论著

文章编号:1000-5404(2013)05-0408-04

莪术醇通过JAK3/STAT信号途径抑制Jurkat细胞增殖

王 恒[1],王 勇[1],江晓霁[1],王志中[2],刘晓飞[1],方勇飞[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院中西医结合科[1];830011 乌鲁木齐,解放军第474医院康复科[2])

[摘要] **目的** 观察莪术醇对抑制Jurkat细胞增殖的影响,并从JAK3/STAT信号途径探讨其作用机制。**方法** 不同浓度(6.25、12.5、25、50 μg/mL)莪术醇干预处理人Jurkat细胞株,分别用新型四唑单钠盐法、流式细胞技术观察检测细胞增殖活力及细胞周期分布。Hoechst 33258染色,观察莪术醇诱导的细胞凋亡形态学变化。设正常对照组、IL-2刺激组、JAK3抑制剂组及莪术醇干预组,Western blot检测细胞中JAK3、STAT3及STAT5a磷酸化蛋白表达量的变化。**结果** 不同浓度的莪术醇体外处理24 h后,Jurkat细胞的增殖受到明显抑制,呈浓度依赖性下降($P<0.05$)。细胞周期分布结果显示,随着莪术醇作用浓度的增加,细胞凋亡的比例明显升高,S期细胞比例呈浓度依赖性增多,G_2/M细胞比例则呈减少趋势。50 μg/mL的莪术醇处理24 h后,细胞表现出核固缩、碎裂等典型的凋亡形态学变化。Western blot检测结果显示,50 μg/mL的莪术醇可抑制JAK3与STAT5a磷酸化蛋白的表达($P<0.05$, $P<0.01$),但对STAT3无明显影响($P>0.05$)。**结论** 莪术醇作用于Jurkat细胞S~G_2/M期,阻滞S期细胞向G_2/M期移行,并下调JAK3/STAT5信号分子以抑制该细胞增殖。

[关键词] 莪术醇;Jurkat T细胞;JAK3-STAT;细胞增殖
[中图法分类号] R285.5; R329.28; R392.12 [文献标志码] A

Proliferation-inhibiting effect of curcumol on human T-cell leukemia cell line Jurkat *via* blocking JAK3/STAT pathway

Wang Heng[1], Wang Yong[1], Jiang Xiaoji[1], Wang Zhizhong[2], Liu Xiaofei[1], Fang Yongfei[1] ([1]Department of Integrated Chinese and Western Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Rehabilitation, No. 474 Hospital of PLA, Urumchi, Xinjiang Uygur Autonomous Region, 830011, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the inhibitory effect of curcumol on Jurkat cells, and to explore the potential mechanism through JAK3 (Janus kinase 3)/STAT (signal transducers and activators of transcription) signal pathway. **Methods** Cell viability was assessed by tetrazolium single sodium salt, and the characteristics of curcumol-induced cell cycle arrest was detected by flow cytometry (FCM) after Jurkat cells exposed to different concentrations of curcumol (6.25, 12.5, 25 and 50 μg/mL) for 24 h. The cell morphology of apoptosis induced by curcumol was assessed by Hoechst 33258 staining. The Jurkat cells were divided into four groups including a normal control group, a interleukin-2 (IL-2) stimulation group, a JAK3 inhibitor group and a curcumol intervention group, and the protein expression levels of p-JAK3 (phosphorylated JAK3), p-STAT3 and p-STAT5a were determined by Western blot analysis. **Results** After different concentrations of curcumol treatment, the Jurkat cell viability decreased significantly in a dose-dependent manner ($P<0.05$). FCM results showed that apoptotic rate and the proportion of the cells arrested in S phase were elevated along with curcumol concentration increase, while the proportion of cells in G_2/M phase declined gradually. After exposure to curcumol for 24 h, the Jurkat cells underwent typical apoptotic morphological changes, such as nucleus condensation and fragmentation. The expression levels of p-JAK3 and p-STAT5a in Jurkat cells were suppressed by 50 μg/mL of curcumol ($P<0.05$, $P<0.01$), while there was no obvious change in STAT3 expression ($P>0.05$). **Conclusion** The underlying mechanism of curcumol on suppressing the proliferation of Jurkat cells may be associated with S to G_2/M phase arresting and JAK3/STAT5 pathway down-regulation.

