

JAK2/STAT3 信号通路介导玉郎伞查尔酮后处理对大鼠 离体心脏的保护作用

覃斐章¹, 黄媛恒¹, 陈兆霓¹, 王稼农², 黄仁彬^{1*}

(1. 广西医科大学, 南宁 530021; 2. 广西壮族自治区食品药品检验所, 南宁 530021)

[摘要] 目的:探讨玉郎伞查尔酮(YLSC)后处理对大鼠离体心脏缺血/再灌注损伤(I/R)的保护作用及相关信号传导通路机制。方法:将 60 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组,模型组,YLSC 组($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),AG490 组($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),YLSC + AG490 组(YLSC $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + AG490 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),每组 12 只。采用停灌 30 min,再灌注 120 min 的方法制备大鼠离体心脏缺血/再灌注模型。再灌注前 10 min 给予 AG490 或 YLSC。记录心率(HR),左心室舒张末压(LVEDP)和左室内压最大变化速率($\pm dp/dt_{\max}$)。收集冠脉流出液,测定冠脉流出液中乳酸脱氢酶(LDH)含量。再灌结束后处死大鼠,2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)法测定心肌梗死面积,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测心肌组织磷酸化 Janus 激酶 2(phosphorylated janus kinase 2,p-JAK2),磷酸化信号转导和转录激活子 3(phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3,p-STAT3),B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2,Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein,Bax)蛋白表达量。结果:与模型组比较,YLSC 后处理可明显改善心功能,缩小心肌梗死面积,减少 LDH 含量,减少凋亡及 Bax 表达水平,上升 p-JAK2,p-STAT3 及 Bcl-2 表达水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。而同时给予 YLSC 和 AG490 处理后,血流动力学改善作用减弱,心肌梗死面积,LDH 及 Bax 表达较 YLSC 组回升,p-JAK2,p-STAT3,Bcl-2 的表达较 YLSC 组降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:YLSC 后处理能减轻大鼠离体心脏缺血/再灌注损伤,其机制可能与激活 JAK2/STAT3 通路有关。

[关键词] 玉郎伞查尔酮; 心肌缺血/再灌注损伤; 后处理; Janus 激酶 2/信号转导和转录激活子 3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)24-0153-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017240153

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170926.1033.022.html>

[网络出版时间] 2017-09-26 10:33

JAK2/STAT3 Signaling Pathway Mediated YLSC Postconditioning-induced Protection Against I/R Injury in Isolated Rat Hearts

QIN Fei-zhang¹, HUANG Yuan-heng¹, CHEN Zhao-ni¹, WANG Jia-nong², HUANG Ren-bin^{1*}

(1. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Guangxi Institute of Food and Drug Control, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of 17-methoxyl-7-hydroxyl-benzofuran chalcone (YLSC) postconditioning on myocardial ischemia reperfusion (I/R) injury in isolated rat hearts and investigate its related signaling pathway. **Method:** Total 60 male SD rats were randomly divided into 5 groups: normal group, model group, YLSC group ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), AG490 group ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and YLSC + inhibitor group (YLSC $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + AG490 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), $n = 12$ in each group. The isolated rat hearts were subjected to 30 min ischemia + 120 min reperfusion to establish the I/R model. AG490 or YLSC was given 10 min before reperfusion.

[收稿日期] 20170807 (018)

[基金项目] 广西自然科学基金项目(2014GXNSFBA118188, 2014GXNSFBA118156); 广西医科大学青年科学基金项目(GXMUYSF201316)

[第一作者] 覃斐章, 博士, 讲师, 从事心血管药理学研究, Tel:13737096346, E-mail:348427590@qq.com

[通讯作者] * 黄仁彬, 博士, 教授, 从事心血管药理学研究, Tel:0771-5358014, E-mail:huangrenbin518@163.com

The heart rate (HR), the left ventricular end diastolic pressure (LVEDP) and the maximum change rate of left ventricular pressure ($\pm dp/dt_{max}$) were recorded, and the level of lactic dehydrogenase (LDH) in coronary effluent was detected. The rats were sacrificed after reperfusion, and their infarct sizes were measured by triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. Phosphorylated janus kinase 2 (JAK2), phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) protein expression levels in myocardium were measured by Western blot. **Result:** As compared with the model group, YLSC postconditioning obviously ameliorated cardiac function, decreased myocardial infarct sizes and LDH level, reduced apoptotic rate and Bax expression levels, and increased p-JAK2, p-STAT3 and Bcl-2 levels ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Combination of YLSC and AG490 could attenuate the hemodynamic improvement effect, increase the infarct sizes, LDH level and Bax expression level, and down-regulate p-JAK2, p-STAT3 and Bcl-2 expression levels as compared with YLSC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** YLSC postconditioning could effectively protect against myocardial I/R injury in isolated rat hearts, and its mechanism may be associated with activation of JAK2/STAT3 signaling pathway.

