

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001729

IL-27 诱导人成纤维样滑膜细胞产生 IL-6 的免疫机制

李春龙, 周洁, 曹炬, 尹一兵

(重庆医科大学检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨白介素-27(interleukin-27, IL-27)对人成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocyte, FLS)的体外活化效应及细胞内信号传导机制。**方法:**IL-27 处理 FLS 后, 酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测细胞培养上清液中白介素-6(interleukin-6, IL-6)水平的变化; 信号通路抑制剂处理 FLS 后 1 h, 用 IL-27 刺激 FLS 48 h, ELISA 检测细胞上清液中 IL-6 的水平变化; Western blot 检测 IL-27 刺激 FLS 不同时间细胞内信号通路蛋白的磷酸化水平。**结果:**IL-27 能刺激正常关节来源的 FLS(N-FLS)和 RA 患者关节来源的 FLS(RA-FLS)产生 IL-6, IL-27(50 ng/mL)刺激 N-FLS 产生的 IL-6 水平 $[(1329.10 \pm 113.15) \text{ pg/mL}]$ 和刺激 RA-FLS 产生的 IL-6 水平 $[(1583.70 \pm 129.54) \text{ pg/mL}]$ 较其阴性对照明显升高($P=0.001$, $P=0.001$)。用不同浓度(0、10、20、50、100 ng/mL)IL-27 分别处理 2 种细胞不同时间(0、12、24、48 h), 产生 IL-6 的水平随浓度和时间增加而升高, 具有时间和剂量依赖性。JAK 抑制剂 AG490 和 JNK 抑制剂 SP600125 可显著抑制 IL-27 诱导 N-FLS 和 RA-FLS 产生 IL-6。IL-27 刺激 N-FLS 和 RA-FLS 后, 细胞内信号通路蛋白 JAK2 和 JNK 的磷酸化水平明显升高(JAK2: $F=303.000$, $P=0.000$; $F=640.400$, $P=0.000$; JNK: $F=98.840$, $P=0.000$; $F=54.820$, $P=0.001$)。**结论:**IL-27 可通过激活 FLS 细胞内 JAK2 和 JNK 信号通路上调 FLS 产生 IL-6 水平, 从而增强关节滑膜的炎症反应。

【关键词】白介素-27; 类风湿关节炎; 成纤维样滑膜细胞; 白介素-6; 信号通路

【中图分类号】R593.22

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-04-24

Mechanism of the production of cytokine interleukin-6 in human FLS induced by interleukin-27

Li Chunlong, Zhou Jie, Cao Ju, Yin Yibing

(Ministry of Education Key Laboratory of Medical Diagnostics, Department of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the in vitro effects of interleukin-27 (IL-27) on the pro-inflammatory activation of human fibroblast-like synoviocytes (FLS), and the underlying intracellular signaling molecules. **Methods:** After treatment of human FLS with IL-27, concentration of IL-6 in culture supernatant was measured by ELISA. FLS were treated with signal pathway inhibitor for 1 hour, and then treated with IL-27 for 48 hours, and the supernatant of IL-6 was detected by ELISA. IL-27 treatment of FLS at different time points, the intracellular signaling pathway phosphorylation level was detected by Western blot. **Results:** IL-27 could significantly induce the release of IL-6 from both N-FLS and RA-FLS ($P=0.001$, $P=0.001$). and the concentration of IL-6 induced by IL-27 (50 ng/mL) in both N-FLS ($1329.10 \pm 113.15 \text{ pg/mL}$) and RA-FLS ($1583.70 \pm 129.54 \text{ pg/mL}$) were higher than those of negative control group. Different concentrations of (0, 10, 20, 50, 100 ng/mL) IL-27 were used to treat cells at different times (0, 12, 24, 48 h), and it was in a dose and time dependant manner. Further study showed that the IL-6 induced by IL-27 could be significantly suppressed by JAK inhibitor AG490 and JNK inhibitor SP600125 in both N-FLS and RA-FLS. Phosphorylation of the intracellular signaling proteins JAK2 and JNK is significantly increased after IL-27 treatment in both N-FLS and RA-FLS (JAK2: $F=303.000$, $P=0.000$; $F=640.400$, $P=0.000$; JNK: $F=98.840$, $P=0.000$, $F=54.820$, $P=0.001$). **Conclusion:** IL-27 has the potential to amplify arthritis inflammation via the up-regulates the release of IL-6 from FLS by activating JAK2 and JNK signaling pathways.

