文章编号:1000-5404(2009)11-1063-03

论著

JAK2/STAT3途径在IL-6抑制LPS诱导的树突状细胞分化成熟中的作用

赵永亮,余佩武,雷 晓,刘 伟,饶 芸 (第三军医大学西南医院全军普通外科中心,微创胃肠外科中心,重庆 400038)

摘 要:目的 观察JAK2/STAT3信号途径在IL-6抑制LPS诱导的小鼠髓源性树突状细胞(bone marrow-derived dendritic cells, BMDCs)分化成熟中的作用。**方法** 分离小鼠骨髓细胞,采用黏附法结合GM-CSF和IL-4刺激法在体外培养BMDCs;用相差倒置显微镜观察BMDCs的形态特点;用LPS诱导DCs成熟;采用流式细胞术观察IL-6处理与否,LPS诱导的BMDCs在表型上的变化;Western blot检测BMDCs细胞质p-JAK2、总STAT3和p-STAT3的表达水平。**结果** 形态观察和FCM分析的结果表明:体外成功培养了纯度较高的高表达CD11c的BMDCs,LPS能明显诱导BMDCs表面MHC-Ⅱ类分子和共刺激分子CD80、CD86、CD40的表达上调;而经过IL-6处理后,LPS诱导BMDCs表面MHC-Ⅱ类分子、CD80、CD86、CD40表达上调的能力被显著削弱($P<0.01$)。Western blot结果显示,与单独用LPS处理的BMDCs相比,经IL-6处理后的BMDC中p-JAK2、p-STAT3表达随作用时间增加而明显上调,提示IL-6促进JAK2/STAT3信号途径活化。**结论** JAK2/STAT3信号途径参与了IL-6抑制LPS诱导的BMDCs成熟过程。

关键词: 髓源性树突状细胞;白细胞介素-6;LPS;JAK2/STAT3信号途径
中图法分类号: R338.12; R392.11; R392.5 **文献标识码:** A

IL-6 suppresses LPS-induced DCs maturation *via* JAK2/STAT3 pathway

ZHAO Yong-liang, YU Pei-wu, LEI Xiao, LIU Wei, RAO Yun (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the role of JAK2/STAT3 signaling pathway in IL-6-induced suppression during the maturation of mouse bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) after LPS treatment. Methods To obtain immature BMDCs, mouse bone marrow cells were isolated and cultured in complete culture medium containing GM-CSF and IL-4 after removing the nonadherent cells. The cell morphology was observed by using a phase contrast inverted microscope. LPS was added into the culture medium of BMDCs to induce the cell maturation. The expression of costimulators and MHC class Ⅱ molecules on the surface of LPS-treated BMDCs with or without IL-6 treatment was analyzed by flow cytometry. The expression of p-JAK2, STAT3 and p-STAT3 were detected by Western blot analysis. Results DCs were obtained from mouse bone marrow with normal morphology and high purity. Compared with BMDCs incubated with LPS only, LPS-treated DCs cultured in the presence of IL-6 expressed much lower levels of CD40, CD80, CD86 and MHC class Ⅱ molecules. The expression level of cytoplasmic p-JAK2 and p-STAT3 in BMDCs treated with both LPS and IL-6 were much higher than in BMDCs treated with LPS only. Conclusion JAK2/STAT3 pathway may be involved in the suppression of LPS-induced DCs maturation by IL-6.

Key words: bone marrow derived dendritic cells; IL-6; LPS; JAK2/STAT3

树突状细胞(dendritic cells,DCs)在诱导和维持机体抗肿瘤特异性免疫应答中具有核心作用。研究表明,肿瘤组织中DCs分化成熟障碍是肿瘤免疫逃逸的重要机制之一[1]。研究DCs分化成熟障碍的分子机制对于肿瘤免疫治疗具有重要意义。目前有研究提示肿瘤微环境中的多种免疫抑制性细胞因子参与肿瘤组织中DCs的分化与成熟障碍[2]。其中,IL-6是一种多功能的细胞因子,在免疫调节、血细胞生成、炎症和肿瘤发生等方面发挥重要的作用。大多数肿瘤细胞可分泌IL-6,而且高血清水平的IL-6与肿瘤恶变及不良预后密切相关[3]。在多发性骨髓瘤患者体内发现了DCs的数量、表型及功能异常与骨髓瘤本身过度分泌IL-6密切相关[4]。这些研究不仅表明了IL-6具有免疫抑制功能,而且间接提示IL-6可能通过抑制DCs的正常分化与成熟,来实现其免疫抑制的。

作者简介: 赵永亮,男,山东省泰安市人,博士,副教授,主要从事胃肠道肿瘤外科及生物治疗方面的研究。电话:(023)68765267, E-mail: yongliang166@sohu.com
通信作者: 余佩武,电话:(023)68754161
收稿日期: 2008-12-08;**修回日期:** 2009-01-10

