

· 论 著 ·

人参皂苷 Rb1 对大鼠脑缺血再灌注 JAK2/STAT3 信号转导通路的影响*

余 录¹,胡光强²,陈碧琼¹,涂 华¹,杨朝鲜²
(泸州医学院:1. 基础医学院;2. 神经生物研究室,四川泸州 646000)

摘 要:目的 探讨人参皂苷 Rb1 对脑缺血再灌注损伤 JAK2/STAT3 胞内信号通路的影响,明确其保护机制。方法 建立大鼠中动脉缺血再灌注(MCAO/R)模型,将大鼠随机分为假手术组、溶媒组、人参皂苷 Rb1 低剂量组、人参皂苷 Rb1 高剂量组,观察大鼠神经行为学障碍程度,ELISA 检测脑组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)的含量,免疫组织化学染色法观察缺血侧大脑 p-JAK2 和 p-STAT3 的表达。结果 (1)与溶媒组比较,人参皂苷 Rb1 高剂量组显著降低大鼠神经行为学评分($P<0.05$)。(2)人参皂苷 Rb1 高剂量组明显减少 TNF- α 、IL-6 的含量($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而在低剂量组,TNF- α 含量显著减少($P<0.05$),IL-6 的含量也有所降低但差异无统计学意义($P>0.05$)。(3)人参皂苷 Rb1 高剂量组、低剂量组显著降低 p-JAK2 和 p-STAT3 的表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 人参皂苷 Rb1 可能通过调控细胞因子介导的 JAK2/STAT3 信号途径保护脑缺血再灌注损伤。

关键词:人参皂苷 Rb1;脑缺血;再灌注损伤;JAK2/STAT3
doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.17.002 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2013)17-1932-03

Effect of ginsenoside Rb1 on the JAK2/STAT3 signal transduction pathway after cerebral ischemia-reperfusion in rats*
Yu Lu¹, Hu Guangqiang², Chen Biqiong¹, Tu Hua¹, Yang Chaoxian²
(1. School of Basic Medical Sciences; 2. Department of Neurobiology, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To explore the effect of ginsenoside Rb1 on the JAK2/STAT3 signal transduction pathway after cerebral ischemia-reperfusion in rats for identifying the protection mechanism. Methods Made the model of middle cerebral artery occlusion/reperfusion(MCAO/R). Rats were randomly divided into sham group, vehicle group, high dosage group, and low dosage group of ginsenoside Rb1. The neurological deficit scores were assessed, the contents of TNF- α and IL-6 in ischemia brain tissue were detected by ELISA and the expressions of p-JAK2 and p-STAT3 were observed in the cortex by immunohistochemistry staining. Results (1) The neurological deficit scores were significantly decreased in ginsenoside Rb1 high dosage group compared with vehicle group($P<0.05$). (2) Ginsenoside Rb1 of high dosage significantly reduced the content of TNF- α and IL-6 in ischemia brain tissue ($P<0.05$ or $P<0.01$), the content of TNF- α was decreased significantly in low dosage group($P<0.05$), the content of IL-6 was also decreased but without statistical significance. (3) Both ginsenoside Rb1 of low and high dosage reduced the expressions of p-JAK2 and p-STAT3 after cerebral ischemia-reperfusion($P<0.05$ or $P<0.01$). Conclusion Ginsenoside Rb1 improved neurologic deficits' symptoms after cerebral ischemia-reperfusion, reduced the contents of TNF- α and IL-6 and inhibited the phosphorylation of JAK2 and STAT3. Therefore, Ginsenoside Rb1 could protect cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating the JAK2/STAT3 signal transduction pathway.

