文章编号:1000-5404(2006)15-1585-03

论著

感染性休克大鼠JAK/STAT对组织IFN-γ表达的影响

周凤桐[1],陶国才[2],王松柏[3],曹怀宇[3],刘俊堂[3] (解放军251医院:[1]肝胆外科,[3]麻醉科,张家口 075000;[2]第三军医大学西南医院麻醉科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨Janus激酶/信号转导和转录激活子(janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)通路对严重腹腔感染肝、肺中干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)表达的调节作用。**方法** 采用盲肠结扎穿孔(CLP)模型,大鼠分为CLP组、JAK激酶抑制剂(AG490)处理组和STAT抑制剂(RPM)处理组。采用RT-PCR技术和ELISA检测试剂盒检测肝、肺IFN-γ mRNA表达水平和蛋白含量。**结果** 与CLP 0时相点相比,CLP后各时相点IFN-γ mRNA表达水平和蛋白含量不同程度升高($P<0.05$,$P<0.01$)。经JAK和STATA抑制剂预处理后,与CLP组相应时相点相比,CLP后多个时相点IFN-γ mRNA表达水平和蛋白含量显著下降($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** 腹腔脓毒症时肝、肺IFN-γ表达明显升高,抑制JAK/STAT通路的活化可下调肝、肺IFN-γ的表达,这可能是防止及治疗多器官功能衰竭的一个新的干预途径。

关键词: 脓毒症;干扰素-γ;信号转导;JAK/STAT通路
中图法分类号: R392.11; R392.13; R631 **文献标识码:** A

Effects of janus kinase/singnal transducer and activator of transcription pathway on interferon-gamma in septic rats

ZHOU Feng-tong[1], TAO Guo-cai[2], WANG Song-bai[3], CAO Huai-yu[3], LIU Jun-tang[3] ([1]Department of Hepatobiliary Surgery, [3]Department of Anesthesiology, The 251th Hospital of PLA, Zhangjiakou 075000; [2]Department of Anesthesiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To determine the effect of janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) pathway on the expressions of interferon-γ (IFN-γ) in vital organs of rats with sepsis. **Methods** A sepsis model was induced by cecal ligation puncture (CLP) in 60 male Wistar rats, and randomly divided into CLP group ($n=24$), AG490 group in which inhibitor of JAK-AG490 at dose of 8 mg/kg was subcutaneously injected 30 min before CLP ($n=18$), and rapamycin group in which inhibitor of STAT-rapamycin at dose of 0.4 mg/kg was subcutaneously injected 30 min before CLP ($n=18$). On 2, 6, 24 h after CLP, all rats were sacrificed, then hepatic and pulmonary tissue samples were harvested to determine IFN-γ mRNA expression levels by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and its protein expression levels by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** As compared with normal rats without CLP, IFN-γ mRNA and protein levels in hepatic and pulmonary tissues at 2, 6, 24 h after CLP significantly elevated ($P<0.05$, $P<0.01$). AG490 or rapamycin could markedly reduce IFN-γ mRNA and protein expression levels at 2 or 6 h after CLP ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** Our data suggest that severe intra-abdominal infection can elevate IFN-γ expressions in vital organs, which might be involved in JAK/STAT pathway. Inhibiting the activation of JAK/STAT pathway can reduce IFN-γ expressions.

Key words: sepsis; interferon-gamma; signal transduction; JAK/STAT

脓毒症及其所导致的多器官功能衰竭综合征每年造成不少患者死亡,国内外研究显示Janus激活/信号转导和转录激活子(janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)信号通路与脓毒症的发生发展有着密切的关系[1,2]。炎症介质过度表达(包括细胞因子)是脓毒症引起的全身炎症反应综合征(SIRS)的主要作用机制之一。干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)是介导SIRS的重要介质,其合成释放与JAK/STAT信号通路密切相关。虽然IFN-γ在炎症免疫反应中意义重要,但JAK/STAT通路在脓毒症时对IFN-γ表达的影响及意义目前尚未完全明了。本研究采用大鼠盲肠结扎穿孔术(cecal ligation puncture, CLP)模型探讨脓毒症时大鼠JAK/STAT通路与肝、肺

作者简介:周凤桐(1969-),男,河北省阳原县人,主治医师,主要从事全身炎症反应综合征防治方面的研究。电话:(0313)8785130
通讯作者:王松柏,电话:(0313)8785167, E-mail: wangsongbai67@sina.com
收稿日期:2005-04-26;修回日期:2005-11-18