【Key words】interleukin-27; rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocytes; interleukin-6; signal pathway

作者介绍: 李春龙, Email: 23209861@qq.com,

研究方向: 细胞因子与感染免疫。

通信作者: 尹一兵, Email: yibingyin723@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(编号: 81370110)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180522.0950.022.html>
(2018-05-23)

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节软骨损伤和关节滑膜炎为病理特征的慢性炎症性自身免疫性疾病。RA 发病机制可能为外源性感染作用于遗传易感个体, 导致机体免疫系统紊乱, 进而引起关节滑膜、软骨组织慢性炎症和破

坏。人成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synovio-cyte, FLS)是关节滑膜间充质细胞之一,活化的 FLS 可产生大量的可溶性或结合于细胞表面的炎症介质,诱发、加剧炎症和组织破坏。白介素-27(interleukin-27, IL-27)是白介素-12(interleukin-12, IL-12)家族成员之一,主要由抗原递呈细胞产生,可促进 T 淋巴细胞增殖,并能诱导幼稚型 T 淋巴细胞分泌干扰素- γ ,从而诱发炎症^[1]。RA 患者血清和关节液 IL-27 浓度水平异常增高,表明 IL-27 可能参与 RA 发病以及病情进展。IL-6 是 RA 的一种关键细胞因子,RA 患者血清 IL-6 浓度升高,并且 IL-6 水平与疾病临床表现、疾病活性及疾病活性相关指标(类风湿因子、血沉、C 反应蛋白)具有相关性^[2]。为进一步探讨 IL-27 在 RA 发生发展过程中的作用,本研究以健康者和 RA 患者关节 FLS 原代细胞为研究对象,分析 IL-27 作用于 FLS 产生 IL-6 的信号分子通路机制,旨在了解 IL-27 在 RA 发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞来源

来自健康者正常关节滑膜及 RA 患者受累关节滑膜的 FLS 原代细胞均购自美国 Cell Applications 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含有 10% 滑膜细胞生长因子的滑膜细胞培养液培养细胞于 5 cm × 5 cm 的培养瓶中,放入 37 ℃、5%CO₂ 培养箱中进行培养,每隔 2~3 d 换 1 次培养液。在显微镜下观察 FLS 的生长情况,当培养瓶中 FLS 长到 80%~90% 时进行传代。

1.2.2 IL-27 处理及 IL-6 检测 采用胰酶消化、洗脱对数生长期 FLS,配制细胞浓度为 5 × 10⁴ 个/mL 的细胞悬液,接种于 12 孔板中(500 μ L/孔);待细胞贴壁长满后,为了使细胞同步化分裂,用不含滑膜细胞生长因子的滑膜细胞培养液饥饿培养细胞 6 h;更换含有不同浓度 IL-27(R&D 公司)及 10% 滑膜细胞生长因子的滑膜细胞培养液,使 IL-27 终浓度依次为 10、20、50、100 ng/mL,另设加入不含 IL-27 等量培养液的对照组,不同浓度 IL-27 处理组及对照组均设置 3 个重复孔;37 ℃、5%CO₂ 培养 12、24、48 h 后,收集上清液,4 000 r/min 离心 5 min,弃沉淀,采用 R&D 公司酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒及 BioTek 公司酶标仪进行 IL-6 检测。操作步骤严格参照试剂盒说明书。

1.2.3 信号分子抑制剂处理及 IL-6 检测 采用胰酶消化、洗脱对数生长期 FLS,配制细胞浓度为 1 × 10⁴ 个/mL 的细胞悬液,接种于 24 孔板中(500 μ L/孔),分别加入核因子 κ B- α (NF- κ B- α) 磷酸化抑制剂 BAY11-7082(终浓度 1 μ mol/L), ERK 抑制剂 PD98059(终浓度 10 μ mol/L), JNK 抑制剂

