

生殖医学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001676

IL-27通过JAK2/STAT1 信号通路影响血管内皮细胞功能参与子痫前期发病机制的相关研究

葛会生,王寒冰,黄冬妮,蒋秀萍,尹楠林,漆洪波

(重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

【摘要】目的:探讨 IL-27 参与原代人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)功能受损的信号通路,及其在子痫前期发病机制中的作用。**方法:**①使用 Western blot 检测子痫前期和正常足月胎盘组织中白介素(interleukin, IL)-27 及其受体 WSX-1 的表达;②分离并培养原代人脐静脉内皮细胞,用免疫荧光的方法鉴定 HUVECs 细胞;③对原代 HUVECs 予以 50 ng/mL 人重组 IL-27 蛋白刺激 15 min、30 min、1 h 和 2 h 后,提取蛋白,Western blot 方法检测 JAK2、STAT1 的活化情况;④使用 JAK 的特异性抑制剂 AG490 处理原代 HUVECs 后,分为 6 个处理组,分别是空白对照组(Con)、DMSO 组、抑制剂组(AG490)、IL-27 处理组(IL-27)、IL-27 和 DMSO 共同处理组(DMSO+IL-27)、IL-27 和抑制剂共同处理组(AG490+IL-27),然后用 Transwell 和细胞管腔成型实验检测 IL-27 对原代 HUVECs 血管成形能力的影响。**结果:**①IL-27 及其受体 WSX-1 的蛋白水平在子痫前期胎盘组织中高于正常足月胎盘($t=2.980, P=0.020; t=2.520, P=0.040$);②成功在体外建立培养原代人脐静脉内皮细胞的模型;③人重组 IL-27(50 ng/mL)刺激 HUVECs 细胞后可以激活 JAK2/STAT1 信号通路;④与相应对照组相比,IL-27 组、DMSO+IL-27 组的迁移和血管成形能力降低($t=16.050, P=0.000; t=16.610, P=0.000; t=11.360, P=0.000; t=11.740, P=0.000$)。但是 AG490+IL-27 组与 AG490 组相比,并无明显变化($t=0.420, P=0.770; t=0.290, P=0.790$)。**结论:**IL-27 可能通过 JAK2/STAT1 信号通路影响血管内皮细胞功能参与子痫前期的发病。

【关键词】白介素-27;原代人脐静脉内皮细胞;JAK2/STAT1;子痫前期

【中图分类号】R714.24*4

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-12-29

IL-27 affects vascular endothelial cell function mediated by JAK2/STAT1 pathway in preeclampsia

Ge Huisheng, Wang Hanbing, Huang Dongni, Jiang Xiuping, Yin Nanlin, Qi Hongbo

(Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the mechanism of IL-27 involved in the pathogenesis of preeclampsia(PE). **Methods:** ①Western blot was used to detect the expression of IL-27 and its receptor WSX-1 in placentas. ②Isolation and culture of primary human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) were conducted, and the cells were identified by immunofluorescence. ③The primary HUVECs were treated with IL-27(50 ng/mL) at time points from 0.25 to 2 hours and analyzed for activated or tyrosine phosphorylated JAK2(p-JAK2) and STAT1(p-STAT1) proteins by Western blot. ④Cell treatments of each group were as follows: normal culture group(Con), DMSO culture group, JAK2 inhibitor AG490 culture group(AG490), IL-27 culture group, DMSO+IL-27 culture group, AG490+IL-27 culture group. The tube formation assays were used to detect the effects of IL-27 on the tube formation capacity of primary HUVECs. **Results:** ① IL-27 and WSX-1 protein levels were both increased in the PE group compared with those of the control group($t=2.980, P=0.020; t=2.520, P=0.040$). ②Primary HUVECs were successfully isolated and cultured. ③After exposure to IL-27, JAK2/STAT1 pathway was activated in primary HUVECs. ④The migration and tube formation abilities of IL-27 group and DMSO+IL-27 group were significantly reduced($t=16.050, P=0.000; t=16.610, P=0.000; t=11.360, P=0.000; t=11.740, P=0.000$). There was no significantly difference between AG490 group and AG490+IL-27 group($t=0.420, P=0.770; t=0.290, P=0.790$). **Conclusion:** IL-27 may play a critical role in the pathogenesis of PE through JAK2/STAT1 pathway.