组织中 IFN-γ 表达之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

酶联仪(MCC/340),Denley,英国。LEICAQ-500IW 图像分析处理系统,德国。DNA 扩增仪,北京红星公司。紫外分光光度仪,日本。台式冷冻高速离心机(17RS),Haerus,西德。冷冻高速离心机,Hitachi,日本。

1.1.1 实验动物 60 只雄性清洁级 Wistar 大鼠(军事医学科学院实验动物中心提供),体质量 200 ~ 240 g。动物购来后动物室清洁级环境笼养 1 周,实验前自由进水,禁食 1 d。

1.1.2 药品与试剂 总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶、PCR 标准(Promega 公司,美国)。大鼠 ELISA IFN-γ 试剂盒(Diaclone 公司,法国),ELISA 灵敏度为 5 pg/ml,检测范围为 5 ~ 1 000 pg/ml。JAK 抑制剂-AG490、STAT 抑制剂-雷帕霉素(RPM)(Calbiochem 公司,美国)。大鼠 IFN-γ 引物序列(扩增片段 288 bp):5′-ATCTGGAGGAACTGGCAAAAG-GACG-3′(上游),5′-CCTTAGGCTAGATTCTGGTGACAGC-3′(下游);三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物序列(扩增片段 309 bp):5′-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3′(上游),5′-AGATCCA-CAACGGATACATT-3′(下游)(由北京赛百盛公司合成)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制作和分组 大鼠分为 3 组:①盲肠结扎穿孔组(CLP 组,24 只),0 h 点将大鼠(6 只)在腹腔注射 2% 戊巴比妥钠(80 mg/kg)麻醉后即刻处死(不行 CLP 术)、其他分别于 CLP 后 2、6、24 h 处死(各时相点 6 只);②AG490 处理组(18 只),CLP 前 30 min 皮下注射 AG490(8 mg/kg);③RPM 处理组(18 只),CLP 前 30 min 皮下注射 RPM(0.4 mg/kg)。2 个处理组分别在 CLP 后 2、6、24 h 处死(各时相点 6 只)。CLP 制作方法见文献[3]。

1.2.2 指标检测及方法 ①组织 IFN-γ mRNA:取适量肝或肺组织,参照试剂盒说明书以异硫氰酸胍一步法总 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA,紫外分光光度仪测定总 RNA 纯度并定量。采用逆转录多聚酶链式反应(RT-PCR)试剂盒对总 RNA 行逆转录获得 cDNA,并扩增 cDNA。IFN-γ 扩增条件为 94 ℃ 1 min,57 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,进行 36 个循环,再 72 ℃ 延伸 10 min。以 GAPDH 作为内参对照。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后照相,照片采用 LEICAQ-500IW 图像分析处理系统进行分析,以目的基因与内参对照的积分光密度比值表示 mRNA 相对表达量。②组织 IFN-γ 蛋白水平:称取适量肝或肺组织置于匀浆器中,加入 3 倍体积磷酸盐缓冲液,冰浴匀浆,离心后取上清液使用 ELISA 试验检测试剂盒测定 IFN-γ 的蛋白含量。蛋白含量以每毫升匀浆液中含多少皮克目的蛋白表示。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验和方差分析。

2 结果

2.1 肝、肺组织 IFN-γ mRNA 的表达

正常大鼠肝、肺组织均表达一定量的 IFN-γ mRNA,与正常肝、肺组织相比,CLP 后大鼠 IFN-γ mRNA 在 2 h 和 6 h 显著升高,24 h 恢复接近至正常水平($P<0.05$,$P<0.01$)。与 CLP 组相比,AG490 和 RPM 处理后,大鼠 IFN-γ mRNA 水平在 2、6 h 时相点均不同程度的显著下降($P<0.05$,$P<0.01$),见表 1。

表 1 脓毒症大鼠肝和肺 IFN-γ mRNA 表达变化及 JAK/STAT 抑制剂对其的影响($n=6$,$\bar{x} \pm s$)

组别	肝				肺			
	0 h	2 h	6 h	24 h	0 h	2 h	6 h	24 h
CLP 组	1.03 ± 0.14	1.54 ± 0.15[b]	1.66 ± 0.18[b]	1.21 ± 0.14	1.56 ± 0.16	2.28 ± 0.20[b]	2.23 ± 0.23[b]	1.87 ± 0.22[a]
AG490 处理组	1.03 ± 0.14	1.24 ± 0.17[d]	1.42 ± 0.18[c]	1.15 ± 0.15	1.56 ± 0.16	1.76 ± 0.22[d]	2.05 ± 0.25	1.79 ± 0.21
RPM 处理组	1.03 ± 0.14	1.19 ± 0.18[d]	1.38 ± 0.17[c]	1.20 ± 0.13	1.56 ± 0.16	1.67 ± 0.19[d]	1.96 ± 0.23	1.81 ± 0.23

