

白细胞介素 13 通过 STAT6 途径促进瘢痕成纤维细胞株胶原合成

熊丽霞¹ 李文林² 蔡震宇¹ 蔡伟³ 邹芳芳¹ 陈厚文³ 石小玉^{3*}

(¹ 南昌大学医学院病理生理学教研室, 南昌 330006; ² 江西省医学科学研究所, 江西省医学生物高技术重点实验室, 南昌 330006; ³ 南昌大学基础医学院, 南昌 330006)

摘要 增生性瘢痕和瘢痕疙瘩是一种皮肤纤维化过程, 是创伤修复的必然产物。白细胞介素 13(IL-13)是与纤维化等多种疾病发生机制密切相关的细胞因子。本文观察重组白细胞介素 13(rIL-13)对瘢痕成纤维细胞株(CRL-1762)的胶原合成作用, 探讨其作用机制。CRL-1762 细胞分为实验组和对照组, 实验组加入 rIL-13(100 μg/L), 用细胞计数和 HE 染色观察细胞增殖和细胞形态; 检测细胞培养上清液中羟脯氨酸(Hyp)含量; RT-PCR 检测细胞 IL-13 受体的表达; 用 Western blot 检测 STAT6 蛋白磷酸化情况。结果显示 CRL-1762 细胞表达 IL-13 受体 α1; 实验组细胞数量显著增加($P<0.01$), 上清液中 Hyp 含量显著高于对照组($P<0.01$); IL-13 作用 CRL-1762 细胞 2 h 后磷酸化 STAT6 蛋白表达最强, 4 h 后衰减。由此可见, CRL-1762 细胞表达 IL-13 受体 α1, rIL-13 通过 STAT6 途径促进 CRL-1762 细胞胶原合成。

关键词 白细胞介素 13; 瘢痕疙瘩; 成纤维细胞; 胶原

瘢痕是皮肤组织在创伤修复过程中, 由于全身和局部因素的影响, 导致细胞外基质过度分泌沉积, 胶原产生增加和降解减少, 包括成纤维细胞在内的组织修复细胞异常增殖分化而形成的, 这些过程受复杂的细胞内分子作用的调节^[1]。已证实 IL-13 是许多 II 类细胞因子决定的病理过程的关键诱导物, 与多种纤维化疾病的发病机制有关^[2,3], 它能调节炎症、黏液产生、组织重建和纤维化, 它成为许多纤维化疾病的重要治疗靶点^[4]。为研究 IL-13 在瘢痕形成过程中的作用, 本实验采用体外培养瘢痕成纤维细胞株, 探讨 IL-13 对瘢痕成纤维细胞的胶原合成作用及信号转导途径, 观察 IL-13 是否结合瘢痕成纤维细胞膜上的 IL-13 受体, 从而激活 JAK/STAT 信号转导通路, 将胞内信号转导和转录激活因子 STAT6 蛋白磷酸化, 从而促进胶原蛋白的合成。

1 材料与方法

1.1 实验对象

瘢痕成纤维细胞 CRL-1762 细胞株(购自美国 ATCC 细胞库), 常规培养在含 15% 胎牛血清、 1×10^5 U/L 的青、链霉素的 DMEM 培养液中, 置于 37℃、含 5% 的 CO₂ 孵箱中培养。实验分实验组和对照组,

实验前, 两组细胞均用无血清 DMEM 培养 12~16 h, 实验组加 rIL-13(100 μg/L)(浓度已做过优化实验, 此浓度最佳)。

1.2 主要试剂

rIL-13、Peprotech、兔抗人 p-STAT6 (磷酸化) 抗体、Santa Cruz、兔抗人 STAT6 (非磷酸化) 抗体、Neomarkers、HRP-羊抗兔 IgG (II 抗) 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Western blotting Luminol Reagent(sc-2048): Santa Cruz、IL-13Rα1 特异性引物购自 TaKaRa 公司(大连宝生物); 正向引物 5'-gTC CCT ggT gTT CTT CCT gAT AC-3'; 反向引物 5'-CAG CAC TAC AgA gTC ggT TTC C-3'。SV total RNA isolation system(Promega); one step RT-PCR kit (TaKaRa 公司); 羟脯氨酸试验检测盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 方法

1.3.1 RT-PCR 检测 CRL-1762 细胞 IL-13 受体 α1 的表达 取对数生长期细胞, 用 SV total RNA

收稿日期: 2010-07-05 接受日期: 2010-10-10

江西省教育厅课题(No.GJJ08083)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0791-6362180, E-mail: shixiaoyu999@sina.com.cn

isolation system 提取总 RNA, 逆转录合成第一条 cDNA, 使用 IL-13R α 1 特异性引物, 按照 TaKaRa RT-PCR kit 标准程序进行扩增, 产物为 360 bp, 进行 1% 琼脂糖电泳。

