

# 肝细胞生长因子活化 JAK2/STAT3 通路促进巨噬细胞 M1 型向 M2 型极化

顾奕玥<sup>1</sup> 胡泽平<sup>1</sup> 王云飞<sup>1</sup> 周青<sup>2</sup> 汪渊<sup>2</sup>

**摘要** 目的 研究肝细胞生长因子(HGF)通过Janus激酶2/信号转导和转录激活因子3(JAK2/STAT3)信号通路促进巨噬细胞M1型向M2型极化及其可能机制。方法 以正常RAW264.7巨噬细胞为M0对照组;干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )和细菌脂多糖(LPS)诱导的RAW264.7巨噬细胞(M1型)为M1组;不同浓度HGF(5、10、20 ng/ml)干预巨噬细胞M1型为5M1组、10M1组、20M1组;用50  $\mu$ mol/L JAK2特异性阻断剂(AG490)与10 ng/ml HGF共同干预巨噬细胞M1型为AG490+10M1组。CCK8法检测HGF对巨噬细胞增殖的影响。应用Griess reagents试剂盒检测各组培养上清液中亚硝酸盐浓度(NO%)。Western blot法检测各组M1型标志物一氧化氮合酶(iNOS)、白细胞介素-6(IL-6)和M2型标志物精氨酸酶I(Arg I)、白细胞介素-10(IL-10)以及JAK2/STAT3信号通路JAK2、P-JAK2、STAT3、P-STAT3的蛋白表达。结果 HGF对巨噬细胞无明显增殖作用。Griess reagents试剂盒检测结果显示,与M0或HGF各干预组相比,M1组培养上清液亚硝酸盐浓度(NO%)明显增高;与M1组相比,HGF各干预组培养上清液亚硝酸盐浓度(NO%)明显降低,并呈剂量依赖性( $P < 0.05$ )。Western blot结果显示,与M0组相比,M1组iNOS、IL-6蛋白表达明显增加,Arg I、IL-10蛋白表达显著减少( $P < 0.05$ )。与M1组相比,HGF各干预组iNOS、IL-6蛋白表达呈剂量依赖性减少,Arg I、IL-10蛋白表达呈剂量依赖性增加( $P < 0.05$ )。与M0或M1组相比,HGF各干预组JAK2/STAT3通路蛋白磷酸化表达呈剂量依赖性增加( $P < 0.05$ )。与10M1组相比,AG490+10M1组M2表型相关蛋白Arg I表达明显下降( $P < 0.05$ )。结论 HGF通过活化JAK2/STAT3信号通路促进巨噬细胞M1型向M2型极化。

**关键词** HGF; JAK2/STAT3; 巨噬细胞 M1 型; 巨噬细胞 M2 型; 极化

中图分类号 R 392.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)05-0696-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.05.006

肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是一种多功能生长因子,与其特异性受体(c-Met)结合后,通过激活相关信号通路在调节炎症免疫等方面发挥重要功能<sup>[1]</sup>。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是由炎症介导的慢性血管疾病,AS斑块中,巨噬细胞通过分泌大量促炎因子,使AS斑块趋于不稳定<sup>[2-3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>表明,AS斑块中的巨噬细胞因局部微环境的变化,可分化为经典活化促炎的M1型和替代活化抗炎M2型。在不稳定斑块的脂质核心M1型大量存在,促进AS进展;在稳定型斑块中M2型数量较高,促进斑块稳定。调控M1型巨噬细胞向M2型极化已成为抗AS治疗的重要靶点。HGF和受体c-Met广泛存在于心血管系统中,具有很强的抗炎作用。本课题组前期进行的动物实验和体外细胞实验<sup>[5]</sup>结果表明:HGF促进M2表型标志物精氨酸酶I(Arg I)的表达,抑制M1表型标志物一氧化氮合酶(iNOS)的表达,促进斑块稳定、抑制AS进展;HGF可能促进巨噬细胞M1型向M2型转化,但其具体分子机制并不明确。近年来研究<sup>[6-7]</sup>显示,信号转导和转录激活因子3(STAT3),作为HGF/c-Met轴的下游效应因子,与M2型巨噬细胞极化和抗炎因子产生密切相关。该研究旨在探讨HGF是否通过JAK2/STAT3信号通路促进巨噬细胞M1型向M2型极化。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞株和主要试剂** RAW264.7细胞株为小鼠来源的巨噬细胞株,由中国科学技术大学生命科学院赠送。HGF、干扰素- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )购自美国Peprotech公司;细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)