SP600125(终浓度 10 μ mol/L), P38MAPK 抑制剂 SB203580(终浓度 20 μ mol/L), JAK 抑制剂 AG490(终浓度 10 μ mol/L) 和 PI3K 抑制剂 LY294002(终浓度 10 μ mol/L) 孵育 1 h 后再在培养基中加入或者不加入 IL-27(终浓度为 50 ng/mL) 孵育 24 h,收集细胞培养上清,采用 ELISA 测定 IL-6 在无细胞上清液中的浓度。

1.2.4 IL-27 对 FLS 细胞信号分子 JAK2 和 JNK 磷酸化的影响 FLS 细胞接种于 10 cm 培养皿中(1 × 10⁷ 个/培养皿),用 IL-27(终浓度为 50 ng/mL) 分别处理人 FLS 细胞 0、5、15、30 min 后,提取细胞总蛋白。50 μ g 样品上样于 100 g/L SDS-PAGE 胶并电泳后用 PVDF 膜在 90 V 恒压且冰浴的条件下电转 4 h;电转完毕, PVDF 膜用封闭液(50 g/L 脱脂奶粉, 10 mL/L Tween20)室温封闭 1 h。根据蛋白大小和抗体说明,将膜剪开并分别于 4 ℃ 孵育鼠抗人 JAK2 抗体、鼠抗人 JNK 磷酸化抗体过夜。次日用 TBST 洗膜 5 min × 3 次,分别将膜用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体常温孵育 1 h。最后洗膜后 DAB 显色、压片、洗片。

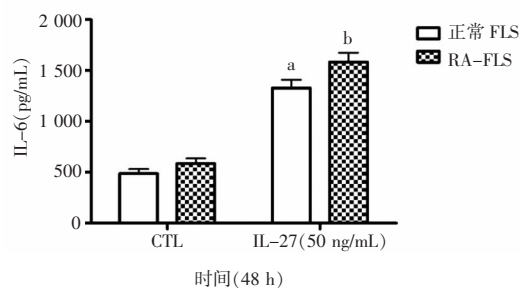
1.3 统计学分析

所有实验数据均采用 SPSS 19.0 统计软件分析,每组实验至少重复 3 次,数据以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间差异比较采用两独立样本 *t* 检验;IL-27 作用时间及剂量差异比较采用重复测量方差分析,组间差异两两比较采用 LSD 检验;多组均数间比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 IL-27 能刺激 N-FLS 和 RA-FLS 产生 IL-6

N-FLS 和 RA-FLS 细胞在无 IL-27 刺激时均可产生一定量的 IL-6[N-FLS: (486.68 ± 64.39) pg/mL; RA-FLS: (585.12 ± 74.84) pg/mL],但两者比较无统计学差异(*t*=1.410, *P*=0.383)。IL-27(50 ng/mL)刺激 N-FLS 和 RA-FLS 产生的 IL-6 水平较其阴性对照明显升高(*t*=9.151, *P*=0.001; *t*=9.439, *P*=0.001),其中 RA-FLS 产生的 IL-6 水平[(1 583.70 ± 129.54) pg/mL]较 N-FLS 产生的 IL-6 水平[(1 329.10 ± 113.15) pg/mL]高,但无统计学差异(*P*=0.136, *t*=2.093),如图 1 所示。



a: IL-27(50 ng/mL)刺激正常 -FLS 与无刺激组相比 *P*=0.001;
b: IL-27(50 ng/mL)刺激 RA-FLS 与无刺激组相比 *P*=0.001

图 1 IL-27 对正常关节来源和 RA 患者关节来源的 FLS 产生 IL-6 的影响

Fig.1 Effect of IL-27 on the production of IL-6 release from normal and RA-FLS

2.2 IL-27 刺激 N-FLS 和 RA-FLS 分泌 IL-6 具有时间和剂量依赖性

以浓度梯度的 IL-27 (0, 10, 20, 50, 100 ng/mL) 刺激 N-FLS 和 RA-FLS 细胞, 收取细胞上清液检测 IL-6 的浓度结果显示, 20 ng/mL 的 IL-27 刺激 N-FLS 和 RA-FLS 细胞产生的 IL-6 水平较其阴性对照明显增高, 并且在 IL-27 为 100 ng/mL 浓度时刺激着 2 种细胞产生的 IL-6 水平达到最高 (分别为 $1\,351.20 \pm 79.55$; $1\,485.90 \pm 81.31$), 提示 IL-27 刺激这 2 种 FLS 产生 IL-6 均具有浓度依赖性 (图 2, 表 1, 表 2)。

