

JAK2-STAT3 通路介导肢体缺血后处理 脑缺血再灌注损伤保护作用的研究

韦家俊 李 浩 廖小明 齐 立 吴 岚 刘开祥

摘要 目的 探讨肢体缺血后处理对大鼠脑缺血再灌注损伤后脑保护的作用机制。方法 健康雄性 SD 大鼠 48 只 随机分为 4 组即假手术组 (sham)、缺血再灌注组 (I/R 组)、肢体缺血后处理组 (Lpost 组)、肢体缺血后处理 + AG490 组 (AG 组)。I/R 组、Lpost 组、AG 组均做缺血 2 h 再灌注 24 h, Lpost 组:再灌注前实施肢体缺血后处理(缺血 15 min,灌注 15 min)3 个循环,AG 组:再灌注前 5 min 时腹腔注射 AG490 (1 mg/kg),其他处理与 Lpost 组相同。各组大鼠神经功能评分后,采用 TTC 染色测脑梗死体积,TUNEL 法测定脑细胞凋亡。结果 ① 与 sham 组相比,I/R 组大鼠神经功能缺损加重($P < 0.05$);与 I/R 组相比,Lpost 组大鼠神经功能缺损减轻($P < 0.05$);与 Lpost 组相比,AG 组大鼠神经功能缺损加重($P < 0.05$);② sham 组大鼠无梗死灶,与 I/R 组相比,Lpost 组大鼠梗死体积减小($P < 0.05$);与 Lpost 组相比,AG 组梗死体积增大($P < 0.05$);③ 与 I/R 组相比,Lpost 组大鼠脑细胞凋亡率明显降低($P < 0.05$);与 Lpost 组相比,AG 组脑细胞凋亡率明显增高($P < 0.05$)。结论 肢体缺血后处理具有显著的脑保护作用,这一作用是由 JAK2-STAT3 通路介导的。

关键词 脑缺血再灌注损伤;肢体缺血后处理;JAK2-STAT3;细胞凋亡

中图分类号 R 743.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)12-1714-04

缺血性脑卒中是危害人类健康的三大疾病之一,具有发病率、致残率和病死率高的特点。阐明其发病机制、探索有效的防治措施一直是目前研究热点。研究^[1]显示肢体缺血后处理可以提高脑缺血耐受,从而减轻脑的再灌注损伤。研究^[2]表明 JAK2-STAT3 信号通路与脑缺血再灌注损伤关系密切。肢体缺血后处理可以激活 JAK2-STAT3 信号通路减轻心肌缺血再灌注损伤^[3],然而是否通过 JAK2-STAT3 信号通路发挥脑保护作用未见相关报

道。该研究通过建立大鼠脑缺血再灌注模型,观察 JAK2-STAT3 通路在肢体缺血后处理脑保护中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要药品及试剂 AG490(JAK2-STAT3 通路阻断剂)购自美国 Sigma 公司;TUNEL 法细胞凋亡检测试剂盒购自上海罗氏公司;2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)及 DAB 显色试剂盒均由武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.2 实验动物分组及给药 清洁级雄性 SD 大鼠 48 只,体重 240~260 g,广西医科大学试验动物中心惠赠。随机分为 4 组:假手术组(sham 组, $n = 12$)、缺血再灌注组(I/R 组, $n = 12$)、肢体缺血后处理组(Lpost 组, $n = 12$)、肢体缺血后处理 + AG490 抑制剂组(AG 组, $n = 12$)。I/R 组、Lpost 组、AG 组采用线栓法制备大鼠脑缺血再灌注损伤模型,Lpost 组:再灌注的同时夹闭双侧股动脉 15 min,再灌注 15 min,反复循环 3 次,AG 组:再灌注前 5 min 时腹腔注射 AG490(1 mg/kg),余同 Lpost 组,其余各组均腹腔注射等量的生理盐水。

