

JAK-STAT 通路抑制剂和自由基清除剂联合应用对大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤的保护作用研究

杨谦梓 雷翀 路志红 王百忍 熊利泽

【摘要】 目的 研究联用 Janus 激酶信号转导及转录激活因子(JAK-STAT)信号通路抑制剂 AG490 和自由基清除剂二甲基硫脲(DMTU)对大鼠局灶性脑缺血/再灌注(I/R)损伤的保护作用及其剂量-效应关系。方法 制备大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)模型。选择雄性 SD 大鼠,按照随机数字表法分组,每组 10 只。实验 1 设 I/R 模型组、二甲亚砜(DMSO)对照组、生理盐水(NS)对照组、AG490 组、DMTU 组以及 AG490 联合 DMTU(A+D)组;实验 2 分为模型组及高、中、低剂量联合组。于 I/R 24、48 和 72 h 对各组大鼠进行神经行为学评分(NBS);72 h 后处死动物,测量其脑梗死体积。结果 I/R 24、48 和 72 h A+D 组、AG490 组和 DMTU 组 NBS 明显高于 I/R 模型组,脑梗死体积明显小于 I/R 模型组,其中 A+D 组脑梗死体积较 AG490 组和 DMTU 组明显减小(P 均 <0.05)。高、中剂量联合组 NBS 明显高于低剂量联合组和模型组,脑梗死体积明显小于后两组,其中高剂量联合组脑梗死体积较中剂量联合组明显减小(P 均 <0.05),而低剂量联合组与模型组之间差异无统计学意义。结论 AG490 和 DMTU 有明显的协同脑保护作用,并呈现剂量依赖性。

【关键词】 缺血/再灌注损伤;脑; JAK-STAT 信号通路; 自由基清除剂; 剂量-效应关系

Neuroprotective effects of combined application of JAK-STAT signal pathway inhibitor and free radical scavenger on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats YANG Qian-zi*, LEI Chong, LU Zhi-hong, WANG Bai-ren, XIONG Li-ze. * Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shanxi, China
Corresponding author: XIONG Li-ze (Email: lxiong@fmmu.edu.cn)

【Abstract】 **Objective** To investigate the neuroprotective effects and dose-response relation by combining JAK-STAT signal pathway inhibitor (AG490) with free radical scavenger dimethylthiourea (DMTU) in rats subjected to focal cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury. **Methods** In all rats, the middle cerebral artery occlusion (MCAO) was produced by occlusion of right internal carotid artery with a nylon monofilament. One hundred male Sprague-Dawley (SD) rats were divided into ten groups according to random digits table, 10 rats were in each group. The first experiment involved I/R model control, dimethyl sulfoxide (DMSO) control, normal saline (NS) control, AG490, DMTU and combination of AG490 and DMTU (A+D) groups. The second experiment involved model group and three experimental groups in which various doses of DMTU and AG490 were administered. The neurological behavior scores (NBS) were assessed at 24, 48 and 72 hours after reperfusion respectively in both experiments, and all the animals were then decapitated to determine the brain infarct volume after 72 hours. **Results** The values of NBS in A+D group, AG490 group and DMTU group were higher than those in model group at 24, 48 and 72 hours after I/R, and their brain infarct volumes were obviously smaller than model group as well (all $P<0.05$). The brain infarct volume in A+D group was obviously smaller compared with AG490 and DMTU alone (all $P<0.05$). The values of NBS were higher and the brain infarct volumes were smaller in both high dose and medium dose combination groups than those in low dose combination and model groups respectively (all $P<0.05$). In addition, brain infarct volumes in high dose group were smaller than medium dose group ($P<0.05$), but there was no statistically significant difference between low dose and model groups. **Conclusion** The combined application of AG490 and DMTU produces a dose-dependent synergistic neuroprotective effect.

【Key words】 cerebral ischemia/reperfusion injury; JAK-STAT signal pathway; free radical scavenger; dose-response relation

急性脑梗死可造成不同程度的神经功能障碍。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30571793)

作者单位:710032 陕西西安,第四军医大学西京医院麻醉科(杨谦梓,雷翀,路志红,熊利泽);第四军医大学神经科学研究所(王百忍)

通信作者:熊利泽,教授,博士生导师,Email:lxiong@fmmu.edu.cn

作者简介:杨谦梓(1983-),女(汉族),陕西省人,硕士研究生。

有研究报道,Janus 激酶信号转导及转录激活因子(JAK-STAT)信号通路中 STAT3 分子在脑缺血后明显活化,并参与了损伤的发生^[1]。作为酪氨酸磷酸化抑制剂,AG490 能选择性拮抗 JAK2,并能有效阻断 JAK-STAT 通路下游信号转导和转录激活因子 STAT3 的活化,从而减轻脑缺血/再灌注(I/R)损