【Key words】IL-27; primary human umbilical vein endothelial cells; JAK2/STAT1; preeclampsia

作者介绍:葛会生; Email: 1347362738@qq.com,

研究方向:围产医学。

通信作者:漆洪波, qihongbo728@163.com。

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(编号:81471472)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180503.1344.026.html>

(2018-05-03)

子痫前期(preeclampsia, PE)是妊娠期相关疾病中最常见的疾病之一,它是导致围产期母婴死亡的重要原因,但是其发病机制至今尚未阐明。目前,滋养层细胞侵袭功能下降和血管重铸功能障碍被认为是导致 PE 发病的两大重要因素^[1],另外继发性的血管内皮细胞功能损伤亦起着至关重要的作用。炎症发生时,由于多种免疫细胞如 CD4⁺T 细胞、树突状细胞(dendritic cell, DC)和自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)等通过调节粘附分子和细胞因子等炎性介质的表达,使得大量白细胞增殖并迁移至血管壁,释放更多肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)等促炎因子产生过度炎症反应,损伤血管内皮细胞,在 PE 发病中发挥重要作用^[2]。IL-27 是由 p28 和 EB 病毒诱导基因 3(EB virus-induced gene 3, EB13)两个亚基组成的异二聚体,IL-12/IL-6 家族的成员之一,主要由抗原提呈细胞(antigen-presenting cells, APCs)产生。IL-27 在 T 细胞的分化和功能中发挥着重要作用,在免疫反应中既可以发挥促炎效应,也可以发挥抑炎效应^[3-4]。IL-27 的受体由一个构成 IL-6 受体的亚基糖蛋白 130(glycoprotein 130, gp130),以及 T 细胞细胞因子受体(T-cell cytokine receptor, TCCR, 也称 WSX-1)所组成,该受体的功能与 JAK/STAT 信号通路密切相关^[5, 12]。那么,IL-27 是否能通过调节 JAK/STAT 信号通路而影响血管内皮细胞的功能,从而在 PE 发病中发挥作用,这值得深入探究。

本研究主要探讨了 IL-27 刺激原代人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)激活 JAK2/STAT1 信号通路,从而损伤血管内皮细胞功能,参与 PE 的发生,该研究可能为 PE 的治疗提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 材料

1.1.1 胎盘组织 于 2015 年 10 月至 2016 年 10 月从重庆医科大学附属第一医院收取正常足月(28 例)和 PE(29 例)剖宫产孕妇的胎盘组织(母面)。胎盘组织收取后在 30 min 内用冰生理盐水洗净并储存于-80℃冰箱中。所有标本均在重庆医科大学附属第一医院伦理委员会批准和患者知情同意的条件下采集。PE 的诊断参照美国妇产科学会(American College of Obstetrics and Gynecology, ACOG)的标准,并排除

妊娠期糖尿病、妊娠期肝内胆汁淤积症等并发症的剖宫产分娩孕妇。

1.1.2 主要试剂及仪器 人重组 IL-27 购自美国 R&D 公司;培养基 M199、胎牛血清购于美国 Gibco 公司;胶原酶 I 来源于美国 VWR 公司;鉴定细胞所用 VIII 因子购自中国碧云天;DAPI 购于美国 Invitrogen 公司;Transwell 小室(膜孔径 8 μ m)为美国 Millipore 公司产品;抗 IL-27 抗体购于 Abcam 公司;基质胶、抗 WSX-1 抗体购于美国 R&D 公司;抗 JAK2、p-JAK2、STAT1 和 p-STAT1 抗体购于美国 CST 公司。免疫荧光成像仪器为 Nikon ECLIPSE 80i;紫外分光光度计为 Thermo scientific NaVoDoP 1000;酶标仪购自美国 BioTeK 公司。