1.3 局灶性脑缺血再灌注模型的制备 制备大鼠大脑中动脉缺血/再灌注(MCAO/R)模型^[4]:大鼠 10%水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射麻醉,取颈部左旁正中切口 3~4 cm,分离左侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA),双极电凝器凝断 ECA 及其分支,用动脉夹夹闭 ICA、CCA 近心端,在 ECA 分叉远心端用眼科剪斜行剪一倒“V”小口并导入栓线,栓线自左 ECA 插入 CCA 分叉处,固定栓线,调整方向,将栓线插入左 ICA 松开动脉夹,缓慢推进,稍感阻力即止,此时插入深度约为 18~19 mm。缺血 120 min 抽出栓线完成 MCAO/R 模型。sham 组:不做脑缺血,栓线插入深度小于 9 mm。模型成功的标志^[5]:苏醒后出现左侧 Horner 综合征;提尾悬拉后出现右上肢蜷缩屈曲;爬行时向右侧转圈或跌倒。造模过程中,因麻醉死亡 1 只,蛛网膜下腔出血死亡 1 只,造模不成功 2

2014-07-23 接收

基金项目:2011 桂林市科技开发项目(编号:0110119-4-6);2012 广西省自然科学基金(编号:2012jjAA40148)

作者单位:桂林医学院附属医院神经内科 桂林 541001

作者简介:韦家俊 男,主治医师,硕士研究生;

刘开祥 男,硕士,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: liukaixiang1128@sina.com

只,共用大鼠 52 只。

1.4 神经功能缺损评分 大鼠脑缺血 2 h 再灌注 24 h,进行神经功能缺损评分。参照文献^[5]神经功能评分标准:无神经功能缺损,活动正常为 0 分;提尾时,病灶对侧前肢不能完全伸直为 1 分;行走向瘫痪侧旋转为 2 分;身体向瘫痪侧跌倒为 3 分;出现意识障碍为 4 分。神经功能缺损达 1~3 分者视为模型制作成功,并且断头取脑后大脑中动脉无出血或血管内血栓形成。

1.5 脑梗死体积测定 缺血 2 h 再灌注 24 h,各组随机取 6 只大鼠,过度麻醉后取脑, -4 °C 冷藏 10 min,冠状切面切成均匀的 5 片,每片约 3 mm,置于 2% TTC 溶液避光温育、多聚甲醛液固定。梗死灶区呈白色,正常组织呈红色。利用 Auto CAD 图象处理软件,计算出各个脑片缺血侧的总体积和梗死区域的体积,再求出梗死区域占大脑半球总体积的百分比。

1.6 细胞凋亡检测 缺血 2 h 再灌注 24 h,各组随机取 6 只大鼠,制成切片后采用 TUNEL 法检测细胞凋亡。基本步骤如下:①厚约 5 μ m 的切片二甲苯浸洗 2 次,每次约 5 min,然后用梯度乙醇 PBS 冲洗 2 次 $\times$ 3 min;②蛋白酶 K (20 μ g/ml) 室温下消化 50 min;③ PBS 冲洗 3 次 $\times$ 3 min 后,加 50 μ l TUNEL 反应混合液(阴性对照组仅加 50 μ l 荧光素标记的 dUTP 液于标本上),暗湿盒中反应 37 °C $\times$ 1 h;④ PBS 冲洗后玻片干后加 50 μ l 转化剂-POD 于标本上,37 °C 暗湿盒中孵育 30 min;⑤ PBS 冲洗,在标本上加 50 μ l DAB 底物,反应 37 °C $\times$ 30 min,苏木精复染。随后进行脱水、透明、封片、光镜观察。以胞核出现棕黄染色颗粒代表 TUNEL 阳性细胞数。每张切片观察 10 个高倍镜视野 ($\times$ 400),计算平均每张切片的阳性细胞数。TUNEL 阳性率即 TUNEL 阳性细胞数占总细胞数的比值。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两样本均数比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 神经功能缺损评分 sham 组大鼠无神经行为学变化;I/R 组、Lpost 组及 AG 组分别出现不同程度的神经功能缺损,各组间比较差异有统计学意义 ($F=96$, $P<0.05$),见表 1。

