

· 烧伤后炎症反应 ·

# Janus 激酶-信号转导及转录活化因子通路对 内毒素/脂多糖体外诱导大鼠腹腔巨噬细胞 高迁移率族蛋白 B1 合成释放的调节作用

刘辉 姚咏明 董月青 于燕 盛志勇

**【摘要】** 目的 探讨 Janus 激酶(JAK)-信号转导及转录活化因子(STAT)通路对内毒素/脂多糖(LPS)诱导大鼠腹腔巨噬细胞高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)合成释放的调节作用。方法 取正常 Wistar 大鼠腹腔巨噬细胞,培养 3 d 后用 LPS 刺激,分别于刺激前及刺激 10、30、60、120 min 时观察 JAK2、STAT1 以及 STAT3 的活化情况,每时相点重复测定 4 次,以积分吸光度(A)值表示;另取细胞分为正常组、LPS 刺激组、JAK2 抑制组、STAT1 抑制组、STAT3 抑制组,培养 3 d 后用 LPS 刺激后 4 组细胞,刺激前 2 h,后 3 组分别加入 AG490、氟达拉滨及雷帕霉素,观察各组 HMGB1 基因表达及蛋白释放情况,每组重复测定 4 次。结果 LPS 可诱导大鼠腹腔巨噬细胞 JAK2、STAT1 及 STAT3 在短时间(120 min)内活化,其中 STAT3 活化最为迅速,10 min 即可达到峰值(7.47 ± 0.56)。JAK2 抑制组、STAT1 抑制组、STAT3 抑制组 HMGB1 基因表达均明显受抑制,其表达量均明显低于 LPS 刺激组( $P < 0.01$ ),其中 JAK2 抑制组明显高于正常组( $P < 0.01$ ),其余两个抑制组则与正常组相近( $P > 0.05$ );但 3 个抑制组 HMGB1 蛋白表达量与 LPS 刺激组基本相同,均明显高于正常组( $P < 0.01$ )。结论 JAK-STAT 通路可在 LPS 刺激下早期活化,部分参与了诱导 HMGB1 合成的信号调控过程。

**【关键词】** 脂多糖类; 高迁移率族蛋白类; 巨噬细胞; Janus 激酶-信号转导及转录活化因子通路

The role of Janus kinase-signal transducer and transcription activator pathway in the regulation of synthesis and release of lipopolysaccharide-induced high mobility group box-1 protein LIU Hui, YAO Yong-ming, DONG Yue-qing, YU Yan, SHENG Zhi-yong. Fundamental Department of Burn Institute, 304th Hospital Affiliated to PLA General Hospital, Beijing 100037, P. R. China

Corresponding author: YAO Yong-ming, Email: c\_ff@sina.com, Tel: 010-66867398

**【Abstract】** Objective To investigate the role of Janus kinase-signal transducer and transcription activator (JAK-STAT) pathway in the regulation of synthesis and release of lipopolysaccharide-induced high mobility group box -1 protein (HMGB1). Methods Peritoneal macrophages harvested from male Wistar rats were incubated for 3 days before the experiment. The activation of Janus kinase-2 (JAK2), signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1) and STAT3 was observed before and 10, 30, 60 and 120 mins after LPS stimulation (4 determinations at each time point) and it was expressed as A value (absorption). In addition, the cells were divided into normal control, LPS stimulation, JAK2 inhibition (with AG490 treatment 2 hours before LPS stimulation), STAT1 inhibition (with fludarabine treatment 2 hours before LPS stimulation) and STAT3 inhibition (with rapamycin treatment 2 hours before LPS stimulation) groups. The cells in all groups except control group were stimulated with LPS 3 days after culture. The expression of HMGB1 gene and its protein release in each group were determined for 4 times and were expressed as A value. Results LPS could activate JAK2, STAT1 and STAT3 within 2 hours, especially the activation of STAT3 appeared more quickly, peaking at 10 minutes after LPS stimulation(7.47 ± 0.56). Pretreatment with the inhibitors of JAK-STAT pathway could markedly reduce the expression of HMGB1 mRNA ( $P < 0.01$ ), but exerted no effect on HMGB1 release. Conclusion JAK-STAT pathway can be activated early during endotoxin challenge, and it may play a role in the regulation of HMGB1 synthesis.