1.3.2 细胞计数观察 rIL-13 对 CRL-1762 细胞增殖的影响 实验组和对照组 CRL-1762 细胞(1×10^8 cells/L)入 6 孔培养板, rIL-13(100 μ g/L)(浓度已作过优化实验, 此浓度最佳)分别作用 24 h、48 h 和 72 h 后收集细胞计数, 重复做 3 孔, 取平均值。

1.3.3 HE 染色观察 CRL-1762 细胞形态 CRL-1762 细胞常规传代, 爬片于盖玻片上, 实验组细胞和对照组分别固定, HE 染色, 显微镜下观察细胞形态及胞浆。

1.3.4 CRL-1762 细胞分泌羟脯氨酸试验 CRL-1762 细胞以 2×10^8 cells/L 接种于培养瓶, 细胞汇合达 80% 左右时, 无血清 DMEM 培养 12~16 h, 实验组加 rIL-13 (100 μ g/L)作用 24 h、48 h 和 72 h 后收集细胞培养上清液, 用羟脯氨酸试验检测盒检测羟脯氨酸含量, 按试剂盒说明操作。

1.3.5 Western blot 检测 rIL-13 作用后 STAT6 蛋白磷酸化 取生长良好的 CRL-1762 细胞, 细胞密度 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ cells/L 接种于培养瓶中, 无血清培养 12~16 h 后, 以 rIL-13 (100 μ g/L)诱导 CRL-1762 细胞 0 h、1 h、2 h、4 h 和 8 h, 收集细胞, 提取蛋白, 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 硝酸纤维膜转印。5% 脱脂奶粉 4 $^{\circ}$ C 封闭, TBS 洗涤, 加兔抗人 p-STAT6 (磷酸化)抗体(1:200) 4 $^{\circ}$ C 过夜, 加 HRP-羊抗兔 IgG (II 抗)(1:5 000)室温孵育 2 h, 显像。对结果利用凝胶定量软件 Quantity One (Bio-Rad)进行光密度分析。

1.4 统计学处理

各实验重复 3 次, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 *t* 检验对实验组和对照组进行差异显著性检验。

2 结果

2.1 CRL-1762 细胞表达 IL-13R α 1

提取总 RNA 后按照 one step RT-PCR kit 试剂盒操作进行 RT-PCR。1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 在 511 bp (β -actin)和 360 bp 处(IL-13R α 1)均可见一明显条带(图 1)。

2.2 rIL-13 促进 CRL-1762 细胞生长和增殖

rIL-13 作用 CRL-1762 细胞 24 h 后, 细胞数量比对照组明显增加($P < 0.05$), 持续至 72 h ($P < 0.01$)(表

1), 细胞增加倍数见图 2。HE 染色见 CRL-1762 细胞呈放射状、编织状或旋涡状排列, 细胞体呈梭形或不规则三角形, 胞质向外伸出大小不等的突起, 核为椭圆形, 染成蓝紫色, 位于胞浆的中央, 胞浆被染成浅紫红色。rIL-13 组细胞可见细胞增长旺盛, 排列有明显的交叉重叠现象, 胞浆更丰富(图 3)。

2.3 rIL-13 对 CRL-1762 细胞分泌羟脯氨酸的影响

rIL-13 组分泌的羟脯氨酸含量($\text{ng}/2 \times 10^5 \text{ cells/ml}$)显著高于对照组($*P < 0.05$, $**P < 0.01$)(表 2)。

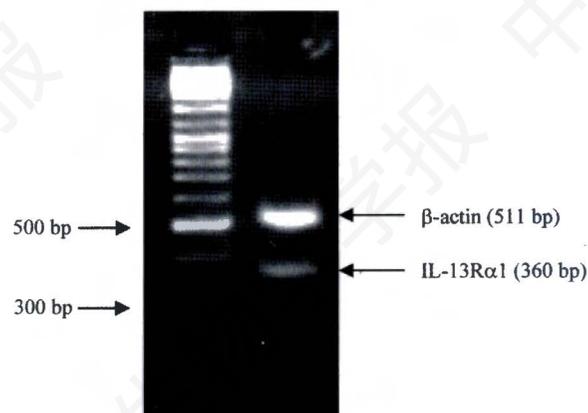


Fig. 1 The result of the IL-13R α 1 mRNA expression in CRL-1762 cells by RT-PCR

Table 1 The effect of rIL-13 on cell proliferation in CRL-1762 cells (cells $\times 10^8$ /L, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Groups	24 h	48 h	72 h
Control	2.10 \pm 0.12	3.30 \pm 0.21	4.20 \pm 0.11
rIL-13	2.90 \pm 0.14*	4.50 \pm 0.08**	5.60 \pm 0.19*** ^Δ

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control, $^{\Delta}P < 0.01$ vs 24 h.