2019-02-01 接收

基金项目:安徽省博士后研究人员科研活动经费资助项目(编号:2016B097);安徽省自然科学基金(编号:1508085MH168);安徽省卫计委中医药科研课题项目(编号:2014zy23);高等学校博士学科点专项科研基金(编号:20123420120005);安徽高校省级自然科学研究重点项目(编号:KJ2012A147)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学第一附属医院心血管内科,合肥 230022

<sup>2</sup>安徽医科大学分子生物学实验室,合肥 230032

作者简介:顾奕玥,女,硕士研究生;

胡泽平,男,主任医师,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:1431318679@qq.com

购自美国 Sigma 公司; DMEM(高糖)培养基购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司; Janus 激酶 2(JAK2) 特异性抑制剂 AG490 购自美国 Med Chem Express 公司; iNOS、白细胞介素-6(IL-6)、Arg I、白细胞介素-10(IL-10)、JAK2、STAT3、P-STAT3、 $\beta$ -actin 抗体购自美国 Sant Cruz Biotechnology 公司; P-JAK2 抗体购自美国 abcam 公司; 二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Griess reagents 试剂盒购自上海碧云天公司。

**1.2 主要仪器和设备** 无菌细胞操作台(苏净安泰公司); CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 三气水套式细胞培养箱、低温离心机(Thermo Scientific, 美国); 酶标仪(1510, Thermo Scientific, 美国); 电泳仪、垂直电泳槽(北京六一仪器厂); 制冰机(SCOTSMAN)。

### 1.3 方法

**1.3.1 细胞培养和传代** 37 °C 水温复苏 RAW264.7 细胞, 用 DMEM(高糖)完全培养基(10% 胎牛血清、100  $\mu$ g/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素)将细胞瓶置入饱和湿度 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 每 48 h 更换培养基 1 次, 待细胞长至 80%~90%, 用 0.25% 胰酶进行消化传代, 用于以下实验。

**1.3.2 细胞诱导和分组** 未极化的 RAW264.7 巨噬细胞为 M0 对照组; IFN- $\gamma$ (20 ng/ml) 和 LPS(500 ng/ml) 诱导 RAW264.7 巨噬细胞(M0 型) 12 h, 使 M0 巨噬细胞极化呈 M1 型<sup>[8-9]</sup>, 为 M1 组。不同浓度的 HGF(5、10、20 ng/ml) 干预巨噬细胞 M1 型 12 h, 为 5M1 组、10M1 组、20M1 组; 50  $\mu$ mol/L AG490 和 10 ng/ml HGF 共同干预巨噬细胞 M1 型 12 h, 为 AG490 + 10M1 组。

**1.3.3 CCK8 检测法** 取冲悬的 RAW264.7 巨噬细胞, 按 200  $\mu$ l/孔( $2 \times 10^3$  个细胞) 种于 96 孔板内, 按 1.3.1 细胞培养方法, 培养至细胞贴壁后, 换用无血清培养基继续培养 12 h, 然后分别给予 0、0.1、0.5、2.5、5、10、15、20 ng/ml 浓度 HGF 干预 12 h。每孔加入 10  $\mu$ l 的 CCK8 试剂, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 4 h 后, 在酶标仪上 450 nm 处检测各孔吸光度值。

**1.3.4 培养上清液亚硝酸盐浓度(NO%) 的测定** 分别收集 M0、M1、5M1、10M1、20M1 组细胞培养上清液。使用 Griess reagents 试剂盒检测各组培养上清液中亚硝酸盐的分泌。使用全自动酶标仪在 540 nm 处读取吸光度值。