Key words: GRb1; brain ischemia; reperfusion injury; JAK2/STAT3

脑卒中为目前世界上致死率和致残率排名第 2 位的疾病^[1],缺血性脑卒中占卒中病例的 70%~80%,是脑卒中的主要类型,严重威胁人类健康与生命安全。因此,开发安全、有效的治疗药物、寻找确切的治疗靶点已是当前迫切需要。人参是中国传统中药之精品,人参皂苷(ginsenoside, GR)是人参的主要有效成分,在临床上尤其是神经科得到广泛的应用。GR 按苷元的不同分多种类型,其中,GRb1 含量最为丰富。研究表明,GRb1 能通过抗炎、抗氧化、抗凋亡等保护脑缺血再灌注损伤。Janus 激酶/信号转导和转录激活因子(Janus kinases/signal transducers and activators of transcription, JAKs/STATs)是细胞因子及氧化应激的一条重要的胞内信号转导途径,与脑缺血等中枢神经系统疾病的病理生理过程密切相关^[2]。本实验通过建立大鼠大脑中动脉缺血再灌注(MCAO/R)模型,探讨 GRb1 对 JAK2/STAT3 胞内信号通路的影响,明确其保护机制。

1 材料与方法
1.1 材料
1.1.1 药物与试剂 GRb1(纯度大于或等于 98%,白色粉末,批号:ZL20100705A),由南京泽朗植提技术有限公司提供。磷酸化 JAK2 多克隆抗体,磷酸化 STAT3 单克隆抗体(Santa Cruz 公司产品)。SABC 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),TNF- α 、IL-6 ELISA 试剂盒(北京环亚泰克生物医学技术有限公司);考马斯亮兰蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),其他试剂均为国产分析纯。
1.1.2 实验动物及分组 雄性 SD 大鼠,体质量 250~300 g,购自第三军医大学动物饲养中心。随机分为 4 组:假手术组、溶媒组、GRb1 高剂量组(40 mg/kg)、GRb1 低剂量组(20 mg/kg)。假手术组和溶媒组给予等量的生理盐水,药物和溶媒均在再灌时立即腹腔注射。

* 基金项目:泸州医学院青年基金资助项目(201125)。 作者简介:余录(1974~),实验师,主要从事心脑血管药理研究。

1.2 方法

1.2.1 MCAO/R 模型的建立 大鼠用 10% 水合氯醛 (350 mg/kg) 腹腔注射麻醉后, 将其仰卧固定于手术台上, 从颈部正中切口, 依次小心分离右侧颈总动脉 (CCA)、颈外动脉 (ECA) 及颈内动脉 (ICA), 结扎并剪断 ECA, 在 ECA 近分叉处用眼科手术剪剪一小口, 从 ECA 往 ICA 插入制备好的栓线, 栓线头端圆润, 直径约 0.34 mm, 插入深度为 18~20 mm, 感到有阻力时停止插入, 然后将栓线尾端固定于 ECA 上, 逐层缝合肌肉皮肤。缺血 2 h 后, 将栓线头端拉出实现再灌注。术中由红外灯照射使大鼠体温维持在 37℃。假手术组除不插入线栓外, 其余步骤相同。

1.2.2 神经行为学评分 缺血后 2 h, 参照 Longa 等^[3] 方法对大鼠进行神经功能缺失评分。0 分: 无任何神经功能缺损; 1 分: 右前肢不能完全伸展; 2 分: 向左侧转圈; 3 分: 行走或静止时向左侧倾倒; 4 分: 不能自主活动; 5 分: 死亡。在初次评分后满足 1~3 分的大鼠纳入后继的实验组。再灌注后 24 h, 再次对大鼠进行神经行为学评分并进行统计学处理。

1.2.3 TNF- α 、IL-6 的含量测定 每组 8 只大鼠, 再灌 24 h 后, 将大鼠麻醉, 剖开胸腔, 剪破右心耳, 用生理盐水从左心室灌注至流出液为澄清, 取出大鼠缺血侧 -80℃ 保存, 测定前称重, 以 1:10 比例加入冰生理盐水匀浆, 3 500 r/min 离心 15 min, 取出上清液, 严格按照 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF- α 、IL-6 的含量。

1.2.4 p-JAK2 和 p-STAT3 免疫组织化学的检测 每组 4 只大鼠, 再灌注 24 h 后, 先用冰冻的 PBS 溶液 (pH 为 7.2~7.4) 约 200 mL 快速灌流, 再用 4% 的多聚甲醛溶液灌流。然后迅速剪开颅骨, 取出大脑, 用 10% 中性甲醛固定 24~48 h, 从大脑前囟 -2.3 mm 处向后切取厚约 3 mm 的冠状脑组织, 用石蜡包埋, 制作厚度约 5 μ m 的脑部冠状切片, 用于免疫组织化学染色。免疫组织化学采用 SABC 法。将石蜡切片脱蜡、复水, 3% 的 H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶, 然后用微波进行抗原修复, 5% BSA 液封闭, 清洗后加一抗 (p-JAK2 和 p-STAT3), 37℃ 孵育 2 h, 移置于 4℃ 冰箱过夜。加二抗孵育 1 h, 清洗后滴加 SABC, 37℃ 孵育 1 h 后, 清洗。DAB 显色, 苏木素复染, 盐酸乙醇分化、氨水返蓝、脱水封片。

