

IL-36 γ 调节JAK-STAT信号通路对人皮肤成纤维细胞功能的影响

葛静瑶¹ 吴晨晨² 张考苑² 胡浩¹ 刘小娟¹ 吴佳莉² 黎满慧¹ 窦侠^{2*} 陈小帆^{1*}

(¹深圳北京大学香港科技大学医学中心生物医学研究所, 皮肤疾病转化医学实验室, 深圳 518036;

²北京大学深圳医院, 皮肤科, 深圳 518036)

摘要 该文探讨了白细胞介素-36 γ (interleukin-36 γ , IL-36 γ)对人皮肤成纤维细胞的活化作用及JAK-STAT信号通路的影响。首先使用IL-36 γ 处理人皮肤原代成纤维细胞, 通过CCK-8法和划痕实验检测细胞增殖和迁移水平; qRT-PCR测定纤维化相关基因(*COL1A1*、*COL3A1*、*COL5A1*、 α -SMA、*CCN2*、*LUM*)的表达情况; 使用基因本体(Gene Ontology, GO)功能分析、京都基因与基因组百科全书数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析和基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)筛选潜在的关键调控途径; Western blot检测JAK-STAT通路中的关键蛋白JAK3和STAT3的表达和活化情况, 并利用选择性通路抑制剂来阻断STAT3的磷酸化, 进而检测IL-36 γ 对皮肤成纤维细胞活化作用的影响。研究结果表明, IL-36 γ 显著增强皮肤成纤维细胞的增殖和迁移能力, 并上调与细胞外基质沉积相关的纤维化相关基因的表达; GO功能分析揭示IL-36 γ 的作用与胞外基质结构成分和胶原蛋白结合等功能有关, KEGG通路富集分析和GSEA进一步显示JAK-STAT通路在IL-36 γ 的作用下被激活; 进一步的实验验证了JAK-STAT信号通路的激活对纤维化相关基因表达的影响。由此提示, IL-36 γ 可有效促进皮肤成纤维细胞的增殖、迁移和活化, 其机制可能与JAK-STAT信号通路的激活密切相关。

关键词 皮肤纤维化疾病; 皮肤成纤维细胞; 细胞外基质; 白细胞介素-36 γ

Regulatory Effects of IL-36 γ on the Function of Human Skin Fibroblasts through JAK-STAT Signaling Pathway

GE Jingyao¹, WU Chenchen², ZHANG Kaoyuan², HU Hao¹, LIU Xiaojuan¹, WU Jiali²,

LI Manhui¹, DOU Xia^{2*}, CHEN Xiaofan^{1*}

(¹Shenzhen Key Laboratory for Translational Medicine of Dermatology,

Shenzhen Peking University-The Hong Kong University of Science and Technology Medical Center, Shenzhen 518036, China;

²Department of Dermatology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, China)

Abstract This study investigates the effects of IL-36 γ (interleukin-36 γ) on the activation of human dermal fibroblasts and its influence on the JAK-STAT signaling pathway. After human primary dermal fibroblasts were treated with IL-36 γ , cell proliferation and migration were assessed using the CCK-8 assay and scratch wound healing assay, respectively. The expression of fibrosis-related genes, including *COL1A1*, *COL3A1*, *COL5A1*, α -SMA, *CCN2*, and *LUM*, were quantified by qRT-PCR. GO (Gene Ontology) functional analysis, KEGG (Kyoto Ency-

收稿日期: 2025-01-16

接受日期: 2025-03-14

深圳市科技计划(批准号: JCYJ20240813162500001)和深圳市科技计划基础研究(自然科学基金)面上项目(批准号: JCYJ20210324105411030)资助的课题

*通信作者。Tel: 13600156947, E-mail: drdouxia@163.com; Tel: 18813987348, E-mail: littlecanva@163.com

Received: January 16, 2025

Accepted: March 14, 2025

This work was supported by the Shenzhen Science and Technology Program (Grant No. JCYJ20240813162500001) and Shenzhen Natural Science Foundation (Grant No. JCYJ20210324105411030)

*Corresponding authors. Tel: +86-13600156947, E-mail: drdouxia@163.com; Tel: +86-18813987348, E-mail: littlecanva@163.com

clopedia of Genes and Genomes) pathway enrichment analysis, and GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) were employed to identify potential regulatory pathways that mediated the effects of IL-36 γ on the activation of human dermal fibroblasts. Western blot analysis was used to detect the expression and activation of JAK3 and STAT3, key proteins in the JAK-STAT pathway. The effects of IL-36 γ on skin fibroblasts were investigated following the inhibition of STAT3 phosphorylation with a selective inhibitor. The results demonstrated that IL-36 γ not only enhanced the proliferation and migration of dermal fibroblasts but also upregulated the expression of fibrosis-associated genes involved in extracellular matrix deposition. GO functional analysis revealed that the effects of IL-36 γ were associated with extracellular matrix structural components and collagen binding. KEGG pathway enrichment analysis and GSEA further indicated activation of the JAK-STAT pathway in response to IL-36 γ . Experimental validation confirmed that activation of the JAK-STAT signaling pathway is critical for regulating fibrosis-related gene expression. These findings suggest that IL-36 γ effectively promotes the proliferation, migration, and activation of dermal fibroblasts through the activation of the JAK-STAT signaling pathway.

Keywords fibrotic skin diseases; skin fibroblasts; extracellular matrix; interleukin-36 γ

皮肤纤维化疾病是临床难治性疾病,其主要特征包括细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度积累以及真皮成纤维细胞的异常活化与增殖。其中真皮成纤维细胞在皮肤纤维化形成过程中处于核心地位^[1]。成纤维细胞的异常活化涉及多因素的复杂调控,包括炎症介质、细胞因子以及机械应力等多种因素之间的相互作用。其中转化生长因子- β (transforming growth factor, TGF- β)作为纤维化过程中的关键因子,与特异性受体结合后可激活Smad信号通路,促进成纤维细胞向肌成纤维细胞的表型转化,并加速胶原蛋白沉积过程^[2]。此外,包括白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)和白细胞介素-13(Interleukin-13, IL-13)在内的其他细胞因子,也被证实能够通过不同的信号转导途径促进成纤维细胞的激活及胶原蛋白的合成^[3-4]。这些细胞因子不仅增强了真皮成纤维细胞的增殖能力,还通过诱导成纤维细胞的迁移和表型转化,进一步推动了皮肤纤维化的进程。近年来,已有报道白细胞介素-36 γ (interleukin-36 γ , IL-36 γ)参与肝、肾、肠等器官纤维化的进程^[5],但IL-36 γ 在皮肤纤维化发病中的具体作用机制尚未得到充分阐述。本研究首次探讨了IL-36 γ 通过激活JAK3-STAT3通路进而调控皮肤成纤维细胞功能的作用,为理解皮肤纤维化的分子机制提供了新的视角。

1 材料与方法

1.1 患者和样本收集

皮肤活检样本均来源于北京大学深圳医院皮

肤科。研究对象在接受皮肤活检前均未进行系统性治疗。对照组样本选取健康受试者的非炎症皮肤组织。本研究已通过北京大学深圳医院伦理委员会审批(伦理批件号:北大深医伦审(2022)第(022)号),且所有研究对象均签署了知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器

