基础研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0064-04

TTX 通过 JAK2/STAT3 通路活化 SOD 减轻心肌细胞凋亡

刘胜中[1],杨双强[2]

(1.四川省医学科学院·四川省人民医院胸心外科,成都 610072;2.重庆医科大学附属第一医院胸心外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究 JAK2/STAT3 信号通路在河豚毒素(Tetrodotoxin,TTX)心脏停搏液心肌保护中的作用。方法:24 只 Wistar 大鼠随机均分为对照组、TTX 组和 TTX+AG490 组,每组 8 只。对照组:开胸取左心室肌作为缺血前对照。TTX 组:建立离体心脏 Langendorff-Neely 灌注模型,预灌注 K-H 缓冲液 30min 后,灌注 4℃ TTX 心脏停搏液,停搏心脏并低温维持 60 min,复灌 K-H 缓冲液 60 min 后,取左心室肌备用。TTX+AG490 组:操作同 TTX 组,但预灌和复灌时均在 K-H 缓冲液中加入 JAK2 抑制剂 AG490(5 μmol/L)。分别采用免疫组化法、比色法和 TUNEL 法测定心肌组织中 p-STAT3、SOD 活性和 MDA 含量,以及心肌细胞凋亡指数(Apoptosis index,AI),并比较组间的变化。结果:与对照组相比,TTX 组和 TTX+AG490 组 p-STAT3 表达量均明显增加($P<0.05$);予以 AG490 处理后,p-STAT3 表达量较 TTX 组明显下降($P<0.05$)。与对照组相比,TTX 组和 TTX+AG490 组 SOD 活性和 MDA 含量均明显增加($P<0.05$);予以 AG490 处理后,SOD 活性较 TTX 组显著降低($P<0.05$),MDA 含量却明显增加($P<0.05$)。经历缺血再灌注后,TTX 组和 TTX+AG490 组心肌细胞 AI 明显高于对照组($P<0.05$);与 TTX 组相比,TTX+AG490 组 AI 显著增加($P<0.05$)。结论:JAK2/STAT3 信号通路通过增强 SOD 活性,减轻膜脂质过氧化损伤,减少心肌细胞凋亡,介导 TTX 心脏停搏液对缺血心肌的保护作用。

【关键词】信号转导及转录激活因子 3;超氧化物歧化酶;凋亡;河豚毒素;心肌保护

【中国图书分类法分类号】R541.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-08-24

作者介绍:刘胜中(1981-),男,医师,硕士,
研究方向:胸心外科,心肌保护。

通讯作者:杨双强,男,教授,E-mail:yysqiang@163.com。

的降低作用。SFI 对 MIRI 具有保护作用,这可能是 SFI 治疗缺血性心脏病的药理学基础,为其临床应用提供了进一步的实验室依据。

参 考 文 献

[1] 季海刚,司 亮,司晓晨,等.丹参对心肌缺血再灌注损伤保护作用的研究进展[J].光明中医,2006,21(3):52-54.

[2] 曹泽玲,叶 平,汪 海.基质金属蛋白酶在心肌缺血再灌注损伤中的作用[J].中华老年多器官疾病杂志,2005,4(2):150-154.

[3] 曾月炉. 参附注射液辅助治疗急性心肌梗死并心力衰竭 54 例[J]. 中国实用乡村医生杂志,2005,12(1):31-32.

[4] 李 芳.参附注射液治疗病态窦房结综合征临床观察[J].中西医结合心脑血管病杂志,2005,2(3): 174-175.

[5] 吴永涛,罗 毅,顾 云,等.参附注射液对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国比较医学杂志,2007,17(1):26-29.

[6] 谢 健,闵 苏.参附注射液对缺血再灌注损伤保护作用的研究进展[J].重庆医学,2006, 35(22):2099-2100.

[7] Zhang XJ,Song L, Zhou ZG,et al.Effect of shenfu injection on gastrointestinal microcirculation in rabbits after myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. World J Gastroenterol,2006, 12(27):4389-4391.