**1.3.5 Western blot 法检测蛋白表达** 上述方法分

组处理好巨噬细胞后, 用 4 °C 的 PBS 清洗 3 次, 每孔加入 150  $\mu$ l 蛋白裂解液, 静置冰上 30 min, 充分裂解后刮取细胞蛋白存于 1.5 ml EP 管中反复冻融 3 次, 4 °C、14 000 r/min 离心 30 min 弃除上清液, 用 BCA 法进行蛋白定量。配制 SDS-PAGE 凝胶, 各组等量蛋白上样、电泳分离, 电泳后将蛋白转移至 PVDF 膜上。室温下 5% 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 2 h, 分别用 TBST、TBS 清洗 PVDF 膜一次, 相应的一抗(1:1 000) 孵膜 4 °C 过夜。TBST 洗膜 3 次后用 TBS 洗膜 1 次, 每次 10 min。室温孵育二抗(1:5 000) 2 h, TBST 洗膜 3 次后用 TBS 洗膜 1 次, ChemiQ4600mini 化学发光成像系统显影,  $\beta$ -actin 为内参, 用 Quantity One 系统进行灰度值分析。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 16.0、GraphPad Prism 5 软件进行数据统计分析, 组间比较采用 SNK-Q 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HGF 对 RAW264.7 巨噬细胞增殖的影响

用浓度在 0~20 ng/ml 之间的 HGF 预处理巨噬细胞 12 h, 与 M0 对照组比较, HGF 对 RAW264.7 巨噬细胞无增殖作用( $F = 1.868$ ,  $P = 0.13$ )。选用 HGF(5、10、20 ng/ml) 进行后续实验。

**2.2 HGF 对 M1 型巨噬细胞培养上清液亚硝酸盐浓度的影响** 与 M0 对照组比较, M1 组培养上清液亚硝酸盐浓度明显升高( $F = 7.129$ ,  $P < 0.05$ )。与 M1 组比较, 各干预组培养上清液亚硝酸盐浓度较干预前明显下降( $F = 5.705$ ,  $P < 0.05$ ), 见图 1。

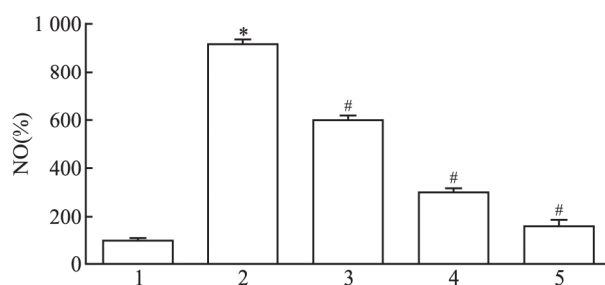


图1 HGF 对巨噬细胞 M1 型培养上清液亚硝酸盐浓度的影响  
1: M0 对照组; 2: M1 组; 3: 5M1 组; 4: 10M1 组; 5: 20M1 组; 与 M0 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 M1 组比较: #  $P < 0.05$

**2.3 HGF 对 M1 型巨噬细胞 M1、M2 表型标志物蛋白表达的影响** 与 M0 对照组比较, M1 组巨噬细胞 M1 表型标志物 iNOS、IL-6 蛋白表达显著增加( $F = 3.326$ 、 $316.529$ ,  $P < 0.05$ ), 见图 2A; M1 组巨噬细胞 M2 表型标志物 Arg I、IL-10 蛋白表达明显减少