无菌PBS、DMEM培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司;分散酶II(D4693)、TRIzol试剂购自美国Sigma-Aldrich公司;DEPC水(R0022)、RIPA裂解液(P0013K)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(P1045)购自中国上海碧云天生物技术股份有限公司;IL-36 γ /IL-1F9蛋白Human(HY-P70670)、STAT3抑制剂Stattic(HY-13818)、CCK-8试剂盒(HY-K0301)购自美国MCE (MedChemExpress)公司;PrimeScript反转录试剂盒(RR036A)购自日本TaKaRa公司;SYBR(439807)购自美国Bio-Rad公司;10% SDS-PAGE一步法凝胶快速制备试剂盒(WB2102)购自中国博泰斯生物技术有限公司;Stat3抗体(#30835)、p-Stat3抗体(#9134)、 β -Tubulin抗体(#2128)购自美国CST(Cell Signaling Technology)公司;JAK3抗体(80331-1-RR)、p-JAK3抗体(29101-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司;辣根过氧化物酶偶联二抗(A9169)购自德国Merck公司;Clarity Western ECL发光底物试剂盒购自美国Bio-Rad公司。

台式低温高速离心机(5810R)、台式小型离心机(5424)购自德国Eppendorf股份公司;Bio-Rad CFX 96实时定量PCR仪购自美国Bio-Rad公司;Nanodrop-2000分光光度计购自美国ThermoFisher

Scientific公司; 酶标仪购自瑞士Tecan公司。

1.3 人原代皮肤成纤维细胞的分离、培养和处理

术后获取的皮肤组织依次用75%乙醇和PBS清洗。随后切除皮下脂肪, 将组织加工成0.5 cm $\times$ 1 cm的小块, 并用2 mg/mL分散酶II在4 $^{\circ}$ C条件下浸没过夜。次日, 用眼科镊分离表皮与真皮, 将分离后的真皮组织进一步切割成0.2 cm $\times$ 0.2 cm的小块, 并贴附于10 cm培养皿表面。滴加含20%胎牛血清和1%青霉素-链霉素溶液的DMEM培养基, 在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下孵育6~7 h后, 补充6~7 mL同成分的DMEM培养基, 继续培养约20天。当原代细胞在10 cm培养皿中覆盖面积约达80%时, 开始剥离组织块。随后, 在37 $^{\circ}$ C且含有5% CO₂的环境中, 向细胞培养皿中加入适量胰蛋白酶-EDTA溶液, 确保覆盖细胞表面, 置于37 $^{\circ}$ C培养箱中消化2~3 min。消化完成后, 将细胞悬液以900 r/min的速度离心3 min, 以收集细胞沉淀。接着, 将沉淀重悬于2 mL含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素溶液的DMEM培养基中, 在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培养条件中培养。用300 ng/mL IL-36 γ 刺激人原代皮肤成纤维细胞, 在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的条件中孵育72 h后进行后续实验分析。用2 μ mol/L Stattic预处理人原代皮肤成纤维细胞24 h, 再经过IL-36 γ 刺激进行后续实验分析。

1.4 人原代皮肤成纤维细胞转录组测序

按照生产商提供的说明书, 使用TRIzol试剂从人原代皮肤成纤维细胞中提取总RNA。提取的RNA样本送至华大基因进行RNA测序。RNA的鉴定、文库制备、测序、质量控制及表达分析均由华大基因完成。

1.5 差异表达基因功能分析

使用DESeq2软件包, 以FDR<0.05、|log₂FC|>1为阈值筛选差异表达基因。使用ggplot2软件包绘制火山图, 可视化不同样本中基因的表达水平和差异程度。使用ClusterProfiler软件包, 对筛选出的差异基因进行功能富集分析, 包括基因本体(Gene Ontology, GO)功能富集分析、京都基因与基因百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析, 以及基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)。GO分析涵盖生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)三个层面。富集分析结果的筛选标准设定为调整后的P值小于0.05, 并使用ggplot2软件包对富集结果进行可视化。

1.6 CCK-8

将处于对数生长期的皮肤成纤维细胞以每孔3 000个细胞的密度接种于96孔板中, 实验组细胞使用含有300 ng/mL IL-36 γ 的DMEM培养基培养, 对照组细胞使用不含IL-36 γ 的DMEM培养基培养。分别处理0 h、24 h、48 h、72 h、96 h后, 加入含有CCK-8试剂的DMEM培养基, 在37 $^{\circ}$ C条件下孵育1.5 h。随后, 使用酶标仪测定450nm波长下的吸光度(D)值, 并对测量结果进行统计分析。

1.7 划痕实验

人皮肤成纤维细胞经300 ng/mL IL-36 γ 刺激72 h后, 以1.5 $\times$ 10⁵个/孔的密度接种于6孔板中。待细胞贴壁并融合至90%~100%单层后, 使用200 μ L无菌枪头轻轻划出划痕。随后, 用PBS缓冲液清洗2次以去除细胞碎片和悬浮细胞, 并加入DMEM培养基进行培养。在0 h、24 h、48 h分别使用倒置显微镜拍摄划痕区域图像, 记录细胞迁移情况。

1.8 蛋白质印迹

使用预冷的PBS润洗成纤维细胞, 随后加入含有磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液以裂解细胞并提取总蛋白。通过10% SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白质, 并将分离后的蛋白转移至PVDF膜上。接着, 用5% BSA对膜室温封闭1 h, 依次孵育一抗(稀释比例为1:1 000)和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗(稀释比例为1:10 000)。最后, 使用Clarity Western ECL发光底物试剂盒进行信号检测。

1.9 总RNA的荧光实时定量分析

提取的总RNA浓度通过Nanodrop-2000分光光度计进行测定。使用PrimeScript反转录试剂盒进行cDNA合成。基因表达水平通过Bio-Rad CFX 96实时定量PCR仪检测, 目的基因包括COL1A1、COL3A1、COL5A1、 α -SMA、CCN2、LUM、JAK3、STAT3和PIMI。相对mRNA表达量采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}方法计算。qRT-PCR反应体系包括10 μ L SYBR Green PCR Master Mix、0.8 μ L引物混合物和2 μ L cDNA模板。表1列出了本研究中所用引物序列。

1.10 统计学方法

采用SPSS软件进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准误表示。所有数据进行正态分布和方差齐性检验, 两组样本符合正态分布, 采用独立样本t检验; 若两组样本不符合正态分布, 采用非参数检验。组间样

本均数两两比较, 样本符合正态分布, 采用单因素方差分析和Tukey多重比较; 若样本不符合正态分布, 采用单因素方差分析和Dunn多重比较。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义(* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)。

2 结果

2.1 IL-36 γ 对皮肤成纤维细胞增殖的影响

与对照组相比, 经IL-36 γ 处理的皮肤成纤维细

胞的增殖速率显著提高($P<0.001$)。在48 h、72 h和96 h的培养时间点, IL-36 γ 处理组的皮肤成纤维细胞与对照组的增殖差异呈现出随时间递增的趋势, 具体结果详见图1。

