细胞呈现明显的活化状态。另外活化的小胶质细胞一个重要特征就是分泌炎性因子，例如 TNF-α，IL-β 等[9]。我们的实验也发现这一特点。印证了 LPS 刺激可以诱导活化形小胶质细胞并分泌细胞因子。

小胶质细胞活化参与 CNS 的多种生理和病理过程。对小胶质细胞活化的调控是针对各种刺激或抑制因素在细胞水平、分子水平和基因水平所形成的复杂网络进行的。由于不同的调制因素之间存在加强作用，调制物和被调制物之间呈正反馈回路，且在不同的病理时期可由不尽相同的调控因素发挥作用，调控机制十分复杂[10]。研究小胶质细胞活化对于神经系统炎性反应的损伤以及修复有着重要的意义。JAK-STAT 是神经系统中重要的炎症信号通路之一，经典的研究认为 IFN-γ 可通过它促进 LPS、TNF-α、IL-1 等引起的炎症反应，而抗炎因子 IL-10、IL-4 也可通过该通路抑制炎症反应的发展[11]。JAK-STAT 通路活化不仅参与介导了活化的小胶质细胞早期分泌炎性细胞因子的信号调控，而且可能与晚期炎症介质的基因表达密切相关。这其中 STAT3 是重要的下游调控分子，磷酸化水

平增加可以激活 STAT3 入核发挥重要功能,调节大量基因的表达。该信号通路可能直接参与诱导了脑缺血所致的神经元凋亡,还有可能与脑缺血时小胶质细胞的活化有关[12]。所以在小胶质细胞炎性反应活化的试验模型中,我们观察了 JAK2-STAT3 信号通路的磷酸化表达变化情况。在我们实验条件中,LPS 诱导了 JAK2-STAT3 信号通路中的磷酸化表达增强,而且有效的被抑制剂 AG490 抑制,所以我们认为 JAK2-STAT3 信号通路参与了 LPS 诱导的小胶质细胞活化。并且影响了 TNF-α 的分泌,提示 JAK2-STAT3 通路激活与炎症因子分泌有关。

参考文献:

[1] Cannella B, Raine C S. Multiple sclerosis: cytokine receptors on oligodendrocytes predict innate regulation[J]. Ann Neurol, 2004, 55(1): 46 - 57.

[2] Liebetanz D, Fauser S, Michaelis T, *et al*. Safety aspects of chronic low-frequency transcranial magnetic stimulation based on localized proton magnetic resonance spectroscopy and histology of the rat brain[J]. J Psychiatr Res, 2003, 37(4): 277 - 286.

[3] Aid S, Langenbach R, Bosetti F. Neuroinflammatory response to lipopolysaccharide is exacerbated in mice genetically deficient in cyclooxygenase-2[J]. J Neuroinflammation, 2008, 5: 17.

[4] Li L, Gao Y, Zhang L L, *et al*. Concomitant activation of the JAK/STAT3 and ERK1/2 signaling is involved in leptin-mediated proliferation of renal cell carcinoma Caki-2 cells[J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7(11): [Epub ahead of print].

[5] Xiong H, Zhang Z G, Tian X Q, *et al*. Inhibition of JAK1, 2/STAT3 signaling induces apoptosis, cell cycle arrest, and reduces tumor cell invasion in colorectal cancer cells[J]. Neoplasia, 2008,10(3): 287 - 297.

[6] Hickman S E, Allison E K, El-Khoury J. Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice[J]. J Neurosci, 2008, 28(33): 8354 - 8360.

[7] Pawate S, Shen Q, Fan F, *et al*. Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferongamma[J]. J Neurosci Res, 2004, 77(4): 540 - 551.

[8] Lee S T, Chu K, Sinn D I, *et al*. Erythropoietin reduces perihematomal inflammation and cell death with eNOS and STAT3 activations in experimental intracerebral hemorrhage[J]. J Neurochem, 2006, 96(6): 1728 - 1739.

[9] D'Arcangelo G, Tancredi V, Onofri F, *et al*. Interleukin-6 inhibits neurotransmitter release and the spread of excitation in the rat cerebral cortex[J]. Eur J Neurosci, 2000, 12(4): 1241 - 1252.

[10] Hashioka S, Klegeris A, Schwab C, *et al*. Interferon-gamma-dependent cytotoxic activation of human astocytes and astrocytoma cells[J]. Neurobiol Aging, 2008, [Epub ahead of print]

[11] Sugaya K. Mechanism of glial differentiation of neural progenitor cells by amyloid precursor protein[J]. Neurodegener Dis, 2008, 5(3 - 4): 170 - 172.

[12] Kong L Y, Abou-Ghazal M K, Wei J, *et al*. A novel inhibitor of signal transducers and activators of transcription 3 activation is efficacious against established central nervous system melanoma and inhibits regulatory T cells[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(18): 5759 - 5768.

(编辑 栾 嘉)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2009)12-1122-01

神经内镜治疗有症状的儿童颅内蛛网膜囊肿的疗效分析

余 红,杨勇灵,陈初亮,陆 斌,伍仕兵,张 镇,沈 健 (贵州省黔东南州人民医院神经外科,贵州 凯里 556000)

我院于2001年3月至2007年12月应用神经内镜行有症状的儿童颅内蛛网膜囊肿(intracranial arachnoid cyst, IAC)脑池或脑室造瘘术17例,取得较好的近期疗效。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本组17例,男性12例,女性5例,年龄3~13岁,平均7.9岁,首次症状:发作性头痛11例,抽搐4例,颞部颅骨隆起5例,行走不稳3例,头颅增大2例,神经系统检查17例均明显阳性体征。CT或MRI显示囊肿分别位于外侧裂及颞极14例,枕大池2例,大脑凸面1例,囊肿大小为3.0 cm×3.0 cm×2.0 cm至7.5 cm×6.0 cm×5.0 cm。

作者简介:余 红,男,贵州省清镇市人,副主任医师,主要从事微创神经外科、脑肿瘤脑出血的显微治疗、颅脑外伤综合救治方面的研究。电话:(0855)8218924

收稿日期:2009-03-06;修回日期:2009-04-16

1.2 手术方法

在全麻下采用德国Storz公司生产的外径为6 mm的硬质神经内镜,在避开皮层功能区和重要血管的原则下,选择于囊壁最近的部位,颅骨钻孔直径约15 mm,于囊腔内侧壁用3F球囊导管造一直径10 mm的瘘孔,并同时行内侧囊壁部分切除,使囊肿腔与周围的脑池或脑室充分交通。术中用37 ℃林格氏液持续冲洗。对于小的渗血,通过冲洗即可停止,明显的出血则用双极电凝止血,术毕骨孔表面置一块明胶海绵,严密关闭切口各层。

2 结果

全组术后随访6个月至4年,平均2.4年,术后头痛消失5例,抽搐消失2例,发作减少2例,行走不稳现象消失1例,好转2例,CT或MRI随诊囊肿完全消失4例,缩小9例,同术前4例,无囊肿扩大病例,2例出现同侧动眼神经麻痹,3~6个月恢复,无其他并发症。

(下转1134页)