

# 特异性抑制 JAK2/STAT3 信号通路对大鼠急性脑缺血再灌注损伤后 COX-2 和 VEGF 表达水平的影响

于洁 张向东 杨新丽 马骊珠

**【摘要】 目的** 探讨特异性抑制蛋白酪氨酸激酶 2/信号转导与激活子 3(JAK2/STAT3)信号通路对急性脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织环氧合酶-2(COX-2)和血管内皮生长因子(VEGF)表达水平的影响。**方法** 采用线栓法制备大鼠急性大脑中动脉闭塞再灌注模型;大鼠随机分为假手术组、模型组和给药组;给药组大鼠于再灌注前 5 min 腹腔注射 JAK2/STAT3 信号通路抑制剂 AG490(1 mg/kg),其余 2 组给予等量生理盐水;再灌注 24 h 后各组行神经功能缺损评分,用氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法检测大鼠脑梗死体积,用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测脑组织中 JAK2、STAT3、环氧合酶 2(COX-2)和血管内皮生长因子(VEGF)的 mRNA 相对表达水平,用蛋白印迹(Western blot)检测脑组织磷酸化 JAK2(p-JAK2)、磷酸化 STAT3(p-STAT3)、COX-2 和 VEGF 的蛋白相对表达水平。**结果** 与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分、脑梗死体积、JAK2 和 STAT3 的 mRNA、p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白、COX-2 的 mRNA 和蛋白相对表达水平均显著升高( $P<0.05$ ),VEGF 的 mRNA 和蛋白相对表达水平显著降低( $P<0.05$ );与模型组比较,给药组大鼠神经功能缺损评分、脑梗死体积、JAK2 和 STAT3 的 mRNA、p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白、COX-2 的 mRNA 和蛋白相对表达水平均显著降低( $P<0.05$ ),VEGF 的 mRNA 和蛋白相对表达水平显著升高( $P<0.05$ )。**结论** 特异性抑制 JAK2/STAT3 信号通路可能通过降低脑组织中 COX-2 表达和促进 VEGF 表达来保护大鼠急性脑缺血再灌注损伤。

**【关键词】** 急性脑缺血再灌注损伤 JAK2/STAT3 信号通路 环氧合酶-2 血管内皮生长因子

**【中图分类号】** R743.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2020)05-0567-05

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2020.05.002

**The effects of specific inhibition of JAK2/STAT3 signaling pathway on the expression levels of COX-2 and VEGF in rats with acute cerebral ischemia reperfusion injury** Yu Jie, Zhang Xiangdong, Yang Xinli, et al. The Third Department of Neurology, Anyang People's Hospital, Anyang Henan 455000

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of specific inhibition of JAK2/STAT3 signaling pathway on the expression levels of COX-2 and VEGF in rats with acute cerebral ischemia reperfusion injury. **Methods** The acute middle cerebral artery occlusion reperfusion model was prepared by the suture method in rats. The rats were randomly divided into the sham operation group, the model group and the drug administration group. The rats in the drug administration group were injected intraperitoneally with JAK2/STAT3 signaling pathway inhibitor AG490 (1 mg/kg) 5 min before reperfusion, and the other two groups were given the same amount of normal saline. Twenty-four hours after reperfusion, the neurological deficit score were performed in each group. The volume of cerebral infarction in rats was measured by triphenyl tetrazolium chloride (TTC) staining. RT-qPCR was used to detect mRNA expression levels of JAK2, STAT3, COX-2 and VEGF in brain tissues, and Western blot was used to detect protein expression levels of p-JAK2, p-STAT3, COX-2 and VEGF. **Results** Compared with the sham operation group, the neurological score, cerebral infarction volume, mRNA expression levels of JAK2 and STAT3, protein expression levels of p-JAK2 and p-STAT3 protein, and mRNA and protein expression levels of COX-2 in the model group were significantly increased ( $P<0.05$ ), and mRNA and protein expression levels of VEGF were significantly reduced ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the neurological score, cerebral infarction volume, mRNA expression levels of JAK2

and STAT3, protein expression levels of p-JAK2 and p-STAT3, and mRNA and protein expression levels of COX-2 in the administration group were significantly reduced ( $P < 0.05$ ), and mRNA and protein expression levels of VEGF were significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Specific inhibition of JAK2/STAT3 signaling pathway might protect brain injury in rats with acute cerebral ischemia reperfusion injury by reducing COX-2 expression and promoting VEGF expression in brain tissue.

