

# 大鼠局灶性脑缺血再灌注区域 STAT3 激活的实验研究

吴文娟 徐凯 荣玉涛 马红

**【摘要】** 目的 研究大鼠局灶性脑缺血再灌注区域信号转导子与转录激活子-3(STAT3)激活变化,探讨其与梗死面积变化的关系。方法 99 只雄性 SD 大鼠分为假手术组和缺血 2 h、6 h 再灌注不同时间组,线栓法建立大脑中动脉闭塞(MCAO)模型。各组动物于不同时间点处死取脑,取相应部位脑组织行 TTC 染色,采用免疫组化及免疫印迹法检测 STAT3 蛋白表达和磷酸化水平,分析其与梗死面积变化的相关性。结果 缺血后 TTC 染色可见部分右侧大脑半球失染呈白色。缺血 6 h 组再灌注 0 h 较缺血 2 h 再灌注 0 h TTC 失染面积大,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。缺血 2 h 再灌注 24 h 后失染面积较灌注 0 h 明显变小,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。免疫组化定位:STAT3 在胞浆中表达,磷酸化 STAT3(P-STAT3)在胞核中表达。Western blot 半定量分析结果:缺血再灌注不引起 STAT3 蛋白表达的变化,但 P-STAT3 表达增加,随着再灌注时间延长,24 h 达到峰值。STAT3 激活的水平与 TTC 失染面积变化呈负性相关(缺血 2 h 组: $r=-0.680$ , $P<0.05$ ;缺血 6 h 组: $r=-0.672$ , $P<0.05$ )。结论 脑缺血再灌注不同时间 STAT3 表达水平无明显变化,但可诱导缺血区域磷酸化水平增加,其激活水平与梗死面积相关。

**【关键词】** 脑缺血再灌注; 信号转导子与转录激活子-3

**【中图分类号】** R743 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)06-0556-04

**Signal transducer and activator of transcription-3 activation after focal cerebral ischemia and reperfusion in rats** WU Wen-juan\*, XU Kai, RONG Yu-tao, MA Hong. \*Department of

Radiology, Wuxi Second People's Hospital, Wuxi 214002, China

Corresponding author: XU Kai, Email: xukaixz@163.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the activation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) in rats following focal cerebral ischemia/reperfusion (IR) and explore the correlation between STAT3 activation and the cerebral infarct volume. **Methods** Ninety-nine SD rats were randomized into sham-operated group ( $n=9$ ) and two IR groups with right middle cerebral artery occlusion with thread for 2 h ( $n=45$ ) and 6 h ( $n=45$ ) followed by reperfusion. At different time points after the end of the ischemia, the rats were sacrificed to obtain the brain tissue for triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining to determine the infarct volume. Immunohistochemistry and Western blot were used to detect the expressions of STAT3 and phosphorylated STAT3 (P-STAT3) in the brain tissue, and their correlations to the infarct volume were analyzed. **Results** Cerebral ischemia induced obvious infarction in the right hemisphere of the rats, where TTC staining was absent. Ischemia for 6 h resulted in more extensive areas without TTC staining than ischemia for 2 h ( $P<0.05$ ). Reperfusion for 24 h after a 2-hour ischemia was associated with obviously reduced area free of TTC staining ( $P<0.05$ ), whereas reperfusion for 24 h following a 6-hour ischemia only caused mild reduction of the TTC staining-free area. Immunohistochemistry of the brain tissue demonstrated the presence of STAT3 protein expression in the cytoplasm and P-STAT3 in the cell nuclei. IR was found to cause changes in the expression of P-STAT3 but not STAT3 protein, and the expression of P-STAT3 increased with the reperfusion time, reaching the peak level at 24 h of reperfusion. The activation level of STAT3 protein was inversely

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2009.06.004

作者单位:214002 无锡市第二人民医院影像科(吴文娟); 221002 徐州,徐州医学院附属医院影像科(徐凯、荣玉涛、马红)

通信作者:徐凯,Email: xukaixz@163.com

correlated to the dimension of the TTC staining-free area in the brain. **Conclusion** STAT3 is expressed in the cytoplasm and P-STAT3 in the cell nucleus of the brain tissue. Without causing obvious changes in STAT3 expression level, cerebral ischemia and reperfusion increases the phosphorylation level of STAT3 in inverse correlation to the size of the infarct area.