**【Key words】** Lipopolysaccharides; High mobility group proteins; Macrophages; Janus kinase-signal transducer and transcription activator pathway

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目(G1999054203-2);国家杰出青年科学基金资助项目(30125020)

作者单位:100037 北京,解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所基础部

通信(讯)作者:姚咏明,Email: c\_ff@sina.com,电话:010-66867398

新近研究表明,高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)作为一种晚期炎症介质参与了脓毒症的病理生理过程<sup>[1]</sup>。目前关于 HMGB1 的许多问题尚待阐明(如其信号转导机制)。笔者既往的研究显示,Janus 激酶(JAK)-信号转导及转录活化因子(STAT)通路可能与 HMGB1 诱生相关<sup>[2,3]</sup>。本实验拟采用大鼠腹

腔巨噬细胞体外培养模型,探讨 JAK-STAT 通路在内毒素/脂多糖(LPS)诱导 HMGB1 合成释放中的调控作用与机制。

## 材料与 方法

### 一、主要试剂及细胞培养

1. 主要试剂: JAK2 特异性抑制剂 AG490、STAT3 磷酸化抑制剂雷帕霉素(又名西罗莫司,美国 Calbiochem 公司), STAT1 特异性抑制剂氟达拉滨(德国 Schering 公司), LPS(美国 Sigma 公司), 兔抗磷酸化 JAK2 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司), T4 寡核苷酸激酶(美国 Promega 公司),  $\gamma$ - $^{32}$ P 腺苷三磷酸(北京亚辉生物工程公司)。寡核苷酸探针(北京奥科生物技术有限责任公司): 包括大鼠 STAT1、STAT3 双链寡核苷酸探针序列(均为 24 bp)<sup>[4]</sup>, 大鼠 HMGB1 序列(扩增片段为 680 bp)<sup>[1]</sup>, 大鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶序列(GAPD, 扩增片段为 309 bp)<sup>[5]</sup>。

2. 腹腔巨噬细胞的分离与培养: 选用清洁级雌性 Wistar 大鼠 80 只(北京医科大学实验动物中心), 体重 220~300 g, 参见文献[6]方法, 每只大鼠可得到约  $2 \times 10^7$  个细胞, 接种至底面积为  $75 \text{ cm}^2$  的去 LPS 培养瓶或以  $1 \times 10^7/\text{ml}$  接种于 24 孔培养板中(预先用<sup>60</sup>Co 照射)。37℃ 下置于体积分数 5% CO<sub>2</sub> 解箱中培养备用。

### 二、检测指标

1. 观察 JAK2 活化情况: 细胞培养 3 d 后, 以  $5 \times 10^7$  个细胞为 1 个刺激单位, 采用  $100 \mu\text{g/L}$  LPS 进行刺激, 分为刺激前及刺激 10、30、60、120 min 5 个时相点, 各时相点重复测定 4 次。刺激完毕后提取胞浆蛋白, 参照文献[7]操作, 并用化学发光反应试剂盒(美国杜邦公司)进行检测。底片冲洗后采用 LEICA Q-5001W 型图像分析处理系统(德国 Leica 公司)进行分析, 以积分吸光度(IA)值表示。

2. 观察 STAT1 与 STAT3 活化的情况: 细胞培养 3 d 后, 以  $2 \times 10^7$  个细胞为 1 个刺激单位, 同上行刺激处理。刺激完毕后提取胞核蛋白, 应用凝胶阻滞分析(EMSA)测定 STAT1、STAT3 的活化情况<sup>[8,9]</sup>。底片冲洗后处理同上, 以 IA 值表示。

