

· 论著 ·

JAK/STAT信号通路调控巨噬细胞参与肌腱损伤后重塑形作用和机制研究*

黄 昆 王景信*

郑州市中心医院 (河南 郑州 470000)

【摘要】目的 探讨JAK/STAT信号通路调控巨噬细胞参与肌腱损伤后重塑型的作用机制。**方法** 选取SPF级雄性SD大鼠24只, 体重(250±20)g, 年龄为2月龄, 随机分为正常组8只, 模型组1、8周各8只。其中正常组不做任何处理, 模型组给予跟腱内部注射(50U/leg)胶原酶。HE染色检测正常组、模型组1周、模型组8周组织病理学情况。免疫组织学染色检测各组M1型巨噬细胞标记物CD86, M2型巨噬细胞标记物CD163。ELISA检测各组血清促炎因子IL-1、IL-1 β 、IL-6、TNF-, INF- γ 水平, 血清抗炎因子IL-4、IL-13水平。West-blot检测各组P-TAKY2、SCOS1、P-STAT1和P-JAK1、P-STAT3、P-STAT6水平。**结果** HE染色结果显示, 与正常组相比, 模型组1周肌腱组织内部有大量炎症细胞浸润, 模型组8周炎症细胞明显减少; 免疫组织学染色结果显示, 与正常组相比, 模型组1周CD86明显增多、CD163明显减少, 模型组8周CD86明显减少, CD163明显增多; ELISA结果显示, 与正常组相比, 模型组1周IL-1、IL-1 β 、IL-6、TNF-, INF- γ 水平, 显著升高, IL-4、IL-13、INF- γ 水平, 显著降低, 模型组8周IL-1、IL-1 β 、IL-6、TNF-, INF- γ 水平, 显著降低, IL-4、IL-13、INF- γ 水平, 显著升高, 差异有统计学意义($P<0.05$); West-blot结果显示, 与正常组相比, 模型组1周P-TAKY2、P-STAT1表达量增加, P-JAK1、SCOS1、P-STAT3、P-STAT6表达量减少, 模型组8周P-TAKY2、P-STAT1表达量减少, p-JAK1、SCOS1、p-STAT3、p-STAT6表达量增加, 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** JAK/STAT信号通路通过调控巨噬细胞M1/M2极化参与肌腱损伤后重塑。

【关键词】 Janus激酶; 信号传导及转录激活蛋白; 巨噬细胞; 细胞期间损伤重塑性; 作用和机制

【中图分类号】 R687

【文献标识码】 A

【基金项目】 河南省科技攻关计划(222102310657); 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20191057)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2024.5.035

Study on the Role and Mechanism of JAK/STAT Signaling Pathway Regulating Macrophages in Tendon Remodeling after Injury*