1.3 统计学处理 免疫组织化学染色后, 取缺血侧皮层额叶 4 个不重叠的区域采图, 然后用 Image Pro-plus5.0 软件分析免疫组织化学阳性表达的累积光密度值 (IOD) 并计算每组平均值。所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验结果采用 SPSS16.0 软件进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析的方法进行, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 GRbl 对缺血再灌注大鼠神经行为学评分的影响 再灌 24 h 后, 大鼠出现明显的神经运动功能障碍, 其主要表现为 Horner 综合征即右侧瞳孔缩小、眼睑下垂、眼裂狭小甚至眼底出血呈红肿, 肢体障碍即提尾时左前肢内收、肩内旋、肌张力明显降低, 爬行时向右侧划圈、追尾, 甚至倾倒或不能自行行走。与溶媒组比较, GRbl 高剂量组神经行为学评分明显降低 ($P < 0.05$), GRbl 低剂量组评分也有所降低, 但差异无统计学意义, 见表 1。

2.2 GRbl 对脑缺血再灌注大鼠脑组织中 TNF- α 和 IL-6 的影响 缺血 2 h 再灌注 24 h 后, 溶媒组 TNF- α 、IL-6 含量明显增高。与溶媒组比较, GRbl 低剂量组、高剂量组 TNF- α 含量均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), IL-6 的含量也有所降低, 其中, 高剂组显示差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 结果见表 2。

表 1 GRbl 对脑缺血再灌注大鼠神经功能评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

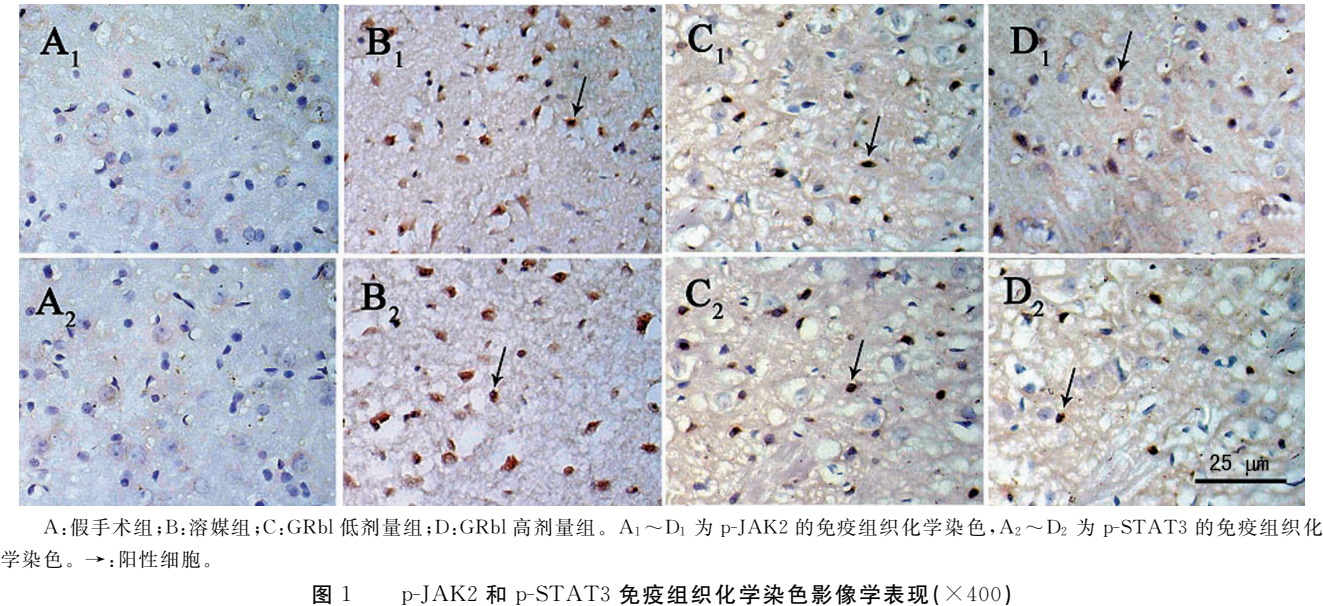
组别	神经行为学评分
假手术组	0.00 $\pm$ 0.00
溶媒组	2.75 $\pm$ 0.96
GRbl 低剂量组	2.28 $\pm$ 0.51
GRbl 高剂量组	1.66 $\pm$ 0.65*