**【Key words】** Acute cerebral ischemia JAK2/STAT3 signaling pathway Cyclooxygenase-2 Vascular endothelial growth factor

缺血性脑血管病是危害人类健康的主要疾病之一。脑缺血再灌注损伤(Cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)是指脑缺血导致脑细胞损伤,恢复血液再灌注后其缺血损伤进一步加重的现象,这也是脑血管疾病发病的主要原因<sup>[1]</sup>。蛋白酪氨酸激酶 2/信号转导与转录激活子 3(Janus kinase signal transducers 2 and activator of transcription 3, JAK2/STAT3)信号通路是细胞内重要的信号通路,参与神经细胞的生长发育、分化及衰老等过程,与脑缺血、脑肿瘤等神经系统病理过程密切相关<sup>[2]</sup>。有研究表明,急性脑缺血时 JAK2/STAT3 信号通路被激活,加重脑损伤<sup>[3]</sup>。环氧合酶 2(cyclooxygenase 2, COX-2)是产生前列腺素的关键限速酶,其可直接损伤神经元,参与脑缺血再灌注损伤<sup>[4]</sup>。血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种高度碱基化的碱性蛋白,可促进血管和神经元再生,保护脑损伤<sup>[5]</sup>。本研究采用线栓法制备大鼠急性大脑中动脉闭塞再灌注模型,以探讨特异性抑制 JAK2/STAT3 信号通路对急性脑缺血再灌注损伤大鼠 COX-2 和 VEGF 表达水平的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和试剂

SD 雄性大鼠,清洁级,体重 180~250 g,购于湖南中医学院实验动物中心,合格证号: SCXK(湘 2002-003);饲养环境:温度 25~28 ℃,保持昼夜各 12 h,自由饮水和进食,适应性饲养 1 周。JAK2/STAT3 信号通路抑制剂 AG490(美国 MedChem Express 公司),氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride, TTC)(北京索莱宝科技有限公司),Trizol 试剂、逆转录试剂盒和 PCR 试剂盒(深圳晶美生物工程有限公司),PCR 引物(上海生工生物工程有限公司),磷酸化 JAK2(p-JAK2)、磷酸化 STAT3(p-STAT3)、COX-2 和 VEGF 多克隆抗体(北京中杉金桥生物试剂公司),二喹啉甲酸(Bicinchoninic acid, BCA)蛋白检测试剂

盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 大鼠分组和模型建立

SD 大鼠按照随机数字表法分为假手术组、模型组和给药组,每组各 12 只;参照文献方法<sup>[6]</sup>,采用线栓法制备大鼠急性大脑中动脉闭塞再灌注模型,即大鼠腹腔注射 100 g/L 的水合氯醛(350 mg/kg)麻醉后左侧颈总动脉(CCA)分叉处分离颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),电凝器凝断 ECA 及其分支,游离 ECA 主干,使用眼科剪于 ECA 的远心端 45°剪一倒“V”小口,导入线栓,深度约 19~22 cm,线栓头端堵塞大脑中动脉(MCA)开口,术后 2 h 后拔出栓线,再灌注 24 h;假手术组只分离 ECA 和 ICA,不插入线栓;给药组在再灌注前 5 min 腹腔注射 JAK2/STAT3 信号通路抑制剂 AG490(1 mg/kg<sup>[7]</sup>),其余 2 组腹腔注射等量生理盐水;以大鼠手术麻醉清醒后出现左侧肢体瘫痪、站立不稳、提尾时向一侧转圈为模型成功的判断标准。

#### 1.2.2 神经功能缺损评分

大鼠再灌注 24 h 后每组各随机选取 6 只,参照 Zea Longa 等<sup>[8]</sup>神经功能缺损评分标准对各组大鼠进行神经功能缺损评分。未出现任何神经功能缺损表现,记 0 分;垂直提起时前爪不能伸直,记 1 分;行走时身体向对侧倾斜或旋转,记 2 分;行走时身体向对侧跌倒,记 3 分;不能自发行走、出现意识障碍,记 4 分。