HUANG Kun, WANG Jing-xin*

Zhengzhou Central Hospital, Zhengzhou 470000, Henan Province, China

Abstract: Objective to investigate the mechanism of JAK/STAT signaling pathway regulating macrophages to participate in tendon remodeling after tendon injury. **Methods** Twenty four SPF grade female SD rats, weighing (250 $\pm$ 20) g, aged 2 months, were randomly divided into 8 normal rats and 8 model rats at 1 and 8 weeks respectively. The normal group did not do any treatment, and the model group was injected with collagenase (50u/leg) into the Achilles tendon. HE staining was used to detect the histopathology of normal group, model group for 1 week and model group for 8 weeks. The M1 macrophage marker CD86 and M2 macrophage marker CD163 were detected by immunohistochemical staining. The levels of serum pro-inflammatory factors IL-1, IL-1 β , IL-6, TNF- and the levels of serum anti-inflammatory factors IL-4, IL-13 and INF- γ were detected by ELISA. The levels of p-TAKY2, SCOS1, p-STAT1, p-JAK1, p-STAT3 and p-STAT6 were detected by West blot. **Results** The results of HE staining showed that compared with the normal group, there were a large number of inflammatory cells in the tendon tissue of the model group at 1 week, and the inflammatory cells in the model group decreased significantly at 8 weeks; The results of immunohistochemical staining showed that compared with the normal group, CD86 increased significantly and CD163 decreased significantly in the model group at 1 week, while CD86 decreased significantly and CD163 increased significantly in the model group at 8 weeks ($P<0.05$); The results of ELISA showed that, compared with the normal group, the levels of IL-1, IL-1 β , IL-6, TNF-, INF- γ in the model group increased significantly at 1 week, and the levels of IL-4, IL-13 and INF- γ in the model group decreased significantly at 8 weeks. The levels of IL-1, IL-1 β , IL-6, TNF-, INF- γ in the model group decreased significantly, and the levels of IL-4, IL-13 and INF- γ increased significantly at 8 weeks ($P<0.05$); The results of West blot showed that, compared with the normal group, the expression of p-TAKY2, SCOS1 and p-STAT1 decreased in the model group at 1 week, and the expression of p-JAK1, p-STAT3 and p-STAT6 increased. The expression of p-TAKY2, SCOS1 and p-STAT1 increased in the model group at 8 weeks, and the expression of p-JAK1, p-STAT3 and p-STAT6 decreased in the model group ($P<0.05$). **Conclusion** JAK/STAT signaling pathway participates in tendon remodeling after tendon injury by regulating M1/M2 polarization of macrophages.

Keywords: Janus Kinase; Signal Transduction and Transcription Activating Proteins; Macrophages; Cellular Damage Remolding; Role and Mechanism

肌腱损伤是常见的一种运动损伤性疾病, 临床上主要临床表现为肌腱疼痛、功能受损, 运动能力下降, 严重影响到了患者的生活质量^[1]。绝大多数研究^[2-3]表明炎症在肌腱病的发生、发展和肌腱重塑中至关重要。巨噬细胞主要分为两种主要类型, M1型和M2型, M1型主要参与促炎反应和组织损伤的发生, M2型主要分泌抗炎因子, 参与进行组织的修复, 研究表明^[4-5], 肌腱的损伤和重塑与巨噬细胞M1型和M2型比值的平衡失调密切相关。JAK/STAT信号通路参与巨噬细胞的炎症调控, IFN- γ 激活JAK/STAT信

号通路诱导M1型极化, 参与组织损伤后炎症的发生, IL-4、IL-13激活JAK/STAT信号通路诱导M2型极化, 参与组织损伤后的修复重塑^[6-7], 但肌腱损伤后是否通过JAK/STAT信号通路调控巨噬细胞M1/M2极化参与肌腱损伤后重塑, 国内鲜有报道。本研究采用构建肌腱损伤急性期模型组大鼠、肌腱损伤后重塑模型组大鼠, 探讨JAK/STAT信号通路调控巨噬细胞参与肌腱损伤后重塑型的作用机制, 为临床研究治疗肌腱损伤后重塑提供药物新靶点。

【第一作者】 黄 昆, 男, 主管康复治疗师, 主要研究方向: 脑卒中、神经系统病损导致的功能障碍康复, 骨与关节功能障碍的康复。E-mail: hk304035801@163.com

【通讯作者】 王景信, 男, 副主任医师, 主要研究方向: 神经康复。E-mail: kfkwangjxbs@163.com

1 实验材料与方法

1.1 主要仪器和试剂 倒置荧光电子显微镜(Nikon); 酶标仪(美国BIO-RAD公司); 电泳仪、电转仪(北京六一仪器厂); 高速离心机(赛默飞); 生物安全柜、医用工作净化台(苏州医疗器械厂)。I型胶原酶(Sigma公司); IL-1、IL-1 β 、IL-6、TNF- γ 、IFN- γ 、IL-4、IL-13酶联免疫试剂盒(CUSABIO生物科技有限公司); 鼠抗 β -actin、兔抗P-TAKY2、SCOS1、P-STAT1、P-JAK1、P-STAT3、P-STAT6(Abcam); CD86、CD163免疫组化抗体(北京中杉金桥)。