[基金项目] 重庆市卫生局中医药科研项目(2012-2-62);国家自然科学基金面上项目(30973827)
[通信作者] 王 勇,电话:(023)68765206, E-mail: wangyongjhy@tom.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121219.1739.008.html(2012-12-19)

[**Key words**] curcumol; Jurkat T cells; JAK3-STAT; cell proliferation

Supported by the Scientific Project of Traditional Chinese Medicine of Chongqing Municipal Health Bureau (2012-2-62) and the General Program of National Natural Science Foundation of China (30973827). Corresponding author: Wang Yong, Tel: 86-23-68765206, E-mail: wangyongjhy@tom.com

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis,RA)是一种以关节滑膜炎为主要病理表现的自身免疫性疾病,其病因至今未明,但滑膜内 $CD4^+$ T 淋巴细胞的大量浸润及滑膜细胞的过度增生被认为是诱发并加重 RA 滑膜炎症的中心环节。研究[1]证实,RA 患者滑膜淋巴细胞聚集区 $CD4^+$ T 细胞高表达 B 细胞淋巴瘤(B-cell lymphoma,Bcl-2)蛋白,且无出凋亡现象。这提示 $CD4^+$ T 细胞的凋亡抑制可能是产生促炎因子和诱发自身免疫反应的重要环节。

JAK(Janus kinase)是一类重要的酪氨酸激酶,迄今发现 JAK1、2、3 及 TYK2 四个家族成员。研究[2]发现,JAK3 仅表达于 T 淋巴细胞和造血系统中,其在自身免疫性疾病的发病过程中起着重要作用,这可能与 JAK3/信号转导与转录活化子(signal transducers and activators of transcription, JAK3/STAT)信号途径在诱导 T 细胞的增殖、分化过程中相关。

莪术醇(curcumol),又名姜黄环奥醇,为活血化瘀中药莪术的挥发油中分离出的有效单体成分,性质稳定,生物活性强。研究[3-4]表明,莪术醇具有较强的抗肿瘤作用,能够有效地抑制多种恶性肿瘤细胞的增殖并诱导其发生凋亡。由于 RA 患者滑膜内 T 淋巴细胞凋亡受到抑制,类似肿瘤的特点,借助莪术醇的抗肿瘤作用,本研究以人外周血白血病 T 淋巴细胞株 Jurkat 细胞为研究对象,围绕 JAK3/STAT 信号途径,探讨莪术醇对该细胞的影响,并揭示其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 莪术醇(购于上海泽润制药公司,No: CUL081007T,纯度 >98%),RPMI1640(HyClone,美国),Hoechst 33258(碧云天生物技术研究所),小牛血清(成都哈里生物公司),新型四唑单钠盐法检测试剂盒(南京凯基生物科技)。重组人白介素-2(rhIL-2,PeproTech,美国),JAK3 抑制剂 ZM39923 盐酸盐(Sigma,美国),兔抗磷酸化 JAK3(p-JAK3,Bioworld Technology,美国),兔抗磷酸化 STAT3(p-STAT3,Biovision,美国),兔抗磷酸化 STAT5a(p-STAT5a,Bioworld Technology,美国),HRP 标记的山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司),增强化学发光(ECL)显影液(Pierce,美国)。莪术醇溶于二甲基亚砜(DMSO)中,制备成 10、5、2.5、1.25 mg/mL 的储备液,过滤除菌后分装,于 -20 ℃避光保存。

1.1.2 Jurkat 细胞株 由我院神经外科实验中心单佑安博士惠赠,用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基于 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度孵育箱内培养。

1.2 方法

1.2.1 细胞增殖毒性实验 取对数生长期的 Jurkat 细胞,以 2.5×10^5/mL 接种于 96 孔板,每孔 199 μL,细胞培养过夜待 Jurkat T 细胞成团稳定后,每孔加入 1 μL 的莪术醇母液(DMSO 的体积 < 总体积的 1%)使其终浓度依次分别是 6.25、12.5、25、50 μg/mL,并设置正常对照组(不加莪术醇)、DMSO 溶剂对照组(仅加 1 μL DMSO),各组设置 3 个复孔。处理 24 h 后,每空加入 10 μL 新型四唑单钠盐法检测试剂,孵育 30 min 后,用酶标仪在波长 450 nm 检测各组细胞的光密度值[D(450)]。