[8] 黄标通,龙建平,熊卫民,等.体外循环心脏瓣膜替换术中参附注射液的心肌保护作用[J]. 实用医学杂志,2006 ,22(2):195-197.

[9] Cao J,Zheng Y Q,Liu T P,et al. Inhibitory efects of ginsenoside Rgl and Rbl on rat brain microsomal Na^+-K^+-ATPase activity [J]. Acta Pharmacol Sin,1990,1(1):10-14.

[10] Tsung S H. Creatine kinase isoenzyme patterns in human tissue obtained at surgery[J]. Clin Chem,1976,22(2):173-175.

[11] Lopez B,Gonzalez A,Diez J.Role of matrix metalloproteinases in hypertension assosiated cardiac fibrosis[J].Curtn Nephrol Hypert,2004,13(11):197-204.

[12] Tao Zhenyin,Maria A,Yang Fang,et al.Temporal changes in matrix metalloproteninase expression an d inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice[J].Life Science,2004,74(12):1561-1572.

[13] 王丽平, 朱曦龄, 杨 方, 等.AcSDKP 对大鼠心成纤维细胞 MMP-2、MMP-9 活性和 MMP-1 表达的影响[J].基础医学与临床,2007,27(3):279-283.

[14] Mcdonough J L,Arrel D K,Van Eyk J E. Troponin I degradation and covalent complex formation accompanied myocardial ischemia/repefusion injury[J].Circ Res,1999,84(1):9-20.

[15] Romanic A M,Harrison S M,Bao W,et al.Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by targeted deletion of matrix metalloopmteinase-9[J].Cardiovasc Res,2002,54(3):549-558.

[16] Bagkelai K, Marktanner R, Datifo JB,et al.Decreased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in stunned myocardium [J].Sarg Res,1998,77(1):35-39.

(责任编辑:关蕴良)

Tetrodotoxin cardiaoplegia decreases cardiomyocytes apoptosis through JAK2/STAT3 pathway inducing the activation of SOD

LIU Sheng-zhong, et al

(*Department of Cardiothoracic Surgery, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan People's Hospital*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of JAK2/STAT3 pathway on myocardial protection of tetrodotoxin(TTX) cardioplegia in rat hearts. *Methods*: 24 wistar rats were randomly divided into group control, group TTX and group TTX+AG490 (n=8). The left ventricular samples in group control were collected as pre-ischemia control through thoracotomy. After isolated heart langendorff and neely models were established the rat hearts in group TTX were continuously perfused with krebs-henseleit (K-H) buffer solution for 30 minutes, arrested by TTX cardioplegia (4℃) for 60 minutes, underwent reperfusion with K-H buffer solution for 60 minutes, and then the left ventricular samples were collected for detection. The rat hearts in group TTX+AG490 were perfused and reperfused with JAK2 inhibitor AG490 (5 μmol/L) and K-H buffer solution under the same procedure as group TTX. The protein expression indexes (PEI) of phosphorylated-STAT3 (p-STAT3) in myocardium were detected by immunohistochemical assay (IHC). Both the activity of superoxide dismutase(SOD) and the content of maleic dialdehyde(MDA) in myocardial tissue homogenate were detected by colorimetry. The apoptosis index (AI) of cardiomyocyte was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL). The changes of these indexes in three groups were used for comparison. *Results*: Compared with group control, the PEI of p-STAT3 in group TTX and group TTX+AG490 increased significantly(P<0.05). Treated with AG490, the PEI of p-STAT3 in group TTX+AG490 was lower than that in group TTX (P<0.05). Compared with group control, the activity of SOD and the content of MDA in Group TTX and group TTX+AG490 increased significantly(P<0.05). Treated with AG490, the activity of SOD in group TTX+AG490 was lower than that in group TTX (P<0.05), but the content of MDA was higher than that in group TTX (P<0.05). After ischemia/reperfusion, AI in group TTX and group TTX+AG490 was significantly higher than that in group control (P<0.05); compared with group TTX, AI in group TTX+AG490 increased significantly (P<0.05). *Conclusions*: JAK2/STAT3 pathway could mediate myocardial protection of TTX cardioplegia in rat hearts via inducing the activity of SOD to alleviate membrane lipid peroxidation injury and decreasing cardiomyocytes apoptosis.