3. 观察 AG490 与氟达拉滨及雷帕霉素对 HMGB1 基因表达的影响: 细胞培养 3 d 后, 分为正常组(不作处理)、LPS 刺激组( $75 \mu\text{g/L}$  LPS 刺激)、JAK2 抑制组( $75 \mu\text{g/L}$  LPS +  $75 \mu\text{mol/L}$  AG490)、STAT1 抑制组( $75 \mu\text{g/L}$  LPS +  $100 \mu\text{mol/L}$  氟达拉

滨)及 STAT3 抑制组( $75 \mu\text{g/L}$  LPS +  $25 \mu\text{g/L}$  雷帕霉素), 每组  $1 \times 10^6$  个细胞, 重复测定 4 次。后 3 组细胞于 LPS 刺激前 2 h 加入 JAK-STAT 通路抑制剂。刺激 36 h 时采用半定量逆转录聚合酶链反应技术检测各组 HMGB1 基因表达水平<sup>[6]</sup>。底片冲洗后处理同上, 以 IA 值表示。

4. 观察 AG490 与氟达拉滨及雷帕霉素对 HMGB1 蛋白释放的影响: 除采用  $100 \mu\text{g/L}$  LPS 刺激外, 分组及处理同上。于刺激后 8、12 h 留取各组细胞的培养上清液  $200 \mu\text{L}$ , 检测 HMGB1 浓度<sup>[7]</sup>。底片冲洗后处理同上, 以 IA 值表示。

### 三、统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 Stat4.0 统计软件进行单因素方差分析。

## 结 果

1. 在 LPS 刺激下, 大鼠腹腔巨噬细胞 JAK2 逐渐活化, 30 min 时其 IA 值明显高于刺激前, 60 min 时达到峰值, 120 min 时却明显低于刺激前 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ )。LPS 刺激 10 min 时 STAT1 开始活化, 其 IA 值明显高于刺激前并逐渐增加, 120 min 时达峰值 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ )。LPS 刺激 10 min 时 STAT3 活化最强, 其 IA 值达到峰值, 之后逐渐下降, 60 min 活性明显低于刺激前, 但在 120 min 时又再度上升 ( $P < 0.01$ )。见表 1 及图 1、2。

表 1 LPS 诱导大鼠腹腔巨噬细胞 JAK2、STAT1、STAT3 活化 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 The activation of JAK2, STAT1, STAT3 induced by LPS in peritoneal macrophages in rats ( $\bar{x} \pm s$ )

刺激条件	IA 值		
	JAK2	STAT1	STAT3
刺激前	91 ± 7	2.28 ± 0.19	0.54 ± 0.17
LPS 刺激			
10 min	76 ± 4	4.43 ± 0.34*	7.47 ± 0.56*
30 min	121 ± 15*	6.70 ± 0.41*	2.76 ± 0.38*
60 min	200 ± 10*	7.36 ± 0.13*	2.09 ± 0.14*
120 min	54 ± 8*	13.39 ± 1.52*	6.41 ± 0.47*

注: 各时相点重复测定 4 次, 测 JAK2 时各时相点细胞数为  $5 \times 10^7$  个, 测 STAT1、STAT3 时为  $2 \times 10^7$  个; 与刺激前比较, \*  $P < 0.05$ , #  $P < 0.01$

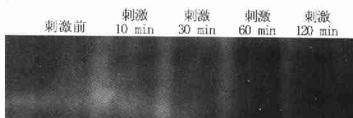
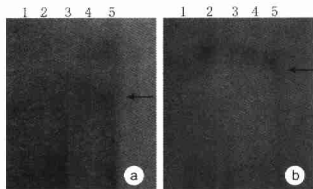