用相同浓度 IL-27 刺激 N-FLS 和 RA-FLS 细胞, 按不同时间点 (12, 24, 48 h) 收取细胞上清液检测 IL-6 的浓度, 对比相同浓度的 IL-27 刺激 N-FLS 和 RA-FLS 细胞分泌的 IL-6 水平, 结果显示, 这 2 种细胞上清液中的 IL-6 浓度均是随着 IL-27 刺激时间的延长而逐步增高, 如 20 ng/mL 的 IL-27, 其刺激 N-FLS 和 RA-FLS 细胞 24 h 产生的 IL-6 水平较其刺激 12 h 明显升高, 而 48 h 时上清液中的 IL-6 水平较 24 h 的明显升高 a, 提示 IL-27 刺激这 2 种 FLS 产生 IL-6 均具有

时间依赖性 (图 2, 表 1, 表 2)。

2.3 信号分子抑制剂对 IL-27 刺激 N-FLS 和 RA-FLS 产生 IL-6 的作用

在 Wong 等^[3]文献中使用 MTT 实验得出信号分子抑制剂的最适抑制浓度, JAK 抑制剂 AG490 (AG, 10 μ mol/L)、NF- κ B 抑制剂 BAY 117082 (BAY, 1 μ mol/L)、PI3K 抑制剂 LY294002 (LY, 10 μ mol/L)、p38MAPK 抑制剂 SB203580 (SB, 20 μ mol/L)、JNK 抑制剂 SP600125 (SP, 10 μ mol/L) 和 ERK 抑制剂 PD98059 (PD, 10 μ mol/L), 文献中指出上述浓度可以产生明显抑制效果但对细胞几乎无毒性作用。在本实验中采用上述浓度, 结果显示, 加入 JAK 抑制剂 AG490 和 JNK 抑制剂 SP600125 后, IL-27 诱导 N-FLS 和 RA-FLS 产生 IL-6 的水平较无抑制剂组明显下降 (图 3, 表 3, 表 4), 即 JAK 和 JNK 信号通路抑制剂可显著抑制 IL-27 诱导 N-FLS 和 RA-FLS 产生 IL-6, 提示 JAK 和 JNK 信号通路可能参与了 IL-27 在 FLS 中对 IL-6 的诱导作用。

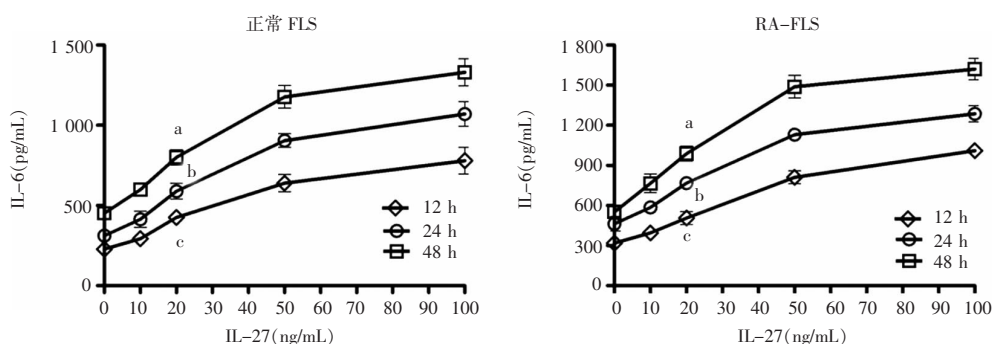


图 2 IL-27 刺激 FLS 产生 IL-6 呈时间和剂量依赖性

Fig.2 Dose and time dependent effect of IL-27 on the induction of IL-6 release from normal and RA-FLS

表 1 IL-27 刺激 N-FLS 产生 IL-6 具有浓度时间依赖性

Tab.1 Dose and time dependent effect of IL-27 on the induction of IL-6 release from N-FLS