2.2 各组大鼠脑梗死体积的比较 TTC 染色呈红色的为正常的脑组织,呈淡白色的为缺血梗死部分

的脑组织。Sham 组大鼠脑组织未见梗死灶。I/R 组脑梗死面积最大,与 Lpost 组及 AG 组比较差异有统计学意义 ($F=583$, $P<0.05$);Lpost 组梗死面积较小,与 I/R 组及 AG 组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠神经功能缺损评分及脑梗死体积的变化 ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	神经功能缺损评分	脑梗死体积(%)
Sham	0	0
I/R	2.40 $\pm$ 0.51	41.06 $\pm$ 2.33
Lpost	1.20 $\pm$ 0.41* #	29.17 $\pm$ 1.68* #
AG	1.73 $\pm$ 0.46	34.98 $\pm$ 2.33

与 I/R 组比较: * $P<0.05$; 与 AG 组比较: # $P<0.05$

2.3 各组大鼠神经元凋亡的比较 Sham 组可见到少量的凋亡细胞,I/R 组凋亡细胞阳性率为 (27.83 $\pm$ 2.93) % ,与 Sham 组比较明显增加 ($P<0.05$)。与 I/R 组比较,Lpost 组 (17.67 $\pm$ 2.16) %、AG 组 (25.83 $\pm$ 1.72) % 凋亡细胞阳性率明显减少,与 sham 组比较,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。且 Lpost 组较 AG 组凋亡细胞阳性率减少,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见图 1。

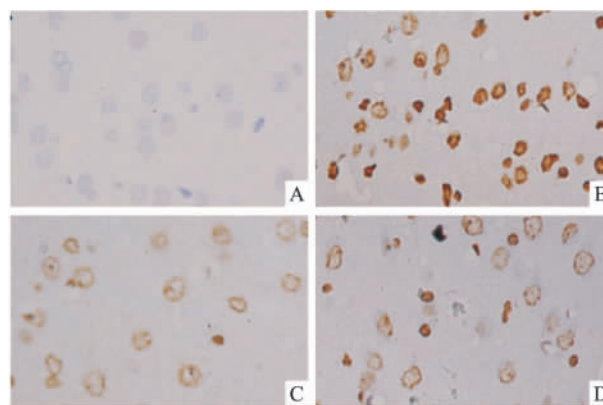


图 1 各组大鼠缺血区脑组织 TUNEL 阳性细胞的比较 $\times$ 400
A: sham 组; B: I/R 组; C: Lpost 组; D: AG 组

3 讨论

Przyklenk et al^[6]首次提出远程缺血预处理概念,2005 年提出了远隔器官缺血后处理的概念,通过实施于非重要器官来保护某些对缺氧缺血极其敏感的重要器官,在缺血后实施,故更具临床价值。Ren et al^[7]研究发现肢体缺血后处理可以改善神经功能评分,减少脑梗死体积。肢体缺血后处理可以诱导脑缺血耐受形成而产生神经保护作用,机制为

触发体内多种介质相互作用,激活多条信号传导系统如蛋白激酶通路和有丝分裂原激活蛋白激酶通路,使细胞产生多种保护性效应如减少一氧化氮、开放线粒体膜表面 ATP 敏感钾通道、抑制 Caspas-3 的表达、抑制炎症因子等^[1]。本研究结果显示,肢体缺血后处理可以改善再灌注 24 h 后神经功能评分,减少脑梗死面积及神经细胞凋亡指数。可见肢体缺血后处理具有强大的脑保护作用。