[**Key words**] 17-methoxyl-7-hydroxyl-benzofuran chalcone (YLSC); ischemia/reperfusion; postconditioning; janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3

缺血心肌恢复血流后组织功能代谢障碍,结构进一步破坏,甚至发生不可逆性损伤,称之为心肌缺血再灌注(I/R)损伤。近年来研究发现,Janus 激酶(janus kinase, JAK)/信号转导和转录激活子(signal transducer and activator of transcription, STAT)作为生存活化因子增强信号通路(survivor activating factor enhancement)的重要组成部分,在保护缺血心肌方面起着关键作用^[1]。Huffman 等^[2]研究提示,将缺血预处理离体心脏的冠脉流出液输入另外一个心脏,可以活化受体心脏的 STAT3 并发挥心肌保护作用。XIE 等^[3]研究发现,使用 AG490 阻断 JAK/STAT 通路后, I/R 小鼠的心肌细胞凋亡数增多,心肌梗死面积也增加。JAK/STAT 能够抑制凋亡,保护心肌细胞,而 JAK2/STAT3 是 JAK/STAT 重要成员之一,在心肌 I/R 损伤保护机制中具有核心作用。

玉郎伞系豆科植物疏叶崖豆的干燥根,为广西壮族的习用药材,用于治疗小儿疳积、骨折、跌打损伤、风湿关节肿痛及中风性偏瘫等^[4]。17-甲氧基-7-羟基-苯并呋喃查尔酮(17-methoxyl-7-hydroxy-benzene-furan chalcone),简称玉郎伞查尔酮(YLSC),是从玉郎伞 60% 乙醇提取物中分离得到的黄酮单体^[5]。本课题组的前期研究证实, YLSC 具有抗氧化、耐缺氧和抗凝血的作用,对大鼠 I/R 损伤和心肌细胞缺氧/复氧损伤有明显的保护作用^[6]。但 YLSC 抗心肌 I/R 损伤的机制尚未完全清楚, JAK2/STAT3 信号通路是否参与了 YLSC 后处理对大鼠心肌 I/R 损伤的保护作用尚未见报道。本实验拟采用大鼠离体心脏 I/R 模型,给予 YLSC 及

JAK2/STAT3 选择性抑制剂 α -氰基-(3,4-羟基) *N*-苄苯乙酰胺(AG490),观察 JAK2/STAT3 信号通路在 YLSC 保护缺血心肌中的作用。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠,体重 280 ~ 300 g,由广西医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(桂)2014-0002。本研究所涉及的动物相关操作均在广西医科大学动物伦理委员会批准下进行(批准号 2012011121)。

1.2 药物与试剂 玉郎伞采自广西灵山县,经广西中医药研究院赖茂祥研究员鉴定是蝶形花科植物疏叶崖豆 *Millettia pulchra* var. *laxior* 的块根。YLSC 由广西医科大学药理教研室提供,将玉郎伞饮片用 60% 乙醇进行微波辅助提取,萃取液浓缩得醋酸乙酯部位,采用多级柱层板、反复三氯甲烷-甲醇重结晶、制备液相色谱法对此部位进行纯化得到 YLSC 单体, HPLC 检测纯度为 98%^[5]; AG490 (美国 Sigma 公司,批号 167342-31-6); 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC,南京奥多福尼生物科技有限公司,批号 20160013); 细胞凋亡原位检测试剂盒(德国 Roche 公司,批号 89539A); 乳酸脱氢酶(LDH)测试试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20160524); 兔抗磷酸化 Janus 激酶 2 (p-JAK2)多克隆抗体,兔抗磷酸化信号转导和转录激活子 3 (p-STAT3)多克隆抗体,鼠抗 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)多克隆抗体,鼠抗 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)多克隆抗体,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,批号分别为

S7021, T5625, 3165J, 5329X, 6742N); IgG-HRP, Immobilon-P 试剂盒(美国 Pierce 公司,批号分别为 MN877532, JS542678)。