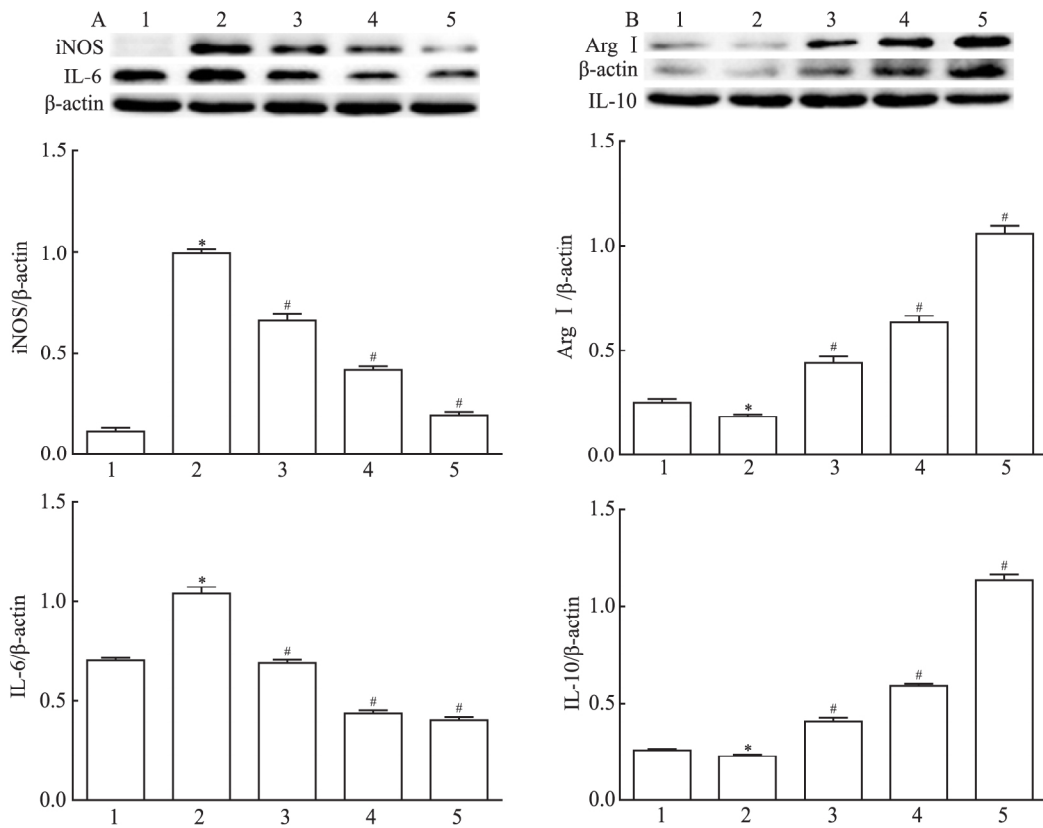


图2 HGF对M1型巨噬细胞M1和M2表型标志物蛋白表达的影响

1: M0 对照组; 2: M1 组; 3: 5M1 组; 4: 10M1 组; 5: 20M1 组; 与 M0 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 M1 组比较: #  $P < 0.05$

( $F = 22.515, 33.832, P < 0.05$ ), 见图 2B。与 M1 组比较, 不同浓度 HGF 干预巨噬细胞 M1 型 12 h 后, 各干预组 M1 表型标志物 iNOS、IL-6 蛋白表达呈剂量依赖性减少 ( $F = 284.711, 568.634, P < 0.05$ ), 见图 2A; 各干预组 M2 表型标志物 Arg I、IL-10 蛋白表达呈剂量依赖性增加 ( $F = 431.018, 1.302, P < 0.05$ ), 见图 2B。

**2.4 HGF 对 JAK2/STAT3 信号通路的影响** 与 M0 对照组比较, M1 组 JAK2/STAT3 通路相关蛋白 JAK2、STAT3 磷酸化水平较低 ( $F = 6.283, 30.863, P < 0.05$ ), 见图 3; 与 M1 组比较, 不同浓度 HGF 干预 M1 巨噬细胞后, 各干预组 JAK2、STAT3 磷酸化水平明显增强, 呈剂量依赖性 ( $F = 130.709, 22.480, P < 0.05$ ), 见图 3。使用 JAK2 特异性阻断剂 AG490 50  $\mu\text{mol/L}$  与 10 ng/ml HGF 干预巨噬细胞 M1 型 12 h 后, 与 10M1 组比较, AG490 + 10M1 组 M2 表型相关蛋白 Arg I 表达水平明显下降 ( $F = 299.75, P < 0.05$ ), 见图 4。