**【Key words】** Cerebral ischemia and reperfusion; STAT3

脑血管疾病是常见病、多发病,其中缺血性脑血管病占 80%,以大脑中动脉分布区的发病率最高。随着溶栓技术的发展,临床需要早期诊断,从而早期采取有效的治疗措施。本实验研究急性脑缺血再灌注后信号转导子与转录激活子-3(STAT3)的激活变化,探讨其与梗死面积的关系,为进一步研究缺血后治疗提供理论基础。

## 材料和方法

### 一、研究对象及主要试剂、材料

健康雄性 SD 大鼠 99 只,由徐州医学院动物中心提供,体质量 250~300 g,按照随机数字表法分为 A 组:假手术组、B 组:缺血 2 h 组、C 组:缺血 6 h 组,B 组、C 组按缺血后再灌注时间分为 0 h、0.5 h、2 h、6 h、24 h 组,每小组 9 只。STAT3 抗体及磷酸化 STAT3(P-STAT3)抗体购买自美国 Cell Signalling 公司;红四氮唑(TTC)购买自上海试剂厂。

### 二、实验方法

首先用线栓法建立大脑中动脉栓塞(MCAO)模型,各组动物于不同时间点处死取脑。每组中 3 只行 TTC 染色、拍照,采用图像处理与分析系统测量 TTC 失染区占同层全脑面积相对面积比。每组中 3 只免疫组化检测 STAT3 及 P-STAT3 的表达,结

果判定:STAT3 蛋白阳性及 P-STAT3 蛋白阳性呈棕黄色颗粒;无阳性细胞或阳性细胞数 <10%为(-),阳性细胞数 >10%为(+)。每组中最后 3 只行 Western blot 检测 STAT3 及 P-STAT3,结果以 Image J 图像分析软件分析条带,测相对灰度值,计算公式为相对灰度值=缺血区域灰度值/假手术组灰度值。

### 三、统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件,数据以均数±标准差表示,多组间采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK 检验,两组间比较采用 *t* 检验,P-STAT3 表达与 TTC 染色面积相关性分析采用 Pearson 相关分析, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、急性脑缺血再灌注前后鼠脑 TTC 染色结果

TTC 染色结果见图 1,表 1。A 组可见到两侧大脑半球呈均匀一致红染,B、C 组见右侧大脑半球片状失染区呈白色,B 组再灌注 24 h 后 TTC 染色失染区相对面积较灌注 0 h 明显变小,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。C 组再灌注 0 h 可见 TTC 染色失染区面积较 B 组再灌注 0 h 大,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),C 组再灌注 24 h 后 TTC 染色失染区面积



1A:假手术组;1B:缺血 2 h 再灌注 0 h 组;1C:缺血 2 h 再灌注 24 h 组;1D:缺血 6 h 再灌注 0 h 组;1E:缺血 6 h 再灌注 24 h 组

图 1 缺血再灌注前后 TTC 染色图

Fig.1 TTC staining of the brain tissue after focal cerebral ischemia and reperfusion

表 1 各组缺血再灌注前后 TTC 染色失染区相对面积变化(% ,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab.1 Changes in the abnormal area in the brain without TTC staining after focal cerebral ischemia and reperfusion(% , Mean±SD)

组别	再灌注 0 h	再灌注 0.5 h	再灌注 2 h	再灌注 6 h	再灌注 24 h	F 值	P 值
B 组	34.8±1.2	33.9±2.4	33.1±1.4	31.3±2.1	29.8±1.2 <sup>a</sup>	4.074	0.033
C 组	40.2±3.1	41.7±5.4	40.1±3.0	40.0±6.2	37.5±2.3	0.375	0.822
<i>t</i> 值	2.814	2.286	3.662	2.302	4.841		
<i>P</i> 值	0.048	0.084	0.026	0.083	0.008		

