

### 【基础研究】

作者简介:陈惠军(1975-),女,河南沁阳人,硕士,副教授,研究方向:婴幼儿脑损伤的基础与临床。

were enlarged, moderately edematous and unevenly colored; the morphological changes of hippocampal tissues of neonatal rats in the intervention group included neuron enlargement, moderate to severe edema, uneven staining, karyopyknosis, slight proliferation of microglia and interstitial edema. At 6, 48 and 72 hours after modeling, the relative expression of miR-21 and STAT3 mRNA in hippocampal tissues of neonatal rats in the HIE group and intervention group was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ), and the relative expression of miR-21 and STAT3 mRNA in hippocampal tissues of neonatal rats in the intervention group was significantly lower than that in the HIE group ( $P < 0.05$ ). The relative expression of miR-21 and STAT3 mRNA in hippocampal tissues of neonatal rats at 48 hours after modeling was significantly higher than that at 72 hours after modeling in the HIE group and intervention group ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the relative expression of miR-21 and STAT3 mRNA in hippocampal tissues of neonatal rats between the time points of 6 hours and 72 hours after modeling in the HIE group and intervention group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The up-regulation of the expression of STAT3 mRNA and miR-21 in the hippocampal tissues of neonatal HIE rats may play a stress protective role on nerve cells, which can be blocked by JAK/STAT3 signal transduction pathway blocker AG490.

**Key words:** hypoxic-ischemic encephalopathy; hippocampus; Janus kinase; signal transducers and activators of transcription 3; microRNA-21

近年来,对 Janus 激酶/信号传导和转录激活因子(Janus kinase/signal transducers and activators of transcription, JAK/STAT)通路的研究主要集中在肝脏、心脏、肾脏及淋巴系统疾病和肿瘤等,而对其在脑缺血损伤中作用的研究较少<sup>[1]</sup>。研究显示, JAK/STAT 通路在调节脑缺血后细胞因子的反应中具有重要作用, STAT3 可以激活 miR-21 的表达,进而影响细胞存活与发展<sup>[2]</sup>。新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是各种原因引起脑组织缺血缺氧,造成神经细胞凋亡与坏死,导致神经功能低下而成为永久性的损害<sup>[3-4]</sup>。有关 JAK/STAT 通路在缺血性脑损伤中的作用尚存在争议,有学者认为其可以发挥保护神经细胞的作用<sup>[5]</sup>,也有学者认为其可导致神经细胞凋亡<sup>[6]</sup>。因此,探讨 JAK/STAT 通路在 HIE 发病机制中的作用对进一步防治 HIE 具有重要意义。本研究在建立新生大鼠 HIE 模型的基础上,观察阻断 JAK/STAT3 通路对新生大鼠 HIE 发生、发展的影响,为 HIE 的基因治疗提供新的思路。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 7 日龄清洁级新生 Wistar 大鼠 70 只,体质量 11~18 g,雌雄不限,由郑州大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(豫)2007-0001。

**1.2 主要试剂与仪器** STAT3、微小 RNA-21 (microRNA-21, miR-21) (美国 Abcam 公司), JAK/STAT3 信号通路阻断剂 AG490 (美国 Sigma 公司);实时荧光定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪 (美国 Bio-Rad 公司), Eppendorf 移液器 (德国 Eppendorf 公司), DYY-III 型电泳槽 (北京六一仪器厂), SW-CJ-ZFD 超净工作台 (苏州净化设备有限公司), 325 型旋转切片机 (英国 Shandon 公司), Nikon-E400 光学显微镜 (日本尼康公司)。

**1.3 实验分组与处理** 将 70 只新生大鼠随机分为对照组 (10 只)、HIE 组 (30 只) 和干预组 (30 只)。HIE 组和干预组新生大鼠根据文献[7]中的方法制备 HIE 模型:乙醚麻醉新生大鼠,颈部正中切开皮肤,暴露并结扎左颈总动脉 2 h,而后恢复 2 h;然后置于 37℃ 恒温水浴缺氧舱中,输入混合气体 (含体积分数 8% 的氧气和 92% 的氮气), 2 h 后取出新生大鼠,由母鼠喂养。干预组新生大鼠于造模型前 10 min 腹腔注射 JAK/STAT 信号通路阻断剂 AG490  $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。对照组新生大鼠仅行左颈总动脉分离,不做结扎和缺氧处理。