### 3 讨论

HGF 最初因其在肝脏再生中的促分裂作用被

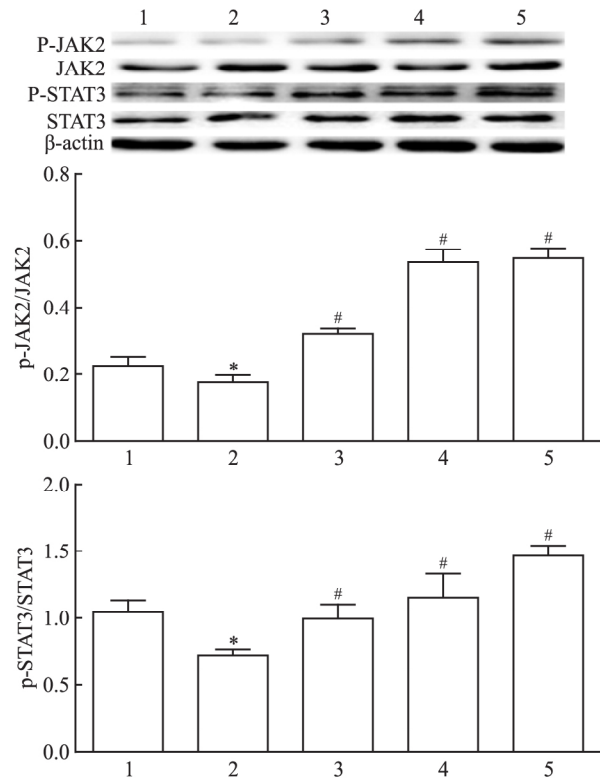


图3 HGF对JAK2/STAT3信号通路的影响

1: M0 对照组; 2: M1 组; 3: 5M1 组; 4: 10M1 组; 5: 20M1 组; 与 M0 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 M1 组比较: #  $P < 0.05$

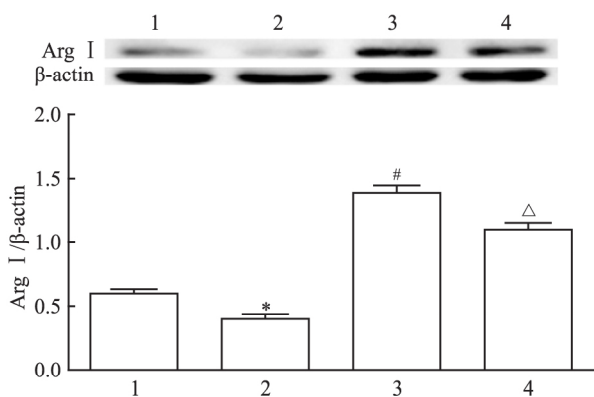


图4 JAK2/STAT3 通路被抑制后 M2 型相关蛋白表达

1: MO 对照组; 2: M1 组; 3: 10M1 组; 4: AG490 + 10M1 组; 与 MO 比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 M1 比较: #  $P < 0.05$ ; 与 10M1 比较: △  $P < 0.05$

发现和研究的。这种多功能生长因子由间质细胞分泌,与其特异性受体 c-Met 结合后,通过激活相关信号通路在细胞增殖、运动与迁移、抗凋亡、抗纤维化和调节炎症免疫等方面发挥重要的功能。近年来研究<sup>[10]</sup>表明,HGF 与受体 c-Met 结合,可促进缺血心肌血管新生,并调节多种细胞信号转导通路,发挥其复杂多效的抗 AS 作用。

AS 是一种慢性炎症性疾病,AS 斑块中,巨噬细胞通过吞噬氧化的低密度脂蛋白(ox-LDL)形成泡沫细胞,并分泌大量促炎因子,导致斑块脂质核心增大,使 AS 斑块趋于不稳定。AS 斑块中的巨噬细胞根据局部微环境的差异,可进一步分化成不同的细胞亚型。并且随着微环境的变化,不同的细胞亚型之间,可以相互转化,即为极化可塑性。目前,研究比较明确的巨噬细胞亚型包括经典活化促炎的 M1 型和替代活化抗炎 M2 型。在动脉粥样斑块中,M1 型巨噬细胞增多时,生成和释放促炎性因子(iNOS、IL-6 等),使斑块稳定性下降易于破裂,导致血栓形成,造成心血管事件的发生;当 M2 型巨噬细胞增多时,分泌 IL-10、转化生长因子-β(TGF-β)等抑炎因子,可使斑块纤维帽增厚,增加斑块的稳定性。因此,诱导 M1 型巨噬细胞向 M2 型极化可以抑制斑块进展,促进斑块稳定。调控巨噬细胞极性可能成为临床治疗以 AS 为病理基础的心血管疾病的新策略。