与再灌注 0 h 比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$

较灌注 0 h 轻度缩小,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

二、免疫组化检测 STAT3 的表达及激活变化

STAT3 阳性细胞在脑组织缺血区域弥散分布,阳性细胞表现为圆或椭圆形,胞膜及胞浆内见棕黄色免疫反应产物,以胞浆着色为主(图 2)。

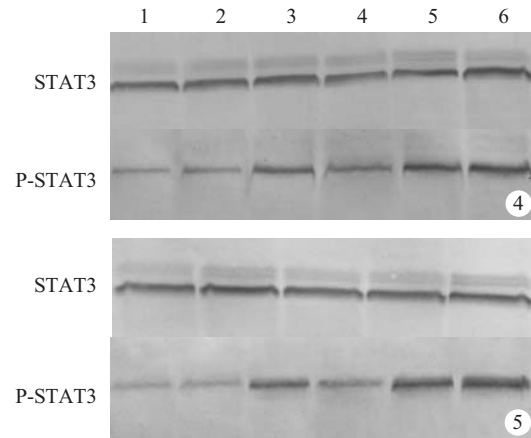
P-STAT3 阳性细胞表现为圆或椭圆形,主要分布于星形胶质细胞内,其次为神经元细胞,胞核内见棕黄色免疫反应产物,阳性细胞在正常脑组织中表达较少,随着缺血再灌注时间的延长,缺血区域内阳性细胞逐渐增多(图 3)。

三、Western blot 分析 STAT3 的表达及激活变化

STAT3 蛋白在正常脑组织中表达,且缺血 2 h、6 h 再灌注不同时间并不能影响 STAT3 表达水平,与再灌注 0 h 比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ),而 P-STAT3 表达水平在正常脑组织中较低,缺血再灌注 0.5 h 明显增加,再灌注 2 h 有所下降,但在再灌注 24 h 时增加最为明显,0.5 h、6 h、24 h 组 P-STAT3 表达水平与再灌注 0 h 比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。(图 4,图 5,表 2)

四、P-STAT3 表达与 TTC 染色面积相关性分析

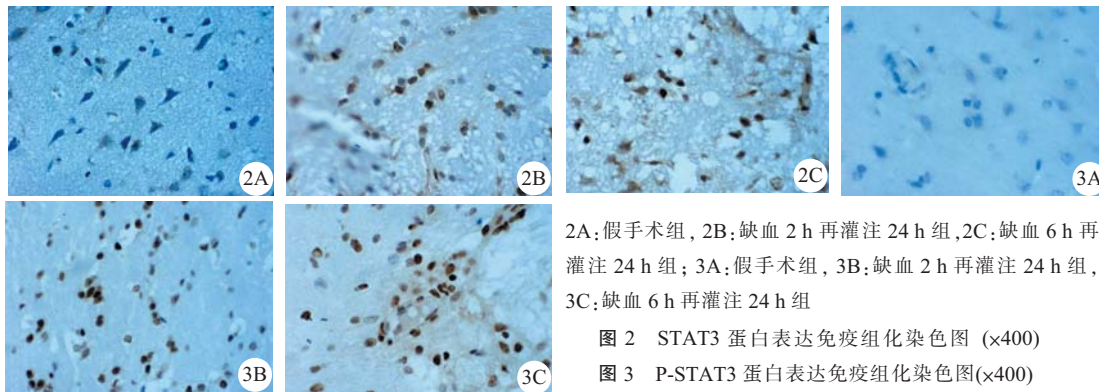
P-STAT3 表达水平变化与 TTC 染色失染区相对面积变化呈负性相关 (B 组: $r=-0.680, P<0.05$ ;C 组: $r=-0.672, P<0.05$ )。



