

• 牙髓病学研究 •

## Janus 蛋白酪氨酸激酶 2/信号转导和转录激活因子 3 信号转导通路在人慢性根尖周炎中的表达

张晨<sup>1,2</sup> 刘璐<sup>3</sup> 赵涵<sup>4</sup> 刘玲霜<sup>1\*</sup>

(1. 青岛大学附属医院 山东 青岛 266003; 2. 青岛大学 山东 青岛 266071;  
3. 青岛大学附属医院口腔正畸科 山东 青岛 266003;  
4. 青岛大学附属医院病理科 山东 青岛 266555)

**[摘要]** 目的:检测 Janus 蛋白酪氨酸激酶 2/信号转导和转录激活因子 3(Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3, JAK2/STAT3)信号转导通路在人慢性根尖周炎中的表达并推测其在慢性根尖周炎中的作用,为研究慢性根尖周病的致病机制提供理论基础。方法:选取健康牙齿牙周膜为对照组,患有根尖周囊肿及根尖周肉芽肿标本分别为实验组 1、实验组 2,每组各 20 例,对各组标本分别进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色并采用免疫组织化学法检测 JAK2、磷酸化 Janus 蛋白酪氨酸激酶 2(phosphorylation-janus kinase 2, p-JAK2)、STAT3 及磷酸化信号转导和转录激活因子 3(phosphorylation-signal transducer and activator of transcription 3, p-STAT3)在各组中的表达。结果:JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 在正常牙周组织中均有少量表达,在根尖周囊肿及肉芽肿组织中表达量增加,实验组 1、实验组 2 与对照组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。实验组 1 与实验组 2 比较, JAK2 及 p-JAK2 的表达差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), STAT3 及 p-STAT3 的表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。对根尖周炎标本中的 JAK2 和 STAT3 以及 p-JAK2 和 p-STAT3 进行相关性分析,结果显示 JAK2 和 STAT3 以及 p-JAK2 和 p-STAT3 之间有相关性。结论:JAK2、p-JAK2、STAT3 及 p-STAT3 在慢性根尖周炎中表达量增加,推测 JAK2/STAT3 信号通路与根尖周炎的炎症过程有关,可能在其发展过程中有重要意义。

**[关键词]** Janus 蛋白酪氨酸激酶 2 信号转导和转录激活因子 3 根尖周囊肿 根尖周肉芽肿

**[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671—7651(2019)01—0084—05

**[doi]** 10.13701/j.cnki.kqxyj.2019.01.020

**Expression of JAK2 and STAT3 in Chronic Periapical Periodontitis.** ZHANG Chen<sup>1,2</sup>, LIU Jun<sup>3</sup>, ZHAO Han<sup>4</sup>, LIU Ling-shuang<sup>1\*</sup>. 1. Department of Stomatology, Affiliated Hospital, Qingdao University, Qingdao 266000, China; 2. Qingdao University, Qingdao 266071, China; 3. Department of Orthodontics, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China; 4. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, 266555, China.

**[Abstract]** **Objective:** To detect the expression of JAK2/STAT3 signal transduction pathway in chronic apical periodontitis in human and speculate its role in chronic periapical diseases. **Methods:** Twenty healthy periodontal membranes, 20 periapical cysts, and 20 periapical granuloma specimens were stained by HE. Immunohistochemistry was used to detect the expression of JAK2, p-JAK2, STAT3, and p-STAT3 in different groups. **Results:** JAK2, p-JAK2, STAT3, and p-STAT3 were slightly expressed in normal tissues, and increased in periapical cysts and granuloma. The differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The difference between JAK2 and p-JAK2 was statistically significant ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in STAT3 and p-STAT3 between periapical cyst group and periapical granuloma group ( $P > 0.05$ ). There was a correlation between JAK2 and STAT3 and p-JAK2 and p-STAT3. **Conclusion:** The expressions of JAK2, p-JAK2, STAT3, and p-STAT3 were increased in chronic periapical diseases. We speculate that JAK2/STAT3 signaling pathway is involved in the inflammatory process of periapical perioditis and may play an important role in its development.