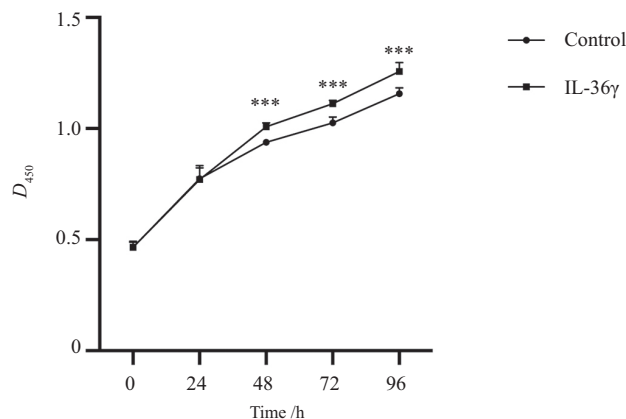
2.2 IL-36 γ 对皮肤成纤维细胞迁移的影响

与对照组相比, IL-36 γ 处理的皮肤成纤维细胞迁移速度显著加快。培养24 h后, IL-36 γ 处理组的划痕愈合率达到了57%, 而在48 h后达到了91%, 这

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
β -actin	Forward: CCT GGC ACC CAG CAC AAT Reverse: GGG CCG GAC TCG TCA TAC
COL1A1	Forward: GAT TCC CTG GAC CTA AAG GTG C Reverse: AGC CTC TCC ATC TTT GCC AGC A
COL3A1	Forward: TGG TCT GCA AGG AAT GCC TGG A Reverse: TCT TTC CCT GGG ACA CCA TCA G
COL5A1	Forward: GGA GAT GAT GGT CCC AAA GGC A Reverse: CCA TCA TCT CCT TTG TCA CCA GG
α -SMA	Forward: CTA TGC CTC TGG ACG CAC AAC T Reverse: CAG ATC CAG ACG CAT GAT GGC A
CCN2	Forward: CTT GCG AAG CTG ACC TGG AAG A Reverse: CCG TCG GTA CAT ACT CCA CAG A
LUM	Forward: AAC ATA CCA ACT GTC AAT GAA AAC C Reverse: TGC CAT CCA AAC GCA AAT GCT TG
JAK3	Forward: AGT GAC CCT CAC TTC CTG CTG T Reverse: GGC TGA ACC AAG GAT GAT GTG G
STAT3	Forward: CTT TGA GAC CGA GGT GTA TCA CC Reverse: GGT CAG CAT GTT GTA CCA CAG G
PIM1	Forward: TCT ACT CAG GCA TCC GCG TCT C Reverse: CTT CAG CAG GAC CAC TTC CAT G



*** $P<0.001$, 与相同时间条件下Control组相比。

*** $P<0.001$ compared with the Control group at the same time conditions.

图1 不同时间点IL-36 γ 对皮肤成纤维细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of IL-36 γ on the proliferation of dermal fibroblasts at different time conditions

两个时间点的愈合率均显著高于对照组的34%和77%。见图2。

2.3 IL-36 γ 对皮肤成纤维细胞纤维化相关基因表达的影响

与对照组相比,在IL-36 γ 处理的皮肤成纤维细胞中,与细胞外基质沉积相关的纤维化相关基因 *COL1A1*、*COL3A1*、*COL5A1*、*CCN2*、*LUM*的mRNA表达水平显著上调。而肌成纤维细胞转化标志基因 α -*SMA*无显著改变,见图3。

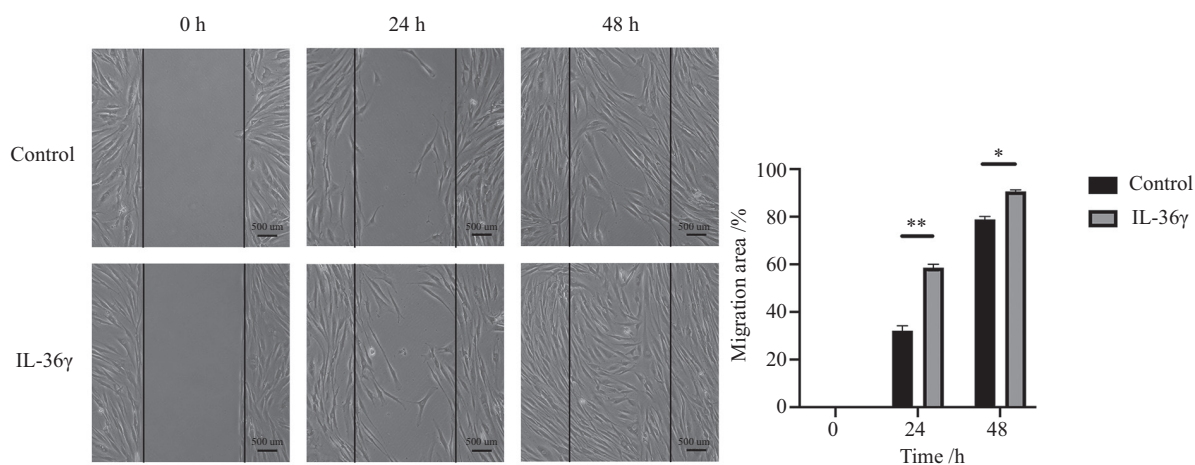
2.4 主成分分析与差异基因分析揭示IL-36 γ 处理组与对照组间的表达差异

样本间的主成分分析(principal component analysis, PCA)结果表明,各组内样本的表达模式具有高度的相似性和良好的可重复性。对照组72 h(对照_72 h组)与IL-36 γ 处理72 h(IL-36 γ _72 h组)之间的样本表现出显著的差异,见图4。以FDR<0.05、 $|\log_2FC|>1$ 为标准,筛选差异表达基因并绘制火山图;

与对照_72 h组相比,IL-36 γ _72 h组有2 066个差异表达基因,其中包括958个上调基因和1 108个下调基因,见图5。

2.5 差异基因的功能富集分析显示IL-36 γ 处理显著激活JAK-STAT信号通路

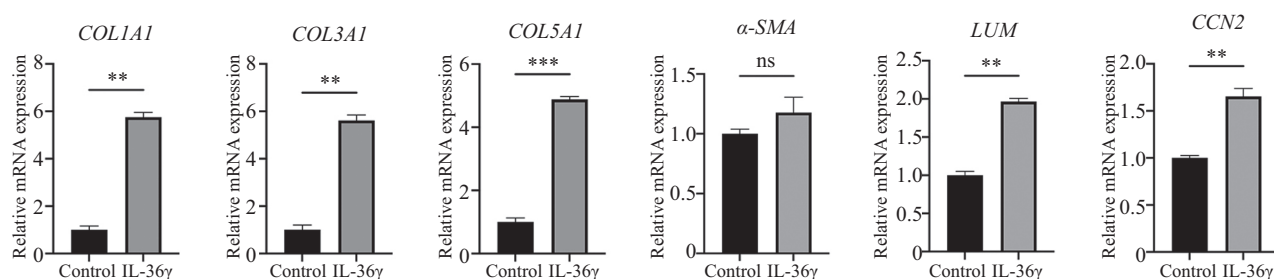
为揭示差异表达基因所参与的生物学通路,对显著上调的差异基因集进行GO和KEGG通路富集分析。GO功能注释显示,这些差异基因在分子功能上显著富集于细胞外基质结构成分及与胶原蛋白结合相关的功能等;在细胞组分方面,主要富集于细胞外区域和含胶原蛋白的细胞外基质等。此外,这些基因主要参与的生物学过程包括细胞黏附、细胞分裂、细胞外基质组成等,见图6。KEGG通路富集分析提示了PI3K-AKT信号通路、JAK-STAT信号通路、TNF信号通路等可能与差异基因表达相关,见图7。GSEA分析结果进一步显示JAK-STAT信号通路在IL-36 γ 处理组中显著上调,提示其可能参与IL-