#### 1.2.3 氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法检测大鼠脑梗死体积

参照文献方法<sup>[9]</sup>,各组大鼠行神经功能缺损评分后断头处死,取出脑组织;速冻 15 min 后冠状位切成 5 片,每片约 3 mm,置于 2% TTC 溶液中 37 ℃避光孵育 30 min,多聚甲醛固定;正常脑组织为红色,而梗死的脑组织呈白色;拍照后利用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件处理,计算各个脑片梗死面积占大脑半球体积百分比。

#### 1.2.4 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测基因表达水平

Trizol 试剂提取大鼠脑组织中总 RNA,使用微量核酸仪检测 RNA 纯度和浓度。参照逆转录试剂盒将提取的 RNA 合成为 cDNA。以 cDNA 为模板,行 PCR 扩增。PCR 扩增条件:95 ℃ 5 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 35 个循环。引物序列:JAK2 上游 5'-GCTTG TGAGAAAGC-3',下游 5'-GTCCCTATACGAAC-3';STAT3 上游 5'-CCATTGGGCCATCCT GT TTCT-3',下游 5'-AGAAACAGGATGGCCCAATGG-3';COX-2 上游 5'-GGCTCCATCCTCAA GAAGGTG-3',下游 5'-GGGACGAGTCCATGCTCTG-3';VEGF 上游 5'-CTCGCAGTGTCGG AGCCGGAGA-3',下游 5'-GCAGCCTGGGACCAGTTGGC-3';GAPDH 上游 5'-TGACGACC GTCGTGATCGGAC-3',下游 5'-CCGTGATCGAAAGCTCGCTGC-3'。以 GAPDH 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 JAK2,STAT3,COX-2 和 VEGF 的 mRNA 相对表达水平。

1.2.5 Western Blot 法检测 p-JAK2、p-STAT3、COX-2 和 VEGF 蛋白相对表达水平

RIPA 蛋白裂解液提取脑组织中总蛋白,采用 BCA 蛋白试剂盒测定蛋白水平;取适量蛋白溶液,100 ℃煮沸 5 min;蛋白变性后以每泳道 30 μg 蛋白行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳;电泳结束后湿转至聚偏乙烯二氟膜;转膜后置于 5%脱脂奶粉中封闭 2 h;洗膜后分别加入 p-JAK2、p-STAT3、COX-2 和 VEGF 抗体孵育液,4 ℃孵育过夜;次日洗膜后置于辣根过氧化酶标记的二抗孵育液中,37 ℃孵育 1 h;洗膜后加入 ELC 化学发光试剂,避光显影,凝胶成像系统曝光拍照。

1.2.6 统计学处理

利用 SPSS. 22.0 软件,符合正态分布的计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠脑组织中 p-JAK2 和 p-STAT3 相对表达水平

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中 JAK2 和 STAT3 的 mRNA 及 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白相对表达水平均显著升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,给药组大鼠脑组织中 JAK2 和 STAT3 的 mRNA 及 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白相对表达水平均

显著降低( $P < 0.05$ )(表 1 和图 1)。

表 1 各组大鼠脑组织中 JAK2 和 STAT3 的 mRNA 相对表达水平( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	JAK2 mRNA	STAT3 mRNA
假手术组	1.06 ± 0.08	1.04 ± 0.07
模型组	2.67 ± 0.19*	3.28 ± 0.24*
给药组	1.46 ± 0.12#	1.67 ± 0.15#

注:与假手术组比较,\*  $P < 0.05$ ;与模型组比较,#  $P < 0.05$

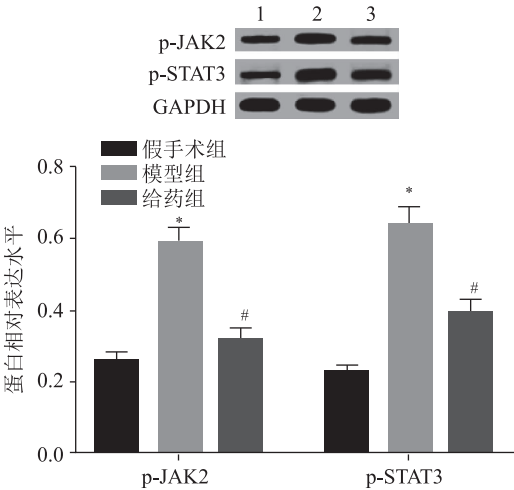


图 1 各组大鼠脑组织 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白相对表达水平 1 为假手术组;2 为模型组;3 为给药组;与假手术组比较,\*  $P < 0.05$ ;与模型组比较,#  $P < 0.05$