1.2.2 莪术醇诱导 Jurkat 细胞凋亡的形态学检测 取对数生长期的 Jurkat 细胞,以 1×10^6/mL 接种于 6 孔板中,加入浓度 50 μg/mL 莪术醇处理 24 h,设置正常对照组,收集细胞,磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.2)洗涤,涂片于载玻片上,Hoechst 33258 染色 5 min,PBS 洗涤,封片,荧光显微镜下观察并照相(激发波长 350 nm 左右,发射波长 460 nm 左右)。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期 取对数生长期的 Jurkat 细胞,以 1×10^6/mL 接种于 6 孔板中。设置正常对照组,以不同浓度(6.25、12.5、25 μg/mL)莪术醇处理 24 h,收集细胞,PBS 洗涤,4% 多聚甲醛 4 ℃固定过夜,离心后弃上清,PBS 洗涤,加 100 μL Rnase 于 37 ℃水浴 30 min,加入 500 μL 碘化丙啶(50 μg/mL)染液 4 ℃避光 30 min,上机检测。

1.2.4 Western blot 检测 p-JAK3、p-STAT3 及 p-STAT5a 蛋白表达 设置正常对照组、IL-2 刺激组(50 ng/mL rhIL-2 刺激 30 min)、JAK3 抑制剂组(50 ng/mL rhIL-2 刺激 30 min 后,50 μmol/L ZM39923 处理 24 h)和莪术醇干预组(50 ng/mL rhIL-2 刺激 30 min 后,50 μg/mL 莪术醇处理 24 h)。收集细胞,加入 100 μL 预冷的细胞裂解液,冰上裂解 30 min,提取细胞总蛋白,二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度并进行定量。常规制胶、上样、电泳,然后转膜,封闭,分别加入兔抗人 p-JAK3(1∶500),兔抗人 p-STAT3(1∶1 000),兔抗人 p-STAT5a(1∶1 000),4 ℃孵育过夜,漂洗后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1∶5 000),漂洗后 ECL 显影液显色,Bio-Rad 凝胶成像系统扫描成像,计算机软件处理分析。以磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)内参对照,实验在相同条件下重复 4 次。

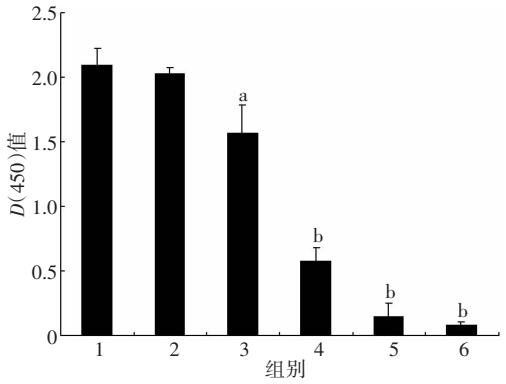
1.3 统计学分析

以 $\bar{x}\pm s$ 表示计量数据,采用 SPSS 18.0 统计软件对数据进行单因素方差分析,Bio-Rad 公司 Image Lab 分析软件处理 Western blot 相关数据。

2 结果

2.1 莪术醇对 Jurkat 细胞活性的影响

DMSO 溶剂对照组与正常对照组无明显差异($P>0.05$),说明 0.5% 的 DMSO 溶剂对细胞的生长没有明显的影响。与正常对照组相比,不同浓度莪术醇处理组细胞增殖活性显著下降($P<0.05$, $P<0.01$),并呈浓度依赖性的下降,其中以莪术醇浓度为 25 μg/mL 和 50 μg/mL 的影响最为明显($P<0.01$)。见图 1。

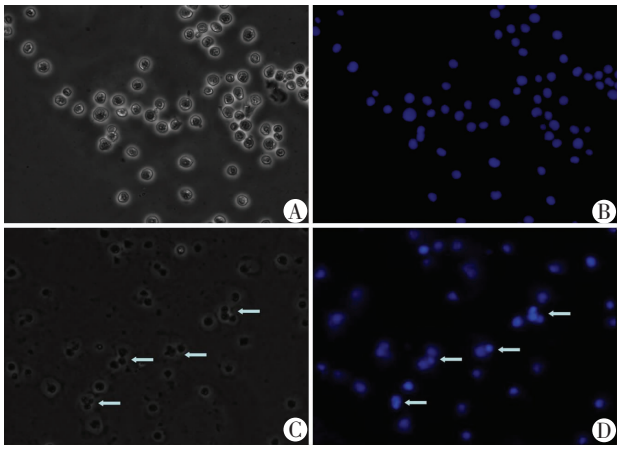


1:正常对照组;2:DMSO溶剂对照组;3:6.25 μg/mL莪术醇组;4:12.5 μg/mL莪术醇组;5:25 μg/mL莪术醇组;6:50 μg/mL莪术醇组 a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与正常对照组比较