1:假手术组;2:缺血再灌注 0 h;3:缺血再灌注 0.5 h;4:缺血再灌注 2 h;5:缺血再灌注 6 h;6:缺血再灌注 24 h

图 4 B 组 STAT3 及 P-STAT3 电泳条带图 图 5 C 组 STAT3 及 P-STAT3 电泳条带图

Fig.4 Western blot of STAT3 and P-STAT3 in the brain tissue after cerebral ischemia (for 2 h) and reperfusion Fig.5 Western blot of STAT3 and P-STAT3 in the brain tissue after cerebral ischemia (for 6 h) and reperfusion



2A:假手术组, 2B:缺血 2 h 再灌注 24 h 组, 2C:缺血 6 h 再灌注 24 h 组; 3A:假手术组, 3B:缺血 2 h 再灌注 24 h 组, 3C:缺血 6 h 再灌注 24 h 组

图 2 STAT3 蛋白表达免疫组化染色图 (×400) 图 3 P-STAT3 蛋白表达免疫组化染色图(×400)

Fig.2 Immunohistochemistry for STAT3 in the brain after focal cerebral ischemia and reperfusion(×400)

Fig.3 Immunohistochemistry for P-STAT3 in the brain tissue after focal cerebral ischemia and reperfusion(×400)

表 2 各组缺血再灌注前后 STAT3 蛋白表达及激活变化的相对灰度值( $\bar{x}\pm s$ )

Tab.2 Changes of the optical density of STAT3 and P-STAT3 after focal cerebral ischemia and reperfusion relative to that in the sham-operated group ( $Mean\pm SD$ )

组别	例数	B组 STAT3	B组 P-STAT3	C组 STAT3	C组 P-STAT3
再灌注 0 h	3	1.13±0.31	1.28±0.20	0.94±0.31	1.18±0.81
再灌注 0.5 h	3	1.18±0.12	2.64±0.50 <sup>a</sup>	1.16±0.42	2.75±0.70 <sup>a</sup>
再灌注 2 h	3	0.96±0.42	2.38±0.31	0.89±0.63	2.14±0.22
再灌注 6 h	3	1.00±0.13	3.56±0.22 <sup>a</sup>	1.11±0.23	3.50±0.52 <sup>a</sup>
再灌注 24 h	3	1.23±0.20	3.79±0.71 <sup>a</sup>	0.97±0.30	4.12±0.13 <sup>a</sup>
F值		0.640	16.671	0.270	13.835
P值		0.651	0.000	0.891	0.000

与再灌注 0 h 比较, <sup>a</sup> $P<0.05$



## 讨 论

### 一、急性脑缺血再灌注后 STAT3 激活变化

Janus 激酶—信号转导子与转录激活子 (AK-STATs) 途径是近年来新发现的一条信号转导途径。STATs 是一种能与靶基因调控区 DNA 结合的胞浆蛋白家族,具有双重功能,即信号转导和 DNA 结合活性,广泛参与细胞生长、恶性转化、凋亡等生理功能的调节<sup>[1,2]</sup>。

STAT3 激活介导起始于细胞因子细胞表面受体,当细胞膜上的细胞因子受体与相应的配体结合后,形成同源或异源二聚体,使胞体内 JAK 相互磷酸化,活化后的 JAK 接近 STATs 并使 STATs 的一个羟基酪氨酸磷酸化,从而激活 STATs。活化后的 STATs 与受体分离,形成同二聚体或异二聚体,然后转位至胞核,启动基因转录<sup>[3]</sup>。Justicia 等<sup>[4]</sup>报道大鼠皮质缺血后星形胶质细胞内 STAT3 核转位,从而诱发了胶质细胞在缺血后的各种反应性变化。本实验免疫组化染色结果证实了 STAT3 蛋白在活化前是在胞浆内表达的,而 P-STAT3 在大鼠正常脑组织神经细胞中表达水平较低,随着缺血再灌注时间的延长,阳性细胞数目上升,免疫反应物主要存在于胞核内,且主要分布于星形胶质细胞,其次是神经元细胞,这与 STAT3 活化后形成二聚体或异二聚体,然后转位至胞核,介导基因转录的机制有关。

