NF－κB 在 Jak2/STAT3 通路增加大鼠心肌缺血再灌注致脑损伤中的作用

袁 泉 夏中元 赵 博 刘 恋 詹丽英

摘 要 目的 探讨 NF－κB 在 Jak2/STAT3 通路增加大鼠心肌缺血再灌注致脑损伤中的作用机制。**方法** 雄性 SD 大鼠随机分为 3 组（$n=8$）：假手术组（Sham）、心肌缺血/再灌注组（MIR）、心肌缺血/再灌注＋AG490 组（MIR＋AG）。结扎大鼠冠状动脉左前降支 30min 再灌注 120min 建立心肌缺血/再灌注模型。取大鼠脑组织 HE 染色观察大鼠病理学结果，Western blot 法检测凋亡相关蛋白及 Jak2、STAT3 的表达，Western blot 法检测核蛋白中 NF－κB/p65 的含量。**结果** 与 Sham 组比较，MIR 组脑组织凋亡水平增加：Bax 及 Cytc 表达增多，Bcl－2 表达降低；p－Jak2、p－STAT3 表达较高，脑组织核蛋白中 p65 含量增多，反映 NF－κB 活性增高（$P<0.05$）；与 MIR 组比较，MIR＋AG 组脑组织的凋亡水平降低：Bax 及 Cytc 表达减少，Bcl－2 表达升高；p－Jak2、p－STAT3 表达减少，NF－κB 活性降低（$P<0.05$）。**结论** 抑制 Jak2/STAT3 通路可下调 NF－κB 活性并对心肌缺血再灌注起到保护作用。则 Jak2/STAT3 通路可能通过活化 NF－κB 增加脑组织凋亡水平。

关键词 NF－κB Jak2/STAT3 心肌缺血再灌注 脑损伤

中图分类号 R614 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.07.013

Mechanism of NF－κB Bing Mediated by Jak2/STAT3 Pathway in Brain Injury Induced by Myocardial Ischemia Reperfusion. *Yuan Quan, Xia Zhongyuan, Zhao Bo, et al. Department of Anesthesiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China*

Abstract Objective To study the mechanism of NF－κB bing mediated by Jak2/STAT3 pathway in brain injury induced by myocardial ischemia reperfusion (MIR). **Methods** Male Sprague－Dawley rats were randomly divided into 3 groups ($n=8$): Sham group, MIR group, MIR＋AG group. MIR was induced by occlusion of anterior descending branch of left coronary artery for 30min and reperfusion for 120min. The rats were sacrificed after reperfusion and the brains were removed for hematoxylin－eosin H&E using a microscope. NF－κB/p65 activity is detected by Western blot, as well as apoptosis－related protein and Jak2, STAT3. **Results** Compared with group sham, Bax, Cytc, p－Jak2, p－STAT3, activity of NF－κB were increased, Bcl－2 was decreased in group MIR ($P<0.05$). Compared with MIR group, Bax, Cytc, p－Jak2, p－STAT3, activity of NF－κB were decreased, Bcl－2 was increased in MIR＋AG group ($P<0.05$). **Conclusion** Chances are that NF－κB is an important midst link in the mechanism of Jak2/STAT3 pathway aggravating brain injury induced by myocardial IR.

Key words NF－κB; Jak2/STAT3; Myocardial ischemia reperfusion; Brain injury

再灌注损伤补救激酶通路（reperfusion injury salvage kinases, RISK）和生存活化因子增强通路（survivoractivating factor enhancement, SAFE）是缺血/再灌注损伤的主要信号通路，其可被多种细胞因子激活[1,2]。其中新近发现最为重要的通路是酪氨酸激酶 2/信号转导子和转录激活子 3（Jak2/STAT3）通路[3]。许多细胞因子和生长因子可通过 Jak/STAT 通路传递信号，如白介素（IL）－6 家族、生长激素、表皮生长因子等。这些配体与 Jak 结合后激活 Jak，激活的 Jak 磷酸化 STAT，使 STAT 形成二聚体，暴露入核信号导致 STAT 被引导入核，调控基因转录。Jak2/STAT3 通路参与心肌细胞增殖、分化、凋亡等重要生物过程，并参与血管生成的调节，在心脏疾病的发生机制中发挥着重要的作用。Mascareno 等[4]就曾报道过 Jak/STAT3 通路参与了心肌缺血再灌注损伤的病理过程，这一观点现已被很多研究证实，也成为很多药物的靶点。同样，近年来 Jak2/STAT3 通路也被证实参与神经元损伤的病理过程。Oshima 等[5]也曾研究证实 STAT3 在心肌缺血再灌注损伤诱导的脑损伤这一病理过程起着重要调节作用。