【Key words】Signal transducer and activator of transcription 3; Superoxide dismutase; Apoptosis; Tetrodotoxin; Myocardial protection

国外及我们前期实验证实[1,2],河豚毒素(Tetrodotoxin, TTX)心脏停搏液用于离体鼠心保护和保存,在诸多方面均明显优于传统的 St.Thomas 液,显示出良好的心肌保护作用,但其具体机制尚待阐明,推测与细胞信号转导有关。本研究应用JAK2 特异性抑制剂 AG490 阻断 Janus 激酶 2/ 信号转导及转录激活因子 3(Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3, JAK2/STAT3)信号通路,检测心肌组织中 p-STAT3 (磷酸化 STAT3)、SOD 活性和 MDA 含量以及心肌细胞凋亡指数,探讨 JAK2/STAT3 信号通路在 TTX 心脏停搏液保护缺血再灌注心肌中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组

体重 250 ~ 300 g 的健康 Wistar 大鼠 24 只,随机均分为对照组、TTX 组和 TTX+AG490 组,每组 8 只。对照组:仅开胸取左心室肌作为缺血前对照。TTX 组:建立离体心脏 Langendorff-Neely 灌注模型,预灌注 K-H 缓冲液 30 min 后,灌注 4℃ TTX 心脏停搏液(20 μmol/L TTX + K-H 缓冲液),停搏心脏并低温维持 60 min,复灌 K-H 缓冲液 60 min 后,取左心室肌备用。TTX+AG490 组:操作同 TTX 组,但预灌和复灌时均在 K-H 缓冲液中加入 JAK2 抑制剂 AG490(5 μmol/L)。

1.2 试剂和灌注液成分

TTX 购自 Sigma 公司,AG490 购自 Biosource 公司,兔抗大鼠 p-STAT3(Tyr705)单克隆抗体购自 CST 公司,ABC 法免疫组化试剂盒购自上海晶美生物工程有限公司,DAB 显色试剂盒购自北京中山生物公司,SOD 和 MDA 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,TUNEL 试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。

K-H 缓冲液成分(质量浓度为 mmol/L):NaCl 119, $NaHCO_3$ 25, KCl 4.75, $MgSO_4$ 1.2, KH_2PO_4 1.18, $CaCl_2$ 1.4, Glucose 11, pH 7.8。

1.3 实验模型的建立

腹腔注射肝素钠 200 U, 20 min 后脱颈处死大鼠,迅速取下心脏。建立离体鼠心 Langendorff 灌注模型,主动脉根部灌注 37℃,体积分数 95% O_2 + 体积分数 5% CO_2 混合气持续氧合的 K-H 缓冲液,压力 60 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)。稳定后经左心耳插管,灌注液转流建立 Neely 左心室工作灌注模型,灌注压 15 mmHg,后负荷 50 mmHg。稳定 30 min 后,采用 TTX 心脏停搏液从主动脉根部缓慢灌注(2 min,压力 60 mmHg)使心脏停搏。停搏后用冰盐水纱布包裹心脏,维持低温状态,30 min 后主动脉根部再次灌注 TTX 心脏停搏液。停搏 60 min

后复温，复灌 37℃，95% O_2+5% CO_2 混合气持续氧合的 K-H 缓冲液，复跳，工作 60 min 后停止实验。分别留取左心室肌标本 2 块，一块用 4%多聚甲醛固定，常规石蜡包埋切片，用于免疫组化和 TUNEL 检测；另一块用于制备 10%心肌匀浆液。