图 1 LPS 刺激下, 大鼠腹腔巨噬细胞 JAK2 逐渐活化, 60 min 时达到峰值, 120 min 时却明显低于刺激前

Fig 1 JAK2 in peritoneal-macrophages of the rats was gradually activated after LPS stimulation, peaked at 60 PSM, but it at 120 PSM was obviously lower than that before LPS stimulation



注: a. STAT1 的活化情况; b. STAT3 的活化情况; 1. 刺激前; 2. LPS 刺激 10 min; 3. LPS 刺激 30 min; 4. LPS 刺激 60 min; 5. LPS 刺激 120 min; 随着刺激时间的延长, STAT1 活化逐渐增强, 至 120 min 时达到高峰; LPS 刺激 10 min 时 STAT3 活化达到峰值, 之后活性降低, 但在 120 min 时其活性再次上升

图 2 LPS 诱导大鼠腹腔巨噬细胞 STAT1、STAT3 的活化

Fig 2 LPS induced STAT1 and STAT3 activation in peritoneal macrophages in rats

2. 各组大鼠腹腔巨噬细胞 HMGB1 基因表达及蛋白释放的情况, 见表 2。

表 2 各组大鼠腹腔巨噬细胞 HMGB1 基因表达及蛋白释放的情况 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 2 The expression of HMGB1 gene and protein release in peritoneal macrophages in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	HMGB1	HMGB1 蛋白释放	
	基因表达	刺激后 8 h	刺激后 12 h
正常组	0.091 ± 0.024*	6.26 ± 0.26*	5.59 ± 0.22*
LPS 刺激组	0.811 ± 0.116*	10.34 ± 0.19*	9.42 ± 0.12*
JAK2 抑制组	0.544 ± 0.082*	9.91 ± 0.35*	9.45 ± 0.26*
STAT1 抑制组	0.285 ± 0.091*	9.60 ± 0.34*	9.25 ± 0.05*
STAT3 抑制组	0.231 ± 0.061*	9.46 ± 0.24*	9.34 ± 0.23*

注: 每组细胞数为  $1 \times 10^6$  个, 数据均重复测定 4 次, 以 t 值表示; 与正常组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与 LPS 刺激组比较, #  $P < 0.01$

## 讨 论

HMGB1 是一大类高度保守的非组蛋白 DNA 结合蛋白, 广泛存在于真核细胞的胞核内, 对 DNA 复制、转录、重组和修复具有重要作用。新近研究表明, HMGB1 可能是一种重要的晚期炎症介质, 它在脓毒症病理过程中升高相对较晚, 并与动物的后期死亡密切相关<sup>[1,10,11]</sup>。有研究表明, JAK-STAT 通路参与白细胞介素 (IL) 1、IL-6、IL-10、IL-4、干扰素 (IFN)  $\gamma$  等多种重要炎症介质的信号调控; HMGB1 可诱导单核细胞产生肿瘤坏死因子 (TNF)  $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等炎性细胞因子, IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  也可反过来诱导单核细胞产生 HMGB1<sup>[12]</sup>。因此, JAK-STAT 通路和 HMGB1 均与 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1、IFN- $\gamma$  等炎性细胞因子有密切联系。