1.3 仪器 722s 型可见光分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);MPA2000 型离体心脏灌流实验系统(上海奥尔科特生物科技有限公司);MS4000U-1C 型生物信号定量记录分析系统(广州市龙飞达科技有限公司);ALC-B5 型恒流泵(上海奥尔科特生物科技有限公司);HH. S11-Ni2 型电热恒温水浴箱(北京长安科学仪器厂);CX41-12C02 型奥林巴斯光学显微镜(Olympus 公司);PAC1000 型电泳仪,Trans-Blot cell 转膜仪,ChemiDoc XRS 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 离体心脏 I/R 模型的建立及实验分组 按照文献[7]的方法复制离体心脏 I/R 模型。腹腔注射戊巴比妥钠($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉大鼠,同时腹腔注射肝素钠($500 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$)抗凝。20 min 后快速开胸取出心脏,立刻放入 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 改良 Krebs-Hensleit (K-H)液($\text{NaCl } 118 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{KCl } 4.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, MgSO_4 $1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, NaHCO_3 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, CaCl_2 $1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Glucose $11 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)中,轻轻挤压心脏,洗净残血,主动脉插管,固定于 Langendorff 灌流装置,行非循环逆行灌流,灌注高度为 80 cm。用 95% O_2 和 5% CO_2 持续通气, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ K-H 液持续灌流。所有心脏均用 K-H 液先平衡 20 min 后,将实验分为 5 组,正常组:离体心脏用 K-H 液持续灌流 150 min;模型组:离体心脏停灌 30 min 再灌注 120 min;YLSC 组:离体心脏停灌 30 min,再灌注前给予含 $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ YLSC 的 K-H 液灌流 10 min,后用 K-H 液再灌注 110 min;YLSC + AG490 组:离体心脏停灌 30 min,再灌注前给予含 $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ YLSC 和 $2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AG490 的 K-H 液灌流 10 min,后用 K-H 液再灌注 110 min;AG490 组:离体心脏停灌 30 min,再灌注前给予含 $2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AG490 的 K-H 液灌流 10 min,后用 K-H 液再灌注 110 min。其中 YLSC 给药剂量根据预实验结果设置。

2.2 血流动力学及冠脉流出液 LDH 的测定 将自制的水囊从左心房插入左心室,使左心室舒张末压(LVEDP)维持在 $5 \sim 10 \text{ mmHg}$ (单位转换 $1 \text{ mmHg} = 0.133 \text{ kPa}$),记录缺血前和再灌注 60,120 min 时心率(HR),LVEDP,左室内压最大上升速率($+ dp/dt_{\text{max}}$)和左室内压最大下降速率($- dp/dt_{\text{max}}$)。收集

冠脉流出液,测定冠脉流出液中 LDH 水平。

2.3 心肌梗死面积的测定 再灌注结束后取下大鼠心脏,置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冷冻 10 min。留取左心室,平行房室沟将心脏切成 6 片(每片约 $2 \sim 3 \text{ mm}$)。切片置于的 1% TTC 磷酸盐缓冲液($37 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 7.4$)中孵育 30 min,后置于 10% 的甲醛中固定过夜。梗死心肌不染色为灰白色,存活心肌染为砖红色。数码相机拍照后,采用 Image J 软件计算心肌梗死面积,心肌梗死面积 = 梗死心肌面积之和/心肌总面积之和 $\times 100\%$ 。

2.4 原位末端标记法(TUNEL)测定心肌细胞凋亡率 按照试剂盒说明书检测心肌凋亡阳性细胞的分布情况。将每个心脏标本切为 5 片,每片取 10 个阳性视野。正常细胞核呈蓝色,阳性凋亡细胞核呈棕黄色,平均计算阳性细胞数占总细胞数的比率作为细胞凋亡率。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 p-JAK2, p-STAT3, Bcl-2, Bax 蛋白表达量 再灌注结束后处死动物,快速取出心脏。提取心肌组织总蛋白,考马斯亮蓝进行总蛋白定量。取蛋白样品 $50 \text{ } \mu\text{g}$ 加入上样孔,经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳、转膜至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上,5% 脱脂奶粉封闭后加入相应稀释倍数的一抗(p-JAK2, p-STAT3, Bcl-2, Bax, GAPDH 的抗体体积比分别为 $1:2000, 1:500, 1:400, 1:2000, 1:500$), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜,再与相应的二抗于室温下作用 1 h。用化学发光系统检测免疫反应性条带蛋白表达水平,Quantity One 软件测定蛋白质印迹条带灰度。GAPDH 作为内参,每个样本重复测定 3 次。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件进行数据统计,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,组内比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 YLSC 对血流动力学的影响 与正常组比较,I/R 处理后 HR, $+ dp/dt_{\text{max}}$ 和 $- dp/dt_{\text{max}}$ 降低,而 LVEDP 升高($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,YLSC 能明显改善心功能,表现为 HR, $+ dp/dt_{\text{max}}$ 和 $- dp/dt_{\text{max}}$ 增加,而 LVEDP 降低($P < 0.05, P < 0.01$),AG490 能明显减弱 YLSC 的心肌保护作用($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,AG490 对心功能无明显影响。见表 1。

