维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)02-0169-04

JAK2/STAT3 通过上调 Bcl-2 蛋白介导 TTX 心肌保护作用

刘胜中,綦 俊,杨双强

(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 60min,复灌 K-H 缓冲液 60min 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)。采用免疫组化法测定心肌组织中 p-STAT3(磷酸化 STAT3)和 Bcl-2 表达量(Protein expression index,PEI),TUNEL 检测心肌细胞凋亡指数(Apoptosis index,AI),比较 2 组间的变化。结果:与对照组相比,TTX 组和 TTX+AG490 组心肌组织中 p-STAT3 和 Bcl-2 的表达量均明显增加($P<0.05$);予以 AG490 处理后,p-STAT3 和 Bcl-2 的表达量较 TTX 组明显下降($P<0.05$)。Bcl-2 蛋白表达与 p-STAT3 蛋白表达呈正相关($r=0.743$,$P<0.05$)。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 信号通路通过上调 Bcl-2 的表达,抑制心肌细胞凋亡,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;Bcl-2;凋亡;河豚毒素;心肌保护

【中国图书分类法分类号】R654.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-07-03

Mediation of JAK2/STAT3 pathway on myocardial protection of tetrodotoxin cardioplegia in rat hearts via upregulating the protein expression of Bcl-2

LIU Sheng-zhong, et al

(*Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To investigate the effect of JAK2/STAT3 pathway on myocardial protection of tetrodotoxin (TTX) cardioplegia in rat hearts. *Methods*: A total of 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, and underwent reperfusion with K-H buffer solution for 60 minutes, then the left ventricular samples were collected for detections. 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) and B-cell lymphoma-2(Bcl-2) in myocardium were detected by immunohistochemical assay(IHC). 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 and Bcl-2 in Group TTX and Group TTX+AG490 increased significantly($P<0.05$); Treated with AG490, the PEI of p-STAT3 and Bcl-2 in Group TTX+AG490 was lower than that in Group TTX($P<0.05$). The PEI of Bcl-2 had a positive correlation with the PEI of p-STAT3 ($r=0.743$, $P<0.05$). After ischemia/reperfusion, AI in Group TTX and Group TTX+AG490 were significantly higher than that in Group Control($P<0.05$); compared with Group TTX, AI in Group TTX+AG490 increased significantly($P<0.05$). *Conclutions*: JAK2/STAT3 pathway could mediate myocardial protection of TTX cardioplegia in rat hearts via upregulating the protein expression of Bcl-2 and suppressing cardiomyocytes apoptosis.

【Key words】 Signal transducer and activator of transcription 3; Bcl-2; Apoptosis; Tetrodotoxin; Myocardial protection

作者介绍:刘胜中(1981-),男,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。

维普资讯 http://www.cqvip.com

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 JAK2/STAT3(Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3)信号通路,检测心肌组织中 p-STAT3(磷酸化 STAT3)和 Bcl-2 蛋白表达量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 250~300g 的健康 Wistar 大鼠 24 只,随机分为对照组、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 30min 后,灌注 4℃ TTX 心脏停搏液(20μmol/L TTX + K-H 缓冲液),停搏心脏并低温维持 60min,复灌 K-H 缓冲液 60min 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(5μmol/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)和 Bcl-2 单克隆抗体购自 CST 公司,TUNEL 试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司,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杉生物公司。

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 200U,20min 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 7.98kPa。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 1.995kPa,后负荷 6.65kPa。稳定 30min 后,采用 TTX 心脏停搏液从主动脉根部缓慢灌注(2min,压力 7.98kPa)使心脏停搏。停搏后用冰盐水纱布包裹心脏,维持低温状态,30min 后主动脉根部再次灌注 TTX 心脏停搏液。停搏 60min 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 60min 后停止实验。取左心室肌 400mg,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。