IL-6 受体(IL-6R)由特异性 α 链和共有链 gp130 组成,IL-6 可以通过 IL-6R 活化细胞内的一系列信号蛋白分子从而实现 IL-6 反应基因的诱导表达。在这个过程中,蛋白酪氨酸激酶 2(janus kinase 2, JAK2)、信号转导子和转录激活子 3(signal transducer and activator of transcription 3,STAT3)即 JAK2/STAT3 信号途径主要参与了 IL-6 在各种靶细胞中的信号转导功能[5]。本研究拟建立 LPS 诱导的体外小鼠髓源性 DCs(bone marrow derived dendritic cells, BMDCs)正常分化成熟模型及 IL-6 作用后的 BMDCs 异常分化模型,并比较分析 2 种不同的 DCs 分化模型中 JAK2/STAT3 信号转导水平的变化,以初步探讨 IL-6 调节 DCs 分化成熟的可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 BALB/c 近交系小鼠,雌性,6~8 周龄,体质量(20±2)g,均购自第三军医大学实验动物中心。

1.2 主要试剂

rmGM-CSF、rmIL-4 和 rmIL-6 购自 R&D 公司;LPS(*Escherichia coli* 026:B6)购自 Sigma 公司;PE 标记的抗小鼠 CD11c 单克隆抗体(mAb),FITC 标记的抗小鼠 I-A、CD80、CD86、CD40 mAb 以及相应的同型对照抗体为 BD PharMingen 公司产品;兔抗 JAK2(D2E12)mAb、兔抗 p-JAK2(Tyr1007/1008)多抗、兔抗 STAT3 多抗、兔抗 p-STAT3(Ser727)多抗、辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔 IgG、ECL 增强化学发光试剂盒均购自美国 Cell Signaling 公司。

1.3 小鼠 BMDCs 诱导培养与处理

将 BALB/c 小鼠断颈处死,无菌条件取出股骨和胫骨,用 RPMI1640 培养基反复冲洗骨髓腔,冲洗得到的细胞混悬液经 100 目筛网过滤,用 ACK 裂解缓冲液(0.15 mol/L NH_4Cl,1.0 mmol/L $KHCO_3$,0.1 mmol/L EDTA)去除红细胞,每只可得到 4×10^7~6×10^7 骨髓细胞。用完全 RPMI1640 培养基(含 10% FBS、10 ng/ml rmGM-CSF、10 ng/ml rmIL-4、青链双抗)悬浮骨髓细胞,置于一次性无菌培养瓶中,37 ℃ CO_2 孵箱中孵育。2 d 后更换培养基,小心吸弃非黏附细胞,以后隔天半量换液,同时补加 rmIL-4 和 rmGM-CSF,培养 6 d 可以观察到松散成团的未成熟 DCs(iDCs),用相差倒置显微镜观察培养期间的 BMDCs 形态。将收获的 iDCs 用完全 RPMI1640 培养基调整细胞数至 1×10^6/ml,分为 A、B 2 组,A 组仅加入 LPS(1 μg/ml),而 B 组同时加入 LPS(1 μg/ml)和 mIL-6(50 ng/ml)。继续培养 24 h 后,用 FCM 检测细胞表型。该培养过程中分别取处理 6、12、24 h 的 A、B 组 DCs,分离 1×10^6 BMDCs 细胞质蛋白用作 Western blot 检测。

1.4 FCM 分析 DCs 表型

DCs 做 Fc 受体封闭处理后,分别用 PE 标记的抗小鼠 CD11c mAb,FITC 标记的抗小鼠 I-A、CD80、CD86、CD40 以及相应的同型对照抗体与待测细胞室温避光孵育 30 min,PBS 洗涤 2 次后,用流式细胞仪分析 BMDCs 各表面分子的表达情况。

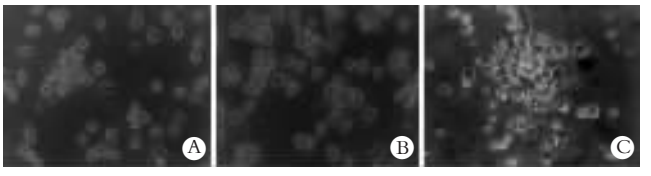
1.5 DCs 细胞质总 JAK2、p-JAK2、总 STAT3、p-STAT3 的 Western blot 检测