**基金项目** 国家自然科学基金(编号:81500834)

**作者简介** 张晨(1988~),女,山东人,硕士,主要从事根尖周炎研究。

\* 通讯作者 刘玲霜, E-mail: lais\_1314@126.com

[Key words] JAK2 Periapical granuloma Periapical cyst

Janus 蛋白酪氨酸激酶/信号转导和转录激活子(Janus kinase /signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)信号转导通路是近年来发现的一条由细胞因子刺激的信号转导通路,其作用广泛,涉及细胞增殖、分化、凋亡以及机体的生长发育和炎症的发生发展等方面<sup>[1]</sup>。正常牙周组织中存在磷酸化 Janus 蛋白酪氨酸激酶 2(phosphorylation-janus kinase 2, p-JAK2)及磷酸化信号转导和转录激活子 3(phosphorylation-signal transducer and activator of transcription 3, p-STAT3),且 p-JAK2 和 p-STAT3 参与了牙周组织改建的过程,对大鼠进行加力后,其牙周膜受压力侧以及受张力侧的 p-JAK2、p-STAT3 的表达量均较未加力的对照组明显升高<sup>[2]</sup>。JAK2 激酶抑制剂 AG490 通过下调 Ser727-STAT3 磷酸化水平可以抑制核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体(receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand, RANKL)诱导的 RAW264.7 细胞增殖,从而导致转录因子活化 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T cells c1, NFATc1)表达水平下降,达到抑制 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化的目的,从而证明了 JAK2/STAT3 是破骨细胞前体细胞分化成熟过程中的关键信号通路<sup>[3]</sup>。

慢性根尖周炎是由牙髓来源的病原体引起的牙周组织的炎症和破坏,属于炎症性骨破坏疾病。从受感染的根管系统侵入根尖区域的细菌或细菌毒素最初导致炎症细胞的浸润和促炎性细胞因子反应的产生<sup>[4,5]</sup>。尽管有文献报道 JAK2/STAT3 在根尖周急性炎症期骨破坏过程中发挥了重要作用<sup>[6]</sup>。然而,目前关于 JAK2/STAT3 信号通路与人慢性根尖周炎关系的研究鲜见报道。因此,本实验通过免疫组织化学方法检测 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 在人慢性根尖周炎标本中的表达情况,探讨其在慢性根尖周炎过程中可能发挥的作用,以期根尖周炎的治疗提供新的思路。

## 1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 抗兔 JAK2、p-JAK2、STAT3 及 p-STAT3 抗体(伊莱瑞特);抗兔链霉菌抗生物素蛋白-过氧化氢酶(streptavidin-peroxidase, SP)免疫组织化学试剂盒(中杉金桥);双花扁豆凝集素(dolichos bifows agglutinin, DBA)染色试剂盒(中杉金桥);乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA, 中杉金桥)。

1.2 组织标本的收集 选取 2017 年 3 月~2017 年 8 月于青岛大学附属医院口腔外科就诊患者 60 例,女 26 例,男 34 例。排除标准:(1)妊娠期;(2)有系统性或传染性疾病者;(3)近 3 个月内有过抗生素治疗史。本实验经青岛大学附属医院伦理委员会同意,在标本收集前,患者均签署知情同意书。根据 X 线片及术中观察以及病理表现将标本分为健康对照组、根尖周囊肿组、根尖周肉芽肿组,每组标本各 20 例。健康组标本:取自因智齿或正畸拔牙患者的健康牙周膜,标准:健康有活力的牙齿;X 线片显示牙体及牙周组织无过高或过低密度影像;组织学观察显示没有明显的炎症细胞浸润及毛细血管增生。根尖周肉芽肿组标本:取自不可治愈根尖周炎患牙的根尖周组织,标准:患牙已无保留价值;X 线片显示根尖区低密度影,圆形,边界清,直径一般 $<1$  cm;组织学观察见肉芽组织、明显的炎症细胞浸润及毛细血管增生。根尖周囊肿组:取自不可治愈根尖周炎患牙的根尖周组织。标准:无保留价值的牙齿;X 线片显示圆形或卵圆形低密度 X 线透视阴影,边缘有一圈阻射白线围绕;手术中发现含有液体或半固体囊性组织的根尖固体软组织病变;组织学观察结果显示,根尖周组织中含有大量胶原纤维,囊肿或组织完全或部分被非角化分层鳞状上皮覆盖。标本取出后置于福马林溶液中 4℃ 下固定 24~48 h。梯度乙醇脱水后石蜡包埋,包埋后厚 4  $\mu$ m 切片以备苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色和免疫组织化学染色。