缺血性脑损伤引起一些细胞因子及生长因子的释放,如 IL-6、TNF- $\alpha$  等。以往研究表明脑缺血的刺激激活了 JAK-STATs 信号通路,在大鼠局灶性脑缺血再灌注皮层的锥体神经元和纹状体的细胞显示 JAK1 高表达,STAT3 核转位明显增加,随后引起小胶质细胞和巨噬细胞大量增生<sup>[4]</sup>。另有研究表明 STAT3 在正常大鼠脑神经元细胞浆中少量表达,大鼠脑皮层缺血不同时间并不能影响 STAT3 蛋白表达水平,而 STAT3 的磷酸化水平逐渐上升<sup>[5]</sup>。至于脑缺血后 STAT3 蛋白的活化及高表达的原因目前尚不太清楚,可能与脑缺血时神经元和胶质细胞快速合成并诱导 IL-6 及 IL-6 受体的表达有关。本实验 Western blot 半定量结果显示,缺血 2 h 和 6 h 再灌注不同时间缺血区 STAT3 被激活,P-STAT3 逐渐上升,但在正常脑组织中表达水平较低,而 STAT3 蛋白表达水平无明显改变。缺血再灌注 0.5 h 时 P-STAT3 水平上升,可能与神经元内 STAT3 和 c-fos、c-jun 等参与即早基因的转录调控有关;缺血再灌注 24 h 时,P-STAT3 水平明显增加,一方面可能与脑缺血时细胞的 ATP 被耗竭,再灌注后 ATP

水平显著升高有关,另一方面,缺血性脑损伤诱导大量反应性胶质细胞、小胶质细胞的增生,随着再灌注时间的延长,细胞因子、生长因子的释放量增加。

### 二、脑缺血再灌注后 TTC 染色面积变化与 STAT3 激活的相关性

TTC 即 2,3,5-三苯基四氮唑,是一种组织厚块的染色方法。正常的脑组织中含有脱氢酶,能与 TTC 发生反应,使正常脑组织呈现红色,受损组织因其线粒体缺乏降解 TTC 的酶而失染呈现白色,使受损组织与正常组织区分开来,TTC 染色被认为是标记脑梗死面积的可靠方法。本实验发现大鼠缺血 2 h 再灌注 24 h 后 TTC 失染区相对面积明显变小,而缺血 6 h 再灌注 24 h 后变化不明显,表明缺血 2 h 时脑组织具有可恢复性。

脑缺血再灌注后脑损伤的同时伴有一系列的细胞信号通路的改变,并引起一些细胞因子及生长因子的释放。有研究表明 STAT3 的核转位可引起 gp130-STAT 信号通路的激活,星形胶质细胞中 STAT3 的活化还与 gp130 的表达密切相关<sup>[6]</sup>。本实验表明缺血再灌注前后 STAT3 激活水平与梗死面积有相关性,提示随着细胞毒性水肿和血管源性水肿的加重,细胞膜某些通道状态改变,随之引起某些细胞信号通路的改变,从而可引起 STAT3 激活水平的变化。而阻断 STAT3 蛋白磷酸化途径对于缺血面积的改变或对脑组织起保护还是损伤作用,还有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Janardhan V, Qureshi AI. Mechanisms of ischemic brain injury[J]. *Curr Cardiol Rep*, 2004, 6(2): 117-123.
- [2] Erdo F, Trapp T, Mies G, et al. Immunohistochemical analysis of protein expression after middle cerebral artery occlusion in mice [J]. *Acta Neuropathol*, 2004, 107(2): 127-136.
- [3] Cattaneo E, Conti L, De FC. Signalling through the JAK-STAT pathway in the developing brain[J]. *Trends Neurosci*, 2000, 22(8): 365-369.
- [4] Justicia C, Gabriel C, Planas AM. Activation of the JAK/STAT pathway following transient focal cerebral ischemia: signaling through JAK1 and STAT3 in astrocytes [J]. *Glia*, 2000, 30(3): 253-270.
- [5] 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.
- [6] 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.

(收稿日期:2009-01-27)

(本文编辑:卢丽玉)