2.2 各组大鼠神经功能缺损评分比较

与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分显著升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,给药组大鼠神经功能缺损评分显著降低( $P < 0.05$ )(图 2)。

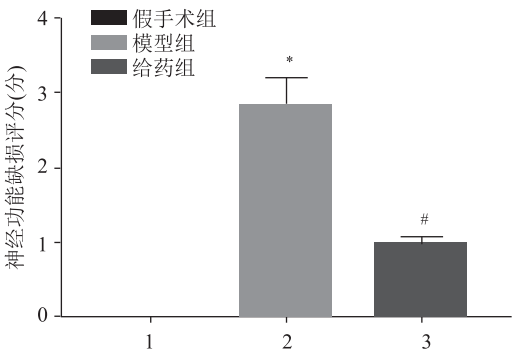


图 2 各组大鼠神经功能缺损评分 1 为假手术组;2 为模型组;3 为给药组;与假手术组比较,\*  $P < 0.05$ ;与模型组比较,#  $P < 0.05$

2.3 各组大鼠脑梗死体积比较

与假手术组比较,模型组大鼠脑梗死体积显著升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,给药组大鼠脑梗死体积显著降低( $P < 0.05$ )(图 3)。

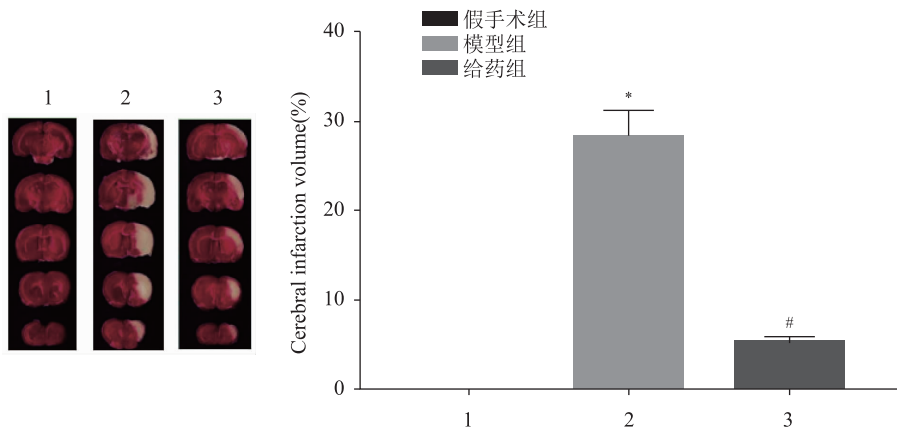


图3 各组大鼠脑梗死体积 1为假手术组;2为模型组;3为给药组;与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,# $P<0.05$

2.4 各组大鼠脑组织中 COX-2 和 VEGF 的 mRNA 相对表达水平比较

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 COX-2 mRNA 相对表达水平显著升高( $P<0.05$ ),VEGF mRNA 相对表达水平显著降低( $P<0.05$ );与模型组比较,给药组大鼠脑组织 COX-2 mRNA 相对表达水平显著降低( $P<0.05$ ),VEGF mRNA 相对表达水平显著升高( $P<0.05$ )(表 2)。

表2 各组大鼠脑组织中 COX-2 和 VEGF 的 mRNA 相对表达水平( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	COX-2 mRNA	VEGF mRNA
假手术组	1.05 ± 0.08	1.03 ± 0.09
模型组	2.43 ± 0.17 *	0.31 ± 0.02 *
给药组	1.35 ± 0.11 #	0.85 ± 0.07 #

注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,# $P<0.05$

2.5 各组大鼠脑组织 COX-2 和 VEGF 的蛋白相对表达水平比较

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 COX-2 蛋

白相对表达水平显著升高( $P<0.05$ ),VEGF 蛋白相对表达水平显著降低( $P<0.05$ );与模型组比较,给药组大鼠脑组织 COX-2 蛋白相对表达水平显著降低( $P<0.05$ ),VEGF 蛋白相对表达水平显著升高( $P<0.05$ )(图 4)。

