文章编号:1000-5404(2007)15-1511-03

论著

JAK抑制剂AG490对大鼠组织iNOS和NO合成的影响

王松柏[1],裴树俊[1],徐昌富[2],李 海[1] (解放军251医院:[1]麻醉科;[2]心胸外科,张家口 075000)

提 要:目的 观察JAK/STAT通路对脓毒症大鼠组织和血清诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)和一氧化氮(NO)合成的影响。**方法** 采用盲肠结扎穿孔术(cecal ligation puncture, CLP)制造大鼠脓毒症模型,将48只Wistar大鼠随机分为正常对照组、假手术组、CLP脓毒症组和AG490处理组。分别采集正常对照组、假手术组以及CLP组和AG490组2、6、24 h的组织和血清,采用RT-PCR测定组织iNOS mRNA表达水平,NO检测试剂盒(酶法)检测组织和血清NO含量;同时分别监测上述各时间点的平均动脉压、脉搏。**结果** 正常组大鼠血清、肺和血管含有少量iNOS mRNA和NO,与正常组大鼠相比,假手术组iNOS mRNA和NO的含量均未见明显差别,CLP后各时间点肺、血管和血清iNOS mRNA、NO含量均升高明显;而MAP严重下降、脉搏剧烈升高($P<0.05$, $P<0.01$)。AG490处理组与CLP组相应时间点相比,肺、血管和血清多个时间点iNOS mRNA表达和NO含量均显著下降;血压和脉搏均显著好转($P<0.05$, $P<0.01$)。相关分析显示:肺和血管组织NO与iNOS mRNA的相关系数分别是0.75和0.73;血清与NO与肺、血管组织iNOS mRNA的相关系数分别是0.68和0.62($P<0.05$),MAP与肺、血管和血浆NO的相关系数分别是-0.85、-0.86和-0.91($P<0.05$)。**结论** 抑制JAK/STAT通路活化可抑制脓毒症大鼠血浆和组织iNOS mRNA和NO合成;并改善循环功能。

关键词:Janus激酶抑制剂/AG490;NO;脓毒症;JAK/STAT信号通路;大鼠;iNOS
中图法分类号:R362;R631.02;R963 **文献标识码**:A

Effects of janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway on synthesis of iNOS and NO in pulmonary and vascular tissues of infectious shock rats

WANG Song-bai[1], PEI Shu-jun[1], XU Chang-fu[2], LI Hai[1] ([1]Department of Anesthesiology, [2]Department of Cardiothoracic Surgery, The 251th Hospital of PLA, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: **Objective** To determine the effects of janus kinase/signal transducer and activator of transcription on the synthesis of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and nitric oxide (NO) in infectious shock rats. **Methods** Forty-eight male Wistar rats were randomly divided into normal control, sham operation group, cecal ligation puncture (CLP) group, and inhibitor of JAK (AG490) treatment group. CLP group and AG490 group were established into the sepsis model induced by CLP, and at 2, 6, 24 h after CLP, the rats were sacrificed. The pulmonary, vascular tissues and serum samples of all rats were harvested to determine iNOS mRNA expression levels by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and NO content respectively. Meanwhile, the mean arterial pressure (MAP) and pulse were monitored. **Results** No notable difference was detected in all parameters between sham operation group and normal control. Compared with normal control, iNOS mRNA and NO levels in pulmonary, vascular tissues and serum at 2, 6 and 24 h following CLP significantly elevated respectively, and MAP fell notably and pulse increased ($P<0.05$ or 0.01). AG490 treatment decreased iNOS mRNA and NO levels markedly at 2 or 6 h after CLP, meanwhile MAP and pulse deteriorated by sepsis were also ameliorated ($P<0.05$ or 0.01). **Conclusion** Inhibiting the activation of JAK/STAT pathway can reduce tissues and serum iNOS mRNA and NO expressions in infectious shock rats and can ameliorate the circulatory function deteriorated by sepsis.

Key words: janus kinase inhibitor/AG490; nitric oxide; infectious shock; JAK/STAT pathway; rat; inducible nitric oxide synthase

国外资料显示:败血症患者的病死率高达33%~40%,脓毒性休克有时甚至高达80%[1]。正常生理情况下,一氧化氮(NO)能舒张血管维持血管合适的张力,但NO过度升高可使血管过度扩张和内皮细胞损伤甚至产生休克等病理状态。研究显示JAK/STAT(janus kinase/signal transducer and activator of tran-

作者简介:王松柏(1967-),男,湖南省攸县人,硕士,副主任医师,主要从事失控性炎症反应及多器官功能衰竭方面的研究,发表论文12篇。电话:(0313)8785167,E-mail:wsb6706@163.com.