*: $P < 0.05$, 与溶媒组比较。

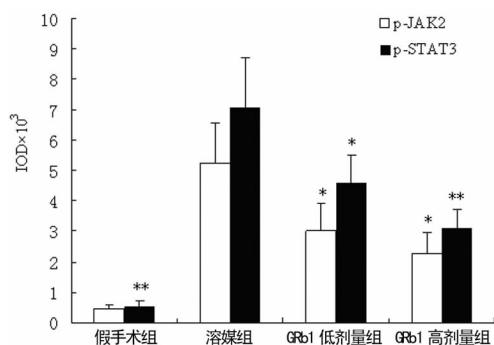
表 2 各组大鼠脑组织中 TNF- α 、IL-6 的含量比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	TNF- α 含量 (pg/g, pro)	IL-6 的含量 (pg/g, pro)
假手术组	75.83 $\pm$ 9.20**	44.67 $\pm$ 16.42**
溶媒组	142.18 $\pm$ 22.43	82.41 $\pm$ 21.33
GRbl 低剂量组	120.35 $\pm$ 17.04*	75.58 $\pm$ 23.09
GRbl 高剂量组	98.29 $\pm$ 20.62**	61.42 $\pm$ 16.67**

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与溶媒组比较。



2.3 GRbl 对大鼠脑缺血再灌注损伤后 p-JAK2, p-STAT3 表达的影响 假手术组未见 p-JAK2 和 p-STAT3 免疫阳性细胞的表达,而在溶媒组可见到缺血侧大量的深棕色阳性细胞的表达,主要集中在缺血半暗带,在缺血核心区也有少量表达。GRbl 高剂量组、低剂量组 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达量明显减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$),结果见图 1~2。



*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, 与溶媒组比较。

图2 p-JAK2 和 p-STAT3 免疫组织化学染色阳性表达累积光密度值

3 讨论

缺血性卒中损伤涉及的病理机制极为复杂。诸多证据显示,炎症事件介导缺血再灌注损伤的病理进程^[4]。炎症级联反应中,细胞因子、转录因子等扮演着重要角色,最终导致神经损伤与功能障碍。JAKs/STATs 是细胞因子、氧化应激等介导的重要胞内信号转导途径^[5]。JAKs 蛋白家族包括 JAK1、JAK2、JAK3、TYK2,而 STATs 蛋白家族包括 STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5a、STAT5b、STAT6。其中 JAK2/STAT3 与脑缺血密切相关。脑缺血及再灌注损伤导致大量炎症细胞因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-6(IL-6)、生长因子以及活性氧的产生和释放,这些因子与特异受体结合激活 JAKs 使其酪氨酸残基磷酸化,识别 STATs 的 SH2 区域并转移至细胞核,调节靶基因的表达,引起白细胞聚集于梗死外周区域,进一步参与迟发性炎症反应,导致神经毒性作用,造成恶性循环。