JAK-STAT 通路是近年来新发现的一条细胞内信号传导途径,主要由 JAKs 蛋白家族和 STATs 蛋白家族组成,将细胞外信号传递到细胞核,进而调节细胞核内转录引发生物学效应,广泛参与细胞应激、生长、增殖、分化和凋亡等过程,并与脑肿瘤、脑缺血等中枢神经系统疾病的病理损伤过程密切相关^[8-9]。最近研究^[10]显示脑缺血再灌注后引起 JAK2-STAT3 信号转导通路的激活,使用 JAK2 特异性抑制剂 AG490 后 P-JAK2、P-STAT3 表达下调,减少神经元死亡,减轻神经功能缺损。本研究表明了肢体缺血后处理可以明显降低大鼠缺血再灌注的神经功能评分,能够明显减轻缺血再灌注后脑组织的病理损伤,减少脑梗死体积及细胞凋亡指数,与 I/R 组比较差异显著。而给予 JAK2 抑制剂 AG490 阻断 STAT3 通路后,其对脑保护作用减弱。从而说明肢体缺血后处理对脑缺血再灌注损伤的保护作用与 JAK2-STAT3 通路关系密切。而肢体缺血后处理对脑保护作用与 JAK2-STAT3 通路的具体关系还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 韦家俊,刘开祥. 肢体缺血后处理对脑保护作用的研究进展[J]. 华夏医学, 2013, 26(4): 868-71.
- [2] 谢惠芳,徐如祥,姜晓丹. JAK-STAT 信号转导通路 with 缺血性脑损伤[J]. 中华神经医学杂志, 2006, 5(10): 1071-2.
- [3] 韩冠平,宋俊贤,任景怡,等. JAK-STAT3 信号通路在远距缺血后处理减轻心肌缺血再灌注损伤中的作用[A]. 中华医学会、中华医学会心血管病学分会. 第十三次全国心血管病学术会议论文集[C]. 中华医学会、中华医学会心血管病学分会: 2011: 1.
- [4] 王耀辉,李国辉,冯华坤,等. 线栓法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的体会与评价[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2013, 16(10): 1686-8.
- [5] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [6] Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, et al. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion[J]. *Circulation*, 1993, 87(3): 893-9.
- [7] Ren C, Yan Z, Wei D, et al. Limb remote ischemic preconditioning protects against focal ischemia in rats[J]. *Brain Res*, 2009, 1288: 88-94.
- [8] Darnell J E. STATs and gene regulation[J]. *Science*, 1997, 277(5332): 1630-5.
- [9] Barry S P, Townsend P A, Latchman D S, et al. Role of the JAK-STAT pathway in myocardial injury[J]. *Trends Mol Med*, 2007, 13(2): 82-9.
- [10] 陈真珍,王凯华,黄龙坚. JAK2/STAT3 信号转导通路在脑缺血再灌注损伤中的作用[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2013, 16(10): 29-32.

Research the protective effect of JAK2-STAT3 pathway mediated limb ischemia treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury

Wei Jiajun, Li Hao, Liao Xiaoming et al

(Dept of Neurology, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001)

Abstract Objective To investigate the mechanism of limb ischemia after treatment on cerebral ischemia-reperfusion injury of brain protection. **Methods** Forty-eight male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups namely sham group (sham), ischemia-reperfusion (I/R group), Limb ischemia treatment (Lpost group), Limb ischemia treatment + AG490 group (AG group). I/R group, Lpost group, AG group were doing ischemia 2 h, reperfusion 24 h, Lpost group: then after the implementation of limb ischemia before reperfusion treatment (ischemia 15 min, perfusion 15 min) 3 cycles, AG group: before 5 min reperfusion intraperitoneal injection of AG490 (1 mg/kg), the same as the other dealing with Lpost groups. The rats neurological score, using TTC staining to measure infarct volume, using TUNEL to detect neural cell apoptosis. **Results** ① Compared with the sham group, I/R rats neurological deficit increased ($P < 0.05$); compared with the I/R group, Lpost alleviated neurological deficit rats ($P < 0.05$); compared with the Lpost group, AG group of neurological defects in rats increased ($P <$