收稿日期:2006-08-31;修回日期:2007-02-01

scription)信号通路活化参与脓毒症大鼠促炎介质合成和释放,介导脓毒症发生和发展[2]。并且细胞实验显示JAK/STAT活化使诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)及NO合成增加[3],但脓毒性休克心血管功能障碍、JAK/STAT通路活化及iNOS和NO表达三者之间的相互关系目前尚不清楚。为此,本研究通过建立脓毒症大鼠模型和应用JAK特异性阻断剂——α-氰-(3,4-二羟基)-N-苄基肉桂酰胺(AG490),探讨JAK/STAT通路与组织中iNOS和NO表达之间的关系及对循环功能的影响,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物模型制作和分组

3月龄的雄性清洁级Wistar大鼠48只(军事医学科学院实验动物中心),体质量(225±26)g,实验前禁食1 d但自由进水。分成4组:①正常组,6只,在腹腔注射2%戊巴比妥钠(80 mg/kg)麻醉后即刻处死。②假手术组,6只,麻醉后只行腹腔开关术,2 h后处死。③CLP组,18只,分别于CLP后2、6、24 h各处死6只;④AG490组,18只,CLP前30 min肩背部皮下注射AG490 (8 mg/kg,Calbiochem公司,美国)[4],并分别在CLP后2、6、24 h各处死6只。CLP制作方法见文献[5]。各组大鼠处死后立即留取适量胸主动脉和肺组织,速冻存于液氮中;同时抽取腹主动脉血,立即离心留取上清冻于-20℃冰箱中待测。

1.2 组织iNOS mRNA测定

取40 mg肺或血管组织参照试剂盒说明书(RNAgents Total RNA Isolation System, Promega公司,美国)以异硫氰酸胍一步法提取组织总RNA,紫外分光度度仪测定总RNA纯度和浓度。采用RT-PCR试剂盒对总RNA行逆转录获得cDNA,并扩增cDNA。大鼠iNOS引物序列[2](扩增片段450 bp):5′-TGGCAGGATGAGAAGCTGAG-3′(上游),5′-CTGGTCGATGTCATGAGC AA-3′(下游);内对照GAPDH引物序列(扩增片段309 bp):5′-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3′(上游);5′-AGATCCACAACGGATACATT-3′(下游),由北京赛百盛公司合成。iNOS扩增条件为94 ℃ 1 min,57 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,36个循环,72℃延伸10 min。扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳,图像分析处理系统(LEICAQ-500IW,Beckman,德国)获取iNOS与GAPDH的积分光密度比值(即mRNA相对表达量)。

1.3 血清和组织NO水平

称取适量肺或血管组织置于匀浆器中,加入磷酸盐缓冲液,冰浴匀浆,离心后留取上清液,与留取的血清;同批次按NO测定试剂盒(北京晶美)说明书操作测定NO含量。

1.4 平均动脉压(MAP, mmHg)、脉搏测定

在大鼠左颈总动脉插管连接生物信号电脑采集系统(Pclab,北京威信斯达)监测反映大鼠休克轻重的MAP和脉搏。

1.5 统计学处理

数据采用SPSS 10.0统计软件包处理,各项指标以$\bar{x}\pm s$表示。分别行线性相关分析、t检验和方差分析。

2 结果

2.1 肺、血管组织iNOS mRNA的表达

正常组大鼠肺和血管均表达一定量的iNOS mRNA,假手术组与正常组相比无明显差别;与正常组肺和血管相比,CLP后大鼠iNOS mRNA均有所升高,2 h和6 h尤为显著($P<0.05$)。与CLP组相比,AG490处理后,大鼠iNOS mRNA水平在2、6 h时间点有不同程度的显著性下降($P<0.05$),见表1。

2.2 血浆、肺和血管组织中NO含量的改变

正常组大鼠血浆、肺和血管均有少量NO合成,假手术组与正常组相比无明显差别。与正常组相比,CLP后NO在2 h即迅速升高,6 h处于高峰,24 h仍处于较高水平($P<0.05$)。与CLP组相比,AG490处理后,大鼠NO水平在2 h和6 h时间点均不同程度的下降($P<0.05$),见表1。