1.2 实验动物 雄性SD大鼠(安徽医科大学动物中心购买)、级别为SPF级, 体重(250 $\pm$ 20)g, 年龄为2月龄。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型构建 将24只大鼠按照随机原则分为3组, 每组8只, 正常组跟腱不做任何处理。模型组1周、模型组8周均在0天切开皮肤和皮下筋膜, 并在跟腱内部注射(50U/leg)胶原酶。缝合皮肤并进行简单包扎。每天肌内注射青霉素80万单位, 每天注射一次, 连续注射三天。分别于术后1周和8周取材血清和跟腱。

1.3.2 HE染色 取材正常组8周、模型组1周、模型组8周的跟腱组织, 按照包埋、切片、染色等常规步骤, 进行HE染色检测, 之后封面烘干, 倒置显微镜下拍片观察。

1.3.3 免疫组织化学染色 取材正常组、模型组1周、模型组8周的跟腱组织, 包埋、切片, 按照北京中杉金桥免疫组化试剂盒进行染色, 之后封面烘干, 倒置显微镜下拍片观察。

1.3.4 ELISA检测 取正常组、模型组1周、模型组8周主动脉血, 分离血清, 按照ELISA酶联免疫试剂盒, 进行相关指标检测。酶标仪测定各指标吸光度。

1.3.5 Westernblot检测 提取正常组、模型组1周、模型组8周跟腱组织蛋白, 按照电泳、电转、封闭、孵一抗、孵二抗等操作, ECL增强型发光剂暗室显色。

1.4 数据统计分析 实验数据使用SPSS 22.0进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用t检验, 以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 肌腱损伤后重塑过程中组织病理学变化规律 HE染色结果显示, 正常组肌腱组织结构完整, 细胞排列规则有序; 模型组1周, 肌腱组织出现部分水肿, 肌腱纤维排列紊乱, 内部有大量炎症细胞, 说明1周为肌腱损伤修复期; 模型组8周肌腱细胞排列较为规则, 内部炎症细胞明显减少, 说明8周为肌腱损伤后重塑期。详见下图1。

2.2 肌腱损伤后重塑过程中病灶区CD86和CD163蛋白表达的规律和特征 免疫组化结果显示, 正常组肌腱组织CD86和CD163基本不表达, 说明正常组织基本无巨噬细胞浸润。模型组1周CD86高表达, CD163基本不表达, 说明1周主要M1型巨噬细胞参与炎症反应。模型组8周CD86低表达, CD163高表达, 说明8周主要为M2细胞参与抗炎反应, 有助于跟腱组织的修复。详见下图2。

2.3 肌腱损伤后重塑过程中促炎因子水平和抗炎因子水平变化情况 ELISA结果显示促炎因子, IL-1、IL-1 β 、IL-6、TNF- γ 、IFN- γ 等在正常组中低表达, 在模型组1周中高表达, 在模型组8周中低表达, 差异有统计学意义($P<0.05$)。抗炎因子IL-4、IL-13在正常组织中高表达, 在模型组1周中低表达, 在模型组8周中高表达, 差异有统计学意义($P<0.05$), 结果说明促炎因子与抗炎因子的平衡失调参与肌腱损伤急性期和损伤后重塑过程, 详见下表1。

2.4 肌腱损伤后重塑过程中JAK/STAT信号通路相关蛋白表达规律 Westernblot结果显示, P-TAKY2、P-STAT1在正常组中低表达, 在模型组1周中高表达, 在模型组8周中低表达, 差异有统计学意义($P<0.05$)。说明肌腱损伤急性期通过启动JAK-STAT信号通路诱导M1型巨噬细胞极化, 参与炎症反应。P-JAK1、SCOS1、P-STAT3、P-STAT6在正常组织低表达, 在模型组1周中更低表达, 在模型组8周中高表达, 差异有统计学意义($P<0.05$)。说明在肌腱损伤重塑过程中启动JAK/STAT信号通路诱导M2型巨噬细胞极化, 参与抗炎反应, 有助于肌腱重塑。详见下图3和图4。