NF－κB（nuclear factor kappa B）也是一组转录因

基金项目：湖北省自然科学基金资助项目（2016CFB167、2017CFB267）；中央高校基本科研业务费专项基金资助项目（2042017kf0147）

作者单位：430060 武汉大学人民医院麻醉科

通讯作者：夏中元，电子信箱：xiazhongyuan2005@aliyun.com

子，参与调控机体免疫及细胞增殖、分化和凋亡，当其活化后被转运入细胞核，可促进多种凋亡因子和促炎因子的基因表达，如白介素（IL）－1、IL－6 等[6,7]。NF－κB 活化的刺激因素包括感染、炎性因子、UV、缺血/再灌注等[8]。Grivennikov 等[9]根据他们的研究提出，在肿瘤和神经退行性疾病的病理过程中，STAT3 调节的 NF－κB 活化起着很重要的作用。目前，NF－κB 在心肌缺血再灌注后脑损伤的作用报道较少，本研究拟探讨 NF－κB 在 Jak2/STAT3 通路中减轻大鼠心肌缺血再灌注致脑损伤的机制。

材料与方法

1. 实验材料：蛋白 BCA 定量试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司。Jak2 特异性抑制剂 AG490 购置于美国 Selleck 公司；单克隆抗体 Jak2、STAT3、Bax、cytc、NF－κB p65 和 Bclx 多克隆抗体购置于美国 CST 公司；核蛋白提取试剂盒 NF－κB 活性检测试剂盒购置于美国 Pierce 公司。

2. 实验动物：雄性 SD 大鼠（SPF 级）24 只，体重 200～220g，购自北京华阜康生物科技股份有限公司。本研究所有动物实验均得到武汉大学人民医院动物保健与使用委员会批准。随机分为 3 组，假手术组（Sham）、心肌缺血/再灌注组（MIR）、心肌缺血/再灌注＋AG490 组（MIR＋AG）。抑制剂组于再灌注前 20min 静脉给予 Jak2 特异性抑制剂 AG490。

3. 大鼠心肌缺血再灌注模型制备：大鼠术前禁食 12h，采用腹腔注射 3% 戊巴比妥钠（50mg/kg）麻醉，固定后气管插管，行动物呼吸机通气，接皮下点极监测Ⅱ导联心电图，分离股静脉并置管。于左锁骨中线第四肋间打开胸腔暴露心脏，在左心耳下缘与肺动脉圆锥间左冠状动脉前降支（LAD）起始部下 3mm 处以 60 尼龙线结扎，心电图见到明显的 ST 段抬高（>0.12mV），心前区变白，则判断造模成功。结扎时间为 30min，松开线结再灌注 120min 后取脑组织。再灌注成功标准：ST 段回落，心尖恢复红润。

4. 观察指标及检测方法：（1）HE 染色观察大鼠脑组织病理学结果：于再灌注 120min 结束后，取脑组织组织，用 4% 多聚甲醛溶液固定，石蜡包埋后于切片机上切片，HE 染色，显微镜下观察病理结果，光镜（×400）下观察病理学结果。（2）Western blot 法检测凋亡相关蛋白 Bax、Bcl－2、Cytc、Jak2、STAT3 的表达量和 p65 的含量：于再灌注 120min 结束时，取脑组织 100mg，用 4℃ 预冷 PBS 灌洗干净后，加入 1000μl RIPA 裂解液，冰上静置 30min，再冰浴电动匀浆，4℃ 下 12000×g 离心 15min，取上清，另取一部分脑组织用核蛋白提取试剂盒提取核蛋白用于检测 NF－κB/p65，用 BCA 法测定蛋白浓度。加 5×上样缓冲液混匀煮沸 10min。Western blot 法进行蛋白定量检测，分别用 10% 分离胶和 5% 浓缩胶、15% 分离胶和 5% 浓缩胶进行电泳，于 PVDF 膜上进行转膜，5% 脱脂奶粉室温封闭 1h，分别用 Bax（稀释度1∶1000）、Bcl－2（稀释度 1∶1000）、Cytc（稀释度1∶1000）、Jak2（稀释度 1∶1000）、STAT3（稀释度1∶1000）和 NF－κB p65（稀释度 1∶1000）4℃ 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次，每次 10min，用山羊抗兔多克隆荧光二抗（稀释度1∶10000，Li－Cor 公司，美国）室温孵育 1h，TBST 洗涤 3 次，每次 10min。用 Odyssey 双色红外激光扫描显影仪（美国 Li－Cor 公司）扫描荧光蛋白条带，用 Odyssey 系统软件进行结果分析，通过目的蛋白条带灰度值与内参 GAPDH 条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。