1.4 免疫组化法检测左心室肌 p-STAT3 蛋白表达

取左心室肌石蜡切片，行 p-STAT3 免疫组化ABC 法染色，严格按照试剂盒说明书进行操作。p-STAT3 的一抗稀释度为 1:50。阴性对照不加抗体(PBS 代替)，阳性对照用已知阳性片，DAB 显色。免疫组化结果判定标准如下：由于 STAT3 正常情况下存在于胞浆中，磷酸化后进入核内，因此本研究以细胞核阳性为 p-STAT3 的判定标准。每只大鼠观察 4 张切片，光镜下(×400)每张切片随机取 5 个视野，应用 GD-8 型病理影像多媒体图文操作系统进行图像分析，测定阳性细胞胞核的平均光密度(OD 值)与阳性细胞百分比，计算蛋白阳性表达指数(PEI)。PEI(%)= OD 值×(阳性细胞数 / 总心肌细胞数)×100。

1.5 心肌匀浆液中 SOD 活性和 MDA 含量测定

操作步骤按试剂盒说明进行。测定时用 DU-600 紫外分光光度计，蒸馏水调零，分别于 550 nm 和 532 nm 处 1 cm 光径比色，测定各管吸光度(OD 值)。

1.6 心肌细胞凋亡测定

取左心室肌石蜡切片，采用脱氧核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)原位检测凋亡心肌细胞，操作步骤按试剂盒说明书进行。不加 TdT 酶者为阴性对照，Dnase I (10 mg/L)消化的左心室肌为阳性对照。光镜下正常心肌细胞核呈蓝色，凋亡的心肌细胞核呈棕褐色或棕黄色。每只大鼠观察 4 张切片，每张切片计数 5 个高倍镜视野(×400)中的凋亡阳性细胞核数，计算凋亡阳性细胞核数/总细胞核数，取其平均值为心肌细胞凋亡指数(AI)。

1.7 统计学处理

结果以平均数±标准差(±s)表示，$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义，采用 SAS8.2 软件进行统计学处理。满足方差分析前提条件者进行单因素方差分析，组间比较采用 q 检验，不满足条件者做秩和检验分析；率指标采用秩和检验分析，$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 左心室肌 p-STAT3 蛋白表达

免疫组化发现，对照组心肌组织中 p-STAT3 蛋白表达少，主要见于细胞浆，偶见于细胞核；TTX 组 p-STAT3 蛋白表达多，可见于细胞浆，大部分细胞核阳性，提示活化的 STAT3 进入细胞核，发挥其生物学功能；TTX+AG490 组 p-STAT3 蛋白表达较多，主要见于细胞浆，细胞核阳性少，提示阻断 JAK2/STAT3 信号通路后，STAT3 活化减少。与对照组相比，TTX 组和 TTX+AG490 组 p-STAT3 PEI 均明显增高($P<0.05$)；与 TTX 组相比，TTX+AG490 组 p-STAT3 PEI 则明显降低($P<0.05$)，见表 1。