伤^[2]。另一方面,在 I/R 损伤的发生过程中,氧自由基发挥了重要的作用。自由基清除剂二甲基硫脲(DMTU)能清除以羟自由基为主的多种自由基及脂质过氧化物^[3],也已被证实具有脑保护作用^[4]。脑 I/R 损伤是一复杂病理生理过程,单用某种抑制剂或拮抗剂作用有限,本实验旨在联合应用 DMTU 和 AG490,观察两者是否具有协同脑保护作用,并探讨其剂量-效应关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及模型制备:100 只雄性 SD 大鼠,体重 280~300 g,由第四军医大学实验动物中心提供。动物分组按随机数字表法。

1.1.1 实验 1:比较单独给予 AG490 或 DMTU 和两者联用的脑保护效应。60 只大鼠随机分为 6 组,每组 10 只。①I/R 模型组:单纯行 I/R 操作;②二甲亚砜(DMSO)对照组:缺血前 20 min 经右侧脑室注射质量分数为 3%的 DMSO 10 μ l(美国 Sigma 公司);③生理盐水(NS)对照组:缺血前 1 h 经腹腔注射 5 ml/kg NS;④AG490 组:缺血前 20 min 经右侧脑室注射 1 000 μ mol/L AG490(溶于 DMSO 中)10 μ l(美国 Calbiochem 公司);⑤DMTU 组:缺血前 1 h 经腹腔注射质量分数为 10%的 DMTU(溶于 NS 中)5 ml/kg(美国 Sigma 公司);⑥DMTU 联合 AG490(A+D)组:同时给予 DMTU 和 AG490。

1.1.2 实验 2:观察两种抑制剂合用的剂量-效应关系。40 只大鼠随机分为模型组、高剂量联合组(A+D I)、中剂量联合组(A+D II)和低剂量联合组(A+D III),每组 10 只。高、中、低联合用药组分别经右侧脑室注射 1 000、500 和 250 μ mol/L AG490 10 μ l,腹腔注射 10%、5%、2.5% DMTU 5 ml/kg,其中 AG490 在缺血前 20 min 给药,DMTU 在缺血前 1 h 给药。

1.1.3 动物模型制备:10 g/L 戊巴比妥 40 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠,用烤灯维持大鼠体温在 37.0~37.5 $^{\circ}$ C。按 Tatlisumak 等^[5]方法并参照我们以前的改进措施^[6],采用右侧颈内动脉尼龙线栓法制备大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)模型。阻塞 120 min 后抽出尼龙线,恢复再灌注。

1.2 观察指标及方法

1.2.1 神经行为学评估:将麻醉苏醒后的动物放回鼠笼,于脑 I/R 后 24、48 和 72 h 由同一位观察者用盲法按 Garcia 等^[7]介绍的评分法评估记录神经行为学评分(NBS)。评估指标包括 6 个方面:自主活动记 0~3 分;四肢活动对称性记 0~3 分;前肢伸展能

力记 0~3 分;攀爬能力记 1~3 分;肢体感觉记 1~3 分;触须反应记 1~3 分。评分分值越低,代表神经功能损伤越大,正常大鼠评分为 18 分。

1.2.2 脑梗死灶体积测量:完成 72 h NBS 后断头处死动物,迅速取全脑放入冰盐水中 10 min,取冠状面切成 2 mm 厚脑片,用 20 g/L 的氯化三苯四唑(TTC)溶液(37 $^{\circ}$ C)染色 30 min,用 40 g/L 甲醛缓冲液固定,24 h 后拍照,计算机处理图像,计算脑梗死体积(粉红色区为正常脑组织,白色区为梗死区)。

$$\text{脑梗死体积} = \frac{\text{对侧正常组织体积} - \text{同侧正常组织体积}}{\text{对侧正常组织体积}} \times 100\%$$

1.3 统计学处理:脑梗死体积用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析(ANOVA)统计,多组间两两比较采用 SNK 检验;NBS 以中位数(范围)[$M(\text{range})$]表示,采用非参法(Kruskal-Wallis)检验,若存在组间差异则以 Mann-Whitney U 检验进行两两比较; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验 1

2.1.1 神经行为学改变(表 1):I/R 24、48 和 72 h A+D 组、AG490 组、DMTU 组 NBS 明显优于 I/R 模型组(P 均 < 0.05),而 3 组间及各组内不同时间点间差异均无统计学意义。