1.3 HE 染色 切片二甲苯脱蜡,梯度乙醇处理后用清水冲洗,然后用苏木精染色 10 min,于流水下冲洗,1%盐酸乙醇分化数秒后再用流水冲洗,温水返蓝。用伊红染液染色 2 min 后,梯度乙醇脱水,使用二甲苯透明,最后用橡胶封片,以备观察。

1.4 免疫组织化学染色 用 SP 法进行免疫组织化学染色,二甲苯脱蜡处理切片,常规梯度乙醇醇化后于流水下冲洗,然后用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗,过氧化氢灭活内源性酶,室温孵育 10 min,然后用 PBS 冲洗,抗原修复液微波修复 2 min,然后用 PBS 冲洗,将非免疫动物血清滴加到切片上,室温孵育 20 min,甩去多余液体。使用兔抗人多克隆抗体 JAK2 (elabscience, E-AB-15734)、STAT3 (elabscience, E-AB-15734)、p-JAK2 (elabscience, E-AB-21017)、p-STAT3



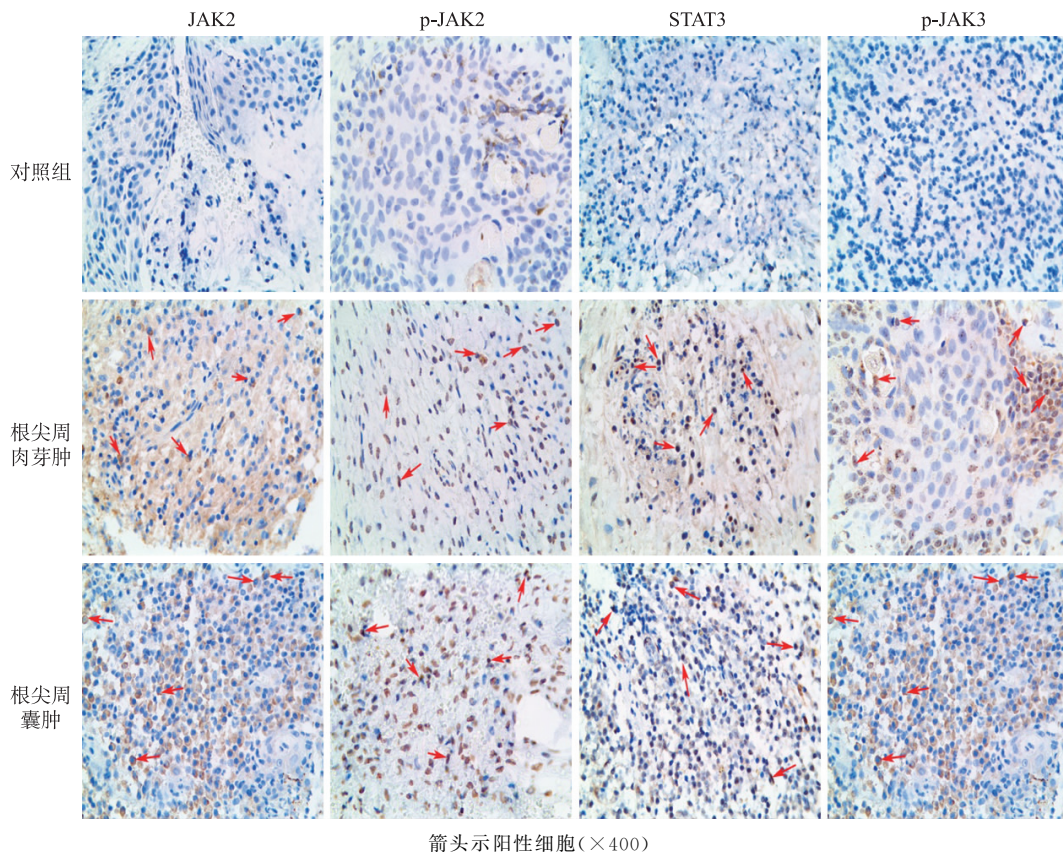


图 2 JAK2、STAT3、P-JAK2 和 P-STAT3 在各组表达情况(×400)

Fig. 2 The expression of AK2, STAT3, P-JAK2, and P-STAT3 in different groups.