* $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图2 不同时间点IL-36 γ 对皮肤成纤维细胞迁移的影响

Fig.2 Effect of IL-36 γ on the migration of dermal fibroblasts at different time conditions



^{ns} $P>0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图3 IL-36 γ 对皮肤成纤维细胞纤维化相关基因表达的影响

Fig.3 Effect of IL-36 γ on the expression of fibrosis marker genes in dermal fibroblasts

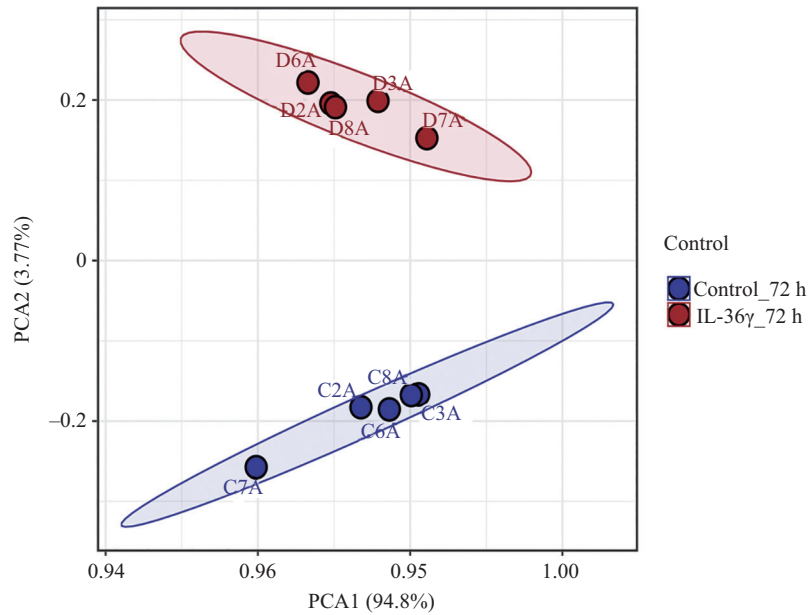


图4 样本间主成分分析

Fig.4 Principal component analysis between samples

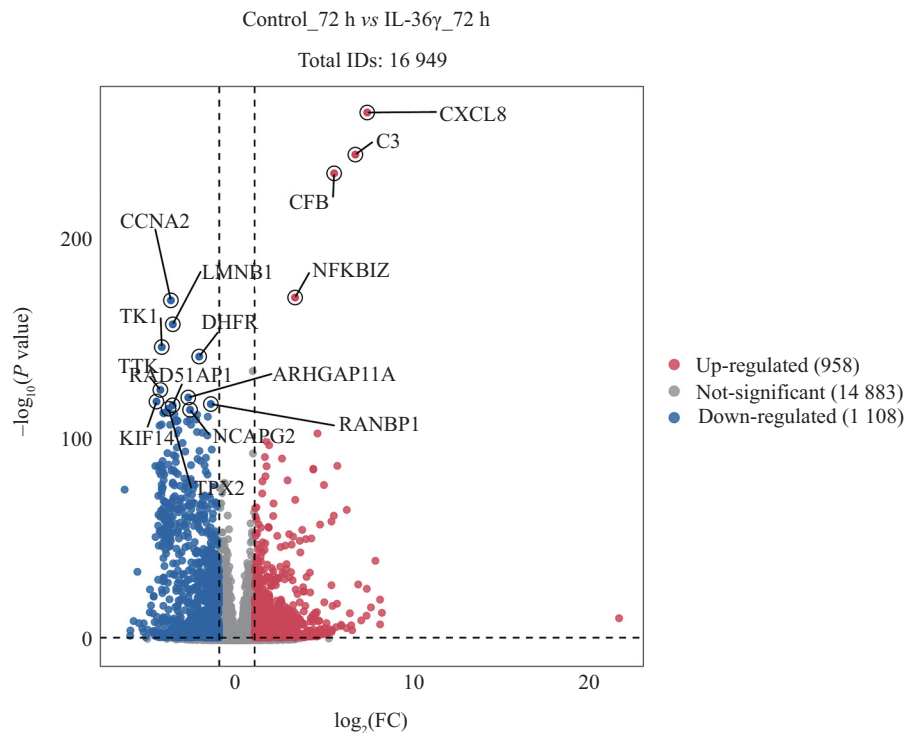


图5 Control_72 h组与IL-36γ_72 h组差异基因火山图

Fig.5 Volcano map of genes differentially regulated in the IL-36γ_72 h group compared with the Control_72 h group

36γ调控纤维化标志基因表达的过程。我们进一步检测了转录组测序数据中JAK-STAT信号通路相关基因的表达变化。结果显示, JAK-STAT通路相关基因 *JAK3*、*STAT3*、*PIM1* 的 mRNA 表达水平在 IL-36γ