1.1.3 细胞分组 原代 HUVECs 共分为 6 个组:空白对照组(Con)、DMSO 组、抑制剂组(AG490)、IL-27 处理组(IL-27)、IL-27 和 DMSO 共同处理组(DMSO+IL-27)、IL-27 和抑制剂共同处理组(AG490+IL-27)。HUVECs 处理前均使用含有 10% 胎牛血清的 1640 培养基,于 37℃、20% O₂、5% CO₂ 条件下培养;当细胞处于对数生长期时进行后续实验。根据前期实验的结果,IL-27 的最适处理浓度为 50 ng/mL,处理 24 h AG490 处理浓度为 9 μ mol/L(其中在 AG490+IL-27 组,AG490 提前加入 1 h)。DMSO 的加入量与抑制剂的加入量相同。

1.2 实验方法

1.2.1 原代人脐静脉内皮细胞分离、培养和鉴定 胎盘娩出后即刻在无菌条件下采集无水肿和夹痕的脐带,15~20 cm。用无菌 PBS 冲洗脐静脉,直至血迹冲洗干净,夹闭一端脐带,用无菌注射器缓慢注入约 10 mL 胶原酶 I,37℃消化约 10 min,期间轻揉脐带促进消化,用 10 mL 10% M199 冲洗脐静脉终止消化,收集消化液。1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用 5 mL 20%的 M199 重悬后转移至 10 cm 培养皿中,于 37℃含 5%的 CO₂ 细胞培养箱中培养。每天换液,倒置显微镜下观察。当细胞铺满 80%以上后用 0.125%胰蛋白酶传代,37℃消化约 2 min。用免疫荧光的方法检测人脐静脉内皮细胞上 VIII 因子的表达以鉴定细胞。

1.2.2 Western blot 检测 IL-27 特异性受体 WSX-1/TCCR 在胎盘组织中的蛋白表达 分别提取子痫前期和正常剖宫产孕妇胎盘组织蛋白,BCA 法检测蛋白水平,蛋白上样量为 40 μ g。进行电泳分离、转膜、封闭、一抗孵育过夜(WSX-1 为 1:1 000;IL-27 为 1:1 000;GAPDH 为 1:1 000)、二抗孵育 1 h, ECL 化学发光检测系统检测。用 Image Lab 5.2 图像分析软件进行分析。

1.2.3 IL-27 作用于人脐静脉内皮细胞产生信号通路的检测 分别用 IL-27(50 ng/mL)刺激原代 HUVECs 0.25、0.5、1、2 h,提取蛋白 BCA 法检测蛋白水平,蛋白上样量为 20 μ g。进行电泳分离、转膜、封闭、一抗孵育过夜(GAPDH、JAK2、p-JAK2、STAT1 和 p-STAT1 均为 1:1 000)、二抗孵育 1 h, ECL 化学发光检测系统检测。用 Image Lab 5.2 图像分析软件进行分析。

1.2.4 Transwell 实验测定细胞的迁移能力 Transwell 小室的上室加入无血清培养基重悬的含细胞数量为 3×10^4 个、体积为 $200 \mu\text{L}$ 的细胞悬液,下室加入 $600 \mu\text{L}$ 含 10% 胎牛血清的培养液。置培养箱孵育 8 h 后,微孔膜外表面的细胞用甲醇固定 10 min, PBS 洗涤,结晶紫染色。在显微镜下随机选取 3 个视野,计数每视野中的细胞数,计算平均值。

1.2.5 管腔成型试验检测细胞的血管形成能力 将 $120 \mu\text{L}$ 的基质胶加入到 48 孔板中,避免气泡产生,待凝固后,加入 3×10^4 个细胞(细胞分别用 PBS 以及 IL-27 预处理 24 h)。8 h 后于显微镜下观察、拍照,使用 Image pro plus 软件计算管腔长度。小管形成指数表示为每平方毫米面积的管腔长度。以上实验均重复 3 次。