收集经不同时间(6、12、24 h)处理的 1×10^6 BMDCs,加入裂解缓冲液 200 μl 冰浴静置 1 h,然后 4 ℃、14 000 r/min 离心 25 min,上清液采用考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度(mg/ml),-80 ℃保存。每个样品取 50 μg 总蛋白,电泳后电转移至 PVDF 膜,90 V 低温条件下电转移 2 h,封闭后分别加入兔抗 JAK2 mAb、兔抗 p-JAK2(Tyr1007/1008)多抗、兔抗 STAT3 多抗、兔抗 p-STAT3(Ser727)多抗,抗体均 1∶500 稀释,4 ℃过夜。PBST 漂洗 4 次后,加入辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔 IgG(1∶5 000稀释),4 ℃孵育过夜。PBST 漂洗 4 次后,用 ECL(增强化学发光)试剂盒显色,底片经扫描仪透扫后,用美国 UVP 公司 LabWorks 415 软件对 Western 条带进行定量分析。

2 结果

2.1 小鼠 BMDCs 的形态观察

经相差倒置显微镜观察,培养 24 h 可见贴壁细胞形成集落;第 2~4 天集落逐渐增加,形如半贴壁的葡萄串状;第 5~6 天,集落丰富,细胞表面突起可见,大量细胞脱落(图 1)。



A: 24 h; B:3 d; C:6 d

图1 体外培养不同时间的小鼠 BMDCs 形态观察 (相差倒置显微镜×400)

2.2 IL-6 明显抑制 LPS 诱导的 BMDCs 分化成熟

收获 iDC,加入 LPS(1 μg/ml)孵育 24 h,诱导 DCs 成熟。FCM 检测这群 DCs 表面 CD11c、I-A、CD80、CD86 及 CD40 的表达情况。结果表明:获得的 BMDCs 纯度高于 80%,且经 LPS 刺激后的 A 组 DCs 表面表达 MHC-Ⅱ类分子及共刺激分子的水平显著增高。而联合用 LPS 和 IL-6 处理过的 B 组 BMDCs 表面 MHC-Ⅱ类分子、共刺激分子的表达水平显著低于 A 组($P<0.01$),提示 IL-6 对于 LPS 诱导 DCs 成熟的过程具有明显的抑制效应(表 1)。

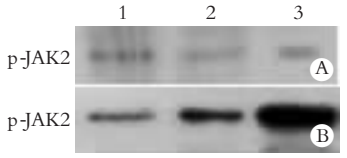
表1 不同培养条件诱导的 DCs 表型分子阳性表达率(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	MHC-Ⅱ	CD40	CD80	CD86
LPS 组	71.90±0.89[a]	66.83±1.61[a]	68.16±1.30[a]	72.63±1.55[a]
LPS+IL-6 组	39.70±0.70	33.93±1.44	37.80±0.61	41.63±1.56

a: $P<0.01$,与 LPS+IL-6 组比较

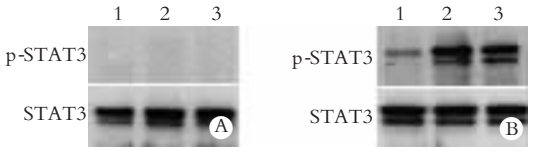
2.3 IL-6 处理对 BMDCs 细胞质内 JAK2/STAT3 信号途径的活化

3 次独立的 Western blot 结果显示,经 IL-6 和 LPS 同时处理的 DCs 细胞质内 JAK2 和 STAT3 的磷酸化活化信号随刺激时间延长而逐渐增强;而单独由 LPS 处理的 DCs 细胞质内在各时相点均检测不出明显的磷酸化 JAK2 和 STAT3 水平。提示 IL-6 处理后,BMDCs 内的 JAK2/STAT3 信号途径被明显活化。见图 2、3。