2.3 MAP和脉搏变化

与正常组大鼠相比,假手术组MAP和脉搏未见明显变化,CLP后大鼠各时间点MAP明显下降,脉搏明显增快。与CLP组相比,AG490处理后,大鼠MAP和脉搏在2 h和6 h时间点的改变不那么明显($P<0.05$),见表1。

2.4 相关分析

相关分析结果显示,肺和血管组织NO与iNOS mRNA的相关系数分别是0.75和0.73;血清NO和肺和血管组织iNOS mRNA的相关系数分别是0.68和0.62($P<0.05$),此结果表明血清以及肺和血管组织NO与相应组织的iNOS mRNA具有较强相关性。MAP与肺、血管和血浆NO含量的相关系数分别是-0.85、-0.86和-0.91($P<0.05$),显示组织和血浆NO含量与血压具有很强的相关性。

表1 脓毒性休克和AG490对大鼠循环功能和组织NO、iNOS mRNA表达的影响($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	血管iNOS mRNA	肺iNOS mRNA	血管NO (μmol/L)	肺NO (μmol/L)	血清NO (μmol/L)	MAP (mmHg)	脉搏 (次/min)
正常组	1.03±0.14	1.48±0.16	3.8±0.5	4.3±0.6	46.1±8.3	105.9±5.7	123.4±7.2
假手术组	1.05±0.12	1.45±0.15	4.0±0.6	4.1±0.6	48.5±9.2	110.0±6.1	125.0±8.0
CLP组							
2 h	1.51±0.15[b]	2.26±0.20[b]	4.7±0.5[a]	5.6±0.5[b]	61.2±9.5[a]	91.2±5.5[b]	134.1±7.1[a]
6 h	1.63±0.19[b]	2.20±0.23[b]	7.1±0.6[b]	8.4±0.7[b]	112.8±11.2[b]	75.8±6.3[b]	153.7±8.8[b]
24 h	1.19±0.14	1.87±0.21[a]	6.4±0.7[b]	7.9±0.6[b]	107.5±10.7[b]	81.4±5.7[b]	150.1±9.7[b]
AG490组							
2 h	1.22±0.16[d]	1.65±0.19[d]	4.2±0.4	4.8±0.5[c]	54.3±9.3	98.3±5.6[c]	127.1±6.4
6 h	1.41±0.18[c]	1.94±0.23	5.8±0.6[d]	6.1±0.5[d]	89.7±10.4[d]	91.8±5.4[d]	137.2±7.9[d]
24 h	1.14±0.16	1.79±0.23	5.3±0.7[c]	6.0±0.6[d]	82.1±9.6[d]	86.5±6.1	132.6±9.3

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与正常组比较; c: $P<0.05$,d: $P<0.01$, 与CLP组中同时相点比较

3　讨论

脓毒症休克与多种炎症介质相关联[6,7]。本实验采用动物脓毒症模型，主要观察 JAK、NO 及血压等之间的关系。实验结果显示，CLP 后肺、血管和血清 iNOS mRNA 和 NO 水平均显著升高，同时血压、脉搏表现为严重休克。假手术组与正常组相比各参数均无显著变化，提示感染性腹膜炎为主要影响因素；也提示 NO 参与了脓毒症的发病过程。iNOS 在肺、肝、脑和血管等内皮细胞和巨噬细胞中广泛分布。且已明确，炎症因子（如 IFN-γ、IL-1 和 TNF-α），特别是革兰阴性菌的脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）可诱导 iNOS 高表达从而催化多种细胞合成大量 NO。相关分析也表明，NO 的含量与组织 iNOS mRNA 水平有较强相关性，提示感染时 NO 的合成主要来源于 iNOS 的催化。研究表明，iNOS 介导产生过量 NO 是脓毒性休克发病的重要机制之一[8]，大量生成的 NO 最终引起血管病理性舒张塌陷、对血管收缩剂反应性下降以及降低心肌收缩力等一系列病理改变，并且可能是感染诱发休克的最后共同通路。

JAK/STAT 信号通路广泛参与了细胞应激、生长、增殖、分化、凋亡等多种生物学效应。它也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。文献[9]显示，iNOS 基因启动子区包含 STAT 转录因子结合位点，LPS 可通过激活 JAK/STAT 通路而诱导 iNOS 的合成，IFN-γ 与 LPS 可相互协同增强 iNOS 的表达量[3]。并且感染可激活多种途径诱生大量 IFN-γ 等促炎介质从而直接或间接诱生 NO[10]；因此，iNOS 和 NO 的大量合成与多种机制有关。但 JAK 途径在其中有着非常重要的作用，而且抑制 JAK 的活性可下调细胞 iNOS 的表达[3]。