(elabscience, E-AB-32981) and SCOS3 (Abcam, 16030) 作为一抗, 阴性对照采用 PBS 代替一抗, 4 °C 过夜。滴加二抗, 室温下静置 1h, PBS 冲洗, DAB 显色, 每个步骤需要用自来水充分洗涤载玻片, 并且使用二氨基联苯胺作为色原。载玻片用苏木精复染 2 min, 盐酸乙醇分化。用自来水冲洗 10 min, 脱水、透明、封片。在显微镜下分析载玻片上的染色标本切片。

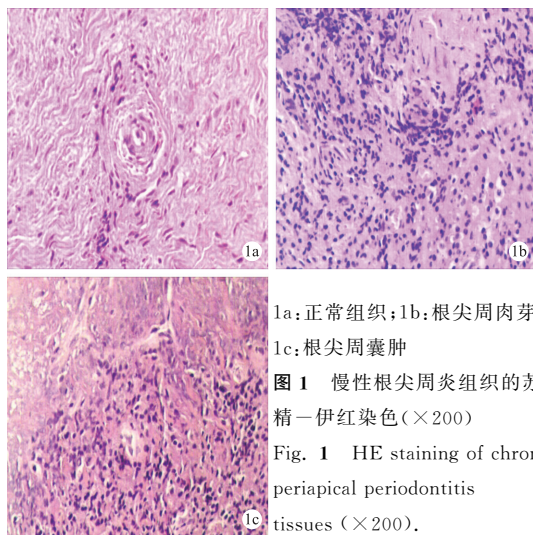
1.5 细胞计数及统计学分析 免疫组织化学染色后, 阳性细胞呈棕色。在高倍镜下(×400)对每个切片进行 JAK2、p-JAK2、STAT3 及 p-STAT3 阳性细胞计数。细胞计数由两位研究者在双盲条件下随机选取 5 个视野进行计数。计数每 100 个细胞里的阳性细胞数。

1.6 统计学分析 数据用均数±标准差表示。采用单因素方差分析进行统计学分析, 采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。另外对 JAK2 和 STAT3 以及 p-JAK2 和 p-STAT3 进行相关性分析。其中  $|r|$  绝对值  $< 0.2$  为极弱相关或不相关,  $0.2 < |r| < 0.4$  为弱相关,  $0.4 < |r| < 0.6$  为中等相关,  $0.6 < |r| < 0.$

8 为强相关,  $0.8 < |r| < 1$  为显著性相关。

## 2 结果

2.1 HE 染色 镜下显示正常组有少量炎症细胞浸润; 根尖周囊肿中含有大量胶原纤维, 囊肿或组织完全或部分被非角化分层鳞状上皮覆盖。根尖周肉芽肿标本中有大量炎症细胞浸润, 可见巨噬细胞和毛细血管增生, 见图 1。



1a: 正常组织; 1b: 根尖周肉芽肿; 1c: 根尖周囊肿

图 1 慢性根尖周炎组织的苏木精-伊红染色(×200)  
Fig. 1 HE staining of chronic periapical periodontitis tissues (×200).

2.2 免疫组织化学结果 JAK2、p-JAK2、STAT3

表 1 每组高倍视野下 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 阳性细胞数(/100 个细胞)

Tab. 1 JAK2, p-JAK2, STAT3, and p-STAT3 positive cells (/100 cells) in each high power field.

分组	JAK2	p-JAK2	STAT3	p-STAT3
对照组	3.00±0.73	2.85±0.75	3.20±0.70	3.30±1.53
根尖周肉芽肿组	59.85±4.36 <sup>*1</sup>	79.65±5.30 <sup>*1</sup>	68.55±5.21 <sup>*1</sup>	69.50±5.84 <sup>*1</sup>
根尖周囊肿组	70.30±4.14 <sup>*1*2</sup>	84.10±6.12 <sup>*1*2</sup>	69.50±5.89 <sup>*1</sup>	70.30±5.28 <sup>*1</sup>
F	2146.22	1892.53	1391.85	1380.13
P	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,\*1  $P < 0.05$ ;与根尖周肉芽肿组比较,\*2  $P < 0.05$