5. 统计学方法：应用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析，计量资料以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，组间比较采用方差分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. 大鼠心肌缺血再灌注后脑组织 HE 染色：光镜下（400 倍），在 Sham 组中，皮层神经元胞质丰富，排列整齐，核圆而碱染呈蓝色。MIR 组中，皮层神经元细胞水肿，结构遭到破坏。胞质空泡化，呈分布不均匀的淡红色，胞核固缩。大量炎性细胞浸润。MIR＋AG 组中，细胞结构基本恢复正常，大多数神经元胞膜完整，胞核清晰（图 1）。

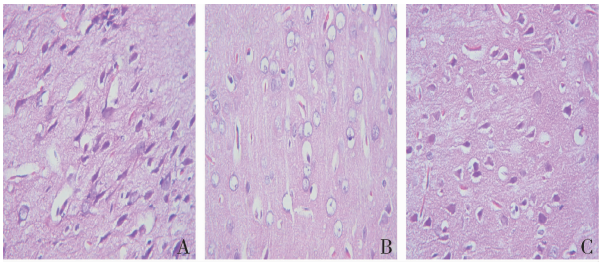


图 1　心脏缺血再灌注后脑组织 HE 染色变化（×400）
A. Sham 组；B. MIR 组；C. MIR＋AG 组

2. 大鼠心肌缺血再灌注后脑组织凋亡水平：MIR 组较 Sham 组比较，Bax 及 Cytc 表达增加，Bcl－2 表达降低（$P<0.05$）；MIR＋AG 组较 IR 组比较，Bax 及 Cytc 表达减少，Bcl－2 表达增加（$P<0.05$），详见表 1。

表 1 心脏缺血再灌注后脑组织的凋亡水平 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	Bax	Bcl-2	Cytc
Sham 组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
MIR 组	2.90 ± 0.28 *	0.50 ± 0.07 *	3.40 ± 0.54 *
MIR + AG 组	1.70 ± 0.24 *#	0.70 ± 0.09 *#	2.50 ± 0.51 *#

与 Sham 组比较，* $P<0.05$；与 MIR 组比较，# $P<0.05$

3. 大鼠心肌缺血再灌注后脑组织 Jak2、STAT3 及 NF-κB 变化：与 Sham 组比较，MIR 组脑组织中 p-Jak2、p-STAT3 的表达增多，且 NF-κB 的活性增高（$P<0.05$）；与 MIR 组比较，MIR + AG 组 Jak2、STAT3 磷酸化水平降低，同时 NF-κB 活性下降（$P<0.05$），详见表 2。

表 2 心脏缺血再灌注后脑组织 Jak2/STAT3 及 NF-κB 活性变化 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	p-Jak2	p-STAT3	NF-κB 活性
Sham 组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
MIR 组	1.80 ± 0.13 *	1.60 ± 0.08 *	2.30 ± 0.14 *
MIR + AG 组	1.30 ± 0.09 *#	1.10 ± 0.11 *#	1.40 ± 0.12 *#

与 Sham 组比较，* $P<0.05$；与 MIR 组比较，# $P<0.05$

讨 论

RISK 通路与 SAFE 通路作为机体内最为重要的缺血/再灌注损伤的主要信号通路。有研究证实：两者之间存在交叉效应，也称“串话”现象[5,10~13]。在两条通路中，保护性信号分子在缺血/再灌注过程中可被激活从而抑制细胞凋亡，减轻损伤。Lecour[14,15]首次提出了 SAFE 促生存信号通路，而 Jak2/STAT3 通路作为 SAFE 通路中最为重要的信号通路，能够介导信号由细胞膜向细胞核转导，从而调控蛋白的表达[16]。

位于 Jak2/STAT3 通路下游的 NF-κB，在维持机体的正常生理功能中具有重要的作用。经典的 NF-κB 信号通路与机体的自身免疫有关[17]。此外，NF-κB 信号通路在细胞凋亡、细胞周期调控与细胞分化等也起重要的调节作用[18]。NF-κB 通过凋亡相关基因的表达发挥抗细胞损伤作用和开关作用，当 NF-κB 不恰当的激活，其可转运入细胞核可启动多种靶基因的转录，是引起过度炎性反应，介导细胞凋亡等损伤的关键因素[19,20]。