组别	IL-6 (pg/mL, 12 h)	IL-6 (pg/mL, 24 h)	IL-6 (pg/mL, 48 h)	F 值	P 值
IL-27 (0 ng/mL) 组	276.30 $\pm$ 12.99	329.30 $\pm$ 18.44	457.70 $\pm$ 33.65	322.460 ^e	0.000 ^e
IL-27 (10 ng/mL) 组	303.30 $\pm$ 19.34	401.70 $\pm$ 8.667 ^a	607.00 $\pm$ 22.03 ^a	14.879 ^f	0.000 ^f
IL-27 (20 ng/mL) 组	399.30 $\pm$ 17.07 ^{ab}	553.70 $\pm$ 25.06 ^{ab}	829.70 $\pm$ 16.41 ^{ab}	150.552 ^g	0.000 ^g
IL-27 (50 ng/mL) 组	578.70 $\pm$ 22.24 ^{abc}	845.70 $\pm$ 17.98 ^{abc}	1 254.00 $\pm$ 32.62 ^{abc}		
IL-27 (100 ng/mL) 组	781.00 $\pm$ 37.29 ^{abcd}	887.70 $\pm$ 24.04 ^{abcd}	1 351.20 $\pm$ 79.55 ^{abcd}		

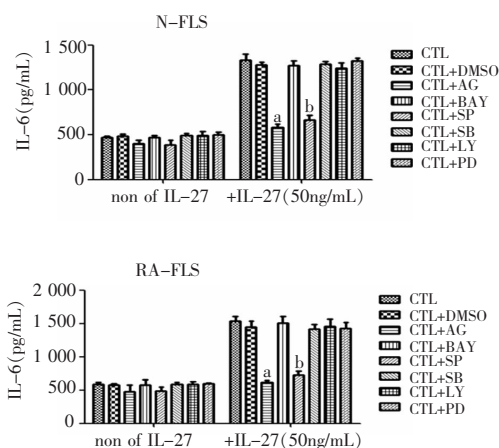
注: a, 与 L-27 (0 ng/mL) 比较有统计学意义; b, IL-27 (10 ng/mL) 比较有统计学意义; c, 与 L-27 (20 ng/mL) 比较有统计学意义; d, 与 L-27 (50 ng/mL) 比较有统计学意义; e, 时间效应的 F 统计量和 P 值; f, 组别与时间交互作用 F 统计量和 P 值; g, 分组效应的 F 统计量和 P 值

表 2 IL-27 刺激 RA-FLS 产生 IL-6 具有浓度时间依赖性

Tab.2 Dose and time dependent effect of IL-27 on the induction of IL-6 release from RA-FLS

组别	IL-6 (pg/mL, 12 h)	IL-6 (pg/mL, 24 h)	IL-6 (pg/mL, 48 h)	F 值	P 值
IL-27 (0 ng/mL) 组	319.70 $\pm$ 51.17	446.00 $\pm$ 28.79	557.70 $\pm$ 27.06	364.339 ^e	0.000 ^e
IL-27 (10 ng/mL) 组	370.00 $\pm$ 31.56 ^a	568.30 $\pm$ 25.98 ^a	773.70 $\pm$ 38.25 ^a	11.812 ^f	0.000 ^f
IL-27 (20 ng/mL) 组	432.70 $\pm$ 18.02 ^{ab}	687.00 $\pm$ 23.46 ^{ab}	963.00 $\pm$ 18.03 ^{ab}	317.245 ^g	0.000 ^g
IL-27 (50 ng/mL) 组	645.30 $\pm$ 17.17 ^{abc}	1 079.00 $\pm$ 18.58 ^{abc}	1 387.00 $\pm$ 16.92 ^{abc}		
IL-27 (100 ng/mL) 组	794.30 $\pm$ 25.46 ^{abcd}	1 104.00 $\pm$ 32.83 ^{abcd}	1 485.90 $\pm$ 81.31 ^{abcd}		

注: a, 与 L-27 (0 ng/mL) 比较有统计学意义; b, IL-27 (10 ng/mL) 比较有统计学意义; c, 与 L-27 (20 ng/mL) 比较有统计学意义; d, 与 L-27 (50 ng/mL) 比较有统计学意义; e, 时间效应的 F 统计量和 P 值; f, 组别与时间交互作用 F 统计量和 P 值; g, 分组效应的 F 统计量和 P 值



a: 用 IL-27 (50 ng/mL) 刺激与加入抑制剂 AG 相比, $P=0.000$
b: 用 IL-27 (50 ng/mL) 刺激与加入抑制剂 SP 相比, $P=0.000$