3 讨论

JAK/STAT 信号通路与 CIRI 发生发展密切相关,由 Janus 酪氨酸激酶家族 JAK 和信号转导与转录激活因子 STAT 组成,JAK2 和 STAT3 是 JAK/STAT 信号通路的主要成员。有研究表明,CIRI 大鼠脑组织 JAK2 和 STAT3 表达增加,诱导脑损伤<sup>[10]</sup>。本研究结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 JAK2 和 STAT3 的 mRNA 及 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白相对表达水平升高,神经功能缺损评分和脑梗死体积显著升高,与相关研究报道结果一致<sup>[9]</sup>,说明急性脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中 JAK2/STAT3 信号通路激活,该信号通路参与

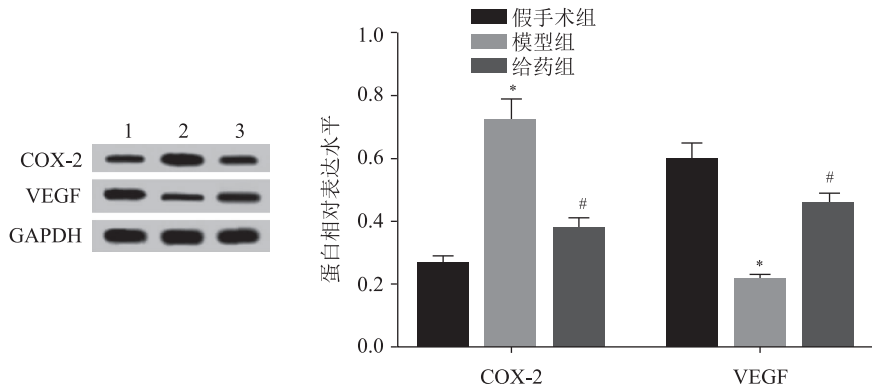


图4 各组大鼠脑组织 COX-2 和 VEGF 蛋白相对表达水平 1为假手术组;2为模型组;3为给药组;与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,# $P<0.05$

脑缺血再灌注损伤。给药组大鼠脑组织 JAK2 和 STAT3 的 mRNA 及 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白相对表达水平降低,神经功能缺损评分和脑梗死体积显著降低,说明抑制 JAK2/STAT3 信号通路可有效降低脑缺血再灌注损伤。

多种炎症因子参与 CIRI 发生时的炎症反应。COX-2 是 COX 的诱导型环异构体,是重要的炎症介质。在正常生理状态下细胞或组织中 COX-2 的表达水平非常低或不表达,当受到炎症、疼痛等刺激后其表达水平明显升高<sup>[11]</sup>。张小菊等<sup>[12]</sup>研究显示,COX-2 在脑缺血再灌注大鼠脑组织中表达水平升高,并加重脑损伤的严重程度。本研究结果显示,模型组大鼠脑组织 COX-2 的 mRNA 和蛋白相对表达水平高于假手术组,而给药组大鼠脑组织 COX-2 的 mRNA 和蛋白相对表达水平显著低于模型组,说明特异性抑制 JAK2/STAT3 信号通路可抑制急性脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中 COX-2 表达,提示抑制 JAK2/STAT3 信号通路可能通过抑制 COX-2 表达来发挥脑保护作用。

VEGF 是目前已知的作用最强、特异性最高的血管生长因子,具有促血管内皮细胞分裂、增生、迁移和增强血管通透性的作用,参与血管再生、神经保护及缺血后神经元再生<sup>[13]</sup>。在 CIRI 时 VEGF 表达上调可刺激内皮细胞增生,形成新的血管,并可诱导内皮细胞中抗凋亡蛋白的产生,维持新生血管中内皮细胞存活<sup>[14]</sup>。VEGF 还可降低脑缺血再灌注大鼠脑梗死体积,减轻脑水肿。高红莉等<sup>[15]</sup>研究显示,黄芪和丹参配伍可能通过上调 VEGF 和碱性成纤维细胞因子的表达来保护局灶性 CIRI。余晴晴等<sup>[16]</sup>研究显示,当归补血汤可能通过增加 VEGF、血管紧张素等表达来促进 CIRI 大鼠脑缺血部位的血管再生,促进神经功能的恢复。本研究结果显示,模型组大鼠脑组织 VEGF 的 mRNA 和蛋白相对表达水平低于假手术组,而给药组大鼠脑组织 VEGF 的 mRNA 和蛋白相对表达水平高于模型组,说明特异性抑制 JAK2/STAT3 信号通路可促进急性脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中 VEGF 表达,提示抑制 JAK2/STAT3 信号通路可能通过促进 VEGF 表达来发挥脑保护作用。