1.4 免疫组化法检测左心室肌 p-STAT3 和 Bcl-2 蛋白表达

取左心室肌石蜡切片,分别行 p-STAT3 和 Bcl-2 免疫组化 ABC 法染色,严格按照试剂盒说明书进行操作。p-STAT3 和 Bcl-2 的一抗稀释度分别为 1:50 和 1:100。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。Bcl-2 以胞浆及胞膜内侧出现棕黄色颗粒为阳性。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,测定阳性细胞胞核或胞浆的平均光密度(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 心肌细胞凋亡的测定

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(10mg/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)。

1.6 统计学处理

结果以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,SAS8.2 软件进行单因素方差分析和相关分析,组间比较采用 q 检验,$P<0.05$ 表示具有显著性差异。

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($P<0.05$),提示在 TTX 心脏停搏液停搏条件下,JAK2/STAT3 信号通路被激活,STAT3 被活化,p-STAT3 蛋白表达增加;与 TTX 组相比,TTX+AG490 组 p-STAT3 PEI 则明显降低($P<0.05$),表明 AG490 阻断了 JAK2/STAT3 信号通路,减少了 p-STAT3 的表达(表 1)。

2.2 左心室肌 Bcl-2 蛋白表达

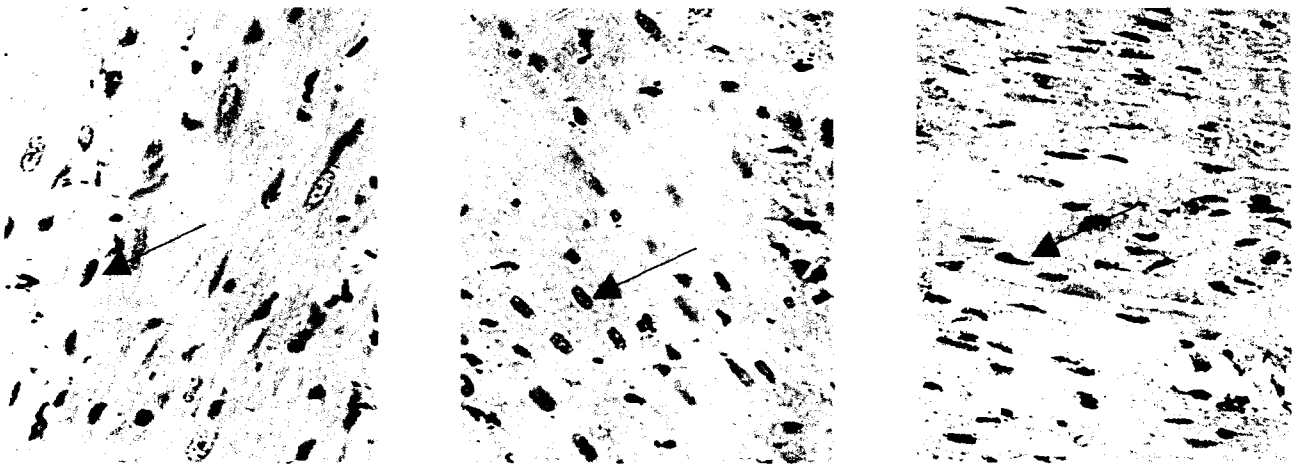
光镜下观察,对照组心肌细胞胞浆中可见到少

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 大鼠心肌组织中 p-STAT3 和 Bcl-2 蛋白表达

组 别	数量(只)	p-STAT3 PEI(%)	Bcl-2 PEI(%)
对照组	8	2.65 ± 0.15	2.52 ± 0.58
TTX 组	8	18.19 ± 1.68*	22.63 ± 1.15*
TTX+AG490 组	8	6.91 ± 1.03*△	14.40 ± 1.20*△

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)