本组资料显示, LPS 可诱导大鼠腹腔巨噬细胞 JAK-STAT 通路活化。LPS 刺激 60 min 时, JAK2 达

到活化高峰, 随后减弱; STAT1 活化呈持续增强趋势, 于 120 min 达到高峰; STAT3 活化最为迅速, 刺激 10 min 活化即达峰值, 此后逐渐减弱, 但到 120 min 又再度增强, 这可能与 LPS 引起其他炎性细胞因子的释放, 从而再次激活 STAT3 有关。值得注意的是, STAT1 活化比 STAT3 晚, 且持续增强, 提示 STAT1 对于巨噬细胞的炎症反应的调控可能具有重要意义。以往的资料也表明, 脓毒症大鼠体内主要脏器的 STAT1 广泛活化, 尤其以肝、肺组织更为明显, 且持续时间较长 ( $> 12$  h); 而 STAT3 的活化较弱, 其活化高峰并不明显<sup>[13]</sup>。有报道称, 腹腔感染动物肝组织 STAT3 活化较迅速 (3 h 达高峰), 随后快速下降<sup>[14]</sup>, 这可能是因肝、肺组织为脓毒症时单核巨噬细胞富集的主要器官。因此, STATs 活化参与了 LPS 诱导失控性炎症反应的病理生理过程, 针对其进行干预可能有助于防治脓毒症。此外, JAK2 需 60 min 才能达到活化高峰, 而 STAT3 在刺激 10 min 时即高度活化, 表明 LPS 可能不是通过 JAK2 激活 STAT3, 而是通过其他信号转导通路使 STAT3 早期迅速活化, 其具体机制还有待深入研究。

为了进一步探讨 JAK-STAT 通路与 HMGB1 合成释放之间的关系, 本实验选用 JAK2 特异性抑制剂 AG490、STAT1 的特异性抑制剂氟达拉滨和 STAT3 磷酸化抑制剂雷帕霉素进行体外干预, 观察它们对 LPS 诱导 HMGB1 合成释放的影响。结果表明, JAK-STAT 通路抑制剂均可显著降低 LPS 刺激 36 h 时巨噬细胞 HMGB1 的基因表达, 但不能调节其蛋白释放。因此, JAK-STAT 通路可能部分参与了 HMGB1 合成释放的信号调控过程。动物整体实验也证实, 抑制 JAK-STAT 途径可明显下调 HMGB1 表达<sup>[3]</sup>, 说明 JAK2、STAT1 及 STAT3 参与了 HMGB1 的诱生过程。本研究可能是通过调节 JAK-STAT 通路来影响 HMGB1 的产生, 从而有效地减轻其直接或间接的致炎效应与组织损害。

JAK-STAT 是脓毒症中重要的炎症信号通路之一, IFN- $\gamma$  可通过它促进 LPS、TNF- $\alpha$ 、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<sup>[12]</sup>。JAK-STAT 通路活化不仅介导了早期炎性细胞因子的信号调控, 而且与晚期炎症介质的基因表达密切相关, 这为脓毒症的防治提供了潜在的干预途径。在烧伤后金黄色葡萄球菌感染所致脓毒症的动物模型中, 应用雷帕霉素可显著下调 STAT3 活化, 并降低 HMGB1 的表达, 明显改善多脏器功能指标<sup>[12,15]</sup>。本实验证实了 HMGB1 的

诱导受 JAK-STAT 通路调节,对于深入认识其在脓毒症中的调控作用以及 HMGB1 的信号转导机制具有一定意义,同时从信号转导水平为如何调控 HMGB1 的产生及炎症效应提供了新的思路。

#### 参考文献

- 1 Wang H, Blauen O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, 1999, 285:248-251.
- 2 姚咏明, 盛志勇. Janus 激酶/信号转导子和转录激活因子通路 与创伤脓毒症的关系. *解放军医学杂志*, 2004, 29: 27-29.
- 3 李红云, 姚咏明, 董宇, 等. 烧伤后全葡萄球菌脓毒症大鼠高迁移率蛋白-1 表达及其信号调节机制. *解放军医学杂志*, 2002, 27:760-762.
- 4 Peters CA, Mainz EJ, Robertson MC, et al. Induction of relaxin messenger RNA expression in response to pituitrin receptor activation requires protein kinase C delta signaling. *Mol Endocrinol*, 2000, 14:576-590.
- 5 Liu S, Adcock IM, Old RW, et al. Lipopolysaccharide treatment in vivo induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 196:1208-1213.
- 6 刘辉, 姚咏明, 于燕, 等. 大鼠腹腔口穿卵圆窗高迁移率蛋白-1 诱导机制的初步探讨. *解放军医学杂志*, 2004, 29:39-41.

