

# JAK2/STAT3 信号通路对激素性股骨头坏死大鼠滑膜组织中细胞因子的影响

福建省福州市第二医院骨科一区（福州 350007） 翁 艳 江文锦 周燕芸

**【摘 要】 目的** 探讨 JAK2/STAT3 信号通路对激素性股骨头坏死大鼠滑膜组织中细胞因子的影响。**方法** 构建股骨头坏死大鼠模型，按照注射生理盐水和 AG490 浓度的不同分为 A、B、C、D、E 组，RT-PCR 技术检测滑膜组织细胞因子 JAK2、STAT3 和血管内皮生长因子 VEGF、HIF-1 $\alpha$ 、CYP3A mRNA 的含量，Western blot 检测 JAK2、STAT3、TGF- $\beta$ 、BMP2、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CYP3A 蛋白的表达。**结果** 与 A、B、C 组相比较，D、E 组 JAK2、STAT3 mRNA 及蛋白表达

---

基金项目：2018 年度福州市卫生计生中青年科学研究项目（2018-S-wq21）

量下降, D、E 组 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CYP3A mRNA 及 TGF- $\beta$ 、BMP2、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CYP3A 蛋白表达量更高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); D 与 E 组相比较, HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CYP3A 等因子的 mRNA 及蛋白表达量差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论 注射 JAK2/STAT3 特异性抑制剂 AG490 会降低 JAK2/STAT3 的量, 并且随着 AG490 注射量的增加, JAK2/STAT3 水平逐步下降, 进而引起 TGF- $\beta$ 、BMP2、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CYP3A 蛋白含量的下降, 改善骨组织微环境。

【关键词】JAK2/STAT3 信号通路; 激素性股骨头坏死; 细胞因子

【中图分类号】R34 【文献标识码】A 【文章编号】1002-2600(2019)02-0131-04

股骨头坏死 (osteonecrosis of femoral head, ONFH) 又称股骨头缺血性坏死, 临床上有创伤性 ONFH 和非创伤性 ONFH 之分。造成非创伤性 ONFH 的一个重要原因是大剂量糖皮质激素的普遍应用<sup>[1]</sup>。ONFH 随病情进展, 会继发股骨头塌陷和骨性关节炎, 出现难以忍受的疼痛和关节强直, 给患者带来极大的生理和心理负担<sup>[2-3]</sup>。目前关于激素性股骨头坏死发病机制的理论包括血管栓塞、血管壁损伤、骨内高压和血管内凝血等, 这些都与股骨头局部血供的受损密切相关, 缺血缺氧是激素性股骨头坏死的关键因素。

活化的 Janus 蛋白酪氨酸激酶 2/信号转导和转录激活子 3 (januskinase signal transducers 2 and activator of transcription3, JAK2 /STAT3) 信号通道能够通过调控促血管生成因子的表达。因此, 本研究用不同浓度 JAK2 /STAT3 特异性抑制剂 AG490 处理股骨头坏死大鼠模型, RT-PCR 技术检测滑膜组织细胞因子 JAK2、STAT3 和血管内皮生长因子 (januskinase signal transducers 2 and activator of transcription3, VEGF)、低氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )、细胞色素 P4503A (cytochromeP4503A, CYP3A) mRNA 的含量, Western blot 检测 JAK2、STAT3、转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein 2, BMP2)、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CYP3A 蛋白的表达, 分析 JAK2/STAT3 信号通路与股骨头坏死大鼠滑膜组织中细胞因子的关系, 探讨抑制 JAK2/STAT3 信号通路对激素性股骨头坏死大鼠滑膜组织中细胞因子的影响。

## 1 材料与方法

1.1 材料: 成年雄性 SD 大鼠由北京维通利华公司提供, 年龄 12 周, 体质量 (350 $\pm$ 20) g, 生产许可证号: SCXK (京) 2010-0028, 质量合格证号: 0000168。一抗 STAT3 (1 : 500)、磷酸化 STAT3 (P-STAT3, 1 : 500)、HIF-1 $\alpha$  (1 : 500) 和 VEGF (1 : 500) 均购自美国 CST 公司; 二抗购自丹麦 Dako 公司; 化学发光试剂盒购自美国 Pierce

公司; JAK2 选择性抑制剂 AG-490、LPS 购自美国 Sigma 公司; 其他材料还有 DMEM 培养基、10%胎牛血清 (FBS)、甲强龙 (美国辉瑞公司)。

### 1.2 实验方法:

1.2.1 股骨头坏死大鼠模型的构建: 称量大鼠体质量, 腹腔注射 LPS (20  $\mu$ g/kg) 两次, 每次间隔 24 h, 24 h 后两侧臀肌交替注射甲强龙 (40 mg/kg) 3 次, 每次间隔 24 h。