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 0 h 比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 CLP 组比较

2.2 肝、肺组织 IFN-γ 蛋白含量的改变

正常大鼠肝、肺组织均表达少量的 IFN-γ 蛋白,与正常肝、肺组织相比,CLP 后大鼠 IFN-γ 蛋白在 2 h 和 6 h 升高($P<0.01$),24 h 恢复至正常水平。与 CLP 组相比,AG490 和 RPM 处理后,大鼠 IFN-γ 蛋白水平在 2、6 h 时相点显著下降($P<0.05$,$P<0.01$),见表 2。

表 2 脓毒症大鼠肝和肺 IFN-γ 蛋白表达变化及 JAK/STAT 抑制剂对其影响(ρ_B/pg·ml^{-1},$n=6$,$\bar{x} \pm s$)

组别	肝				肺			
	0 h	2 h	6 h	24 h	0 h	2 h	6 h	24 h
CLP 组	311 ± 24	882 ± 71[b]	680 ± 55[b]	287 ± 44	101 ± 11	283 ± 26[b]	186 ± 17[b]	97 ± 12
AG490 处理组	311 ± 24	691 ± 77[d]	465 ± 60[d]	265 ± 38	101 ± 11	212 ± 37[d]	151 ± 21[d]	104 ± 14
RPM 处理组	311 ± 24	713 ± 74[c]	483 ± 17[d]	279 ± 26	101 ± 11	195 ± 35[d]	162 ± 20[c]	94 ± 10

b:$P<0.01$,与 0 h 比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 CLP 组比较

3 讨论

CLP 模型是模拟脓毒症最为经典的模型之一,它所诱导的腹腔感染也与临床消化道穿孔性腹膜炎最为接近。一般认为 IFN-γ 是一个早期促炎介质,其表达早持续时间短。本研究表明,脓毒症发作后数小时循环中 IFN-γ mRNA 和蛋白水平迅速增加,蛋白水平最高达正常时的数倍,随后逐渐下降并向正常水平接近。

同时 CLP 组大鼠在脓毒症发作后表现出重度休克症状，如呼吸急促、腹泻、立毛和毛色干枯等。有文献报道注射内毒素时，IFN-γ 缺乏鼠死亡率明显低于野生鼠，同时其急性肝损伤也减轻[4]，提示 IFN-γ 密切参与介导了内毒素休克的过程。业已明确，IFN-γ 在脓毒症的发病机制中同样具有重要意义，提示本实验脓毒症发作后数倍升高的 IFN-γ 有可能介导了脓毒症所导致的组织损伤。

脓毒症时炎症介质过度表达与机体多条信号通路活化有关。JAK/STAT 信号通路环节少，致病因子从细胞膜到 JAK 再到 STAT 而把细胞膜上感受的信号直接传递到核内——启动基因转录。它广泛参与了细胞应激[5]、生长、增殖、分化、凋亡等多种生物学效应。JAK/STAT 信号通路是致病微生物激发机体抗感染免疫力信号传导中的一个关键通路。机体感染时炎症介质的合成与释放更是与 JAK/STAT 通路密切相关。有资料显示，脓毒症时 STAT 基因缺乏鼠抗感染能力的改变与 IFN-γ 合成释放量密切相关[2]。这暗示通过干预 JAK/STAT 的活化调节炎症介质 IFN-γ 的合成有望成为可能。有资料显示，JAK/STAT 通路在 LPS、IFN-γ 等炎症介质介导的炎症反应中发挥着重要作用。尤其值得注意的是：IFN-γ 在感染中作用的发挥与 STAT1 密切相关[2]。体内实验显示 STAT 在脓毒症时 IFN-γ 的诱生中有重要作用[6]。同时体外实验显示 JAK/STAT 信号通路对 IFN-γ 的产生发挥着一定的调节作用[7]。我们此前的研究发现抑制 JAK/STAT 信号通路的活化有助于减轻脓毒症大鼠重要器官的损伤[1]，本实验旨在探索 JAK/STAT 信号通路对机体 IFN-γ 的调控作用并寻找对 IFN-γ 表达的新干预手段。AG490 和 RPM 通过阻断各自底物（JAK，STAT）特异位点上的酪氨酸或丝氨酸的磷酸化，从而阻断下游激酶的活化进而抑制细胞因子的生理和病理效应。AG490 作为 JAK2 抑制剂在细胞培养中能有效抑制内毒素对诱导型一氧化氮合酶的诱导作用[8]，另外给小鼠腹腔注射 3 mg/kg 时可有效阻滞实验性自身免疫性疾病（多发性硬化病）的发生及发展[9]。结合文献和预实验的结果，本实验只使用 1 个 AG490 和 RPM 剂量，其量效关系未作严密观察。应用 JAK 和 STAT 抑制剂抑制 JAK/STAT 信号通路的活化后，CLP 后 2、6 h 肝和肺组织 IFN-γ mRNA 和蛋白水平均有不同程度的下降，提示 JAK/STAT 信号通路对脓毒症大鼠 IFN-γ mRNA 和蛋白水平的表达均具有一定影响。有资料显示，CLP 后给小鼠注射 IFN-γ 导致小鼠死亡时间提前和死亡率增加，并且与 IFN-γ 的剂量相关[10]。而抗-IFN-γ 抗体可以显著降低 CLP 脓毒症大鼠腹膜细菌载量[11]。我们此前的实验显示抑制 JAK/STAT 信号通路有助于防止脓毒症大鼠组织损伤[1]，可能与抑制 JAK/STAT 信号通路的活化下调 IFN-γ 的合成有关。另 JAK3 可调节外周血单个核细胞 IL-10 的表达[12]，这也可能是其作用机制之一。