图 3 信号分子抑制剂对 IL-27 刺激 N-FLS 和 RA-FLS 产生 IL-6 的作用

Fig.3 Effects of signaling molecule inhibitors on IL-27-induced IL-6 production from normal and RA-FLS

图 3 信号分子抑制剂对 IL-27 刺激 N-FLS 和 RA-FLS 产生 IL-6 的作用

Fig.3 Effects of signaling molecule inhibitors on IL-27-induced IL-6 production from normal and RA-FLS

组别	IL-6 (pg/mL)
对照 (CTL+IL-27) 组	1 335.00 ± 37.53
CTL+DMSO+IL-27 组	1 280.00 ± 17.90
CTL+AG+IL-27 组	583.00 ± 20.88 ^a
CTL+BAY+IL-27 组	1 276.00 ± 28.48
CTL+SP+IL-27 组	666.70 ± 29.04 ^b
CTL+SB+IL-27 组	1 285.00 ± 18.58
CTL+LY+IL-27 组	1 242.00 ± 34.53
CTL+PD+IL-2 组	1 324.00 ± 16.48
<i>F</i> 值	136.721
<i>P</i> 值	0.000

注: a, IL-27 (50 ng/mL) 刺激与加入抑制剂 AG 相比, $P=0.000$; b, IL-27 (50 ng/mL) 刺激与加入抑制剂 SP 相比, $P=0.000$

表 4 信号分子抑制剂对 IL-27 刺激 RA-FLS 产生 IL-6 的作用
Tab.4 Effects of signaling molecule inhibitors on IL-27-induced IL-6 production from RA-FLS

组别	IL-6 (pg/mL)
对照 (CTL+IL-27) 组	1 536.00 ± 42.35
CTL+DMSO+IL-27 组	1 446.00 ± 49.54
CTL+AG+IL-27 组	616.30 ± 20.34 ^a
CTL+BAY+IL-27 组	1 509.00 ± 55.08
CTL+SP+IL-27 组	730.00 ± 30.04 ^b
CTL+SB+IL-27 组	1 418.00 ± 42.31
CTL+LY+IL-27 组	1 462.00 ± 59.04
CTL+PD+IL-2 组	1 424.00 ± 52.33
<i>F</i> 值	66.075
<i>P</i> 值	0.000

注: a, IL-27 (50 ng/mL) 刺激与加入抑制剂 AG 相比, $P=0.000$; b, IL-27 (50 ng/mL) 刺激与加入抑制剂 SP 相比, $P=0.000$

2.4 IL-27 对 N-FLS 和 RA-FLS 细胞信号分子 JAK2 和 JNK 磷酸化的影响

Western blot 结果显示, IL-27 (50 ng/mL) 能诱导 N-FLS 和 RA-FLS 的 JAK2 磷酸化 ($F=63.486$, $P=0.000$; $F=395.686$, $P=0.000$) (图 4, 表 5, 表 6)。同时 IL-27 (50 ng/mL) 能诱导 N-FLS 和 RA-FLS 的 JNK 磷酸化 ($F=61.240$, $P=0.000$; $F=73.446$, $P=0.000$) (图 5, 表 5, 表 6)。上述结果提示: IL-27 可以促进 N-FLS 和 RA-FLS 细胞信号分子 JAK2 和 JNK 的磷酸化, 从而激活其信号通路。

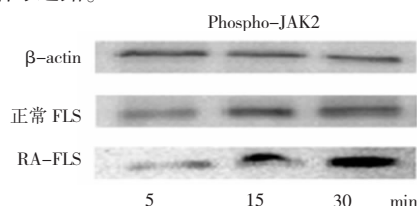


图 4 Western blot 检测 IL-27 对 FLS 细胞内 JAK2 磷酸化的影响

Fig.4 Effect of IL-27 on the phosphorylation of JAK2 in FLS by Western blot

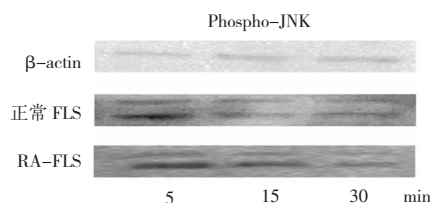


图 5 Western blot 检测 IL-27 对 FLS 细胞内 JNK 磷酸化的影响

Fig.5 Effect of IL-27 on the phosphorylation of JNK in FLS by Western blot

表 5 IL-27 刺激 N-FLS 后, JAK2 和 JNK 的磷酸化水平
Tab.5 the phosphorylation of JAK2 and JNK in N-FLS after treated with IL-27