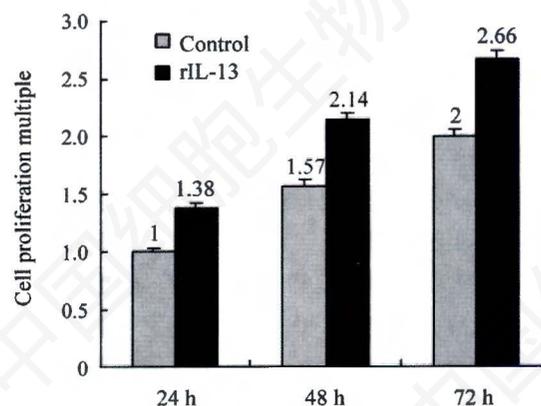


Fig. 2 The effect of rIL-13 on proliferation multiple in fibroblasts

Table 2 The effect of rIL-13 on Hyp production in CRL-1762 cells (ng/2×10⁵cells/ml $\bar{x}\pm s$, n=3)

Groups	24 h	48 h	72 h
Control	0.239±0.032	0.321±0.043	0.395±0.047
rIL-13	0.415±0.036*	0.938±0.041**	1.137±0.039** ^Δ

*P<0.05, **P<0.01 vs control, ^ΔP<0.01 vs 24 h.

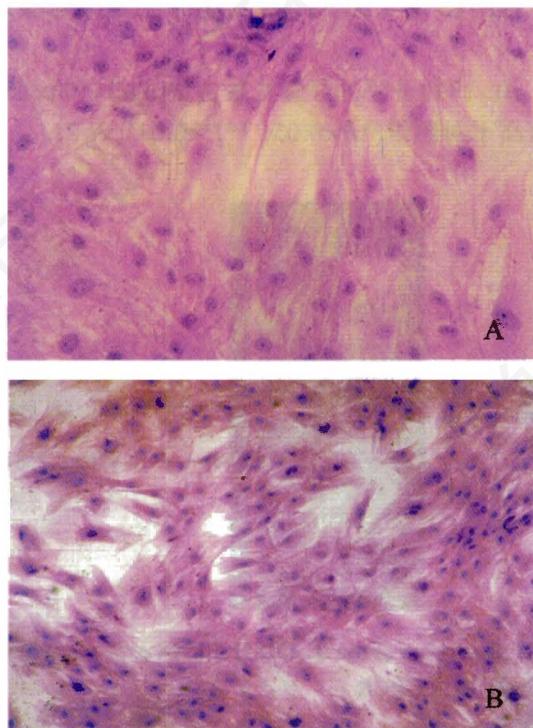


Fig. 3 The morphology changes of cells between control and rIL-13 groups in HE stain (phase contrast microscope, ×250)

A: many processes in control cells; B: cells in the rIL-13 groups grow rapidly.

2.4 rIL-13 诱导 STAT6 蛋白磷酸化

对照组及实验组总STAT6蛋白表达不变, rIL-13 作用 2 h 后磷酸化 STAT6 蛋白表达最强, 4 h 后衰减 (图 4)。

3 讨论

瘢痕形成是皮肤纤维化过程, 是皮肤组织烧伤创伤修复后的必然产物。当创伤修复过程异常时, 以成纤维细胞为主的细胞增殖, 活性增强, 胶原蛋白的分泌量明显高于正常水平, 造成瘢痕组织真皮层中细胞外基质(胶原蛋白为主)过度沉积, 最终形成大量的纤维化组织, 称为增生性瘢痕或瘢痕疙瘩^[5]。本实验体外培养瘢痕成纤维细胞株, 观察细胞因子 IL-13 对瘢痕成纤维细胞的胶原产生作用, 探讨 IL-13 促进瘢