本研究中,LPS 和 IFN-γ 诱导的 M1 型巨噬细胞高度表达 M1 表型标志物 iNOS、IL-6,并大量分泌亚硝酸盐。经 HGF 干预后,M1 表型标志物 iNOS、IL-6 的表达和培养上清中亚硝酸盐的释放明显降低,M2 表型标志物 Arg I、IL-10 的表达明显增加。这些结果表明 HGF 促进 M1 向 M2 表型极化。

JAK2 是一种蛋白酪氨酸激酶,STAT3 作为 JAK2 的直接底物,存在于细胞质中并调节相关靶基因的表达<sup>[11-12]</sup>。JAK2 对 STAT3 的磷酸化,促进 STAT3 的核转位,并激活 M2 巨噬细胞相关抗炎因子 IL-10、Arg-1 的表达<sup>[13-14]</sup>。M2 型巨噬细胞中,STAT3 信号通路的激活程度,远高于 M1 型巨噬细胞。有研究<sup>[15]</sup>表明,HGF/c-Met 可激活下游效应因子 STAT3,调节免疫应答。本研究显示,与 MO 对照组或 M1 组相比,HGF 干预 LPS 和 IFN-γ 诱导的 M1 型巨噬细胞后,可以显著活化 JAK2/STAT3 信号通路。通过在 HGF 干预的 M1 型巨噬细胞中加入 JAK2 特异性阻断剂,发现 LPS 和 IFN-γ 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞(M1 型)M2 表型相关蛋白 Arg I 表达明显降低。这表明抑制 JAK2 可阻断 HGF 促进 M2 型巨噬细胞极化和产生抗炎因子 Arg I 的能力。这些结果表明,HGF 促进 M1 型巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞极化的分子机制可能与活化 JAK2/STAT3 信号通路相关。

体内大部分巨噬细胞在复杂的微环境中是处于 M1 型和 M2 型之间的某个状态。HGF 促进 M1 向 M2 表型极化,调节了 M1/M2 型巨噬细胞分化的比例,可能成为治疗 AS 的新靶点。但 HGF 调控 M1 型巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞极化,是否还涉及其他分子机制,有待进一步深入研究。

## 参考文献

- [1] Hu Z P, Bao Y, Chen D N, et al. Effects of recombinant adenovirus hepatocyte growth factor gene on myocardial remodeling in spontaneously hypertensive rats[J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2013, 18(5): 476-80.
- [2] Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options[J]. Nat Med, 2011, 17(11): 1410-22.
- [3] Viiri L E, Full L E, Navin T J, et al. Smooth muscle cells in human atherosclerosis: proteomic profiling reveals differences in expression of annexin A1 and mitochondrial proteins in carotid disease[J]. J Mol Cell Cardiol, 2013, 54: 65-72.
- [4] Murray P J, Allen J E, Biswas S K, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines[J]. Immunity, 2014, 41(1): 14-20.
- [5] 圣波, 胡泽平, 郭影, 等. 肝细胞生长因子对小鼠巨噬细胞 M1、M2 亚型极化的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(11): 1725-30.
- [6] Choi J W, Kwon M J, Kim I H, et al. Pyropia yezoensis glycoprotein promotes the M1 to M2 macrophage phenotypic switch via the STAT3 and STAT6 transcription factors[J]. Int J Mol Med, 2016, 38(2): 666-74.
- [7] Yuan F, Fu X, Shi H, et al. Induction of murine macrophage M2