3.2 YLSC 对心肌梗死面积和冠脉流出液 LDH 水平的影响 与模型组比较,YLSC 后处理能明显减

表 1 YLSC 对离体心脏血流动力学的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effect of YLSC on hemodynamic parameters in isolated rat hearts ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	HR/beats $\cdot \text{min}^{-1}$			LVEDP/mmHg		
		缺血前	再灌注 60 min	再灌注 120 min	缺血前	再灌注 60 min	再灌注 120 min
正常	-	265.6 \pm 21.3	273.7 \pm 25.4	262.3 \pm 28.4	7.3 \pm 0.6	7.6 \pm 0.6	7.2 \pm 0.5
模型	-	272.9 \pm 23.4	241.2 \pm 17.0 ¹⁾	236.5 \pm 18.9 ¹⁾	7.0 \pm 0.8	18.9 \pm 0.8 ²⁾	18.5 \pm 0.6 ²⁾
YLSC	5	269.0 \pm 26.6	253.1 \pm 19.6 ¹⁾	260.5 \pm 13.4 ³⁾	6.8 \pm 0.5	13.2 \pm 0.4 ^{2, 4)}	13.5 \pm 0.5 ^{2, 4)}
YLSC + AG490	5 + 2	260.7 \pm 11.3	248.4 \pm 21.5 ¹⁾	253.4 \pm 15.3 ³⁾	7.0 \pm 0.9	17.5 \pm 0.5 ^{2, 6)}	18.0 \pm 0.6 ^{2, 6)}
AG490	2	268.4 \pm 15.2	233.7 \pm 20.0 ^{1, 5)}	245.9 \pm 27.3 ⁵⁾	7.2 \pm 0.7	19.3 \pm 0.7 ^{2, 6)}	19.2 \pm 0.9 ^{2, 6)}

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	+ dp/dt _{max} /mmHg $\cdot \text{s}^{-1}$			- dp/dt _{max} /mmHg $\cdot \text{s}^{-1}$		
		缺血前	再灌注 60 min	再灌注 120 min	缺血前	再灌注 60 min	再灌注 120 min
正常	-	2 610 \pm 209	2 653 \pm 184	2 627 \pm 252	1 924 \pm 176	1 998 \pm 192	1 972 \pm 177
模型	-	2 539 \pm 176	1 874 \pm 242 ²⁾	1 852 \pm 266 ²⁾	2 005 \pm 190	1 209 \pm 235 ²⁾	1 324 \pm 168 ²⁾
YLSC	5	2 580 \pm 148	2 317 \pm 226 ^{1, 4)}	2 145 \pm 186 ^{1, 3)}	1 972 \pm 243	1 764 \pm 207 ^{1, 4)}	1 813 \pm 185 ⁴⁾
YLSC + AG490	5 + 2	2 579 \pm 295	1 960 \pm 181 ^{2, 5)}	1 985 \pm 247 ²⁾	2 123 \pm 191	1 154 \pm 215 ^{2, 6)}	1 207 \pm 181 ^{2, 6)}
AG490	2	2 631 \pm 182	1 945 \pm 235 ^{2, 5)}	1 873 \pm 230 ^{2, 5)}	1 930 \pm 184	1 237 \pm 165 ^{2, 6)}	1 214 \pm 189 ^{2, 6)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;与 YLSC 组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 4 同)。

小心肌梗死面积,减少 LDH 释放 ($P < 0.01$)。与 YLSC 组比较, YLSC + AG 组心肌梗死面积明显增加, LDH 释放增多 ($P < 0.01$)。与模型组比较, AG490 对心肌梗死面积和 LDH 水平无明显影响。见表 2。