1.2.2 实验分组: 随机将股骨头坏死大鼠模型分为 A、B、C、D、E 组, 每组 5 只, 分别将生理盐水、25  $\mu$ mol/L、50  $\mu$ mol/L、100  $\mu$ mol/L、150  $\mu$ mol/L AG490 注射到 A、B、C、D、E 组股骨头坏死大鼠模型中。

1.2.3 RT-PCR 检测不同浓度 AG490 下 JAK2、STAT3、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CYP3A mRNA 的表达: 在股骨头坏死大鼠模型膝关节正中纵行切开皮肤后, 分离其肌肉并暴露膝关节, 再用手术刀片刮取其中的滑膜组织。Real-time PCR 定量检测滑膜组织中 JAK2、STAT3、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CYP3A 的 mRNA 含量。反应扩增条件如下: 逆转录 1 个循环, 60  $^{\circ}$ C, 30 min; 预变性 1 个循环, 90  $^{\circ}$ C, 3 min; 变性、退火延伸共 46 个循环, 95  $^{\circ}$ C, 10 s, 55  $^{\circ}$ C, 在 55  $^{\circ}$ C 时采集荧光信号。引物序列由上海生工生物工程公司合成, 部分引物序列如下: JAK2 上游引物 5'-TAAATGGAGAAGACGGCCTGA-3', 下游引物 5'-ACGGTGAAGAGTGATGGACAG-3'; STAT3 上游引物 5'-AGGACGCGAGAATGAAGGAG-3', 下游引物 5'-TGTTCTCCAGGTCTCCCTGG-3'; HIF-1 $\alpha$  上游引物 5'-GCAGGAAATGGCGACGATG T-3', 下游引物 5'-CAGCAAGGAGATCACAAACAG-3'。反应在 LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪上进行, 结果以 Ct 值形式得到, 实验重复测量 3 次。

1.2.4 Western blot 检测不同浓度 AG490 下 JAK2、STAT3、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CYP3A、TGF- $\beta$ 、BMP2 蛋白的表达: 提取总蛋白, 电泳, 转膜, 5%脱脂奶粉封闭 2 h; 一抗稀释比例均为 1 : 500, 4  $^{\circ}$ C 过夜; TBST 洗膜 3 次, 10 min /次;

加入 1 : 5 000 稀释的二抗, 室温孵育 2 h; TBST 洗膜 3 次, 10 min/次; 以 GAPDH 作为内参。化学发光试剂盒使蛋白条带显色发光。实验重复 3 次, 并且独立完成。

**1.3 统计学分析:** 用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行分析, 计量资料以均数±标准差表示, 多组之间的两两比较采用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  表示结果具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同浓度 AG490 对 JAK2、STAT3、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CYP3A mRNA 表达的影响:** 与 A、B、C 组相比较, D、E 组 JAK2、STAT3 mRNA 表达量下降, D、E 组 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CYP3A mRNA 表达量升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); D 与 E 组相比较, JAK2、STAT3、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CYP3A mRNA 表达量差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 不同浓度 AG490 对 JAK2、STAT3、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CYP3A mRNA 表达的影响 (n=5,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	JAK2	STAT3	HIF-1 $\alpha$	VEGF	CYP3A
A 组	0.98±0.07	0.94±0.29	1.21±0.37	1.17±0.15	1.21±0.35
B 组	0.83±0.23	0.83±0.72	1.31±0.29	1.32±0.13	1.35±0.53
C 组	0.75±0.01	0.79±0.36	1.48±0.06	1.39±0.42	1.46±0.72
D 组	0.59±0.92*# $\Delta$	0.53±0.82*# $\Delta$	1.77±0.08*# $\Delta$	1.74±0.05*# $\Delta$	1.76±0.82*# $\Delta$
E 组	0.61±0.54*# $\Delta$	0.55±0.54*# $\Delta$	1.78±0.09*# $\Delta$	1.75±0.06*# $\Delta$	1.75±0.36*# $\Delta$

注: 与 A 组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 B 组比较, #  $P < 0.05$ ; 与 C 组比较,  $\Delta P < 0.05$ 。

**2.2 不同浓度 AG490 对 JAK2、STAT3、TGF- $\beta$ 、BMP2、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CYP3A 蛋白表达的影响:** 与 A、B、C 组相比较, D、E 组 JAK2、STAT3 蛋白表达量下降, TGF- $\beta$ 、BMP2、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、