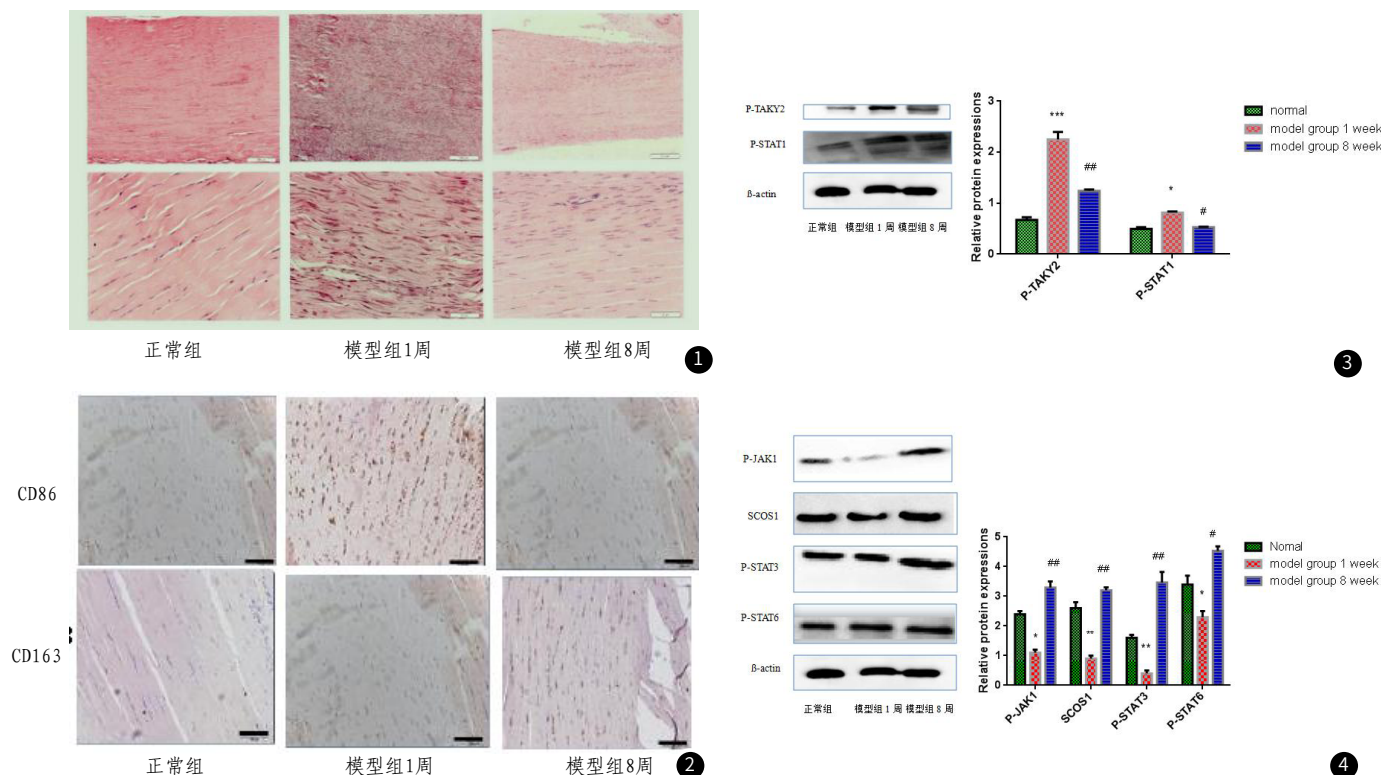


图1 肌腱损伤后重塑不同时间组织病理学变化。**图2** 肌腱损伤后重塑不同时间M1、M2型巨噬细胞标志物表达。**图3** 各组P-TAKY2、P-STAT1表达, 与正常组相比, *** $P<0.001$, * $P<0.05$; 与模型组1周相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。**图4** 各组P-JAK1、SCOS1、P-STAT3、P-STAT6表达, 与正常组相比, ** $P<0.01$, * $P<0.05$; 与模型组1周相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