处理的皮肤成纤维细胞中显著上调, 见图8。

2.6 JAK-STAT信号通路介导了IL-36γ调节皮肤成纤维细胞中纤维化标志基因的表达

Western blot结果显示, JAK-STAT信号通路关键

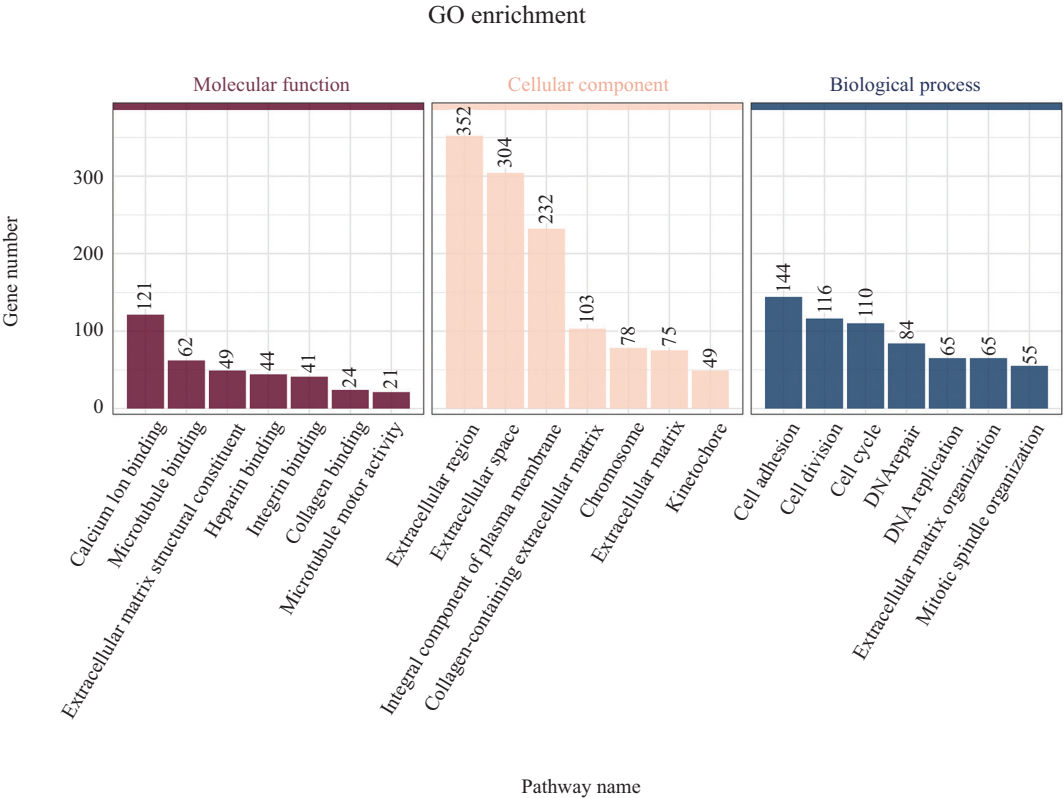


图6 IL-36 γ _72 h组与对照_72 h组间差异基因富集的GO通路

Fig.6 Regulated genes GO enrichment analysis in the IL-36 γ _72 h group compared with the Control_72 h group

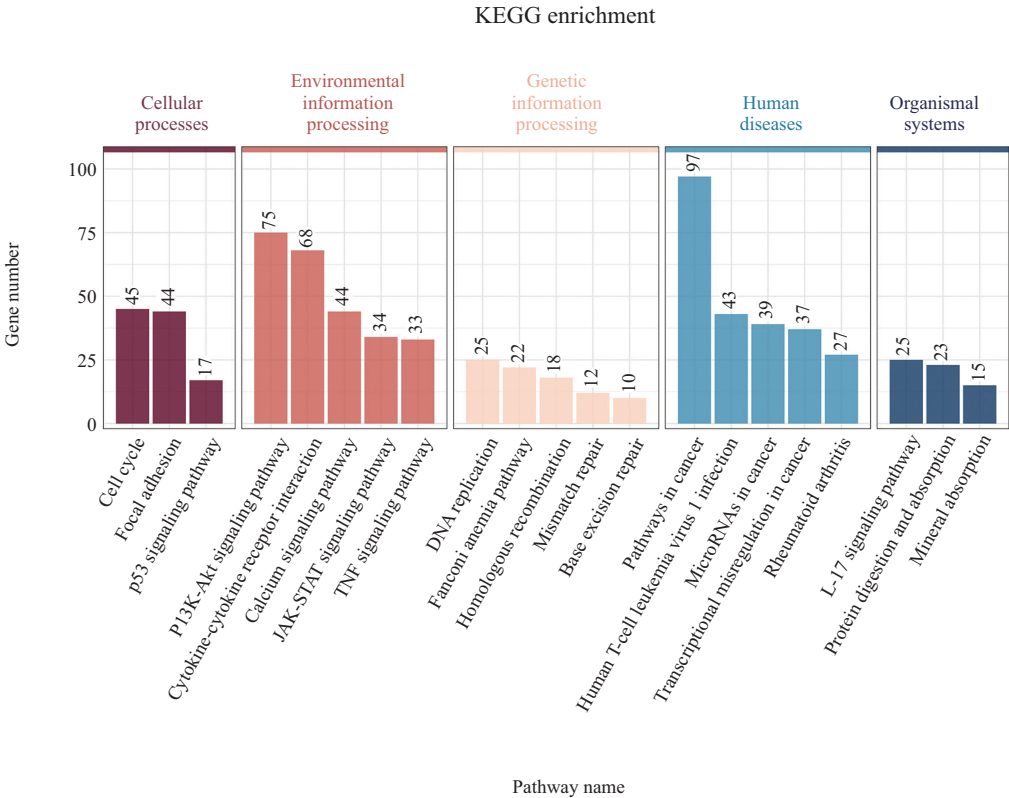


图7 IL-36 γ _72 h组与对照_72 h组间差异基因富集的KEGG通路

Fig.7 Regulated genes KEGG enrichment analysis in the IL-36 γ _72 h group compared with the Control_72 h group

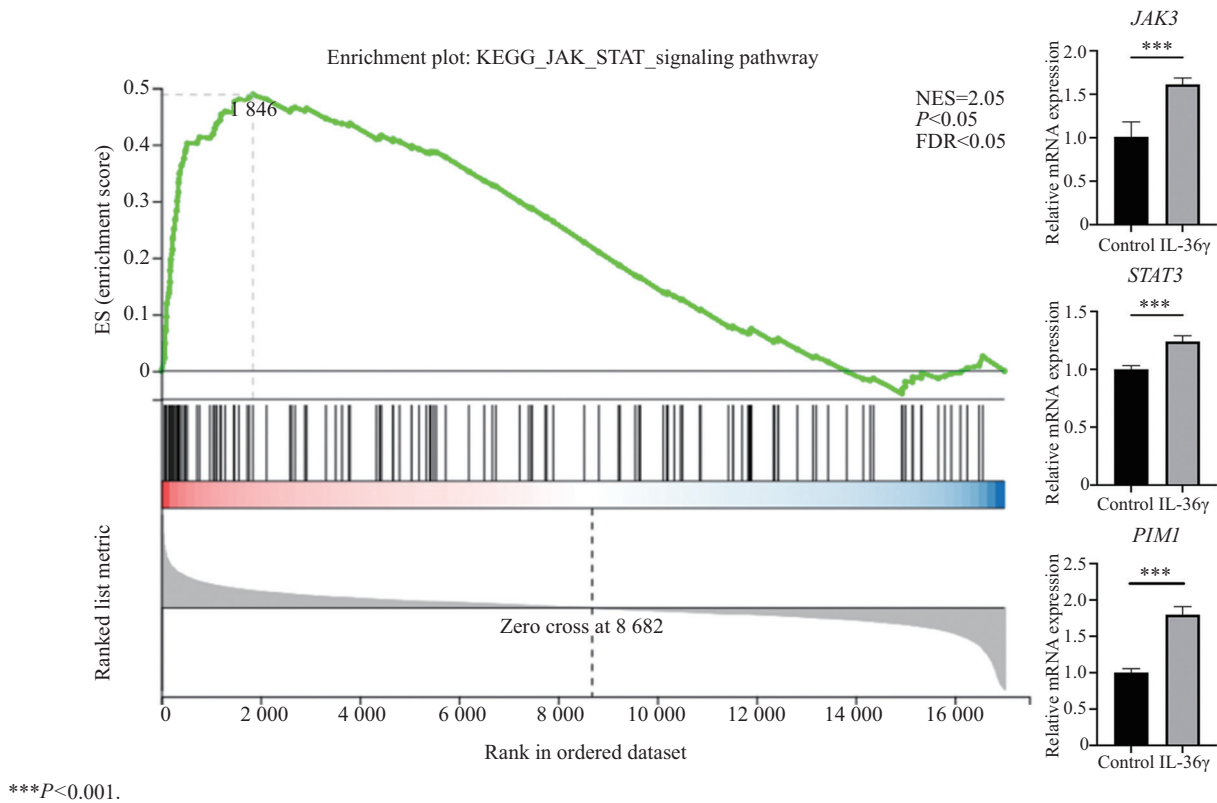


图8 IL-36 γ _72 h组真皮成纤维细胞中JAK-STAT通路相关基因显著上调

Fig.8 JAK-STAT pathway-related genes were significantly upregulated in dermal fibroblasts in the IL-36 γ _72 h group