表 1 各组大鼠脑 I/R 后不同时间点 NBS 的变化比较 [$M(\text{range})$] 分

组别	动物数	I/R 24 h	I/R 48 h	I/R 72 h
I/R 模型组	10	7.0(6~12)	7.0(6~12)	7.5(6~12)
DMSO 对照组	10	8.0(8~13)	8.5(8~13)	8.5(8~13)
NS 对照组	10	7.5(6~12)	8.0(6~13)	8.0(6~13)
AG490 组	10	10.0(9~14) ^a	10.5(9~14) ^a	11.0(9~14) ^a
DMTU 组	10	10.0(8~13) ^a	10.8(8~13) ^a	10.8(8~13) ^a
A+D 组	10	11.5(10~14) ^a	12.0(10~14) ^a	14.5(10~16) ^a

注:与 I/R 模型组同期比较,^a $P < 0.05$

2.1.2 脑梗死体积(表 2):I/R 72 h AG490 组、DMTU 组及 A+D 组梗死体积明显小于 I/R 模型组,且 A+D 组较 AG490 组和 DMTU 组亦有明显减小(P 均 < 0.05);I/R 模型组、DMSO 对照组和 NS 对照组 3 组间比较差异无统计学意义。

表 2 各组大鼠脑 I/R 72 h 脑梗死体积比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	脑梗死体积(%)	组别	动物数	脑梗死体积(%)
I/R 模型组	10	49.3 $\pm$ 6.8	AG490 组	10	31.8 $\pm$ 5.8 ^{ab}
DMSO 对照组	10	45.4 $\pm$ 4.6	DMTU 组	10	34.7 $\pm$ 5.5 ^{ab}
NS 对照组	10	46.6 $\pm$ 7.3	A+D 组	10	16.5 $\pm$ 2.3 ^a

注:与 I/R 模型组比较,^a $P < 0.05$;与 A+D 组比较,^b $P < 0.05$

2.2 实验 2

2.2.1 神经行为学改变(表 3):A+D I 组和 I 组 NBS 较 II 组及模型组明显升高,I/R 72 h II 组 NBS 优于模型组(P 均 <0.05);而 A+D I 组和 II 组间及各组内不同时间点比较差异均无统计学意义。

表 3 A+D 不同剂量组大鼠脑 I/R 后不同时间点 NBS 的变化比较[$M(\text{range})$] 分

组别	动物数	I/R 24 h	I/R 48 h	I/R 72 h
模型组	10	7.5(6~12)	7.5(6~12)	8.0(6~12)
A+D I 组	10	11.5(10~14) ^{ab}	12.0(10~14) ^{ab}	14.5(10~16) ^{ab}
A+D II 组	10	11.0(9~13) ^{ab}	11.5(9~13) ^{ab}	13.0(9~14) ^a
A+D III 组	10	8.5(7~12)	9.0(7~12)	10.0(9~14) ^a

注:与模型组同期比较,^a $P<0.05$;与 A+D II 组同期比较,^b $P<0.05$

2.2.2 脑梗死体积(表 4):I/R 72 h A+D I 组和 II 组脑梗死体积明显小于 A+D III 组和模型组,且 I 组更明显小于 II 组(P 均 <0.05);A+D III 组和模型组比较差异无统计学意义。

表 4 A+D 不同剂量组大鼠脑 I/R 72 h 脑梗死体积比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	脑梗死体积(%)	组别	动物数	脑梗死体积(%)
模型组	10	48.2 $\pm$ 9.2	A+D I 组	10	28.9 $\pm$ 5.7 ^{ab}
A+D II 组	10	16.5 $\pm$ 2.3 ^{abc}	A+D III 组	10	47.4 $\pm$ 5.8

注:与模型组比较,^a $P<0.05$;与 A+D III 组比较,^b $P<0.05$;
与 A+D II 组比较,^c $P<0.05$

3 讨 论

脑 I/R 损伤是多种病理生理机制共同作用的结果,而目前研究的脑保护药物或措施大多只是针对脑 I/R 损伤过程中的部分机制,其疗效有限。此外,为提高疗效而单独增加某一种药物的剂量会增加药物毒性或副作用。近年来一些实验研究对某些神经保护药物及措施的联合应用进行了观察,为临床治疗脑血管疾病提供了可靠的理论依据^[8-9]。