多基因启动子甲基化参与的乳腺癌 MCF-7 对他莫昔芬敏感性探究

郑璐 汤铜钱 波李 佳

摘要 目的 探讨多基因启动子甲基化参与的乳腺癌 MCF-7 对他莫昔芬敏感性的关系。方法 用 MTT 法对比乳腺癌 MCF-7 细胞株与耐药株生长增殖差异; 流式细胞检测亲本与耐药株细胞凋亡之间的差异; RT-PCR 及 Real-Time PCR 对比两细胞株相关基因 mRNA 表达差异; 甲基化特异性 PCR (MSP) 检测 4 个候选基因(DAPK、MGMT、P53、RASSF1A) 在亲本及耐药株中的甲基化状态。结果 Real-Time PCR 可见 MCF-7/TAM 细胞中抑癌基因 DAPK、RASSF1A 水平低于亲本株 ($P < 0.05$); 而 MGMT、P53、DNMT1、DNMT3B 的 mRNA 表达水平却较亲本细胞株升高 ($P < 0.05$); 基因 DNMT3A 的 mRNA 表达水平较低, 在亲本及耐药株中均未检出。MSP 显示, 在 MCF-7 细胞中, DAPK、P53 呈非甲基化状态, 而他莫昔芬细胞株这 2 个基因为甲基化状态。结合 Real-Time PCR 检测结果, 基因甲基化状态与甲基转移酶 (DNMT1、DNMT3B) 表达呈正相关性; 除 P53 基因外, 基因 mRNA 表达水平与甲基化状态呈负相关性。结论 相关基因表达差异及启动子的甲基化状态可能与乳腺癌细胞株对他莫昔芬敏感性相关, 为下一步进行临床评估和机制探讨提供了依据。

关键词 MCF-7; DNA 甲基化; 化疗耐受; 抑癌基因

中图分类号 R 737.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)12-1717-05

他莫昔芬作为 ER/PR(+) 的乳腺癌内分泌治疗的一线药物, 其耐受性的产生, 无疑是临床内分泌治疗失败的主要原因。而目前缺乏有效的疗效预测方法, 导致临床内分泌治疗不可避免地存在一定程度的盲目性。近年来, 随着人们对表观遗传学研究

的深入, 其在肿瘤耐受中的作用日益受到关注。DNA 甲基化是一种重要的表观遗传修饰, 在调节基因表达和维持基因组稳定性中扮演着重要角色^[1-2]。为寻找可预测乳腺癌内分泌治疗敏感性的相关基因及其启动子甲基化状态的标志物, 该研究分别对 MCF-7 亲本及耐药株乳腺癌细胞株进行相关基因 mRNA 水平的分析, 并通过甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) 法检测了 4 个候选基因(DAPK、MGMT、P53、RASSF1A) 在这些细胞株中的甲基化状态。

1 材料与方法

1.1 实验材料 乳腺癌细胞株 MCF-7 及他莫昔芬成功诱导的耐药株 MCF-7/TAM 均由中国科技大学生命科学院乳腺癌研究中心提供。他莫昔芬购自日本 Sigma 公司; Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit 凋亡检测试剂盒购自美国 Beckman 公司; RNA、DNA 提取、Real-Time PCR、EpiTect MSP Master Mix 试剂盒提剂盒购自德国 QIAGEN 公司; 逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司; 甲基化修饰试剂盒购自美国 Epigentek 公司; DMEM 培养基及胎牛血清购自美国 Gibco 公司; RT-PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; 引物用 Primer 5.0 软件设计, 由上海生工生物技术有限公司合成。

1.2 细胞培养 乳腺癌 MCF-7 及 MCF-7/TAM 细胞株于 10% 胎牛血清 DMEM (另含有 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 青霉素和 100 mg/ml 链霉素), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养, MCF-7/TAM 培养液中加入 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 他莫昔芬, 以维持其耐药性。

1.3 MTT 法检测 MCF-7、MCF-7/TAM 两细胞株生长增殖差异 取对数生长期的两细胞株, 按

2014-06-27 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1308085QH152)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院普通外科, 合肥 230601

作者简介: 郑璐, 女, 硕士研究生;

汤铜钱, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail:

tt20164@126.com

0.05); ② sham rats without infarct volume, compared with the I/R group, Lpost rats reduced infarct volume ($P < 0.05$); compared with Lpost group, AG infarct volume increased ($P < 0.05$); ③ with I/R group rats brain cells apoptosis, Lpost index was significantly lower ($P < 0.05$); compared with Lpost group, AG group of brain cells wither death Index was significantly higher ($P < 0.05$). **Conclusion** limb ischemia treatment has a significant neuroprotective effect, this effect is mediated by the JAK2-STAT3 pathway.

Key words ischemia-reperfusion injury; limb ischemia postconditioning; JAK2-STAT3; apoptosis