综上所述,特异性抑制 JAK2/STAT3 信号通路可降低急性脑缺血再灌注大鼠脑损伤,其机制可能与抑制 COX-2 表达和促进 VEGF 表达有关。

## 参 考 文 献

- [1] 王佳,高峰,张春兵. 川芎嗪对二甲酰胺引起的 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 分子诊断与治疗杂志,2014,6(5):302-306.
- [2] Tang Y, Tong X, Li Y, et al. JAK2/STAT3 pathway is involved in the protective effects of epidermal growth factor receptor activation against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Neurosci Lett,2018,662(5):219-226.
- [3] 韩德雄,张莺,冯培培,等. 电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠 JAK2/STAT3 mRNA 及神经元凋亡的影响[J]. 中华中医药杂志,2015,30(12): 4446- 4449.
- [4] Yu L, Yang B, Wang J, et al. Time course change of COX2-PGI2/TXA2 following global cerebral ischemia reperfusion injury in rat hippocampus[J]. Behav Brain Funct,2014,10(1): 42-51.
- [5] 许鹏,史磊,周杰,等. VEGF 联合 BMSCs 移植对脑出血大鼠神经功能修复的机制研究[J]. 中华生物医学工程杂志,2018,24(2):91-96.
- [6] 戴伟娟,张国安,王旭,等. 前列腺素 E1 对大鼠脑缺血再灌注损伤后 Apaf-1 及 TLR4 表达的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志,2017,26(4):300-303.
- [7] 韦家俊,廖小明,王耀辉,等. JAK2/STAT3 信号转导通路在大鼠脑缺血再灌注损伤中的作用[J]. 临床神经病学杂志,2015,28(4):281-283.
- [8] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke,1989,20(1):84-91.
- [9] 张昕洋,傅晨,曾子修,等. 清脑滴丸激活脑缺血再灌注大鼠海马 JAK2/STAT3 磷酸化的神经保护作用[J]. 中华中医药杂志,2018,33(9): 4184- 4187.
- [10] 蒋持怡,艾琪,刘喆,等. 电针改善慢性脑低灌注大鼠空间学习记忆能力和海马 IL-6/JAK2/STAT3 的信号调节[J]. 中国病理生理杂志,2018,34(7):1170-1176.
- [11] Tang SC, Liao PY, Hung SJ, et al. Topical application of glycolic acid suppresses the UVB induced IL-6, IL-8, MCP-1 and COX-2 inflammation by modulating NF- $\kappa$ B signaling pathway in keratinocytes and mice skin[J]. J Dermatol Sci,2017,86(3): 238-248.
- [12] 张小菊,王荔,高建英,等. 高脂血症对脑缺血再灌注大鼠脑组织中 MMP-9 和 COX-2 表达的影响[J]. 中国临床神经科学,2011,19(3): 270- 275.
- [13] Zhao QQ, Ji ML, Wang XM. IL-10 inhibits retinal pigment epithelium cell proliferation and migration through regulation of VEGF in rhegmatogenous retinal detachment [J]. Mol Med Rep,2018,17(5):7301-7306.
- [14] Peng L, Yin JW, Wang S, et al. TGF- $\beta$ 2/Smad3 signaling pathway activation through enhancing VEGF and CD34 ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury after isoflurane post-conditioning in rats[J]. Neurochem Res,2019,44(11):2606-2618.
- [15] 高红莉,王德才,曲晓兰,等. 黄芪丹参配伍对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 VEGF 和 bFGF mRNA 表达的影响[J]. 中药药理与临床,2013,29(5):95-98.
- [16] 余晴晴,柏建峰,王江军. 当归补血汤对脑缺血再灌注损伤大鼠血管新生及 Ang-1、Ang-2、VEGF 和 Tie-2 的影响[J]. 国际医药卫生导报,2017,23(9):1317-1321.