JAK-STAT 信号通路是在细胞膜受体活化后将信号迅速传至细胞内,并进入核内启动 RNA 转录和蛋白翻译的快速反应通路。该信号通路与 I/R 损伤后病理生理过程中的多种信号通路存在交叉对话(cross-talk),其中 JAK2-STAT3 通路还直接参与了 I/R 后的炎症反应发生^[10]。AG490 作为一种选择性拮抗 JAK2 酪氨酸磷酸化的抑制剂,可有效阻断其下游信号转导和转录激活因子 STAT 的活化。Satiriotomo 等^[2]证明,AG490 能明显减小缺血后的梗死体积,改善 NBS,有脑保护作用。另一方面,在 I/R 损伤的病理生理过程中,氧自由基发挥了重要

作用,实验证明清除氧自由基、减少活性氧(ROS)的产生是实现脑保护的一条重要途径^[11]。常用的自由基清除剂 DMTU 能清除·OH 为主的多种自由基及脂质过氧化物^[3,12]。Martz 等^[4]证实 DMTU 能减小大鼠脑梗死体积,具有脑保护作用。值得提出的是,本实验室以往的研究发现,大鼠局灶性脑 I/R 后损伤区 STAT3 的活化与 ROS 有关,缺血前 1 h 给予 DMTU,再灌注后 STAT3 磷酸化水平显著降低,且呈剂量依赖性^[13],表明氧自由基损伤作用的表达与 JAK-STAT 通路有直接或间接的关系。

本实验证实,经右侧脑室注射 JAK-STAT 信号通路抑制剂 AG490 联合经腹腔注射自由基清除剂 DMTU,较两药单独使用能更显著地减小脑梗死体积,减轻神经功能损害,且这种协同保护作用有剂量依赖效应。其机制为:合适浓度的 DMTU 能有效清除 I/R 后产生的 ROS,从上游阻断了氧自由基连锁反应;而 AG490 抑制了 JAK-STAT 通路的信号转导,在下游一定程度上阻断了损伤效应的表达。此外,由于这两个关键环节之间以及各自与其他环节之间均存在相互联系,因而联合应用这两种药物能使与 ROS 和 JAK-STAT 有关的所有致损伤反应都受到不同程度的抑制,从而显示出有效的保护效应。

本研究选取的 AG490 和 DMTU 基础剂量及给药方式系参照本实验室以往的研究结果^[13]。由于尚不确定 AG490 是否能够通过血脑屏障,故采用侧脑室注射给药方式。值得指出的是,DMTU 增至 1 000 mg/kg 不会造成正常大鼠死亡;但在 MCAO 大鼠,当 DMTU 增至 500 mg/kg 以上时,动物出现行为抑制,死亡率增高^[14],这不仅与 DMTU 本身的非特异性作用有关,还与 MCAO 的持续时间有关^[11]。在本研究的第一部分中,我们发现 DMTU 组大鼠明显表现出反应迟钝、活动减少等特点。

由于 JAK-STAT 信号转导通路与细胞生长、活化、分化、凋亡等正常生理功能密切相关^[15],给予 AG490 后 JAK-STAT 信号通路参与的正常生理功能可能受到抑制,从而影响机体的生存状态。我们在实验中也发现,尽管高剂量联合组梗死体积相对最小,神经功能恢复较快,但其副作用亦更明显,动物死亡率(30%)亦增加。其原因除了脑室注射以及连续手术操作带来创伤较大以外,更可能是由于这两种药物的副作用叠加所致。相比之下,中剂量联合获得了可与单独应用大剂量 DMTU 或 AG490 相比拟的脑保护效应,且安全性大大提高,比高剂量联合显示出更大的应用价值。

必须指出的是,由于尚不明确 AG490 能否通过血脑屏障及其目前的给药方式所限,此研究结果距临床应用还有一定距离;此外,DMTU 与 AG490 具体通过何种途径相协同仍需要进一步研究证实。