目标蛋白	JAK2	JNK
5 min	1.064 0 ± 0.073 5	3.451 0 ± 0.250 5
15 min	2.478 0 ± 0.212 3 ^{ab}	1.541 0 ± 0.115 9 ^{ab}
30 min	3.592 0 ± 0.159 2 ^c	1.052 0 ± 0.051 0 ^c
<i>F</i> 值	63.486	61.240
<i>P</i> 值	0.000	0.000

注: a, 与用 IL-27 (50 ng/mL) 刺激 5min 相比, $P=0.002$; b, 与用 IL-27 (50 ng/mL) 刺激 30min 相比, $P=0.008$; c, 与用 IL-27 (50 ng/mL) 刺激 5min 相比, $P=0.000$; a': 与用 IL-27 (50 ng/mL) 刺激 5 min 相比, $P=0.001$; b': 与用 IL-27 (50 ng/mL) 刺激 30 min 相比, $P=0.183$; c': 与用 IL-27 (50 ng/mL) 刺激 5min 相比, $P=0.000$

表 6 IL-27 刺激 RA-FLS 后, JAK2 和 JNK 的磷酸化水平
Tab.6 The phosphorylation of JAK2 and JNK in RA-FLS after treated with IL-27

目标蛋白	JAK2	JNK
5 min	0.935 0 ± 0.076 4	4.084 0 ± 0.082 8
15 min	3.185 0 ± 0.2784 ^{ab}	2.401 0 ± 0.229 7 ^{ab}
30 min	8.186 0 ± 0.1451 ^c	1.214 0 ± 0.159 0 ^c
<i>F</i> 值	395.686	73.446
<i>P</i> 值	0.000	0.001

注: a, 与用 IL-27 (50 ng/mL) 刺激 5 min 相比, $P=0.000$; b, 与用 IL-27 (50 ng/mL) 刺激 30 min 相比, $P=0.000$; c, 与用 IL-27 (50 ng/mL) 刺激 5 min 相比, $P=0.000$; a': 与用 IL-27 (50 ng/mL) 刺激 5 min 相比, $P=0.001$; b': 与用 IL-27 (50 ng/mL) 刺激 30 min 相比, $P=0.007$; c': 与用 IL-27 (50 ng/mL) 刺激 5min 相比, $P=0.000$

3 讨论

RA 是一种以慢性滑膜炎症及进行性骨破坏为主要表现的自身免疫性疾病。在 RA 患者的关节腔内,位于滑膜内层的 FLS 被各种启动因素激活而变得具有侵略性:一方面,FLS 可引起滑膜增生肥厚形成许多绒毛样突起(血管翳),造成关节损伤;另一方面,FLS 可大量产生各种炎性细胞因子(TNF- α 、IL-1 β 和 IL-17 等)、趋化因子、细胞粘附分子及基质金属蛋白酶,介导炎症和内皮细胞相互作用,从而加重 RA 患者的关节炎症,进而造成骨和软骨的破坏^[4-6]。IL-27 是一种新型 IL-6/IL-12 家族细胞因子,是由 EBI3 和 p28 组成的异二聚体^[7]。IL-27 能作用于固有免疫系统和适应性免疫系统的各种细胞而发挥广泛的免疫调节作用。有研究报告 RA 患者的 IL-27 血清学水平明显高于所有正常对照,并且 IL-27 的水平与 RA 的疾病活动度相关,经过免疫抑制剂治疗后 RA 患者血清 IL-27 水平明显下降,提示 IL-27 可能在 RA 病情加重中具有免疫病理作用^[8]。为了研究 IL-27 在 RA 致病机理中的免疫调节作用,用 50 ng/mL 的 IL-27 刺激正常关节来源和 RA 患者关节来源的 FLS,发现 IL-27 能刺激 N-FLS 和 RA-FLS 产生 IL-6,RA 患者关节来源的 FLS 产生 IL-6 的浓度与正常关节来源的 FLS 产生 IL-6 的浓度无统计学差异。IL-6 也是 RA 的关键细胞因子,对 RA 的主要致病作用包括促炎症相关的 B 细胞和 Th17 细胞的分化以及急性期蛋白的合成;诱导破骨细胞分化,造成关节损伤;诱导基质金属蛋白酶的产生,破坏关节软骨等^[9-11]。因此本研究表明 IL-27 可通过刺激 FLS 产生 IL-6,从而增强关节滑膜的炎症反应,加重关节的损伤。