人参是珍贵的多年生草本植物,具有补气生血、安神益智、生津止渴之功效。GR 是人参、三七等中药材的主要有效成分,在临床上尤其是神经科得到广泛的应用。GR 按二元的结构可分为齐墩果酸型、原人参二醇型(如 Rb1、R3)和原人参三醇型(Rg1),GRbl 是其中含量最丰富的人参皂苷单体之一,其具有广泛的药理学活性,作用于中枢神经系统、心血管系统、免疫系统等^[6]。研究表明,GRbl 能通过抗凋亡等保护脑缺血再灌注损伤^[7-8],而缺血后 JAK2/STAT3 信号通路异常激活导致神经元凋亡的发生,应用 JAK2 特异性抑制剂 AG490 阻断 JAK2 和 STAT3 的磷酸化,而且具有抗细胞凋亡作用^[9]。GRbl 能抑制缺血再灌注炎症反应^[10],而 IL-6、活性氧是选择性激活 JAK2/STAT1、STAT3 的细胞因子。有研究发现,GRbl 通过 JNK/p38 MAPK 信号途径减轻神经元 tau 蛋白的过度磷酸化,而阻断 MAPK 的作用后,STAT 的转录活性明显降低,表明 MAPK 可能激活 STAT 的转录活性^[11]。因此,GRbl 有可能作用于脑缺血损伤中的 JAK2/STAT3 信号通路。

本实验研究发现,大脑缺血 2 h 再灌 24 h 后,大鼠有明显的神经行为学缺失症状,缺血侧脑组织可见明显的水肿以及苍

白色的梗死灶,脑组织中细胞因子 TNF- α 、IL-6 的含量明显增加。Acalovschi 等^[12]研究表明,IL-6 加重脑缺血损伤,其水平与脑梗死体积相关,是神经功能恶化的预警器。本实验免疫组织化学染色发现,缺血侧皮层 p-JAK2 和 p-STAT3 免疫阳性表达提高,而先前文献报道,缺血再灌注 24 h,磷酸化 STAT3 蛋白在缺血半暗带区达高峰。本实验在给予人参皂苷处理后,大鼠神经功能障碍减轻,脑组织中炎症细胞因子 TNF- α 、IL-6 含量降低,p-JAK2 和 p-STAT3 的表达也明显减少,表明 GRbl 可能通过抑制细胞因子介导的 JAK2/STAT3 信号途径保护脑缺血再灌注损伤。

参考文献:

- [1] Liu M, Wu B, Wang WZ, et al. Stroke in China: epidemiology, prevention, and management strategies[J]. Lancet Neural, 2007, 6(5): 456-458.
- [2] Satriotomo I, Bowen KK, Vemuganti R. JAK2 and STAT 3 activation contributes to neuronal damage following transient focal cerebral ischemia[J]. Neurochem, 2006, 98(5): 1353-1356.
- [3] Longa E, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-86.
- [4] Muir KW, Tyrrell P, Sattar N, et al. Inflammation and ischaemic stroke[J]. Curr Opin Neurol, 2007, 20(3): 334-336.
- [5] Campbell IL. Cytokine-mediated inflammation, tumorigenesis, and disease-associated JAK/STAT/SOCS signaling circuits in the CNS[J]. Brain Res Rev, 2005, 48(2): 166-168.
- [6] 杨艳萍. 人参皂苷 Rbl 药理作用的研究概述[J]. 中国药师, 2010, 13(2): 280-282.
- [7] Gao XQ, Yang CX, Chen GJ, et al. Ginsenoside Rbl regulates the expressions of brain-derived neurotrophic factor and caspase-3 and induces neurogenesis in rats with experimental cerebral ischemia[J]. J Ethnopharmacology, 2010, 132(2): 393-395.
- [8] 杨朝鲜, 周玲, 袁琼兰, 等. 大鼠局灶性脑缺血时人参皂苷 Rbl 抑制细胞凋亡和调控凋亡基因的表达[J]. 中风与神经疾病杂志, 2008, 5(1): 135-137.
- [9] 谢惠芳, 徐如祥, 魏继鹏. JAK2/STAT3 信号转导通路在缺血性脑损伤中作用机制的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2008, 25(2): 135-137.
- [10] Zhu J, Jiang Y, Wu L, et al. Suppression of local inflammation contributes to the neuroprotective effect of ginsenoside Rbl[J]. Neuroscience, 2012, 202(3): 342-344.
- [11] Finbloom DS, Larner AC. Regulation of the Jak/STAT signalling pathway[J]. Cell Signal, 1995, 7(8): 739-742.
- [12] Acalovschi D, Wiest T, Hartmann M, et al. Multiple levels of regulation of the interleukin-6 system in stroke[J]. Stroke, 2003, 34(8): 1864-1866.