表 2 YLSC 对心肌梗死面积和冠脉流出液 LDH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of YLSC on myocardial infarct sizes and LDH level ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	梗死面积/%	LDH/U $\cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	4.80 \pm 0.61	170.36 \pm 21.48
模型	-	48.39 \pm 4.75 ²⁾	490.58 \pm 34.62 ²⁾
YLSC	5	25.73 \pm 3.52 ^{2, 4)}	250.49 \pm 31.45 ^{1, 4)}
YLSC + AG490	5 + 2	44.69 \pm 5.19 ^{2, 6)}	460.86 \pm 39.26 ^{2, 4)}
AG490	2	46.38 \pm 5.44 ^{2, 6)}	500.24 \pm 42.17 ^{2, 6)}

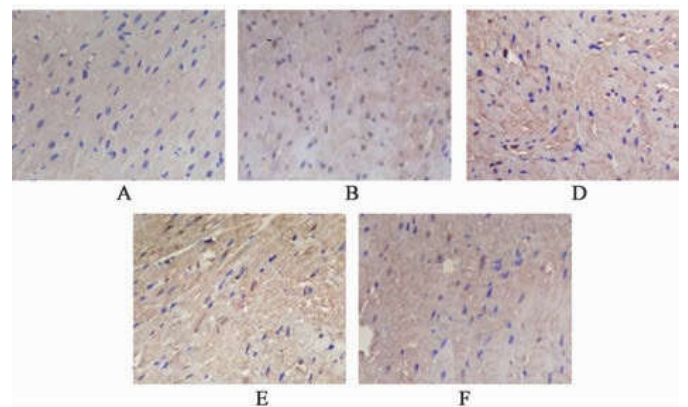
3.3 YLSC 对心肌细胞凋亡率的影响 缺血 30 min 再灌注 120 min 能明显增加心肌细胞凋亡率。与模型组比较, YLSC 后处理能明显减少心肌细胞凋亡率 ($P < 0.01$)。与 YLSC 组比较, YLSC + AG490 组心肌细胞凋亡明显增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较, AG490 对心肌细胞凋亡无明显影响。见表 3, 图 1。

3.4 YLSC 后处理对心肌 p-JAK2, p-STAT3, Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组 p-JAK2, p-STAT3, Bax 表达增加, Bcl-2 表达减少 ($P < 0.01$); 与模型组比较, YLSC 组 p-JAK2, p-STAT3 表达进一步增加, Bax 表达减少而 Bcl-2 表达增多 ($P < 0.01$); 与 YLSC 组比较, YLSC + AG490 组 p-

表 3 YLSC 对心肌细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of YLSC on apoptotic rate in isolated rat hearts ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	凋亡率/%
正常	-	2.54 \pm 0.32
模型	-	45.73 \pm 5.29 ²⁾
YLSC	5	19.38 \pm 4.46 ^{2, 4)}
YLSC + AG490	5 + 2	43.06 \pm 6.05 ^{2, 6)}
AG490	2	41.27 \pm 5.30 ^{2, 6)}



A. 正常组; B. 模型组; C. YLSC 组; D. YLSC + AG490 组; E. AG490 组 (图 2 同)

图 1 YLSC 对大鼠心肌细胞凋亡率变化的影响 (TUNEL, $\times 400$)

Fig. 1 Changes of apoptotic rate in each group (TUNEL, $\times 400$)

JAK2, p-STAT3, Bcl-2 水平降低, Bax 水平升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, AG490 能减少 p-JAK2, p-STAT3 表达 ($P < 0.01$), 而对 Bcl-2 和 Bax 水平无明显影响。见表 4, 图 2。

表 4 YLSC 对大鼠心肌组织 p-JAK2, p-STAT3, Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of YLSC on protein levels of p-JAK2, p-STAT3, Bcl-2 and Bax in myocardium($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	p-JAK2/GAPDH	p-STAT3/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH
正常	-	0.35 ± 0.04	0.32 ± 0.03	0.43 ± 0.03	0.25 ± 0.01
模型	-	0.83 ± 0.07 ²⁾	0.68 ± 0.04 ²⁾	0.13 ± 0.01 ²⁾	0.96 ± 0.07 ²⁾
YLSC	5	1.16 ± 0.10 ^{2, 4)}	0.93 ± 0.06 ^{2, 4)}	0.35 ± 0.02 ^{1, 4)}	0.44 ± 0.03 ^{2, 4)}
YLSC + AG490	5 + 2	0.28 ± 0.01 ^{4, 6)}	0.50 ± 0.04 ^{1, 3, 6)}	0.14 ± 0.01 ^{2, 6)}	0.87 ± 0.06 ^{2, 6)}
AG490	2	0.33 ± 0.02 ^{4, 6)}	0.41 ± 0.03 ^{1, 3, 6)}	0.15 ± 0.01 ^{2, 6)}	0.91 ± 0.05 ^{2, 6)}