参考文献

- [1] Suzuki S, Tanaka K, Nogawa S, et al. Phosphorylation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) after focal cerebral ischemia in rats[J]. *Exp Neurol*, 2001, 170(1): 63-71.
- [2] Satriotomo I, Bowen KK, Vemuganti R. JAK2 and STAT3 activation contributes to neuronal damage following transient focal cerebral ischemia [J]. *J Neurochem*, 2006, 98(5): 1353-1368.
- [3] Sagone AL Jr, Husney RM, Wewers MD, et al. Effect of dimethylthiourea on the neutrophil myeloperoxidase pathway [J]. *J Appl Physiol*, 1989, 67(3): 1056-1062.
- [4] Martz D, Rayos G, Schielke GP, et al. Allopurinol and dimethylthiourea reduce brain infarction following middle cerebral artery occlusion in the rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(4): 488-494.
- [5] Tatlisumak T, Takano K, Carano RA, et al. Delayed treatment with an adenosine kinase inhibitor, GP683, attenuates infarct size in rats with temporary middle cerebral artery occlusion [J]. *Stroke*, 1998, 29(9): 1952-1958.
- [6] 赵翠,熊利泽,董海龙,等. 远程缺血预处理对大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. *中国危重病急救医学*, 2007, 19(6): 340-342.
- [7] Garcia JH, Wagner S, Liu KF, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats[J]. *Stroke*, 1995, 26(4): 627-634.
- [8] Yanamoto H, Nagata I, Nakahara I, et al. Combination of intraischemic and postischemic hypothermia provides potent and persistent neuroprotection against temporary focal ischemia in rats[J]. *Stroke*, 1999, 30(12): 2720-2726.
- [9] 郑玉,熊利泽,吴明春,等. 异氟醚预处理联合参附注射液对大鼠短暂性局灶性脑缺血损伤协同保护作用中的研究[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2001, 8(6): 338-340.
- [10] Satriotomo I, Bowen KK, Vemuganti R. JAK2 and STAT3 activation contributes to neuronal damage following transient focal cerebral ischemia [J]. *J Neurochem*, 2006, 98(5): 1353-1368.
- [11] Kiyota Y, Pahlmark K, Memezawa H, et al. Free radicals and brain damage due to transient middle cerebral artery occlusion; the effect of dimethylthiourea[J]. *Exp Brain Res*, 1993, 95(3): 388-396.
- [12] Zhang X, Xiong L, Hu W, et al. Preconditioning with prolonged oxygen exposure induces ischemic tolerance in the brain via oxygen free radical formation[J]. *Can J Anaesth*, 2004, 51(3): 258-263.
- [13] 雷冲. STAT3 分子在脑缺血再灌注后的活化及其在 HBO 预处理脑保护效应中的作用研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2007.
- [14] Pahlmark K, Folbergrová J, Smith ML, et al. Effects of dimethylthiourea on selective neuronal vulnerability in fore-brain ischemia in rats[J]. *Stroke*, 1993, 24(5): 731-736.
- [15] Leonard WJ, O'Shea JJ. JAKs and STATs: biological implications[J]. *Annu Rev Immunol*, 1998, 16: 293-322.

(收稿日期: 2008-03-15 修回日期: 2008-10-17)

(本文编辑: 李银平)

• 启事 •

中国病理生理学会危重病医学专业委员会 10 周年纪念大会

暨第八届全国危重病医学学术会议及中华医学会呼吸学会危重病学组年会通知

肩负着期待与梦想, 承载着责任与挑战, 中国病理生理学会危重病医学专业委员会在过去的 10 年间经历了中国危重病医学的起步、发展和辉煌。回顾艰难历程, 开拓创新思维, 探索未来发展, 学会将于 2008 年 11 月 21—23 日在花城广州召开成立 10 周年纪念大会暨第八届危重病医学学术会议及中华医学会呼吸学会危重病学组年会。

本次会议上, 多名国际、国内知名危重病学家将对当今本学科的热点问题专题阐述。内容涉及脓毒症、液体复苏与组织灌注、急性肾功能衰竭、凝血功能障碍、胃肠功能保护、机械通气、危重病护理以及 ICU 组织建设等基础与临床研究进展。会议授予与会者国家级继续教育 I 类学分(10 分)。

(中国病理生理学会危重病医学专业委员会 中华医学会呼吸学会危重病学组)

2008 年机械通气临床应用新进展学习班通知

上海同济大学附属第十人民医院将于 2008 年 12 月 20—23 日在上海市举办机械通气临床应用新进展学习班(第二届)[编号: 20080413039], 授予国家级继续医学教育项目 I 类学分 10 分。学习班以“临床应用与最新进展相结合”为宗旨, 届时将邀请国内危重病与呼吸领域的著名专家刘大为、汤耀卿、孙波、方强、蔡映云、曹同瓦、诸杜明、杨毅、瞿洪平、陈德昌、陈宇清、俞康龙、陆铸今等对机械通气相关知识的临床应用与新进展进行授课与交流。培训内容涵盖广泛, 从基础知识到最新进展的内容均有讲授。

学费及住宿费: 学费 680 元/人(含资料与午餐), 早晚餐、住宿自理, 有需要者可代为安排。住宿: 上海同济大学干部培训楼, 约 200 元/d(标准间)。

为了便于更好地安排您的学习过程, 请欲参加者用以下方式与王启星联系。电话: 15921416019, 13501898092; Email: sicustph@126.com; 通信或回执地址: 上海市延长中路 301 号, 上海第十人民医院外科重症监护科, 邮编: 200072。

(上海同济大学附属第十人民医院)