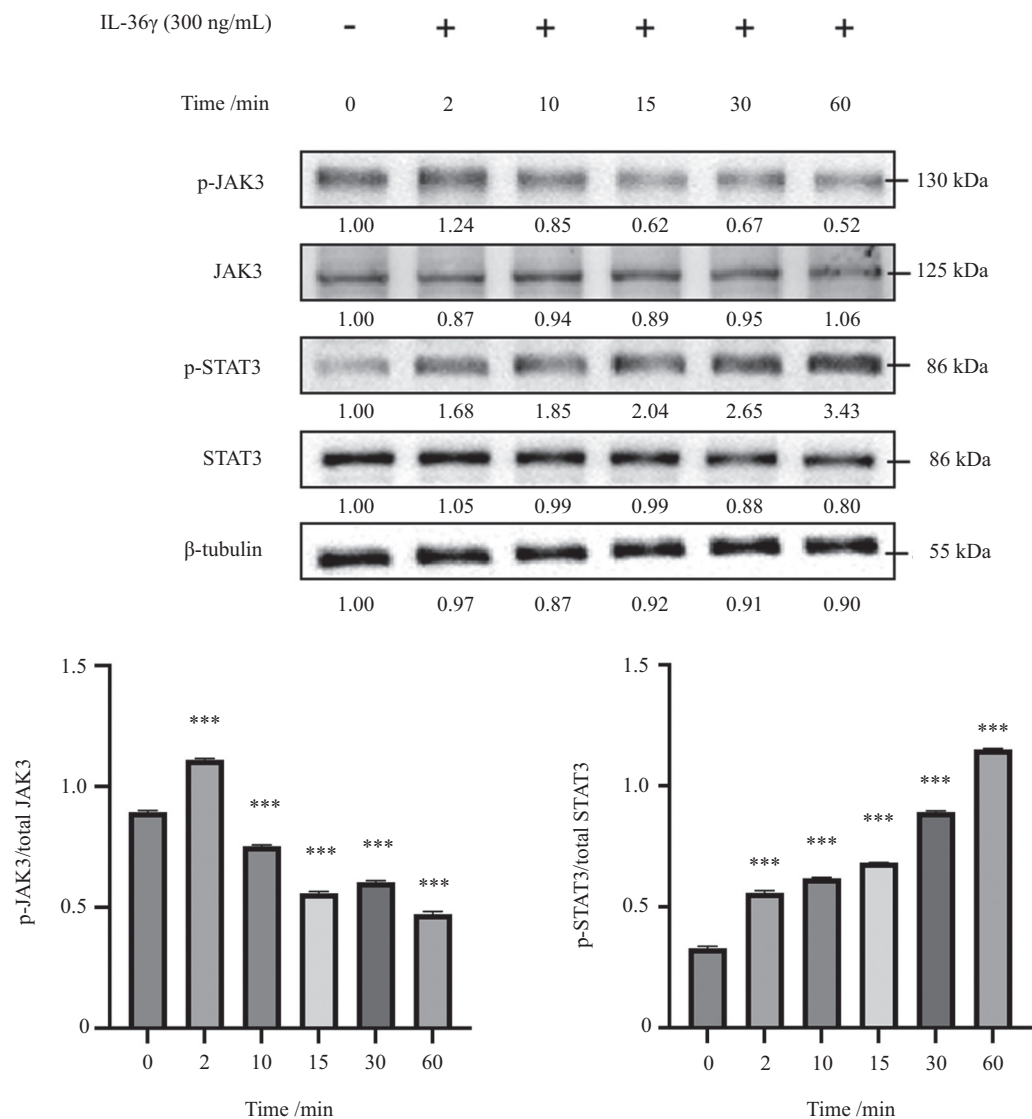
蛋白JAK3的磷酸化水平在IL-36 γ 刺激2 min时达到高峰,随后其磷酸化水平逐渐下降,而STAT3的磷酸化水平在IL-36 γ 处理15 min后随着时间的推移持续增强。这表明JAK3-STAT3信号通路在IL-36 γ 的作用下被持续激活,见图9。Western blot结果显示,选择性STAT3抑制剂Stattic处理可显著抑制STAT3的磷酸化,见图10。有趣的是,IL-36 γ 诱导的与细胞外基质沉积相关的纤维化标志基因的表达水平显著下降,而与肌成纤维细胞转化相关的标志基因 α -SMA无显著改变,见图11。

3 讨论

纤维性皮肤病包括硬皮病、增生性瘢痕和瘢痕疙瘩等,它们的发病通常与慢性炎症、成纤维细胞异常活化以及细胞外基质过度沉积密切相关^[6]。皮肤纤维化疾病不仅对患者的皮肤结构和功能造成不可逆的损害,还可能引发剧烈瘙痒、疼痛以及活动受限等症状,严重影响患者的生活质量和心理健康^[7]。目前,针对皮肤纤维化疾病的治疗主要包括抗炎药物、免疫抑制剂、物理治疗以及手术切除等方法,但这

些手段往往疗效有限且存在副作用,较难获得理想的治疗效果^[8-10]。因此,深入研究皮肤纤维化疾病的病理机制,探索疾病发病的关键靶点,将为开发高效、特异的治疗策略奠定基础。

既往研究发现多种炎症因子在皮肤纤维化疾病的发生和发展中发挥关键的启动和促进作用。通过阻断这些炎症因子的信号转导途径,可以有效地减轻纤维化症状^[11]。例如,针对IL-6受体的单克隆抗体药物Tocilizumab已应用于治疗系统性硬化症^[12];靶向TGF- β 的人源化单克隆抗体药物Fresolimumab在临床前研究中也显示出改善系统性硬化症纤维化进展的潜力^[13]。IL-36 γ 是IL-1超家族的成员,作为一种促炎细胞因子,已被证实参与多种炎症性及纤维性疾病的发病过程。例如,ZHENG等^[14]和ZHANG等^[15]在特发性肺纤维化患者中发现,IL-36 γ 的水平显著升高,并且其表达水平与病理进展密切相关。实验研究已经表明,在小鼠和人类成纤维细胞中IL-36R的激活会导致肠道纤维化和组织重塑相关基因的表达水平增加。IL-36R功能阻断已被证实可减轻结肠炎和纤维化的程度^[16]。基于HPA(human



*** $P < 0.001$, 与0 min组相比。
*** $P < 0.001$ compared with the 0 min group.

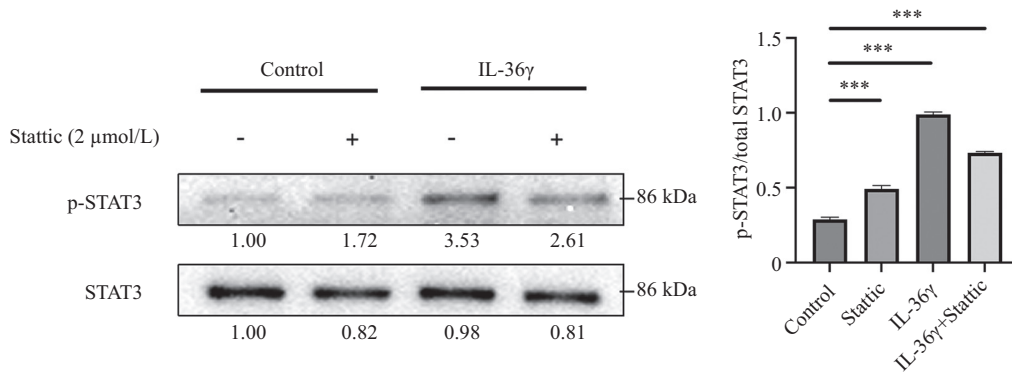
图9 Western blot检测IL-36 γ 诱导的JAK-STAT通路中JAK3和STAT3蛋白随时间的表达变化