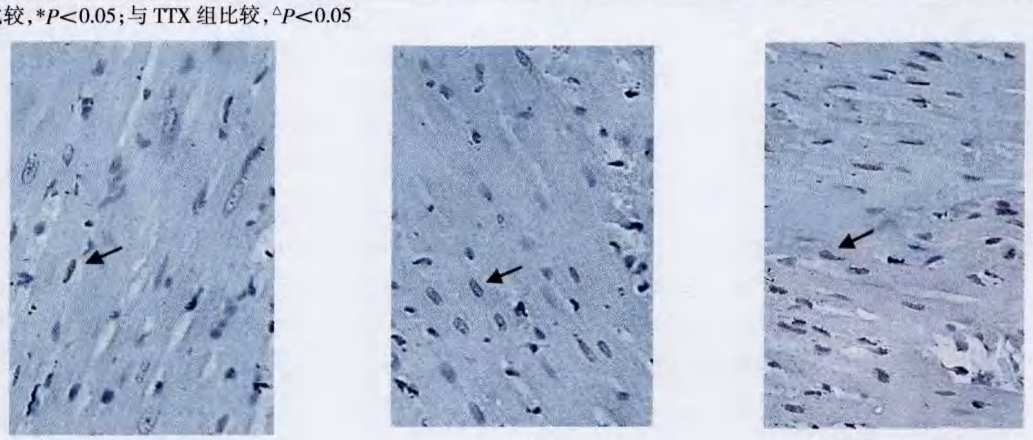
2.2 心肌匀浆液中 SOD 活性和 MDA 含量

对照组心肌匀浆液中 SOD 活性低，MDA 含量少；而经历缺血 60 min 及再灌注 60 min 后，TTX 组和 TTX+AG490 组心肌匀浆液中 SOD 活性升高，MDA 含量增加。与对照组相比，TTX 组和 TTX+AG490 组心肌匀浆液中 SOD 活性均显著升高($P<0.05$)，MDA 含量亦均显著增加($P<0.05$)；与 TTX 组相比，TTX+AG490 组 SOD 活性显著降低 ($P<0.05$)，MDA 含量明显增加($P<0.05$)，见表 1。

表 1 大鼠心肌组织中 p-STAT3 蛋白表达、心肌匀浆液中 SOD 活性和 MDA 含量及心肌细胞凋亡指数(n=8)

组 别	p-STAT3 PEI(%)	SOD 活性(U/mgprot)	MDA 含量(nmol/mgprot)	AI(%)
对照组	2.65±0.15	6.55±0.81	3.13±0.31	1.31±0.11
TTX 组	18.19±1.68*	20.56±1.16*	8.55±0.53*	6.92±1.11*
TTX+AG490 组	6.91±1.03*△	13.55±1.17*△	15.52±1.04*△	16.21±1.40*△

注：与对照组比较，*$P<0.05$；与 TTX 组比较，△$P<0.05$



对照组　　TTX 组　　TTX+AG490 组

图 1 各组心肌细胞凋亡情况(TUNEL×400)

2.3 心肌细胞凋亡测定结果

光镜下观察,对照组心肌细胞未见明显凋亡,TTX 组可见散在分布的凋亡心肌细胞,TTX+AG490 组可见到凋亡心肌细胞弥漫分布,见图 1。与对照组相比,TTX 组和 TTX+AG490 组心肌细胞 AI 均有明显增加($P<0.05$);与 TTX 组相比,TTX+AG490 组心肌细胞 AI 则明显增加($P<0.05$),见表 1。

3 讨 论

JAK2/STAT3 信号通路是目前研究得较为深入和透彻的一个信号转导途径,参与了多种细胞因子和生长因子介导的信号传递。有文献报道,心肌缺血缺氧及再灌注等可以作为应激原刺激多种细胞因子产生,激活 JAK2,启动 JAK2/STAT3 信号通路,介导心肌保护作用[3-5]。TTX 是细胞膜上的一种 Na^+ 通道阻断剂,能迅速停搏心脏,使心脏缺血,从而建立缺血再灌注模型。那么,在 TTX 心脏停搏液停搏状态下,是否有 JAK2/STAT3 信号通路激活,并增强 SOD 活性,从而介导 TTX 的心肌保护作用呢?

STAT3 作为 JAK2 的靶蛋白,正常情况下位于细胞浆内。当 JAK2 被激活后,信号经 JAK2/STAT3 通路传导,使 STAT3 磷酸化而活化,即 p-STAT3 表达增加,然后转入核内,与靶基因启动子结合,诱导基因表达,转录合成效应底物[6]。所以,当组织中 p-STAT3 及效应底物表达增加,可推知有 JAK2/STAT3 信号通路的存在且被激活。本实验通过免疫组化发现,经 TTX 心脏停搏液停搏后,心肌组织中 p-STAT3 表达明显增加,提示在 TTX 心脏停搏液停搏条件下,JAK2/STAT3 信号通路被激活,活化 STAT3,增加 p-STAT3 表达,亦表明有 JAK2/STAT3信号通路的存在。