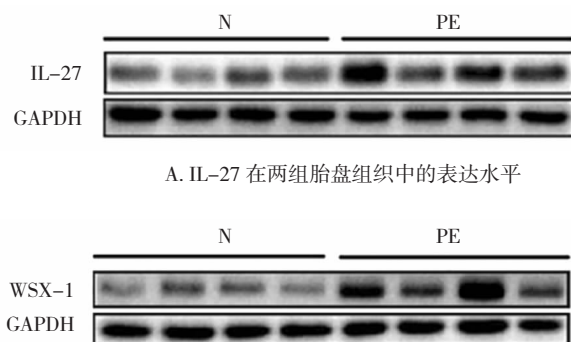
1.3 统计学处理

所有数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,计量资料均用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。2 组数据均数间比较采用两独立样本 t 检验;多组数据均数间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Western blot 检测正常足月妊娠组与子痫前期组胎盘中 IL-27 及其受体 WSX-1 蛋白表达水平

Western blot (图 1) 结果证实与正常足月妊娠组胎盘组织相比,子痫前期组胎盘中 IL-27 及其受体的蛋白水平升高,差异具有统计学意义(2.19 ± 0.20 vs. 3.73 ± 0.48 , $t=2.980$, $P=0.020$; 0.39 ± 0.07 vs. 0.82 ± 0.16 , $t=2.520$, $P=0.040$)。



B. WSX-1 在两组胎盘组织中的表达水平

N 代表正常足月胎盘; PE 代表子痫前期患者的胎盘

图 1 胎盘组织中 IL-27 和 WSX-1 的表达

2.2 人脐静脉内皮细胞鉴定

如图 2 所示,荧光二抗所标记的 V Ⅲ 因子呈红色荧光, V Ⅲ 因子主要定位细胞膜; DIPI 标记的细胞核呈蓝色荧光。免疫荧光显示 HUVECs V Ⅲ 因子阳性,证明 HUVECs 提取成功。

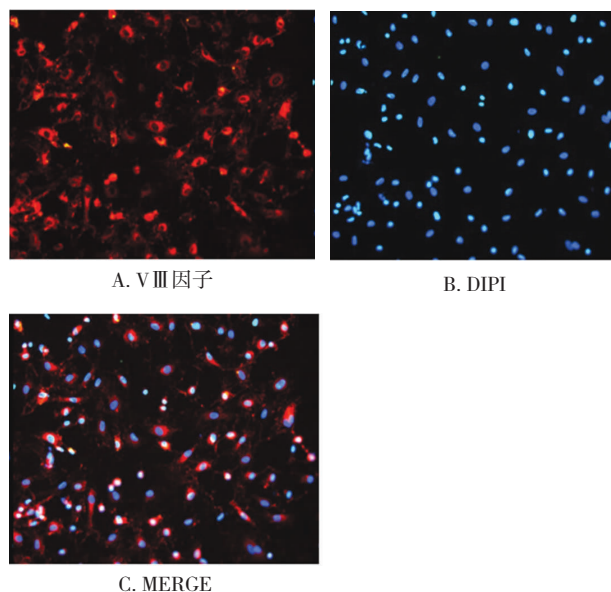


图 2 HUVEC 免疫荧光鉴定结果 (200 $\times$)

2.3 IL-27 刺激原代 HUVECs 激活 JAK2/STAT1 信号通路

对原代 HUVECs 予以 50 ng/mL 人重组 IL-27 刺激 0.25、0.5、1 和 2 h 后,用 Western blot 检测 JAK2/STAT1 信号通路的活化情况。如图 3 所示, p-JAK2 和 p-STAT1 的水平明显升高,但其活化程度随时间呈下降趋势。