及 p-STAT3 阳性细胞呈深棕色,在各组都有表达,多为形态各异的炎症细胞,见图 2。其中 JAK2、p-JAK2、STAT3 及 p-STAT3 阳性细胞表达量均为正常组(对照组) < 根尖周肉芽肿组及根尖周囊肿组,正常组与根尖周囊肿组及根尖周肉芽肿组对比 JAK2、p-JAK2、STAT3 及 p-STAT3 阳性细胞的表达量比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),根尖周囊肿与根尖周肉芽肿间 JAK2 及 p-JAK2 比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),STAT3 及 p-STAT3 比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1。分别对 JAK2 和 STAT3、p-JAK2 和 p-STAT3 进行相关性分析,JAK2 和 STAT3 间为中等相关( $r = 0.662$ ),p-JAK2 和 p-STAT3 间为强相关( $r = 0.907$ )。

### 3 讨论

根尖周病是一种常见的炎症性骨破坏疾病,其主要病理改变为大量炎症细胞浸润及骨吸收。牙髓受到细菌侵袭导致牙髓炎的发生,随着牙髓组织的破坏,最终导致根尖周组织的病变,牙槽骨的破坏<sup>[7]</sup>。目前关于根尖周炎致病机制的研究很多,许多炎症细胞因子和骨破坏因子,如白细胞介素-27、RANKL 和肿瘤坏死因子受体相关因子 6 参与根尖周炎的炎症及骨破坏过程<sup>[8,9]</sup>。现阶段已有采用药物或其他治疗方法干预大鼠根尖周炎症模型的文献报道<sup>[10,11]</sup>。然而目前关于根尖周炎的致病机制尚无明确结论。

JAK2 参与多种 I 类细胞因子的调控,如生长激素、促红细胞生成素、白细胞介素-3、干扰素- $\gamma$  以及瘦素等<sup>[12-14]</sup>。如果机体缺乏生长因子,免疫系统就会受到影响,同时骨密度会降低<sup>[15]</sup>。瘦素可以增加 CD25 的表达以及人类白细胞抗原 DR,同时能够通过激活 JAK2/STAT3 途径激活 B 细胞分泌细胞因子,这些都有助于机体免疫调节以及炎症活动<sup>[16]</sup>。转录因子 STAT 家族有 7 个成员,包括 STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5a、STAT5b、STAT6。STATs 是一种潜在的细胞质转移因子,被细胞因子和生长因子激活后可以将信号从细胞表

面传递到细胞核内。STATs 的 C 端附近有被 JAKs 磷酸化的保守的酪氨酸残基。这种磷酸化使得 2 个 STAT 间发生二聚化。STATa 通过和 STATb 的保守的 SH2 区域相互作用,STATb 也可以与 STATa 的 SH2 结构域相互作用,从而发生二聚化<sup>[17]</sup>。研究表明,IL-6 可通过 STAT3 信号通路上调成骨细胞 RANK 的表达,说明 IL-6/STAT3 信号通路通过成骨细胞间接调控了破骨细胞的分化<sup>[18]</sup>。

本研究的结果显示根尖周肉芽肿以及根尖周囊肿标本中的 JAK2、p-JAK2、STAT3 及 p-STAT3 阳性细胞数的表达量均比正常组明显升高,根尖周囊肿组与根尖周肉芽肿组比较 JAK2、p-JAK2、STAT3 及 p-STAT3 阳性细胞数的表达量均高,其中 JAK2、p-JAK2 比较差异有统计学意义,但 STAT3 及 p-STAT3 比较差异无统计学意义。

JAK2 与 STAT3 及 p-JAK2 与 p-STAT3 的表达量之间存在相关性,结果提示在慢性根尖周炎的炎症发展过程中,JAK2 与 STAT3 共同作用,参与了根尖周疾病的病变过程。猜测 JAK2/STAT3 信号通路抑制剂可以作为治疗根尖周炎的潜在靶点。本研究只是在免疫学水平上检测了 JAK2、p-JAK2、STAT3 及 p-STAT3 的表达量,进而预测其对根尖周炎的作用,其对根尖周炎的具体作用机制仍未明确,将在后期的研究中对其进行进一步完善。

### 参考文献

- [1] Chatterjee-Kishore M, van den Akker F, Stark GR. Association of STATs with relatives and friends [J]. Trends Cell Biol. 2000, 10(3):106-111.
- [2] 梁又德,周毅,李异雷,等. p-JAK2 和 p-STAT3 在实验性牙移动牙周组织中的表达及意义[J]. 口腔医学研究, 2014, 30(8):724-727.
- [3] 李常虹,赵金霞,孙琳,等. JAK2/STAT3 信号通路对 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2013, 19(5):421-425.
- [4] Stashenko P, Teles R, Souza RD. Periapical inflammatory responses and their modulation [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 1998, 9(4):498-521.