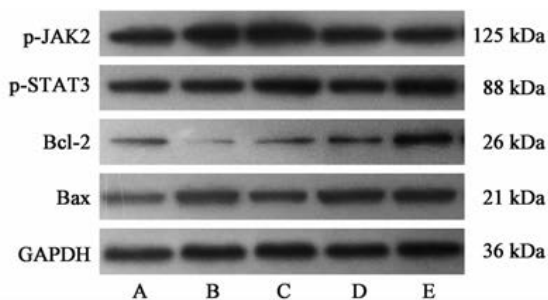


图 2 YLSC 对心肌 p-JAK2, p-STAT3, Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

Fig. 2 Expressions of protein p-JAK2, p-STAT3, Bcl-2 and Bax in myocardium

4 讨论

随着体外循环、急诊溶栓、冠脉搭桥术等广泛开展,心肌 I/R 损伤成为临床常见的病理生理过程,如何减轻 I/R 损伤是目前研究的热点。本课题组的前期研究证实,YLSC 具有明确的保护心肌作用。YLSC 可减少大鼠 I/R 损伤引起的心肌梗死面积增加和心肌酶的释放,同时通过 PI3K/Akt 信号途径减少心肌细胞的凋亡与自噬^[8]。YLSC 长期用药还可以减轻压力负荷性大鼠引起的心肌肥厚及心衰,其机制可能与保护内皮细胞,减少 PGI₂ 的合成与分泌有关^[9],但目前 YLSC 保护心肌的作用机制尚未完全清楚,仍需进一步研究。

JAK/STAT 信号通路是 1992 年发现的一条重要的细胞内信号通路,在感受细胞应激,调节免疫、增殖、炎症、凋亡及肿瘤等方面发挥着重要的作用^[1]。目前,哺乳动物中分离出 4 种 JAKs (包括 JAK1, JAK2, JAK3 和 TYK2) 和 7 种 STATs (包括 STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B 和 STAT6)。研究发现,即使短暂的缺血缺氧, JAK/STAT 也能被迅速激活,位于细胞膜表面的 JAK 被磷酸化,进而激活位于胞质的 STAT。STAT 形成同/异二聚体,转入细胞核,连接 DNA,诱导目标基因的转录^[10]。很多动物实验证明了 STAT3 的心脏保护作用。STAT3 基因敲除小鼠缺血 1 h 再灌注 24 h

后,其心肌梗死面积明显增加^[11]。而过表达 STAT3 能减轻心肌 I/R 损伤和阿霉素引起的心肌肥大^[12]。该通路在心肌 I/R 损伤以及缺血预处理、缺血后处理的心肌保护机制中发挥着重要的作用^[13]。有研究发现^[14],激活 JAK2/STAT3 可减少心肌细胞凋亡。Hattori 等^[15]报道,用 JAK/STAT 信号阻断剂 AG490 能取消缺血后处理引起的 Bcl-2 升高及 Bax 下调。目前的研究提示,STAT3 不仅存在于细胞质和细胞核,线粒体也有分布,STAT3 蛋白可减少 mPTP 的开放,抑制凋亡^[16]。线粒体靶向的 STAT3 过表达保留了线粒体呼吸链 complex I 的呼吸功能,减少 ROS 的生成和 Cyt C 的释放^[17]。Bolli 等^[18]研究发现,STAT3 的激活对减少死亡受体途径和线粒体途径介导的凋亡同样重要。