Fig.9 Western blot analysis of the time-dependent expression changes of JAK3 and STAT3 protein in the IL-36 γ -mediated JAK-STAT signaling pathway

protein atlas)数据库的转录组学分析(<https://www.proteinatlas.org/>), 我们发现IL-36 γ 在皮肤组织中的表达水平显著高于肺、肠道等器官, 提示IL-36 γ 可能在皮肤纤维化进程中发挥重要的调控作用。进一步整合HPA数据库信息与已发表文献数据发现, 皮肤中IL-36 γ 在表皮角质形成细胞中特异性高表达^[17]。角质形成细胞为皮肤特有的上皮细胞类型, 因此IL-36 γ /JAK3/STAT3信号轴构成了皮肤纤维化独特的分子基础, 同时也为开发针对皮肤纤维化的靶向治疗策略提供了关键线索。

本研究进一步对IL-36 γ 处理的皮肤成纤维细胞

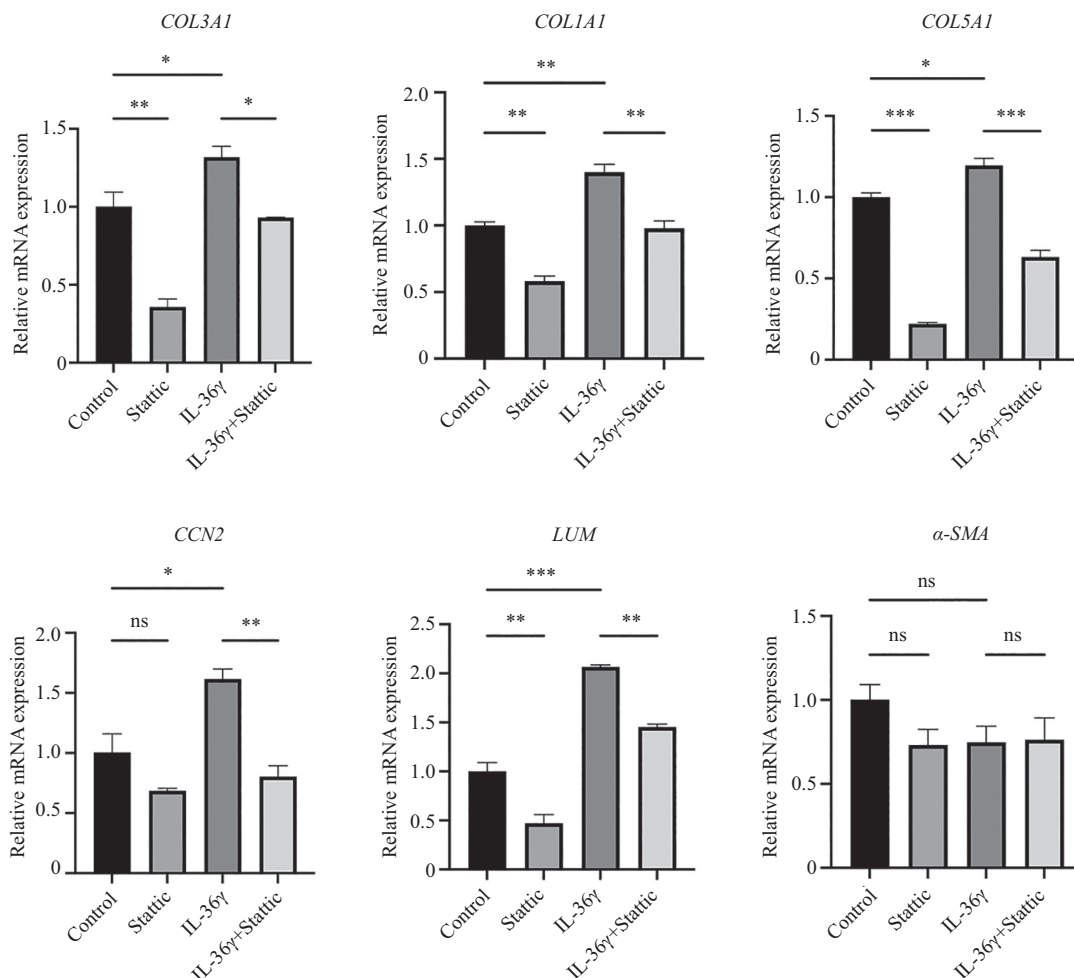
进行了转录组测序。KEGG分析结果显示, IL-36 γ 刺激72 h后, 皮肤成纤维细胞中PI3K-AKT、TNF、JAK-STAT等信号通路均显著富集。但GSEA分析结果发现PI3K-AKT信号通路在IL-36 γ 处理组中无显著差异, 且因为TNF信号通路主要与炎症反应相关, 而JAK-STAT信号通路被广泛报道直接参与纤维化, 所以后续实验重点探讨了JAK-STAT通路介导的IL-36 γ 调控纤维化机制。JAK-STAT信号通路在细胞增殖、分化、凋亡和免疫调控等多种生物学过程中发挥重要作用。其核心机制是通过细胞因子或生长因子与细胞膜受体的结合, 诱导JAK激酶活化后



*** $P < 0.001$.

图10 Western blot分析IL-36 γ 诱导的成纤维细胞中JAK-STAT通路的激活情况, 比较有无Stattic处理的差异

Fig.10 Western blot analysis of the activation of the JAK-STAT pathway in IL-36 γ induced fibroblasts with or without Stattic treatment



^{ns} $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图11 qRT-PCR分析IL-36 γ 对皮肤成纤维细胞纤维化相关基因表达的影响, 比较有无Stattic处理的差异

Fig.11 qRT-PCR analysis of the effect of IL-36 γ on the expression of fibrosis marker genes in dermal fibroblasts with or without Stattic treatment

促进STAT蛋白磷酸化并转位至细胞核, 最终调控目标基因的表达^[18]。近年研究发现JAK-STAT信号通路与组织纤维化密切相关^[19]。例如, 在肝纤维化中,

STAT3通过上调TGF- β 1和血管内皮生长因子的表达加剧肝纤维化^[20-21]。在肺纤维化进程中, IL6-JAK2-STAT1/3的异常激活被证实与炎症因子释放和纤维