表1 肌腱损伤后重塑过程促炎因子水平和抗炎因子水平

指标(ng/mL)	正常组	模型组1周	模型组8周
IFN-γ	0.120.03	1.120.10***	0.250.12 [#]
IL-1	0.540.15	1.220.24***	0.720.23 ^{###}
IL-1β	0.430.23	1.980.33***	0.880.41 ^{##}
IL-6	2.211.08	6.562.13***	3.561.14 [#]
TNF-	1.180.09	7.711.33***	5.451.26 [#]
IL-4	5.671.15	2.121.13***	6.451.88 ^{###}
IL-13	5.751.43	2.560.56***	7.561.03 ^{###}

注：与正常组相比，***P<0.001；与模型组1周相比，[#]P<0.05，^{##}P<0.01，^{###}P<0.001。

3 讨论

肌腱病又称为肌腱炎，研究^[8]认为肌腱炎与传统的炎症反应不一样，本身并无白细胞参与，是一种介于机体动态平衡和典型炎症反应间的“准炎症”反应。巨噬细胞在肌腱损伤后及重塑过程中至关重要^[9-11]，M1/M2型巨噬细胞失衡在肌腱损伤后过程中发挥着不同作用，肌腱损伤后急性炎症期在促炎症因子如IFN-γ等作用下，此时巨噬细胞主要以M1型巨噬细胞为主，分泌大量炎症因子如IL-1、IL-1β、IL-6、TNF-进而参与炎症反应。急性期过后大约在6周左右，此阶段肌腱炎症反应基本消失，肌腱开始修复、重塑，此时在抗炎因子IL-4、IL-13等作用^[12-13]，诱导巨噬细胞分化为M2型巨噬细胞，进而产生大量抗炎因子有助于肌腱的重塑。

以往研究^[14]主要集中于巨噬细胞与肌腱损伤和重塑间的关系，但通过哪种分子信号通路参与巨噬细胞调节鲜有文献报道。JAK-STAT信号通路是众多细胞因子信号传导的共同途径，有研究^[15]认为它与巨噬细胞参与炎症调节密切相关，本研究基于以往研究提出如下论点，不同JAK-STAT分子通路参与M1、M2型巨噬细胞的调节，进而调节肌腱损伤和重塑过程。肌腱损伤急性炎症期，在IFN-γ炎症因子刺激下激活酪氨酸激酶2即TAKY2磷酸化，此时在SCOS1负反馈调节下，激活STAT1磷酸化，进而诱导巨噬细胞M1型极化，进而分泌IL-1、IL-1β、IL-6、TNF-进而参与炎症反应。肌腱损伤后重塑期在抗炎因子IL-4、IL-13等刺激下激活JAK1磷酸化，促使STAT3、STAT6磷酸化，诱导巨噬细胞M2型极化，进而分泌IL-4、IL-13等抗炎因子有助于肌腱损伤后重塑。本研究分别从组织病理学、分子生物学、免疫血清学等方面论证JAK-STAT信号通路是如何通过调节巨噬细胞极化参与肌腱损伤和重塑过程。研究通过建立正常组、模型组1周(肌腱损伤急性期)、模型组8周(肌腱损伤后重塑期)进行相关验证。首先HE染色结果如结果2.1所示，结果表明肌腱急性期、肌腱损伤后重塑期模型成功建立。免疫组化结果如结果2.2所示所示，结果表明在肌腱损伤急性期M1型巨噬细胞主要参与，肌腱损伤后重塑期M2型巨噬细胞主要参与，与文献^[14]报道一致。ELISA结果如结果2.3所示，结果表明急性期大量炎症因子参与炎症反应，重塑期大量抗炎因子参与反应，与文献^[6-7]报道一致。为进一步论证研究论点，研究从分子生物学角度进行论证，WB结果如结果2.4所示，结果与研究论点一致：肌腱损伤急性期炎症因子通过激活TAKY2下调SCOS1表达，上调STAT1表达，诱导巨噬细胞M1型极化，参与肌腱损伤急性期炎症反应。重塑期在抗炎因子等刺激下激活JAK1上调STAT3、STAT6表达，诱导巨噬细胞M2型极化，参与肌腱重塑。