AG490 为 JAK2 的相对特异性抑制剂，对 JAK1 和 JAK3 也有一定抑制作用，通过阻断 JAK 特异位点上的酪氨酸或丝氨酸的磷酸化，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。本实验在使用 AG490 后，CLP 刺激的肺、血管和血清 iNOS mRNA 和 NO 水平升高的幅度显著下降；且血压和脉搏显著好转。相关分析表明：组织和血浆 NO 含量与血压具有很强的相关性。提示抑制 JAK 活化可抑制脓毒症大鼠的 iNOS 表达，进而下调 NO 水平，且可改善休克导致的循环功能不全；循环功能的好转可能与 iNOS 和 NO 下调有关。另外 JAK/STAT 可调节其他许多炎症介质的表达[11,12]，这些也可能与循环功能好转有关。

此外，可以注意到血液循环中的 NO 的含量大大高于肺和血管中 NO 的含量。多种组织的内皮细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等均可合成 iNOS 和 NO；因此，循环中的 NO 可能还来源于其他器官组织。

但另有实验发现，NO 升高可有助于机体杀灭致病微生物。小鼠盲肠结扎穿孔（CLP）实验显示，iNOS 缺陷小鼠的死亡率明显高于野生型的对照组。提示 iNOS 介导生成的 NO 对动物具有保护效应。这些与本实验不一致的结论，可能与 NO、NOS 的调节过程非常复杂且不同研究所采用的实验动物种属的差异，模型的不同，检测的时相不同等有关。

本实验结果提示 JAK/STAT 途径与大鼠脓毒症的 iNOS 和 NO 诱生密切相关，并且这一作用与脓毒症的循环功能变化密不可分，调控 JAK/STAT 途径可能有助于控制脓毒症，其量效和时效关系及其确切临床效果还有待于进一步实验证实。

参考文献：

[1] Kumar A, Haery C, Parrillo J E. Myocardial dysfunction in septic shock [J]. Crit Care Clin, 2000, 16(2): 251 - 287.

[2] 王松柏，姚咏明. Janus 激酶/信号转导和转录激活因子途径与脓毒症的研究进展[J]. 中国危重病急救医学，2003，15(11)：690 - 693.

[3] Dell'Albani P, Santangelo R, Torrisi L, *et al*. JAK/STAT signaling pathway mediates cytokine-induced iNOS expression in primary astroglial cell cultures [J]. J Neurosci Res, 2001, 65(5): 417 - 424.

[4] 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.

[5] 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.

[6] 张希洲，陈学云，戴建新，等. 脓毒症和脓毒性休克大鼠一些脏器内皮素-1 和内皮素 A 受体基因表达的变化[J]. 第二军医大学学报，2001，22(9)：839 - 842.

[7] 钟进营，韩文献. 雷公藤内脂醇对脓毒症大鼠血清炎症介质水平的影响[J]. 郑州大学学报（医学版），2005，40(5)：882 - 884.

[8] Li H Y, Yao Y M, Shi Z G, *et al*. Significance of biopterin induction in rats with postburn Staphylococcus aureus sepsis [J]. Shock, 2003, 20(2): 159 - 165.

[9] Chong M M, Thomas H E, Kay T W. Suppressor of cytokine signaling-1 regulates the sensitivity of pancreatic beta cells to tumor necrosis factor [J]. J Biol Chem, 2002, 277(31): 27945 - 27952.

[10] Cooney R N, Yumet G. Cytokine signaling in sepsis: redundancy, crosstalk, and regulatory mechanisms [J]. Crit Care Med, 2002, 30(1): 262 - 263.

[11] Lee C, Lim H K, Sakong J, *et al*. Janus kinase-signal transducer and activator of transcription mediates phosphatidic acid-induced interleukin (IL)-1beta and IL-6 production [J]. Mol Pharmacol, 2006, 69(3): 1041 - 1047.

[12] 周凤桐，陶国才，王松柏，等. 感染性休克大鼠 JAK/STAT 对组织 IFN-γ 表达的影响[J]. 第三军医大学学报，2006，28(15)：1585 - 1587.

（编辑　张大春）