- [5] Zhang R, Wang L, Peng B. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in rat periapical lesions [J]. J Endod, 2008, 34(10):1207-1210.
- [6] 敖翔,王丽娜,王娇娇,等. JAK2-STAT3 信号通路在大鼠根尖周炎中表达的相关性研究[J]. 口腔医学研究, 2017, 33(1):1-5.
- [7] Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation [J]. Crit Rev Oral Biol Med, 1998, 9(4):498-521.
- [8] Li J, Wang R, Huang SG. Immunomodulatory activity of interleukin-27 in human chronic periapical diseases [J]. AM J Transl Res, 2017, 9(3):1460-1470.
- [9] Vernal R, Dezerega A, Dutzan N, et al. RANKL in human periapical granuloma; possible involvement in periapical bone destruction [J]. Oral Dis, 2006, 12(3):283-289.
- [10] Liu L, Zhang C, Hu Y, et al. Protective effect of metformin on periapical lesions in rats by decreasing the ratio of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin [J]. J Endod, 2012, 38(7):943-947.
- [11] Gao B, Chen W, Hao L, et al. Inhibiting periapical lesions through AAV-RNAi silencing of cathepsin K [J]. J Dent Res, 2013, 92(2):180-186.
- [12] Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin [J]. Cell, 1993, 74(2):227-236.
- [13] Watling D, Guschin D, Muller M, et al. Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon-gamma signal transduction pathway [J]. Nature, 1993, 366(6451):166-170.
- [14] Waters MJ, Brooks AJ. JAK2 activation by growth hormone and other cytokines [J]. Biochem J, 2015, 466(1):1-11.
- [15] Sloatweg MC. Growth hormone and bone [J]. Horm Metab Res, 1993, 25(7):335-343.
- [16] Agrawal S, Gollapudi S, Su H, et al. Leptin activates human B cells to secrete TNF-alpha, IL-6, and IL-10 via JAK2/STAT3 and p38MAPK/ERK1/2 signaling pathway [J]. J Clin Immunol, 2011, 31(3):472-478.
- [17] Abroun S, Saki N, Ahmadvand M, et al. STATs; an old story, yet mesmerizing [J]. Cell J, 2015, 17(3):395-411.
- [18] O'Brien CA, Gubrij I, Lin SC, et al. STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF-kappaB ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1,25-dihydroxyvitamin D3 or parathyroid hormone [J]. J Biol Chem, 1999, 274(27):19301.

[收稿日期:2018-06-25]

(本文编辑 关隽)

## 关于使用牙位新标示法的说明

为方便读者阅读以及适应结构化排版的需求,参考 GB/T 9938—2013《牙科学·牙位和口腔区域的标示法》,本刊从 2018 年第 1 期开始对牙位使用如下标示法:用编码两位数字表示牙齿的具体牙位,编码的第 1 位数字表示牙位所在象限,并区分乳牙与恒牙;编码的第 2 位数字表示牙位本身。

1. 第 1 位数字:数字 1 至 4 表示恒牙列,自右上口腔区域始顺时针递增排列,即 1、2、3、4 分别表示右上、左上、左下、右下象限的恒牙;数字 5 至 8 表示乳牙列,自右上口腔区域始顺时针递增排列,即 5、6、7、8 分别表示右上、左上、左下、右下象限的乳牙。

2. 第 2 位数字:在同一象限的牙位由 1 至 8(乳牙由 1 至 5)表示。恒牙列:1、2、3、4、5、6、7、8 分别表示中切牙、侧切牙、尖牙、第一前磨牙、第二前磨牙、第一磨牙、第二磨牙、第三磨牙。乳牙列:1、2、3、4、5 分别表示乳中切牙、乳侧切牙、乳切牙、第一乳磨牙、第二乳磨牙。

本刊即日起采用上述牙位新标示法,请作者按此要求书写所涉牙位。

(转自《中华口腔医学杂志》)