A: LPS 组; B: LPS + IL-6 组　　1:6 h; 2: 12 h; 3: 24 h

图 2　BMDCs 细胞质内 JAK2 磷酸化信号的检测



A: LPS 组; B: LPS + IL-6 组　　1:6 h; 2: 12 h; 3: 24 h

图 3　BMDCs 细胞质内 STAT3 磷酸化信号的检测

3　讨论

DCs 来源于骨髓造血祖细胞(haematopoietic progenitor cells ,HPCs),其前体主要是未成熟髓样细胞(immature myeloid cells,iMCs),iMCs 最终可分化为粒细胞、巨噬细胞和 DCs。DCs 刚离开骨髓时还是 iDCs,iDCs 表面低表达甚至不表达 MHC-Ⅱ类分子和共刺激分子如 CD40、CD80 和 CD86。一旦 iDCs 遭遇抗原后,并在一些活化因子如 LPS 等作用下可分化为成熟 DCs(mDCs),其表面 MHC-Ⅰ、Ⅱ类分子及共刺激分子的表达显著上调。在触发机体 T 细胞反应过程中,不同成熟阶段的 DCs 所表达的特征性表面分子或分泌的不同细胞因子决定了机体发生免疫反应的类型,包括免疫激活或免疫耐受。过去 10 年中,人们发现绝大多数肿瘤患者体内的抗瘤免疫反应微乎其微,即便采取主动免疫策略仍难以诱导出有效的肿瘤保护性免疫应答,这在很大程度上归因于肿瘤自身具有免疫逃逸及诱导机体免疫耐受的能力,其重要机制之一就是荷瘤机体内的 DCs 分化成熟障碍,具体表现为:①mDCs 绝对数量减少;②iDCs 比例增加但不能上调 MHC-Ⅱ类分子和共刺激分子的表达,也不能产生相应的细胞因子;③iMCs 蓄积。肿瘤细胞可以产生大量的 IL-6,而这可能与 DCs 分化成熟障碍有关,但对于 IL-6 是否调节 DCs 分化成熟尚缺乏直接证据。为了观察 IL-6 对 DCs 分化成熟的直接作用,我们在成功诱导出大量纯度较高的 $CD11c^+$ BMDCs 基础上,利用组合性细胞表面标志来判断给予 IL-6 处理与否,LPS 诱导的 DCs 成熟情况。LPS 是 G^- 细菌的主要致病物质,通常在 DCs 培养的后期用 LPS 刺激 24 ~ 48 h,便可以诱导 DCs 分化成熟,表现为 MHC-Ⅱ类分子、共刺激分子和某些黏附分子表达增加。本研究通过 FACS 检测证实在 LPS 联合 IL-6 处理的 B 组 DCs 表面共刺激分子 CD40、CD80 和 CD86 的表达水平明显低于单独给予 LPS 处理的 A 组 DCs($P < 0.01$),由于这些共刺激分子是 DCs 成熟的标志,提示 IL-6 可明显阻止 LPS 诱导的 DCs 成熟。该实验为进一步研究 IL-6 抑制 DCs 成熟的分子机制奠定了基础。

近年来,JAK/STAT 信号途径是 IL-6 信号转导机制研究的热点。JAK 蛋白酪氨酸激酶家族的 JAK1、JAK2 和 TYK2 广泛地参与了 IL-6 在各种组织中的信号转导功能。虽然 3 种 JAK 激酶广泛地参与了 IL-6 在各种靶细胞中的信号传导功能,但在不同的 IL-6 反应细胞系中却有不同的 JAK 激酶被活化。IL-6 刺激淋巴造血干细胞、胚胎干细胞、白血病细胞和前 B 细胞后主要表现为 JAK2 的磷酸化水平增加。STAT 蛋白是近年来研究异常活跃的转录因子家族,目前共发现有 9 个成员,其中 STAT3 主要参与了 IL-6 的信号转导功能。STAT3 几乎在所有的 IL-6 反应细胞系中都能够被活化[6]。那么,JAK2/STAT3 信号通路是否也参与了 IL-6 抑制 DCs 分化成熟这一过程呢? 我们通过 Western blot 发现,经 IL-6 和 LPS 同时处理的 DCs 细胞质内 JAK2 和 STAT3 的磷酸化活化信号随刺激时间延长而逐渐增强,而单独由 LPS 处理的 DCs 细胞质内在各时相点均检测不出明显的磷酸化 JAK2 和 STAT3 水平。提示 IL-6 处理后,BMDCs 内的 JAK2/STAT3 信号途径被明显活化。

本研究通过体外培养实验,直接观察到 IL-6 抑制 LPS 诱导的 DCs 分化成熟这一现象,解释了肿瘤患者体内 DCs 分化成熟障碍的可能机制,并初步证实 JAK2/STAT3 信号途径参与了 IL-6 抑制 DCs 分化成熟这一过程。而对于 JAK2/STAT3 信号过度活化导致 DCs 分化成熟障碍的分子机制研究,将是我们以后研究的重点。

参考文献:

[1] Yang L, Carbone D P. Tumor-host immune interactions and dendritic cell dysfunction[J]. Adv Cancer Res, 2004, 92:13 - 27.

[2] Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(12): 941 - 952.

[3] Blay J Y, Negrier S, Combaret V, *et al*. Serum level of interleukin 6 as a prognosis factor in metastatic renal cell carcinoma[J]. Cancer Res, 1992, 52(12):3317 - 3322.

[4] Ratta M, Fagnoni F, Curti A, *et al*. Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6[J]. Blood, 2002, 100(1):230 - 237.

[5] O'Sullivan L A, Liongue C, Lewis R S, *et al*. Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease[J]. Mol Immunol, 2007, 44(10): 2497 - 2506.

[6] Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors[J]. Oncogene, 2000, 19(21):2548 - 2556.

(编辑　王　红)