图1 莪术醇对Jurkat T细胞增殖的影响

2.2 莪术醇对Jurkat细胞形态的影响

正常的Jurkat细胞呈圆形,大小均匀,细胞膜完整具有折光性,细胞核较大,呈均匀弥散荧光。50 μg/mL莪术醇处理Jurkat细胞24 h后,细胞皱缩呈不规则形态,细胞膜折光性差,可见明显的细胞碎片,并且细胞核出现凋亡的形态学改变,细胞核固缩,大小不一,染色不均匀,表现出荧光增强的颗粒。见图2。



A、B:对照组;C、D:50 μg/mL莪术醇组;A、C:光镜;B、D:荧光显微镜 ↑:荧光增强的颗粒

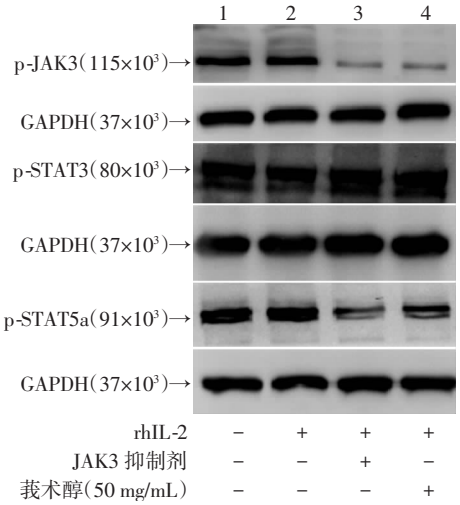
图2 莪术醇对Jurkat T细胞形态的影响 (×200)

2.3 莪术醇对Jurkat细胞周期的影响

亚G_1期(Sub G_1期)表示凋亡相关染色质的降解情况。如图3所示,不同浓度莪术醇体外处理细胞24 h后,处于Sub G_1期的细胞百分比有升高的趋势,分别是0.54%(正常对照组)、3.16%(6.25 μg/mL)、6.29%(12.5 μg/mL)、21.02%(25 μg/mL);非凋亡的细胞中,细胞处于S期的细胞比例增高,分别是28.70%(正常对照组)、31.77%(6.25 μg/mL)、32.48%(12.5 μg/mL)、38.12%(25 μg/mL),而处于G_2/M期的细胞比例下降,分别是31.07%(正常对照组)、28.73%(6.25 μg/mL)、25.46%(12.5 μg/mL)、19.27%(25 μg/mL)。这些变化趋势提示莪术醇作用于Jurkat细胞的S~G_2/M期,阻滞S期细胞向G_2/M期移行,引起S期细胞堆积,导致细胞增殖受抑制。

2.4 莪术醇对p-JAK3、p-STAT3、p-STAT5a蛋白表达的影响

正常对照组与IL-2刺激组中p-JAK3、p-STAT3、p-STAT5a蛋白的表达水平均呈较高的表达水平。与IL-2刺激组相比,JAK3抑制剂组及莪术醇干预组(50 μg/mL)两者变化趋势相一致,p-JAK3及p-STAT5a的蛋白表达水平明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),而p-STAT3的表达水平无明显变化($P>0.05$)。见图3、表1。



1:正常对照组;2:IL-2刺激组;3:JAK3抑制剂组;4:莪术醇干预组

图3 莪术醇处理后p-JAK3、p-STAT3、p-STAT5a蛋白水平的变化

表1 JAK3-STAT信号通路相关蛋白的表达(目的条带/GAPDH, $n=4$, $\bar{x}\pm s$)

组别	p-JAK3	p-STAT3	p-STAT5
正常对照组	0.591 7±0.023 75	0.896 2±0.037 70	0.959 4±0.018 69
IL-2刺激组	0.585 0±0.025 86	0.900 3±0.046 59	0.923 4±0.011 56
JAK3抑制剂组	0.321 7±0.023 46[b]	0.855 5±0.099 84	0.751 3±0.040 27[a]
莪术醇干预组	0.347 2±0.011 12[b]	0.805 4±0.153 41	0.734 4±0.028 90[a]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与IL-2刺激组比较