- 7 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 主编. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译; 侯云德, 等校. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2002. 876-898.
- 8 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 主编. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译; 侯云德, 等校. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2002. 556-558.
- 9 宋伦, 黎孟, 沈信富. 280 位 His 残基对  $\alpha$ IL-6R 介导的 IL-6 信号转导功能的影响. *中国实验临床免疫学杂志*, 1999, 11:34-36.
- 10 姚咏明, 张立天, 陆家齐, 等. 脓毒症大鼠肾髓质高迁移率蛋白-1 与肿瘤坏死因子表达的关系. *中华烧伤杂志*, 2003, 19: 241.
- 11 姚咏明, 黎家科, 盛志勇. 烧伤脓毒症的诊断标准与防治. *中华烧伤杂志*, 2003, 19:65-66.
- 12 姚咏明, 盛志勇. 脓毒症信号转导机制的现代认识. *中国危重急救医学*, 2003, 15:3-6.
- 13 崔秀珍, 姚咏明, 王松楠, 等. 脓毒症大鼠多器官内信号转导和转录激活蛋白-3 变化及其作用. *中华创伤杂志*, 2004, 20: 146-149.
- 14 Andrejko KM, Chen J, Deutschman CS. Intrahepatic STAT-3 activation and acute phase gene expression predict outcome after CLP sepsis in the rat. *Am J Physiol*, 1998, 275(6Pt1): 1423-1429. (收稿日期:2004-07-12) (本文编辑:莫 愚)

#### · 技术与方法 ·

## 头皮止血带的改制与应用

王成刚 李素玲 牟滨 侯丽波

头皮是天然皮库,短期内可反复取皮,具有愈合快,不易感染,不留瘢痕,不影响头发生长等优点。但头皮血管丰富,手术时出血较多。为减少出血,保持术野清晰,临床上在取头皮时常用头皮止血带止血<sup>[1]</sup>,但其压力难以控制,易松脱或向下滑落压迫眼球。为此,笔者将普通头皮止血带改制或气压头皮止血带,临床应用效果较好,现介绍如下。

改制与使用:将普通气压止血带根据颅骨周径改制成长 64.0 cm,宽 2.5 cm 的窄长密闭橡皮管,保留橡皮管以充气气囊,袋外配置相应的布套,布套上缝制尼龙快搭扣即成(图 1)。以甲硝唑蒸馏液消毒后,其上垫薄层纱布,再枕骨粗隆下,经双耳上方绕至颞部,粘合搭扣,外用绷带缠绕,打气至气压为 400 mm Hg 即可止血(图 2)。

临床应用及效果:本组共 102 例,男 78 例,女 24 例,年龄 16-68 岁,平均 23.6 岁。取头皮 56 例,术中均采用气压

头皮止血带,出血量均较少。每取 1% TBSA 头皮出血量为  $(12 \pm 5)$  ml(见图 3)。

讨论:头皮血供主要来自颈动脉、枕后动脉及耳大动脉等,这些动脉都是由外周走向头颅,其深层为坚硬的颅骨,为使用新型止血带提供了有利的解剖条件。该止血带应用后,因出血量少,术野清晰,便于准确、快速操作,可缩短手术时间,避免输血或减少输血量。该气压头皮止血带压力可以控制,受力均匀,不易松脱,也不会向面部滑落压迫眼球。压力若保持在 400 mm Hg 左右,即使持续使用 90 min,亦无因压迫重要神经而发生止血带麻痹等并发症。除常规头皮取皮外,也适用于头部的其他手术。其改制简单,安全可靠,使用方便,易于推广。

#### 参考文献

- 1 艾深海. 头皮止血带的应用. *中华整形烧伤外科杂志*, 1986, 2:263.



图 1 改制后的气压头皮止血带



图 2 新型止血带的应用



图 3 止血带气压可控制,患者出血量较少

(收稿日期:2005-03-01)

(本文编辑:赵 敏)