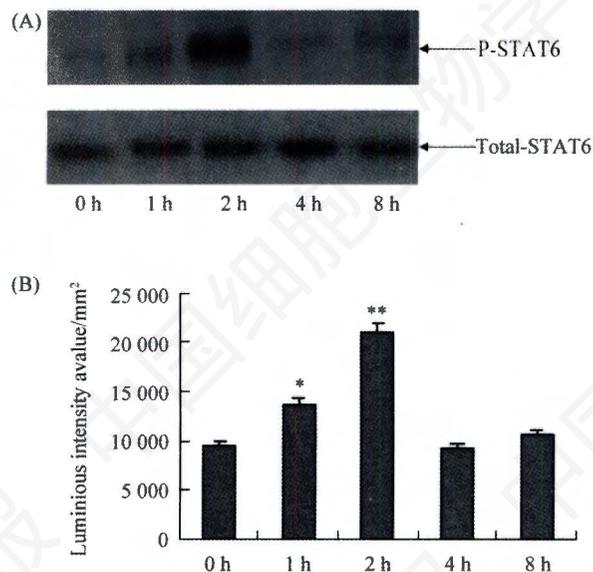


Fig. 4 rIL-13 induces the expression of phosphorylated STAT6 protein in CRL-1762 cells

A: the upper panel is the effects of rIL-13 on the expression of phosphorylated STAT6 protein. The level of phosphorylated STAT6 protein in 2h was significantly higher than other time, the level of phosphorylated STAT6 has been decreased after 4h of stimulation with rIL-13. The lower panel is the effects of rIL-13 on the expression of total STAT6 protein; B: the luminous intensity of phosphorylated STAT6 with different time points. *P<0.05, **P<0.01 vs 0 h.

痕成纤维细胞的胶原产生的细胞信号转导机制。

实验中 HE 染色结果显示, 体外培养的瘢痕成纤维细胞在 IL-13 作用下, 细胞增长旺盛, 排列有明显的交叉重叠现象, 胞浆更丰富。实验用培养上清中羟脯氨酸的测定来反映细胞分泌总胶原蛋白的量, 结果显示实验组比对照组培养上清中分泌的总胶原蛋白的量显著增加。

为进一步探讨 IL-13 促进瘢痕成纤维细胞的胶原产生的细胞信号转导机制, RT-PCR 实验结果显示瘢痕成纤维细胞株表达 IL-13R α 1。IL-13R α 1 是 IL-13 作用于靶细胞的跨膜连接蛋白, 研究表明 IL-13R α 1 存在于 B 细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜碱性粒细胞及肥大细胞、内皮细胞表面^[6]。研究证实正常人皮肤成纤维细胞上有 IL-13R 表达^[7]。国内外研究表明肺上皮细胞、乳腺上皮细胞、角质化细胞 HaCaT、纵隔淋巴瘤细胞、肺成纤维细胞、肠道细胞等细胞 IL-13 能够激活 JAK-STAT6 通路^[8-10]。信号转导和转录激活因子 STATs 是一类隐藏在胞浆中, 能被众多的细胞外多肽类分子激活, 参与基因转

录调控的蛋白质家族。STAT6 是该家族成员之一, 它通过 JAK-STAT 信号传导通路介导细胞因子 IL-4 和 IL-13 等诱导的基因表达, 发挥多种生物学功能, 如促有丝分裂作用, 促进辅助性 T 细胞(T_H)向 T_{H2} 型分化等^[11,12]。当细胞因子 IL-13 与 IL-13R α 1 结合后, 磷酸化 JAK 激酶, 随后 STAT6 与受体结合、发生磷酸化, 最后通过 SH2 结构域相互作用自身二聚化, 再转移至核内, 与靶序列结合, 调节基因转录^[13,14]。本实验观察到瘢痕成纤维细胞表达 IL-13R α 1 和 STAT6 蛋白, 加入 rIL-13 后 STAT6 总蛋白无显著改变, 但磷酸化 STAT6 蛋白在 rIL-13 作用 2 h 后出现高峰, 4 h 后出现衰减, 说明 IL-13 不改变 STAT6 蛋白总量, 但主要通过磷酸化 STAT6 蛋白而发挥基因转录调控作用。综合本实验结果, 我们推测 IL-13 可能通过磷酸化 STAT6 蛋白与胶原基因的启动子结合从而上调胶原基因的转录, 促进胶原的合成。

参考文献(References)