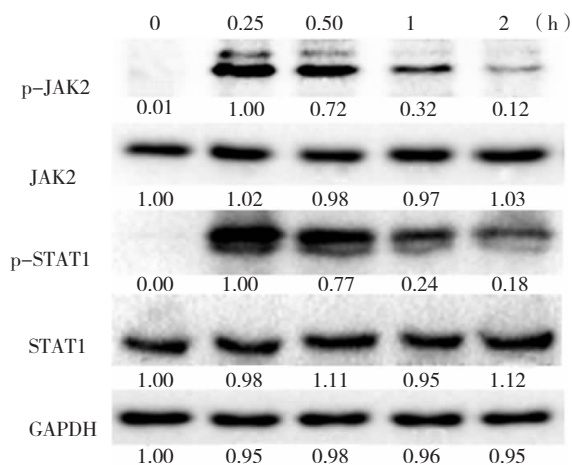
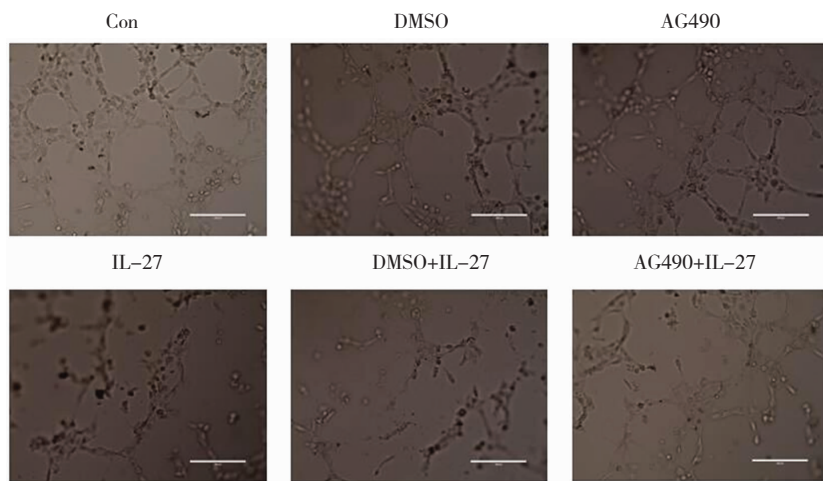


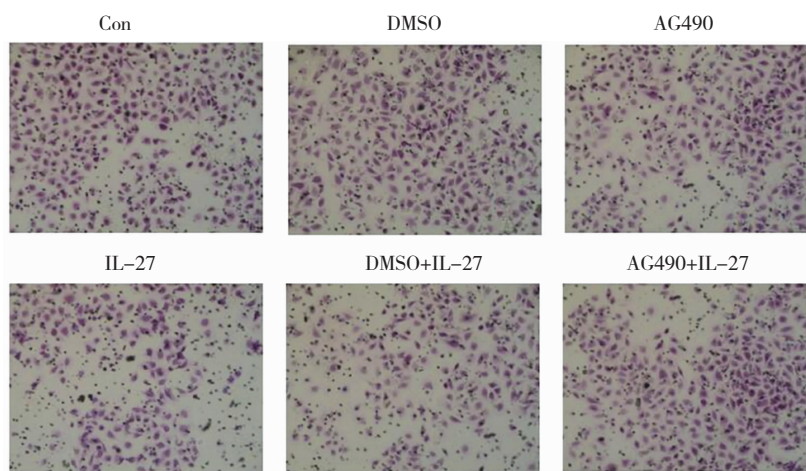
图 3 IL-27 作用于原代 HUVECs 后激活 JAK2/STAT1 信号通路