引起心肌缺血/再灌注损伤的机制复杂,氧自由基的爆发生成是其主要机制之一[7]。氧自由基作用于细胞外基质,使胶原和透明质酸崩解,促使膜磷脂结构内的多聚不饱和脂肪酸过氧化而直接损伤细胞膜,造成肌浆网和线粒体破裂,最终导致心肌细胞损伤。MDA 是脂质过氧化反应的代谢产物,其浓度是膜脂质过氧化损害程度的标志,测定心肌匀浆液中 MDA 浓度可以间接反映出氧自由基对心肌细胞的损伤程度。SOD 是体内清除氧自由基的一种特异酶,能保护细胞免受损伤,SOD 活性可间接反映出机体清除氧自由基的能力[8]。Negoro 等[9]研究发现,STAT3 活化后,可以诱导 MnSOD 的表达来减轻心肌细胞缺氧/复氧损伤。在体实验证实,特异性表达活化 STAT3 的转基因小鼠,在经历缺血再灌注后,心肌梗死面积较同窝出生者减少 60.3%,活性氧物质也明显减少[10]。本研究发现,运用 TTX 停搏后,心肌匀浆液中 SOD 活性明显升高;加用 AG490 阻断 JAK2/STAT3 信号通路后,SOD 活性明显降低,MDA 含量显著增加,膜脂质过氧化损伤加重,细胞凋亡显著增加;提示 TTX 心脏停搏液可以通过 JAK2/STAT3 信号通路,激活 STAT3,促进 p-STAT3 表达,增强心肌 SOD 的活性,清除大量氧自由基,减轻膜脂质过氧化损伤,减少 MDA 产生,减少心肌细胞凋亡,使心肌细胞得到较好的保护。

综上所述,JAK2/STAT3 信号通路在 TTX 心脏停搏液心肌保护中具有重要作用;其激活后,可以增强 SOD 活性,清除大量氧自由基,减轻膜脂质过氧化损伤,减少心肌细胞凋亡,减轻心肌缺血/再灌注损伤。该结论为 TTX 的在体动物实验以及临床应用提供了理论依据。

参 考 文 献

[1] 杨朝坤,杨双强,谭松涛,等.河豚毒素停搏液减轻大鼠心肌细胞内钙超载作用的实验研究[J].第三军医大学学报,2005,27(3):192-195.

[2] 杨双强,谭松涛,杨朝坤,等.极化停搏液用于离体大鼠心脏保存的实验研究[J].重庆医科大学学报,2005,30(3):438-441.

[3] Hattori R,Maulik N,Otani H,et al.Role of STAT3 in ischemia preconditioning[J]. J Mol Cell Cardiol,2001,33(11):1929-1936.

[4] Omura T,Yoshiyama M,Ishikura F,et al.Myocardial ischemia activates the JAK-STAT pathway through angiotensin Ⅱ signaling in vivo myocardium of rats[J].J Mol Cell Cardiol,2001,33(2):307-316.

[5] Xuan Y T,Guo Y,Han H,et al.An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2001,98(16):9050-9055.

[6] Schindler C W.Series introduction JAK-STAT signaling in human disease[J].J Clin Invest,2002,109(9):1133-1137.

[7] Paradies G,Petrosillo G,Pistolese M,et al.Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion[J].Free Radic Biol Med,1999,27(1-2):42-50.

[8] 复正远,顾家珍,张遵严,等.体外循环下心肌缺血再灌注后血清心肌酶、SOD 活性变化及复方丹参的应用[J].中华麻醉学杂志,1996,16(3):1153-1155.

[9] Negoro S,Kunisada K,Fujio Y,et al.Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase[J].Circulation,2001,104(9):979-981.

[10] 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.

(责任编辑:冉明会)