总之，JAK/STAT 信号通路与脓毒症大鼠组织 IFN-γ 合成密切相关；通过干预 JAK/STAT 通路可调节 IFN-γ 的合成，并可能与脓毒症大鼠组织器官损伤相关。这也许是防治 MODS 和脓毒症的新药物靶点。

参考文献：

[1] 王松柏，姚咏明，陈劲松，等. 严重腹腔感染大鼠 JAK/STAT 通路活化与多器官功能损害的关系[J]. 解放军医学杂志，2004，29(1)：42－44.

[2] MERAZ M A，WHITE J M，SHEEHAN K C，*et al*. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway[J]. Cell，1996，84(3)：431－442.

[3] 翟秀珍，姚咏明，王松柏，等. 脓毒症大鼠多器官内信号转导和转录激活因子 3 变化及其作用[J]. 中华创伤杂志，2004，20(3)：146－149.

[4] SHIMIZU Y，MARGENTHALER J A，LANDEROS K，*et al*. The resistance of P. acnes--primed interferon gamma-deficient mice to low-dose lipopolysaccharide-induced acute liver injury[J]. Hepatology，2002，35(4)：805－814.

[5] 王关嵩，蔡文琴，钱桂生，等. 低氧刺激复合培养的平滑肌细胞表达 Janus 激酶[J]. 第三军医大学学报，2003，25(2)：101－103.

[6] MATSUKAWA A，KAPLAN M H，HOGABOAM C M，*et al*. Pivotal role of signal transducer and activator of transcription (Stat)4 and Stat6 in the innate immune response during sepsis[J]. J Exp Med，2001，193(6)：679－688.

[7] REDDY J，CHASTAGNER P，FIETTE L，*et al*. IL-2-induced tumor necrosis factor (TNF)-beta expression：further analysis in the IL-2 knockout model，and comparison with TNF-alpha，lymphotoxin-beta，TNFR1 and TNFR2 modulation[J]. Int Immunol，2001，13(2)：135－147.

[8] JACOBS A T，IGNARRO L J. Lipopolysaccharide-induced expression of interferon-beta mediates the timing of inducible nitric-oxide synthase induction in RAW 264.7 macrophages[J]. J Biol Chem，2001，276(51)：47950－47957.

[9] CONSTANTIN G，BROCKE S，IZIKSON A，*et al*. Tyrphostin AG490，a tyrosine kinase inhibitor，blocks actively induced experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Eur J Immunol，1998，28(11)：3523－3529.

[10] MILES R H，PAXTON T P，DRIES D J，*et al*. Interferon-gamma increases mortality following cecal ligation and puncture[J]. J Trauma，1994，36(5)：607－611.

[11] QIU G，WANG C，SMITH R，*et al*. Role of IFN-gamma in bacterial containment in a model of intra-abdominal sepsis[J]. Shock，2001，16(6)：425－429.

[12] KIM H J，HART J，KNATZ N，*et al*. Janus kinase 3 down-regulates lipopolysaccharide-induced IL-1 beta-converting enzyme activation by autocrine IL-10[J]. J Immunol，2004，172(8)：4948－4955.

（编辑　龙　亮）