本研究结果显示，大鼠心肌缺血再灌注后脑组织的 Jak2 和 STAT3 磷酸化程度增高，同时 NF-κB 活性增高，进一步研究显示大鼠脑组织中凋亡相关蛋白 Bax、Cytc 的表达量增高，抗凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达量降低。因此推测大鼠 Jak2/STAT3 通路的激活可能与脑组织局部凋亡相关因子释放增加有关[21]。同时本研究结果显示，在给予抑制剂后，抑制剂组脑组织凋亡程度较再灌注组下降，凋亡相关蛋白 Bax、Cytc 表达量降低，抗凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达量增多。Jak2/STAT3 通路磷酸化降低的同时 NF-κB 活性下降。因此推测 Jak2/STAT3 的表达可能对 NF-κB 的活性起到调控作用。而 NF-κB 通过转运入细胞核，于特定的基因位点相结合，调节目的基因表达，减少细胞损伤[22,23]。

综上所述，Jak2/STAT3 通路通过调控 NF-κB 的活性，影响凋亡相关蛋白的表达，进而对心肌缺血再灌注后脑损伤发挥重要作用。抑制 Jak2/STAT3 通路，降低 NF-κB 的活性，可以减轻大鼠心肌缺血再灌注所致的脑损伤。

参考文献

1 Liu P, You W, Lin L, *et al*. Helix B surface peptide protects against acute myocardial ischemia-reperfusion injury via the RISKand SAFE pathways in a mouse model[J]. Cardiology, 2016, 134(2):109-117

2 Kalakech H, Hibert P, Prunier-Mirebeau D, *et al*. RISK and SAFE signaling pathway involvement in apolipoprotein A-I-induced cardioprotection[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e107950

3 Li L, Li H, Li M. Curcumin protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by activating JAK2/STAT3 signaling pathway in rats[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(9): 14985-14991

4 Mascareno E, El-Shafei M, Maulik N, *et al*. JAK/STAT signaling is associated with cardiac dysfunction during ischemia and reperfusion[J]. Circulation, 2001, 104:325-329

5 Oshima Y, Fujio Y, Nakanishi T, *et al*. STAT3 mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury through metallothionein induction in the heart[J]. Cardiovasc Res, 2005, 65(2):428-435

6 Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades[J]. Nature, 2001, 412(6847): 641-647

7 Zhang N, Cheng GY, Liu XZ, *et al*. Expression of Bcl-2 and NF-κB in brain tissue after acute renal ischemia-reperfusion in rats[J]. Asian Pac J Trop Med, 2014, 7(5):386-389

8 Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1 a000034

9 Grivennikov S, Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-κB collaboration and crosstalk in cancer[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2010, 21:11-19

10 Gross ER, Hsu AK, Gross GJ. The JAK/STAT pathway is essential for opioid-induced cardioprotection: JAK2 as a mediator of STAT3, Akt, and GSK-3 beta[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 291(2):H827-H834

11 Fuglesteg BN, Suleman N, Tiron C, *et al*. Signal transducer and activator of transcription 3 is involved in the cardioprotective signalling pathway activated by insulin therapy at reperfusion[J]. Basic Res Cardiol, 2008, 103(5):444 – 453

12 Tamareille S, Mateus V, Ghaboura N, *et al*. RISK and SAFE signaling pathway interactions in remote limb ischemic perconditioning in combination with local ischemic postconditioning[J]. Basic Res Cardiol, 2011, 106(6):1329 – 1339

13 Hausenloy DJ, Lecour S, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase and survivor activating factor enhancement prosurvival signaling pathways in ischemic postconditioning: two sides of the same coin [J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 14(5): 893 – 907

14 Lecour S. Multiple protective pathways against reperfusion injury: a SAFE path without Aktion? [J] J Mol Cell Cardiol, 2009, 46(5): 607 – 609

15 Lecour S. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? [J]. J Mol Cell Cardiol, 2009, 47(1): 32 – 40

16 Luan HF, Zhao ZB, Zhao QH, *et al*. Hydrogen sulfide postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia and reperfusion injury mediated by the JAK2/STAT3 survival pathway[J]. Braz J Med Biol Res, 2012, 45(10):898 – 905

17 Richmond A, Yang J. The role of NF – κB in modulating antitumor immunity[J]. Oncoimmunology, 2015, 5(1):e1005522

18 Lv FH, Yin HL, He YQ, *et al*. Effects of curcumin on the apoptosis of cardiomyocytes and the expression of NF – κB, PPAR – γ and Bcl – 2 in rats with myocardial infarction injury[J]. Exp Ther Med, 2016, 12(6):3877 – 3884

19 Fu K, Pan H, Liu S, *et al*. Glycogen synthase kinase – 3β regulates tumor necrosis factor – related apoptosis inducing ligand (TRAIL) – induced apoptosis via the NF – κB pathway in hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Lett, 2015, 10(6):3557 – 3564