3 讨论

遗传学研究[5]显示超过80%的RA患者,其人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)为DRB1/DRB4/DRB14等位基因,提示$CD4^+$ T细胞是滑膜炎症形成和发展中的重要环节。在RA患者中,$CD4^+$ T细胞与滑膜细胞通过细胞因子或直接接触相互作用,形成复杂的功能网络,释放IL-1、TNF-α、IL-17等促炎性细胞因子,引起细胞增殖和骨质破坏[6-7]。因此,$CD4^+$T细胞与滑膜细胞相互作用,在特定遗传背景和炎症微环境下,呈现功能异常,是诱发并加重RA滑膜炎症的中心环节。Jurkat细胞是人的外周血白血病细胞,其细胞表型和某些功能与正常T细胞相似,可作为体外研究T淋巴细胞的生物模型,我们所用的Jurkat细胞表面标志含$CD4^+$,国内外常用于RA的机制研究[8-9]。国内外已有研究报道,莪术醇能够有效地抑制多种恶性肿瘤细胞的增殖,但其是否能够抑制T细胞增殖及其可能作用的机制有待进一步阐明。

Zhang等[4]发现莪术醇能够通过非Caspases的线粒体信号途径诱导人肺腺癌ASTC-a-1细胞株发生凋亡,从而有效地抑制了该细胞的增殖。本研究通过不同浓度的莪术醇体外干预Jurkat细胞,发现该药可呈浓

度依赖性地抑制 Jurkat 细胞的增殖。另外,50 μg/mL 莪术醇处理 Jurkat 细胞 24 h 后,经 Hoechst33258 染色,观察到细胞核固缩、碎裂,类似凋亡样的形态学改变。流式细胞技术检测不同浓度的莪术醇对 Jurkat 周期分布的影响,结果发现 S 期细胞比例呈浓度依赖性的升高,G_2/M 期则呈浓度依赖性的降低。因此,我们推测莪术醇通过作用于 Jurkat 细胞 S ~ G_2/M 期,阻滞 S 期向 G_2/M 期的移行,抑制该细胞进入细胞周期,从而达到抑制 Jurkat 细胞增殖的作用。

JAK/STAT 是 1 条介导细胞因子信号转导的通路,在细胞的生长、增殖及分化过程中发挥重要作用。JAK3 作为 JAK 家族的重要成员之一,在 T 细胞的发育和维持免疫系统的稳态起着关键作用。Gu 等[10]发现 RA、关节病型银屑病患者的外周血混合淋巴细胞 JAK3 呈高表达。近年来,小分子 JAK3 抑制剂 Tasocitinib(CP690550)在治疗 RA 的临床试验中疗效显著,提示 JAK3/STAT 信号通路在 RA 的重要地位[11-12]。STATs 是一蛋白家族,在哺乳动物中已发现 7 个成员,分别是 STAT1-4、5a、5b、6,为 JAK/STAT 信号转导通路的下游转录因子,被 JAK 磷酸化后形成二聚体后进入细胞核内传递细胞信号[13]。研究[14]证实,STAT5 作为 IL-2 激活的 JAK3/STAT 信号通路下游的重要转录因子之一。

本研究结果发现:正常对照组与 IL-2 刺激组中 p-JAK3、p-STAT3、p-STAT5a 蛋白的表达水平均呈较高的表达水平。究其原因,Jurkat 细胞是一活化的细胞株,自身能够产生较高的 IL-2,以自分泌形式刺激细胞增殖[15],因此与该细胞 IL-2 受体关联的下游 JAK3/STAT 信号转导分子如 p-JAK3、p-STAT3、p-STAT5a 均呈活化状态,所以外源性加入 IL-2 的情况下并没有发现其与正常对照组中的 Jurkat 细胞有明显的差异。免疫印迹显示:莪术醇与 JAK3 抑制剂均可抑制 JAK3 磷酸化蛋白的表达。STAT5a 是 JAK3 下游的重要转录因子[16],我们推测莪术醇抑制了 JAK3 蛋白的磷酸化,进而下调了 JAK3 相关联的下游 STAT5a 磷酸化蛋白的表达。STAT3 是一个广泛表达于多种细胞的重要转录因子,可通过结合在 IL-6 家族受体上的 JAK2 而被活化,亦可通过表皮生长因子受体或其他受体酪氨酸激酶如 c-MET,磷酸化激活 STAT3,进一步传递信号[17]。本研究发现,莪术醇对 STAT3 磷酸化蛋白无明显影响,其可能原因是 STAT3 并未参与 IL-2 诱导的 JAK3/STAT 信号途径下游的信号传递,或者莪术醇不作用于 STAT3 转录因子。由于 JAK3/STAT 信号途径在 IL-2 诱导的细胞增殖中发挥重要作用,研究发现莪术醇可抑制 JAK3 的活性及下调细胞质内 STAT5a 的表达,因此,我们推测,莪术醇干预了 JAK3/ STAT5 的活性而抑制细胞增殖并诱导细胞的凋亡,这为该药的临床应用研究提供了理论指导。