量 Bcl-2 蛋白表达,TTX 组和 TTX+AG490 组心肌细胞胞浆中可见到较多的 Bcl-2 蛋白表达。与对照组相比,TTX 组和 TTX+AG490 组心肌组织中 Bcl-2 PEI 均显著增高($P<0.05$),说明在 TTX 心脏停搏液停搏条件下,Bcl-2 蛋白表达增加;与 TTX 组相比,TTX+AG490 组 Bcl-2 PEI 则显著降低($P<0.05$),表明应用 AG490 阻断 JAK2/STAT3 信号通路后,Bcl-2 蛋白表达减少(表 1)。

2.3 左心室肌 Bcl-2 及 p-STAT3 蛋白表达的相关分析

结果发现,p-STAT3 蛋白表达增加时,Bcl-2 蛋白表达相应增加;p-STAT3 蛋白表达减少时,Bcl-2 蛋白表达也相应减少,二者呈正相关($r=0.743$, $P<0.05$),提示 Bcl-2 蛋白是 p-STAT3 蛋白的效应底物,STAT3 活化后,可以诱导 Bcl-2 蛋白表达。

2.4 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(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($P<0.05$),提示缺血再灌注可以导致心肌细胞发生凋亡。与 TTX 组相比,TTX+AG490 组心肌细胞 AI 则明显增加($P<0.05$),表明阻断 JAK2/STAT3 信号通路后,心肌细胞凋亡增加(表 2)。

表 2 大鼠心肌细胞凋亡指数

组 别	数量(只)	AI(%)
对照组	8	1.31 ± 0.11
TTX 组	8	6.92 ± 1.11*
TTX+AG490 组	8	16.21 ± 1.40*△

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

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,使 STAT3 磷酸化及二聚化后转入核内,诱导目的基因表达,转录合成 Bcl-2 等多种心肌保护因子,介导心肌保护作用[3-5]。TTX 是细胞膜上的一种 Na^+ 通道

维普资讯 http://www.cqvip.com

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，并诱导 Bcl-2 表达，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。

Bcl-2 是一种抗凋亡蛋白，系 Bcl-2 基因表达产物。Chen 等[7]报道携带有人 Bcl-2 转基因的小鼠在经历缺血再灌注后，心功能恢复快，乳酸脱氢酶降低，心肌梗死面积缩小，凋亡细胞明显减少，提示 Bcl-2 在减轻心肌缺血 / 再灌注损伤中具有重要作用。有实验证明，缺血预处理可以通过 JAK2/STAT3 信号通路活化 STAT3，上调抗凋亡基因 Bcl-2，下调促凋亡基因 Bax，促进缺血后心室收缩功能的恢复，减少心肌细胞凋亡和心肌梗死面积[3]。实验发现，心脏经 TTX 停搏后，心肌组织中 Bcl-2 蛋白表达明显增加；同时加用 AG490 阻断 JAK2/STAT3 信号通路后，Bcl-2 蛋白表达显著降低，凋亡心肌细胞显著增加，提示 TTX 心脏停搏液可能通过 JAK2/STAT3 信号通路，激活 STAT3，促进 Bcl-2 蛋白表达，减少心肌细胞凋亡，从而保护心肌。Bcl-2 抗心肌细胞凋亡的机制可能是：①通过防止凋亡诱导基因（如 p53）的激活来起作用；②通过抗氧化作用或抑制氧自由基的产生而抑制凋亡；③通过调节胞内 Ca^{2+} 浓度来调节凋亡[8]；④与凋亡蛋白酶结合，实现其抗凋亡作用。

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，可以上调 Bcl-2 蛋白表达，抑制心肌细胞凋亡，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 YT，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 CW.Series introduction JAK-STAT signaling in human disease[J]. J Clin Invest，2002；109(9)：1133-1137.

[7] Chen Z，Chua CC，Ho YS，et al.Overexpressiom of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol，2001；280(5)：H2313-2320.

[10] Snoeckx LH，Comelussen RN，Van Nieuwenhoven FA，et al. Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology[J]. Physiol Rev，2001；81(4)：1461-1497.

（责任编辑：关蕴良）