- polarization by cigarette smoke extract *via* the JAK2/STAT3 pathway [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107063.
- [8] 陈涛,梁萧,贺明,等. RAW264.7 细胞 M1、M2 亚型的诱导和鉴定 [J]. *中国分子心脏病学杂志* 2011, 11(2): 117-20.
- [9] Qin H, Holdbrooks A T, Liu Y, et al. SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation [J]. *J Immunol*, 2012, 189(7): 3439-48.
- [10] Gallo S, Sala V, Gaetti S, et al. Cellular and molecular mechanisms of HGF/Met in the cardiovascular system [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2015, 129: 1173-93.
- [11] Aggarwal B B, Kunnammakara A B, Harikumar K B, et al. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1171: 59-76.
- [12] Yang X O, Panopoulos A D, Nurieva R, et al. STAT3 regulates cytokine mediated generation of inflammatory helper T cells [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(13): 9358-63.
- [13] Rodríguez M, Márquez S, de la Rosa J V, et al. Fungal pattern receptors down-regulate the inflammatory response by a cross-inhibitory mechanism independent of interleukin-10 production [J]. *Immunology*, 2017, 150(2): 184-98.
- [14] Yan D, Wang H W, Bowman R L, et al. STAT3 and STAT6 signaling pathways synergize to promote cathepsin secretion from macrophages *via* IRE1 $\alpha$  activation [J]. *Cell Rep*, 2016, 16(11): 2914-27.
- [15] Gentile A, Trusolino L, Comoglio P M. The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2008, 27(1): 85-94.

## Hepatocyte growth factor promotes phenotypic polarization of macrophage from M1 to M2 *via* the JAK2/STAT3 pathway

Gu Yiyue, Hu Zeping, Wang Yunfei, et al

(Dept of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the effect of hepatocyte growth factor (HGF) on the polarization of macrophage from M1 to M2 *via* Janus kinase 2/signal transduction and activator of transcription 3 (JAK2/STAT3) signaling pathway, and to investigate its possible mechanism behind the effect. **Methods** The normal RAW264.7 macrophages were used as M0 control group; RAW264.7 macrophages induced by LPS and IFN- $\gamma$  (M1 phenotype) were M1 group; M1 phenotype macrophages interfered with different concentrations of HGF (5, 10, 20 ng/ml) were 5M1 group, 10M1 group, and 20M1 group, respectively; M1 phenotype macrophages interfered with 50  $\mu$ mol/L JAK2 specific blocker (AG490) and 10 ng/ml HGF were AG490 + 10M1 group. The effect of HGF on the proliferation of macrophages was detected by CCK8 method. The nitrite concentration of culture supernatant (NO%) in each group was measured by the Griess reagents kit. Western blot was used to detect the protein expressions of marker for M1 group, including nitric oxide synthase (iNOS), interleukin-6 (IL-6), and that for M2, including arginase I (Arg I), interleukin-10 (IL-10). The protein expressions of JAK2, P-JAK2, STAT3, P-STAT3 involved in JAK2/STAT3 signaling pathway were also detected by using Western blot. **Results** HGF did not significantly inhibited the proliferation of macrophages. The results of the Griess reagents kit showed that the nitrite concentration of culture supernatant (NO%) in the M1 group was higher than that in the M0 or HGF intervention groups; the nitrite concentration of culture supernatant (NO%) in the HGF intervention group was decreased explicitly in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ). Western blot analysis showed that, compared with M0 group, the protein expressions of iNOS and IL-6 were increased, while the protein expressions of Arg I and IL-10 were decreased in M1 group ( $P < 0.05$ ). Compared with M1 group, the protein expressions of iNOS and IL-6 in HGF intervention group were decreased in a dose-dependent manner; the protein expressions of Arg I and IL-10 were increased in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ). Compared with M0 or M1 group, the phosphorylation of JAK2/STAT3 signaling pathway in HGF intervention group was increased in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ). Compared with the 10M1 group, the protein expression of M2 phenotype-associated Arg I was decreased in the AG490 + 10M1 group ( $P < 0.05$ ) after blocking the JAK2/STAT3 signaling pathway. **Conclusion** HGF promotes the polarization from M1 phenotype macrophage to M2 phenotype by activating JAK2/STAT3 signaling pathway.

**Key words** HGF; JAK2/STAT3; M1 phenotype macrophage; M2 phenotype macrophage; polarization