本研究发现,与 Control 组相比, I/R 后离体心脏磷酸化的 JAK2, STAT3 数量都增高,同时凋亡的心肌细胞也明显增多。与 I/R 组比较, YLSC 处理后 p-JAK2, p-STAT3 的表达水平进一步升高,同时观察到抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达增加和促凋亡蛋白 Bax 表达减少。于再灌注前 10 min 给予 JAK2 抑制剂 AG490 后 JAKs 和 STATs 的活化被显著抑制,凋亡的心肌细胞数量也明显增加, Bcl-2 表达减少而 Bax 表达增加。提示 YLSC 的心肌保护作用可能与激活 JAK2/STAT3 通路,进一步调节凋亡相关蛋白的表达,减少心肌细胞凋亡有关。同时笔者还观察到,离体大鼠心脏缺血 30 min,再灌注 120 min 后,心脏的收缩和舒张功能明显下降,主要表现为 HR, LVEDP 和 +dp/dt_{max} 均降低, LVEDP 升高。YLSC 后处理可明显改善心脏功能,同时减少心肌梗死面积,使冠脉流出液 LDH 水平下降,提示 YLSC 后处理可以减轻心肌损伤。而加入 AG490 后, YLSC 后处理改善血流动力学的作用被取消,心肌梗死面积增加,心肌酶 LDH 渗出增加,提示 JAK2/STAT3 参与了 YLSC 后处理对心肌 I/R 损伤的保护作用。

综上所述, YLSC 后处理能够有效地改善 I/R

心脏的血流动力学指标,减少心肌梗死的面积,上调 p-JAK2, p-STAT3 水平,发挥抗凋亡作用。而这种保护作用可被 JAK2/STAT3 信号通路抑制剂 AG490 所抑制,提示 JAK2/STAT3 信号可能介导了 YLSC 的心肌保护效应。

[参考文献]

[1] XUAN Y T, GUO Y, HAN H, et al. An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (16): 9050-9055.

[2] Huffman L C, Koch S E, Butler K L. Coronary effluent from a preconditioned heart activates the JAK-STAT pathway and induces cardioprotection in a donor heart [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294(1): 257-262.

[3] XIE X J, FAN D M, XI K, et al. Suppression of microRNA-135b-5p protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by activating JAK2/STAT3 signaling pathway in mice during sevoflurane anesthesia [J]. *BioSci Rep*, 2017, 37(3):186-196.

[4] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准[M]. 南宁:广西科学技术出版社,1992:31-32.

[5] 简洁,张士军,邱莉,等. 壮药玉郎伞查尔酮类成分的研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2010, 30(20): 1734-1737.

[6] 覃斐章. 17-甲氧基-7-羟基-苯并呋喃查尔酮对心肌缺血的保护作用及机制研究[D]. 南宁:广西医科大学,2012.

[7] 胡明珠,周波,盛琼,等. PI3K/Akt/Sirt1 信号通路介导硫化氢后处理对大鼠缺血心肌的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(2):268-273.

[8] 禚霏霏,黄建春,唐静芝,等. 玉郎伞查尔酮调控 PI3K/Akt 信号通路抗心肌缺血/再灌注损伤的作用及机制研究[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(12): 1730-1734.

[9] 黄建春. 17-甲氧基-7-羟基-苯并呋喃查尔酮逆转压力超负荷大鼠心血管重构的作用及机制研究[D]. 南宁:广西医科大学,2014.

[10] Levy D E, Darnel J E. Stats:transcriptional control and

biological impact [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 137(3):651-662.

[11] Hilfiker K D, Hilfiker A, Fuchs M, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury [J]. *Circ Res*, 2004, 95(2):187-195.

[12] Kunisada K, Negoro S, Tone E, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(1):315-319.

[13] Barry S P, Townsend P A, Latchman D S, et al. Role of the JAK/STAT pathway in myocardial injury [J]. *Trends Mol Med*, 2007, 13(2):82-89.

[14] WANG Z, YU J, WU J, et al. Scutellarin protects cardiomyocyte ischemia-reperfusion injury by reducing apoptosis and oxidative stress [J]. *Life Sci*, 2016, 157:200-207.

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

[16] Boengler K, Hilfiker Kleiner D, Heusch G, et al. Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion [J]. *Basic Res Cardiol*, 2010, 105(6):771-785.

[17] Szczepanek K, CHEN Q, Derecka M, et al. Mitochondrial-targeted signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protects against ischemia-induced changes in the electron transport chain and the generation of reactive oxygen species [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(34):29610-29620.

[18] Bolli R, Stein A B, GUO Y R, et al. A murine model of inducible, cardiac-specific deletion of STAT3: its use to determine the role of STAT3 in the upregulation of cardioprotective proteins by ischemic preconditioning [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50(4):589-597.

[责任编辑 邹晓翠]