- 1 Buchanan EP, Longaker MT, Lorenz HP. Fetal skin wound healing. *Adv Clin Chem* 2009; 48:137-61.
- 2 Wynn TA. Fibrotic disease and the T_H1 / T_H2 paradigm. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(8): 583-94.
- 3 Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008; 214(2): 199-210.
- 4 Mentink-Kane MM, Wynn TA. Opposing roles for IL-13 and IL-13 receptor alpha 2 in health and disease. *Immunol Rev* 2004; 202: 191-202.
- 5 Coolen NA, Vliq M, van den Boqaerdt AJ, Middelkoop E, Ulrich MM. Development of an *in vitro* burn wound model. *Wound Repair Regen* 2008; 16(4): 559-67.
- 6 Arima K, Sato K, Tanaka G, Kanaji S, Terada T, Honio E, *et al.* Characterization of the interaction between interleukin-13 and interleukin-13 receptors. *J Biol Chem* 2005; 280(26): 24915-22.
- 7 Murata T, Husain SR, Mohri H, Puri RK. Two different IL-13 receptor chains are expressed in normal human skin fibroblasts, and IL-4 and IL-13 mediate signal transduction through a common pathway. *Int Immunol* 1998; 10(8): 1103-10.
- 8 Liu T, Jin H, Ullenbruch M, Hu B, Hashimoto R, Moore B, *et al.* Regulation of found in inflammatory zone 1 expression in bleomycin-induced lung fibrosis: role of IL-4/IL-13 and mediation via STAT-6. *J Immunol* 2004; 173(5): 3425-31.
- 9 Khaledw T, Read EK, Nicholson SE, Baxter FO, Brennan AJ, Came PJ, *et al.* The IL-4/IL-13/Stat6 signalling pathway promotes luminal mammary epithelial cell development. *Development* 2007; 134(15): 2739-50.
- 10 Guitier C, Dusanter-Fourt I, Copie-Bergman C, Boulland ML, Le Gouvello S, Gaulard P, *et al.* Constitutive STAT6 activation in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 2004; 104(2): 543-49.
- 11 Kim EG, Shin HJ, Lee CG, Park HY, Kim YK, Park HW, *et al.* DNA methylation and not allelic variation regulates STAT6 expression in human T cells. *Clin Exp Med* 2010; 10(3): 143-52.
- 12 Finkelman FD, Shea-Donohue T, Morris SC, Gildea L, Strait R, Madden KB, *et al.* Interleukin-4 and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol Rev* 2004; 201: 139-55.
- 13 Hebenstreit D, Wirnsberger G, Horejs-Hoech J, Duschl A. Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17(3): 173-88.
- 14 Chen W, Daines Mo, Hershey GK. Methylation of STAT6 modulates STAT6 phosphorylation, nuclear translocation, and DNA-binding activity. *J Immunol* 2004; 172(11): 6744-50.

Upregulation of Collagen Generation by IL-13 in Human Keloid Fibroblasts Strain via the STAT6 Signaling Pathways

Li-Xia Xiong¹, Wen-Lin Li², Zhen-Yu Cai¹, Wei Cai³, Fang-Fang Zou¹, Hou-Wen Chen³, Xiao-Yu Shi^{3*}

¹Department of Pathophysiology, Basic Medical College, Nanchang University, Nanchang 330006, China; ²Jiangxi Institute of Medical Research, Jiangxi Key Laboratory of Medical Biotechnology, Nanchang 330006, China;

³Basic Medical College, Nanchang University, Nanchang 330006, China)

Abstract Hypertrophic scar and keloids are frequent and severe form of fibrosis of the skin, scar tissue is the product of repairing human body after injury. Interleukin (IL)-13 has been implicated in the pathogenesis of various diseases characterized by fibrosis. In this study we observed the effects of recombinant interleukin-13(rIL-13) on collagen generation from keloid fibroblasts strain(CRL-1762) and explored its mechanism. CRL-1762 cells were divided into two groups: the treated group was treated with rIL-13(100 µg/L) and the control was without rIL-13 treatment. The effects of rIL-13 on the growth of CRL-1762 cells were detected by cell counting experiment and HE staining. The Hydroxyproline(Hyp) release assay was used to measure total collagen content of the culture supernatant. The expression of IL-13 receptor $\alpha 1$ was determined by RT-PCR. Western blot was used to analyze the level of STAT6 phosphorylated. The results showed that rIL-13 induced significant proliferation of cells and significantly increased Hyp secretion ($P < 0.01$). The expression of IL-13 receptor $\alpha 1$ mRNA was detected in CRL-1762 cells. The level of phosphorylated STAT6 protein in 2h was significantly higher than that in other time, the level of phosphorylated STAT6 has been decreased after 4h of stimulation with IL-13. These demonstrated that IL-13 receptor $\alpha 1$ expression in human keloid fibroblast was observed and rIL-13 upregulated the collagen generation via the STAT6 signaling pathways.

Key words interleukin-13; keloid; fibroblast; collagen

Received: July 5, 2010 Accepted: October 10, 2010

This work was supported by the Scientific and Technological Program Granted by Jiangxi Provincial Educational Department (No. GJJ08083)

*Corresponding author. Tel: 86-791-6362180, E-mail: shixiaoyu999@sina.com.cn