CYP3A 蛋白表达量升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); D 与 E 组相比较, JAK2、STAT3、TGF- $\beta$ 、BMP2、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CYP3A 蛋白表达量差异均无统计学 ( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 2 不同浓度 AG490 对 JAK2、STAT3、TGF- $\beta$ 、BMP2、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CYP3A 蛋白表达的影响 (n=5,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	JAK2	STAT3	TGF- $\beta$	BMP2	HIF-1 $\alpha$	VEGF	CYP3A
A 组	0.95±0.17	0.89±0.25	1.24±0.52	1.24±0.32	1.14±0.37	1.27±0.15	1.21±0.35
B 组	0.83±0.63	0.81±0.42	1.39±0.24	1.37±0.24	1.27±0.29	1.37±0.13	1.29±0.53
C 组	0.77±0.11	0.77±0.36	1.44±0.27	1.46±0.27	1.32±0.06	1.44±0.42	1.44±0.72
D 组	0.58±0.42*# $\Delta$	0.52±0.74*# $\Delta$	1.77±0.18*# $\Delta$	1.77±0.18*# $\Delta$	1.77±0.08*# $\Delta$	1.74±0.05*# $\Delta$	1.71±0.82*# $\Delta$
E 组	0.57±0.21*# $\Delta$	0.52±0.92*# $\Delta$	1.72±0.06*# $\Delta$	1.75±0.06*# $\Delta$	1.73±0.06*# $\Delta$	1.74±0.06*# $\Delta$	1.71±0.36*# $\Delta$

注: 与 A 组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 B 组比较, #  $P < 0.05$ ; 与 C 组比较,  $\Delta P < 0.05$ 。

## 3 讨论

缺血性股骨头坏死作为常见的骨关节疑难病, 目前临床上治疗的方法很多, 但效果都不是很明显, 也没有统一的标准化治疗方案, 由于缺血缺氧是激素性股骨头坏死的关键因素, 因此如何在血管生成、死骨吸收和新骨形成之间形成连接是股骨头坏死修复的重要环节。有研究表明, JAK2/STAT3 信号通道能够调控促血管生成因子的表达<sup>[4]</sup>, 而在缺血/缺氧环境下, HIF-1 $\alpha$  信号通路是最具特征性的低氧反应通路<sup>[5-6]</sup>, 对骨形成和血管生成的偶联过程起重要的调节作用。

现在已揭示出多种细胞因子通过自分泌和旁分泌两种基本方式来调节骨和软骨的生成过程, 并且

能促进骨髓间充质干细胞向骨细胞、软骨细胞分化, 在股骨头坏死的治疗方面发挥重要作用。在众多的细胞生长因子中, 骨形态发生蛋白 (BMP2) 作为唯一能够单独诱导间充质细胞向骨组织方向分化的生长因子, 在骨组织形成过程中的作用尤其关键。通过 HIF-1 $\alpha$  转染骨髓间充质干细胞, 发现 HIF-1 $\alpha$  转染能够诱导其表达 VEGF, 且成骨分化能力明显加强, 这表明 HIF-1 $\alpha$  转染能加强其在体外成骨和成血管的能力。

本实验用不同浓度 JAK2/STAT3 特异性抑制剂 AG490 处理股骨头坏死大鼠模型, RT-PCR 技术检测滑膜组织细胞因子 JAK2、STAT3 和血管内皮生长因子 VEGF、HIF-1 $\alpha$ 、CYP3A mRNA 的含

量, Western blot 检测 JAK2、STAT3、TGF- $\beta$ 、BMP2、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CYP3A 蛋白的表达。结果表明, 不同浓度的 JAK2/STAT3 信号通路抑制剂 AG490 均能在一定程度上抑制 JAK2/STAT3 信号通路, 从而引起 TGF- $\beta$ 、BMP2 等因子 mRNA 和蛋白含量的变化, 综合比较发现, 注射 100  $\mu$ mol/L AG490 的 D 组效果最佳。D 组通过有效抑制 JAK2/STAT3 信号通路, 引起 TGF- $\beta$ 、BMP2、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CYP3A 蛋白含量升高, 在骨组织中创造一个有利于血管化的环境, 从而促进坏死股骨头的修复。

#### 参考文献

- [1] Zhao D W, Yu M, Hu K, et al. Prevalence of nontraumatic osteonecrosis of the femoral head and its associated risk factors in the Chinese population: Results from a nationally representative survey [J]. Chin Med J, 2015, 128 (21): 2843-2850.
- [2] Alves E M, Angrisani A T, Santiago M B. The use of extracorporeal shock waves in the treatment of osteonecrosis of the femoral head: a systematic review [J]. Clin Rheumatol, 2009, 28 (11): 1247-1251.
- [3] 赵丁岩, 俞庆声, 郭万首, 等. 淫羊藿苷对激素诱导损伤人股骨头微血管内皮细胞蛋白质表达谱的影响 [J]. 中华医学杂志, 2016, 96 (13): 1026-1030.
- [4] Johansson H R, Zywił M G, Marker D R, et al. Osteonecrosis is not a predictor of poor outcomes in primary total hip arthroplasty: a systematic literature review [J]. Int Orthop, 2011, 35 (4): 465-473.
- [5] 周勇, 任菲菲, 丰凡翔, 等. 血管内皮生长因子和骨形态发生蛋白 2 在非创伤性股骨头坏死不同区域的表达 [J]. 中医正骨, 2015, 11 (8): 7-10.
- [6] Lu X, Kang Y. Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of metastasis [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16 (24): 5928-5935.