2.4 IL-27 对原代 HUVECs 迁移和血管成形能力的影响

使用特异性抑制剂 AG490 处理原代 HUVECs 1 h 后,然后用重组 IL-27 蛋白预刺激 24 h,按照相应步骤分别进行 Transwell 和内皮细胞管腔成型实验。如图 4 所示, IL-27 组和 DMSO+IL-27 组与其相应的对照组比较后显示,原代 HUVECs 的迁移能力明显降低($t=16.050$, $P=0.000$; $t=16.610$, $P=0.000$), 血管成形能力亦明显降低($t=11.360$, $P=0.000$; $t=11.740$, $P=0.000$)。但是 AG490+IL-27 组与 AG490 组相比,细胞的迁移和血管成形的能力并未发生明显变化($t=0.420$, $P=0.770$; $t=0.290$, $P=0.790$)。统计分析见表 1, 表 2。



A. 管腔成型实验检测各组内皮细胞的血管成形能力



B. Transwell 实验检测细胞的迁移能力

图 4 IL-27 对原代 HUVECs 的迁移和血管成形能力的影响 (200 ×)

表 1 各组 HUVECs 管腔成型的对比分析

组别	小管形成指数(mm/mm ²)	F 值	P 值
Con组	0.107 ± 0.019	20.630	0.000
DMSO组	0.105 ± 0.010		
AG490组	0.077 ± 0.009		
IL-27组	0.036 ± 0.009		
DMSO+IL-27组	0.034 ± 0.005		
AG490+IL-27组	0.075 ± 0.014		

表 2 各组 HUVECs 迁移能力的对比分析

组别	迁移细胞数(个)	F 值	P 值
Con组	177.6 ± 18.0	54.420	0.000
DMSO组	175.4 ± 20.1		
AG490组	142.0 ± 20.7		
IL-27组	86.2 ± 10.5		
DMSO+IL-27组	80.9 ± 16.2		
AG490+IL-27组	139.7 ± 15.0		

3 讨论

PE 是一种以高血压和蛋白尿等为主要临床表现的妊娠期特有疾病。胎盘浅着床和子宫螺旋动脉重铸功能障碍是其主要病理特点。然而 PE 病情变化复杂,难以明确其发病的具体原因及病理机制。有文献证实妊娠期间弥散性血管内皮细胞损伤是 PE 发病的重要机制^[9]。由于脐静脉内皮细胞与动脉内皮细胞具有相似的生物学特征,且该细胞模型易于建立,所以用脐静脉内皮细胞作为研究对象。提取原代 HUVECs,用免疫荧光的方法鉴定细胞提取成功后选取形态和活性均较好的第 4 代细胞进行实验。

随着人们对 PE 发病机制的深入研究,越来越多的数据表明胎盘形成过程中发生免疫功能失调

和血管形成障碍在 PE 发病中起着重要作用^[6]。IL-27 可以激活各种细胞产生多种炎性介质(IL-6、IFN- γ 等),从而在疾病的发生发展中发挥重要作用^[5,10]。Tanbe 等^[7]及 LaMarca 等^[8]发现 PE 患者血清中 IL-6、TNF- α 等细胞因子的水平明显升高,这些细胞因子同时被发现参与调控血管内皮细胞、心血管以及肾脏的病理生理功能。

与正常妊娠孕妇相比,IL-27 在早发型和晚发型子痫前期孕妇的外周血中明显升高^[13]。本课题组的前期研究^[10]发现 PE 患者胎盘的血管内皮细胞中 WSX-1 的表达量是升高的,且在本实验中再次证实了 PE 胎盘组织中 IL-27 及其受体都是高表达的。这些结果均提示 IL-27 可能参与 PE 的发病。