20 Pordanjani SM, Hosseinimehr SJ. The role of NF – κB inhibitors in cell response to radiation[J]. Curr Med Chem, 2016, 23(34): 3951 – 3963

21 Hu GQ, Du X, Li YJ, *et al*. Inhibition of cerebral ischemia/reperfusion injury – induced apoptosis: nicotiflorin and JAK2/STAT3pathway [J]. Neural Regen Res, 2017, 12(1): 96 – 102

22 Li L, Li M, Li Y, Sun W, *et al*. Exogenous H2S contributes to recovery of ischemic post – conditioning – induced cardioprotection by decrease of ROS level via down – regulation of NF – κB and JAK2 – STAT3 pathways in the aging cardiomyocytes[J]. Cell Biosci, 2016, 6:26

23 Zeng KW, Wang S, Dong X, *et al*. Sesquiterpene dimer (DSF – 52) from Artemisia argyi inhibits microglia – mediated neuroinflammation via suppression of NF – κB, JNK/p38 MAPKs and Jak2/Stat3 signaling pathways[J]. Phytomedicine, 2014, 21(3):298 – 306

（收稿日期:2017 – 09 – 11）
（修回日期:2017 – 09 – 24）

（接第 190 页）

11 Nassimiha D, Aronow WS, Ahn C, *et al*. Association of coronary risk factors with progression of valvular aortic stenosis in older persons[J]. Am J Cardiol, 2001, 87(11):1313 – 1314

12 Potpara TS, Vasiljevic ZM, Vujisictesic BD, *et al*. Mitral annular calcification predicts cardiovascular morbidity and mortality in middle – aged patients with atrial fibrillation: the Belgrade Atrial Fibrillation Study[J]. Chest, 2011, 140(4):902 – 910

13 Dzeshka MS, Lip GY, Snezhitskiy V, *et al*. Cardiac fibrosis in patients with atrial fibrillation: mechanisms and clinical implications [J]. J Ame College Cardiol, 2015, 66(8):943 – 959

14 Rapezzi C, Merlini G, Quarta CC, *et al*. Systemic cardiac amyloidoses: disease profiles and clinical courses of the 3 main types. [J]. Circulation, 2009, 120(13):1203

15 Tocchi A, Quarles EK, Basisty N, *et al*. Mitochondrial dysfunction in cardiac aging[J]. Biochim Biophy Acta (BBA) – Bioenerget, 2015, 1847(11):1424 – 1433

16 Najafi A, Sequeira V, Kuster D W D, *et al*. β – adrenergic receptor signalling and its functional consequences in the diseased heart[J]. Eur J Clin Invest, 2016, 46(4):362 – 374

17 Babusíková E, Lehotsky J, Dobrota D, *et al*. Age – associated changes in Ca(2 +) – ATPase and oxidative damage in sarcoplasmic reticulum of rat heart. [J]. Physiol Res, 2012, 61(5):453

18 Braunwald E. The war against heart failure: the Lancet lecture. [J]. Lancet, 2015, 385(9970):812

19 Pino AD, Caruso E, Costanzo L, *et al*. A novel RyR2 mutation in a 2 – year – old baby presenting with atrial fibrillation, atrial flutter, and atrial ectopic tachycardia[J]. Heart Rhythm, 2014, 11(8): 1480

20 Keller KM, Howlett SE. Sex Differences in the Biology and Pathology of the Aging Heart[J]. Canadian J Cardiol, 2016, 32(9):1065

21 Nakou ES, Parthenakis FI, Kallergis EM, *et al*. Healthy aging and myocardium: A complicated process with various effects in cardiac structure and physiology[J]. Int J Cardiol, 2016, 209:167

22 Lópezlluch G, Hunt N, Jones B, *et al*. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency[J]. Proce Nat Acad Sci U St A, 2006, 103(6):1768 – 73

23 Qin F, Cohen RA, Colucci WS. Regulation of SERCA via oxidative modifications: implications for the pathophysiology of diastolic dysfunction in the aging heart// Aging and Heart Failure[M]. New York:Springer, 2014:449 – 456

24 Strait JB, Lakatta EG. Aging – associated cardiovascular changes and their relationship to heart failure. [J]. Heart Fail Clin, 2012, 8(1): 143

25 Spadaccio C, Rainer A, Mozetic P, *et al*. The role of extracellular matrix in age – related conduction disorders: a forgotten player? [J]. Geriatr Cardiol, 2015, 12(1):76 – 82

（收稿日期:2017 – 10 – 17）
（修回日期:2017 – 10 – 30）