本研究论证了JAK/STAT信号通路调控巨噬细胞参与肌腱损伤后重塑的作用机制，有助于肌腱损伤药物分子靶点的寻找，对治疗肌腱损伤具有指导意义。

参考文献

- [1] Abat F, Alfredson H, Cucchiaroni M, et al. Current trends in tendinopathy: consensus of the ESSKA basic science committee. Part I: biology, biomechanics, anatomy and an exercise-based approach[J]. J Exp Orthop, 2017, 4(1): 18-29.
- [2] Mosca, Michael J, Carr, et al. Differential expression of alarmins—S100A9, IL-33, HMGB1 and HIF-1α in supraspinatus tendinopathy before and after treatment[J]. Bmj Open Sport-Exercise Medicine, 2017, 3(1): e000225.
- [3] Stolk M, Klatte-Schulz F, Schmock A, et al. New insights into tenocyte-immune cell interplay in an in vitro model of inflammation[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 9801.
- [4] Mu X, Li Y, Fan G C. Tissue-resident macrophages in the control of infection and resolution of inflammation[J]. Shock, 2021, 55(1): 14-23.
- [5] Chen X, Tang J, Shuai W, et al. Macrophage polarization and its role in the pathogenesis of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome[J]. Inflamm Res, 2020, 69(9): 883-895.
- [6] Rahal OM, Wolfe AR, Mandal PK, et al. Blocking interleukin(IL)4- and IL-13-mediated phosphorylation of STAT6 (Tyr641) decreases M2 polarization of macrophages and protects against macrophage-mediated radioresistance of inflammatory breast cancer[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2018, 100(4): 1034-1043.
- [7] Ma C, Jiang Y, Zhang X, et al. Isoquercetin ameliorates myocardial infarction through anti-inflammation and anti-apoptosis factor and regulating TLR4-NF-κB signal pathway[J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 17(5): 124-127.
- [8] 赵敏. 活血通腑方调控巨噬细胞极化和SOCS/JAK2/STAT/PPAR-γ通路防治腹腔粘连的机制研究[D]. 南京中医药大学, 2020.
- [9] Liu L, Zhu X, Zhao T, et al. Sirt1 ameliorates monosodium urate crystal-induced inflammation by altering macrophage polarization via the PI3K/Akt/STAT6 pathway[J]. Rheumatology, 2019, 58(9): 1674-1683.
- [10] Seyedizade S S, Afshari K, Bayat S, et al. Current status of M1 and M2 macrophages pathway as drug targets for inflammatory bowel disease[J]. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 2020, 68(2): 10.
- [11] 陈浪, 邹轩, 余武汉, 等. 炎症反应中巨噬细胞极化机制和中药靶向治疗[J]. 生命的化学, 2021, 41(12): 8.
- [12] 顾新丰, 周义钦, 郑显新, 等. 炎症在肌腱病中的作用研究进展[J]. 国际骨科学杂志, 2020, 41(6): 5.
- [13] Millar N L, Murrell G, McInnes I B. Inflammatory mechanisms in tendinopathy -towards translation[J]. Nature Reviews Rheumatology, 2017, 13(2): 110.
- [14] 赵九洲, 姜晓旭, 李宏伟, 等. JAK-STAT信号通路与巨噬细胞炎症调控的研究进展[J]. 癌变·畸变·突变, 2020, 32(5): 4.
- [15] 马陈芳, 詹小兰, 孙张弛. 基于JAK/STAT的栀子苷体外抑制巨噬细胞M2极化作用[J]. 中国药师, 2020, 23(10): 6.

(收稿日期: 2023-03-25)

(校对编辑: 韩敏求)