参考文献:

[1] Chetoui N, Boisvert M, Gendron S, *et al*. Interleukin-7 promotes the survival of human CD4$^+$ effector/memory T cells by up-regulating Bcl-2 proteins and activating the JAK/STAT signalling pathway[J]. Immunology, 2010, 130(3): 418 - 426.

[2] Wang L H, Kirken R A, Erwin R A, *et al*. JAK3, STAT, and MAPK signaling pathways as novel molecular targets for the tyrphostin AG-490 regulation of IL-2-mediated T cell response[J]. J Immunol, 1999, 162(7): 3897 - 3904.

[3] 王娟, 陈旭, 曾建红. 莪术醇对鼻咽癌细胞 CEN-2 增殖与凋亡的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(7): 790 - 792.

[4] Zhang W, Wang Z, Chen T. Curcumol induces apoptosis via caspases-independent mitochondrial pathway in human lung adenocarcinoma ASTC-a-1 cells[J]. Med Oncol, 2011, 28(1): 307 - 314.

[5] Firestein G S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis[J]. Nature, 2003, 423(6937): 356 - 361.

[6] Zhu L, Ji F, Wang Y, *et al*. Synovial autoreactive T cells in rheumatoid arthritis resist IDO-mediated inhibition[J]. J Immunol, 2006, 177(11): 8226 - 8233.

[7] Sarkar S, Fox D A. Targeting IL-17 and Th17 cells in rheumatoid arthritis[J]. Rheum Dis Clin North Am, 2010, 36(2): 345 - 366.

[8] Oki M, Watanabe N, Owada T, *et al*. A functional polymorphism in B and T lymphocyte attenuator is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis[J]. Clin Dev Immunol, 2011(2011): 305656.

[9] Tarr J M, Winyard P G, Ryan B, *et al*. Extracellular calreticulin is present in the joints of patients with rheumatoid arthritis and inhibits FasL (CD95L)-mediated apoptosis of T cells[J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(10): 2919 - 2929.

[10] Gu J, Marker-Hermann E, Baeten D, *et al*. A 588-gene microarray analysis of the peripheral blood mononuclear cells of spondyloarthropathy patients[J]. Rheumatology (Oxford), 2002, 41(7): 759 - 766.

[11] Papageorgiou A C, Wikman L E. Is JAK3 a new drug target for immunomodulation-based therapies? [J]. Trends Pharmacol Sci, 2004, 25(11): 558 - 562.

[12] West K. CP-690550, a JAK3 inhibitor as an immunosuppressant for the treatment of rheumatoid arthritis, transplant rejection, psoriasis and other immune-mediated disorders[J]. Curr Opin Investig Drugs, 2009, 10(5): 491 - 504.

[13] Walker J G, Smith M D. The Jak-STAT pathway in rheumatoid arthritis[J]. J Rheumatol, 2005, 32(9): 1650 - 1653

[14] Snow J W, Abraham N, Ma M C, *et al*. Loss of tolerance and autoimmunity affecting multiple organs in STAT5A/5B-deficient mice[J]. J Immunol, 2003, 171(10): 5042 - 5050.

[15] Pawelec G, Borowitz A, Krammer P H, *et al*. Constitutive interleukin 2 production by the JURKAT human leukemic T cell line[J]. Eur J Immunol, 1982, 12(5): 387 - 392.

[16] Liu Y, Yang T, Li H, *et al*. BD750, a benzothiazole derivative, inhibits T cell proliferation by JAK3/STAT5 signal pathway[J]. Br J Pharmacol, 2012, doi: 10.1111/j.1476 - 5381. [Epub ahead of print]

[17] Yuan Z L, Guan Y J, Wang L, *et al*. Central role of the threonine residue within the p + 1 loop of receptor tyrosine kinase in STAT3 constitutive phosphorylation in metastatic cancer cells[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(21): 9390 - 9400.

(**收稿**:2012-10-12;**修回**:2012-11-21)

(编辑 王小寒)