失控性炎症反应参与 PE 发病的机制尚不清楚。人们依然致力于研究和寻找触发失控性炎症反应的靶分子。IL-27 与其受体结合后能产生强大的免疫调节作用,既可以活化 Th1 细胞发挥促炎效应,也可以通过抑制 Th2 和 Th17 细胞分化及诱导 T 细胞产生 IL-10 产生抑炎效应^[3,14]。研究还发现,IL-27 的促炎效应参与了多种炎症疾病的发生,它通过激活 JAK/STAT 等通路显著促进其他细胞因子的释放,如 CXCL10 趋化因子配体 10 等,参与系统性硬化症、银屑病等疾病的发生^[4]。这就提示 IL-27 可能通过相关信号转导途径触发失控性炎症反应损伤血管内皮细胞而参与 PE 发病。用 IL-27 处理原代 HUVECs,其 JAK2/STAT1 信号通路明显激活。IL-27 可以明显抑制内皮细胞的迁移血管成形能力,但该抑制作用可以被 JAK2 信号通路的抑制剂部分抵消。这表明 IL-27 可能通过激活 JAK2/STAT1 通路损伤血管内皮细胞的功能。以往研究证明多种因子(如 IFN- γ 、TNF- α 等)也可以通过调控 JAK/STAT 信号通路,参与子痫前期的发病^[11]。

IL-27 可以通过促进滋养细胞下游大量炎性因子的释放,引发人体的失控性炎症反应而在子痫前期发病中发挥重要作用^[10],但其对血管内皮细胞损伤机制尚未明确。本文通过分离并培养原代 HUVECs,建立符合人体生物学特性的细胞模型之后,初步显示 IL-27 可能通过激活 JAK2/STAT1 信号通路损伤血管内皮细胞的功能。IL-27 亦有可能刺激血管内皮细胞产生大量炎性因子或者影响子宫螺

旋动脉重铸的过程而参与 PE 的发病,接下来课题组将进一步探讨 IL-27 在 PE 发病过程中的机制研究,为 PE 的防治提供新的策略。

参 考 文 献

- [1] Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia[J]. Lancet, 2005, 365(9461): 785-799.
- [2] LaMarca BD, Cornelius DC, Harmon AC, et al. Identifying immune mechanisms mediating the hypertension during preeclampsia[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2016, 311(1): R1-9.
- [3] Awasthi A, Carrier Y, Peron JP, et al. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells[J]. Nat Immunol, 2007, 8(12): 1380-1389.
- [4] Hunter CA, Kastelein R. Interleukin-27: balancing protective and pathological immunity[J]. Immunity, 2012, 37(6): 960-969.
- [5] Villarino AV, Huang E, Hunter CA. Understanding the pro- and anti-inflammatory properties of IL-27[J]. J Immunol, 2004, 173(2): 715-720.
- [6] Myatt L, Webster RP. Vascular biology of preeclampsia[J]. J Thromb Haemost, 2009, 7(3): 375-384.
- [7] Tanbe AF, Khalil RA. Circulating and vascular bioactive factors during hypertension in pregnancy[J]. Curr Bioact Compd, 2010, 6(1): 60-75.
- [8] LaMarca BB, Bennett WA, Alexander BT, et al. Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat: role of tumor necrosis factor- α [J]. Hypertension, 2005, 46(4): 1022-1025.
- [9] Wang L, Yang T, Ding Y, et al. Chemerin plays a protective role by regulating human umbilical vein endothelial cell-induced nitric oxide signaling in preeclampsia[J]. Endocrine, 2015, 48(1): 299-308.
- [10] Yin N, Zhang H, Luo X, et al. IL-27 activates human trophoblasts to express IP-10 and IL-6: implications in the immunopathophysiology of preeclampsia[J]. Mediators Inflamm, 2014, 2014: 926875.
- [11] Xiao JP, Yin YX, Gao YF, et al. The increased maternal serum levels of IL-6 are associated with the severity and onset of preeclampsia[J]. Cytokine, 2012, 60(3): 856-860.
- [12] Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications[J]. Annu Rev Immunol, 1998, 16: 293-322.
- [13] Jahantigh D, Mousavi M, Forghani F, et al. Association between maternal circulating IL-27 levels and preeclampsia[J]. Cytokine, 2017, 102: 163-167.
- [14] Pflanz S, Timans JC, Cheung J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4⁺ T cells[J]. Immunity, 2002, 16(6): 779-790.

(责任编辑:张辉洁)