RA 在发病过程中,炎性细胞因子可在 FLS 信号传导途径的不同阶段产生效应,使细胞内的蛋白激酶持续性激活,从而引发 FLS 信号传导发生异常变化,进而导致 FLS 的凋亡失衡和增殖^[12]。JAK-STAT 信号通路已证实在 RA 发病过程中处于激活状态并发挥致病作用^[13],多种细胞因子均通过作用于 JAK/STAT 信号传导通路各个环节而发挥其生物学作用,在机体炎症反应中有着重要作用,但 JAK-STAT 信号通路参与 RA 发病的确切机制尚不明确。Wong 等研究发现 FLS 可以表达功能性 IL-27R (WSX-1 和 gp130),且 IL-27 可通过识别 FLS 的 IL-27R 激活下游的 JAK-2、STAT1、AKT、PI3K 和 JNK 等信号传导通路,从而上调粘附分子(ICAM-1 和 VCAM-1)和趋化因子(CCL2、CXCL9 和 CXCL10)的产生^[9]。在本

实验中,分别用 JAK、NF- κ B、PI3K、p38MAPK、JNK 和 ERK 信号分子抑制剂来观察它们对 IL-27 刺激 FLS 产生 IL-6 的抑制作用,结果显示:JAK 抑制剂 AG490 和 JNK 抑制剂 SP600125 可以明显抑制 IL-27 诱导的 IL-6 产生,进一步的 Western blot 检测到 IL-27 能刺激人 FLS 细胞内信号通路蛋白 JAK2 和 JNK 的磷酸化水平升高。本研究初步明确了 IL-27 通过 JAK-2 和 JNK 信号通路刺激人 FLS 细胞产生 IL-6 的促炎症作用,在接下来的研究中需进一步探讨 JAK-STAT 信号通路在 IL-27 刺激 FLS 产生 IL-6 中的可能机制,深入了解 JAK/STAT 信号通路与 RA 之间的关系,为开发新的抗 RA 药物提供新的理论依据。

参考文献

- [1] Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, et al. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27[J]. *J Immunol*, 2004, 172(4): 2225-2231.
- [2] Cronstein BN. Interleukin-6—a key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis[J]. *Bull NYU hosp Jt Dis*, 2007, 65(s1): 11-15.
- [3] Wong CK, Chen DP, Tam LS, et al. Effects of inflammatory cytokine IL-27 on the activation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(4): R129.
- [4] Kay J, Calabrese L. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2004, 43(S3): iii2-9.
- [5] Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease[J]. *J Pathol*, 2008, 214(2): 149-160.
- [6] Agarwal S, Misra R, Aggarwal A. Interleukin 17 levels are increased in juvenile idiopathic arthritis synovial fluid and induce synovial fibroblasts to produce proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases[J]. *J Rheumatol*, 2008, 35(3): 515-519.
- [7] 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.
- [8] 赖晓霏, 张莉萍. 类风湿关节炎患者血清中 IL-27、炎症指标和疾病活动度的相关性分析[J]. *免疫学杂志*, 2014, 30(6): 536-538.
- [9] Yoshida Y, Tanaka T. Interleukin 6 and rheumatoid arthritis[J]. *Biomed Res Int*, 2014(2014): 698313.
- [10] Hashizume M, Mihara M. The roles of interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis*, 2011(2011): 765624.
- [11] Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation[J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(s2): 3.
- [12] Chihara H, Hino M, Makizono T, et al. Inhibitory effects of hybrid liposomes on the growth of synoviocyte causing rheumatoid arthritis[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(1): 207-210.
- [13] Galligan CL, Siminovich KA, Keystone EC, et al. Fibrocyte activation in rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2010, 49(4): 640-651.

(责任编辑:张辉洁)