化标志物表达增加密切相关^[22]。在小鼠肾纤维化模型中, JAK-STAT通路的激活与成纤维细胞聚集和细胞外基质沉积显著相关^[23]。本研究揭示了JAK-STAT信号通路在IL-36 γ 诱导的皮肤成纤维细胞中介导细胞外基质沉积相关的纤维化相关基因的表达上调。通过应用特定的通路靶向抑制剂来阻断JAK-STAT信号通路, 可逆转IL-36 γ 诱导皮肤成纤维细胞中该类纤维化相关基因的上调表达效应。这提示IL-36 γ 可能通过激活JAK-STAT信号通路, 促进皮肤成纤维细胞外基质的沉积, 进而在皮肤纤维化疾病的发生与发展中发挥重要作用。

目前的研究仅局限于体外实验, 未能在体内环境中验证IL-36 γ 的致皮肤纤维化作用及其缓解机制。因此, 未来的研究应当在动物模型中验证IL-36 γ 在皮肤纤维化疾病中的作用, 并深入探究其参与疾病产生的机制, 为开发新的治疗策略提供更坚实的理论依据。此外, KEGG分析也显示PI3K-AKT和TNF信号通路在IL-36 γ 处理组中显著富集, PI3K-AKT信号通路可通过增强TGF- β 信号通路的作用参与纤维化, 而TNF信号通路通过招募免疫细胞浸润的方式参与纤维化, 因此这些信号通路可能和JAK-STAT通路协同调控成纤维细胞的纤维化反应^[24-26]。因此, 下一步将深入研究IL-36 γ 在纤维化中的多通路交叉调控网络。除了参与肠、肝、肾等器官的纤维化外, IL-36 γ 在扁桃体、食管、肝、阴道中均有表达, 这表明IL-36 γ 可能具有广泛的纤维化调控功能。未来, IL-36 γ 或有望被开发为多器官纤维化疾病的潜在治疗靶标。综上所述, 本研究首次发现IL-36 γ 通过激活JAK3-STAT3通路, 诱导皮肤成纤维细胞增殖、迁移, 并显著上调与细胞外基质沉积相关的纤维化标志基因表达。上述结果揭示了IL-36 γ 在皮肤纤维化中的调控作用, 这提示阻断IL-36信号转导可能成为未来治疗皮肤纤维化疾病的新方向。

参考文献 (References)

- [1] DENG C C, HU Y F, ZHU D H, et al. Single-cell RNA-seq reveals fibroblast heterogeneity and increased mesenchymal fibroblasts in human fibrotic skin diseases [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3709.
- [2] ZHANG T, WANG X F, WANG Z C, et al. Current potential therapeutic strategies targeting the TGF- β /Smad signaling pathway to attenuate keloid and hypertrophic scar formation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 110287.
- [3] ANDERSON-CRANNAGE M, ASCENSIÓN A M, IBANEZ-SOLÉ O, et al. Inflammation-mediated fibroblast activation and immune dysregulation in collagen VII-deficient skin [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1211505.
- [4] WYNN T A. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis [J]. *J Exp Med*, 2011, 208(7): 1339-50.
- [5] SUGIURA K, FUJITA H, KOMINE M, et al. The role of interleukin-36 in health and disease states [J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2024, 38(10): 1910-25.
- [6] PEÑA O A, MARTIN P. Cellular and molecular mechanisms of skin wound healing [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25(8): 599-616.
- [7] MURAKAMI T, SHIGEKI S. Pharmacotherapy for keloids and hypertrophic scars [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(9): 4674.
- [8] MA Q Y, YANG Y T, CHEN Z A, et al. Laser combined with radiotherapy for keloid treatment: a novel and efficient comprehensive therapy with a lower recurrence rate [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2023, 152(6): 1022e-9e.
- [9] KREUTER A, MOINZADEH P, KINBERGER M, et al. S2k guideline: diagnosis and therapy of localized scleroderma [J]. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2024, 22(4): 605-20.
- [10] AN Y, LIN S, TAN X, et al. Exosomes from adipose-derived stem cells and application to skin wound healing [J]. *Cell Prolif*, 2021, 54(3): e12993.
- [11] DISTLER J H W, GYÖRFI A H, RAMANUJAM M, et al. Shared and distinct mechanisms of fibrosis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2019, 15(12): 705-30.
- [12] KHANNA D, LIN C J F, FURST D E, et al. Tocilizumab in systemic sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. *Lancet Respir Med*, 2020, 8(10): 963-74.
- [13] RICE L M, PADILLA C M, MCLAUGHLIN S R, et al. Fresolimumab treatment decreases biomarkers and improves clinical symptoms in systemic sclerosis patients [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(7): 2795-807.
- [14] ZHENG W, HU X, ZOU M, et al. Plasma IL-36 α and IL-36 γ as potential biomarkers in interstitial lung disease associated with rheumatoid arthritis: a pilot study in the chinese population [J]. *Inflammation*, 2023, 46(1): 285-96.
- [15] ZHANG Q, GUO L, SONG X, et al. Serum IL-36 cytokines levels in idiopathic pulmonary fibrosis and connective tissue disease-associated interstitial lung diseases [J]. *Clin Chim Acta*, 2022, 530: 8-12.
- [16] SCHEIBE K, KERSTEN C, SCHMIED A, et al. Inhibiting interleukin 36 receptor signaling reduces fibrosis in mice with chronic intestinal inflammation [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(4): 1082-97, e11.
- [17] ELIAS M, ZHAO S, LE H T, et al. IL-36 in chronic inflammation and fibrosis-bridging the gap [J]? *J Clin Invest*, 131(2): e144336.
- [18] XUE C, YAO Q, GU X, et al. Evolving cognition of the JAK-STAT signaling pathway: autoimmune disorders and cancer [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 204.
- [19] LIU J, WANG F, LUO F. The role of JAK/STAT pathway in fibrotic diseases: molecular and cellular mechanisms [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(1): 119.
- [20] XU M Y, HU J J, SHEN J, et al. Stat3 signaling activation cross-linking of TGF- β 1 in hepatic stellate cell exacerbates liver injury and fibrosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842(11): 2237-45.
- [21] OGATA H, CHINEN T, YOSHIDA T, et al. Loss of SOCS3 in

- the liver promotes fibrosis by enhancing STAT3-mediated TGF- β 1 production [J]. *Oncogene*, 2006, 25(17): 2520-30.
- [22] XUE Z, ZHAO F, SANG X, et al. Combination therapy of tanshinone IIA and puerarin for pulmonary fibrosis via targeting IL6-JAK2-STAT3/STAT1 signaling pathways [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(10): 5883-98.
- [23] CHEN W, YUAN H, CAO W, et al. Blocking interleukin-6 trans-signaling protects against renal fibrosis by suppressing STAT3 activation [J]. *Theranostics*, 2019, 9(14): 3980-91.
- [24] TANG Q, MARKBY G R, MACNAIR A J, et al. TGF- β -induced PI3K/AKT/mTOR pathway controls myofibroblast differentiation and secretory phenotype of valvular interstitial cells through the modulation of cellular senescence in a naturally occurring in vitro canine model of myxomatous mitral valve disease [J]. *Cell Prolif*, 2023, 56(6): e13435.
- [25] LIANG Y, SUN X, WANG M, et al. PP2A α promotes macrophage accumulation and activation to exacerbate tubular cell death and kidney fibrosis through activating Rap1 and TNF α production [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(9): 2728-44.
- [26] QIN W, CAO L, MASSEY I Y. Role of PI3K/Akt signaling pathway in cardiac fibrosis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(11): 4045-59.