**1.4 组织标本采集** HIE 组和干预组新生大鼠分别于造模后 6、48、72 h 处死,每组每个时间点处死 10 只;对照组新生大鼠于 48 h 时全部处死。大鼠行乙醚麻醉后开胸,经心先后灌注磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 和  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  多聚甲醛,断头,取大脑海马 (CA1 区) 组织。标本分为 2 份,一份置于液氮中保存,待行 PCR 检测;另一份用于组织病理学观察。

**1.5 新生大鼠海马组织病理学观察** 取海马组织,置于  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  多聚甲醛中固定 24 h;常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明;石蜡包埋,切片 (片厚约  $4 \mu\text{m}$ ),脱蜡至水;行苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色,脱水透明,中性树胶封片,光镜下观察大鼠海马组织病理学改变。

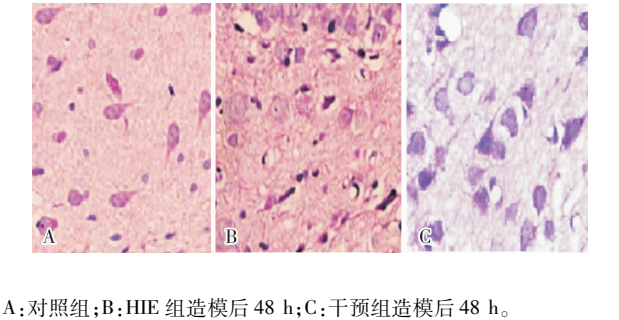
**1.6 实时荧光定量 PCR 检测大鼠海马组织中 miR-21 和 STAT3 mRNA 的表达** 取适量脑组织,利用 TRIzol 提取总 RNA,反转录合成 cDNA。反应体系:RNA  $5 \mu\text{L}$ 、N6 Rnandom Primer  $0.8 \mu\text{L}$ 、上游和下游引物 ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 各  $1 \mu\text{L}$ 、三磷酸脱氧核苷 (deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP)  $0.4 \mu\text{L}$ 、反转录酶  $0.3 \mu\text{L}$ 、RNasin  $0.4 \mu\text{L}$ 、 $5 \times$  缓冲液  $4 \mu\text{L}$ ,补充焦碳酸二乙酯水至  $20 \mu\text{L}$ 。混匀反应液,放入 37℃

水浴中1 h。94 ℃ 3 min 灭活反转录酶。PCR 扩增产物,反应体系:cDNA 模板 5 μL、dNTP (10 mmol · L<sup>-1</sup>) 0.2 μL、上游和下游引物 (10 mmol · L<sup>-1</sup>) 各 1 μL、10 × PCR 缓冲液 2.5 μL、MgCl<sub>2</sub> (50 mmol · L<sup>-1</sup>) 0.7 μL、50 × SYBR Green 0.12 μL、Taq DNA 聚合酶(2 500 kU · L<sup>-1</sup>)0.4 μL,补充双蒸水至 25 μL。反应条件:37 ℃ 2 min,94 ℃ 5 min;94 ℃ 20 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,循环重复 40 次。引物序列由北京奥科生物技术有限公司合成,以 U6 作为 miR-21 内参,β-actin 作为 STAT3 内参。miR-21 引物序列(70 bp):上游为 5'-GAAATGCCTCACAGCTATCGT-3',下游为 5'-CCCTCCACAAAGAGCCACC-3';U6 引物序列(75 bp):上游为 5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3',下游为 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3';STAT3 引物序列(306 bp):上游为 5'-ACAGGTTTCCAGCACGC-3',下游为 5'-CATCGAGAAAGAGTCTACG-3';β-actin 引物序列(197 bp):上游为 5'-CGTGCAGGCATC-CGGCACGC-3',下游为 5'-TGGCATAAGGTGAAC-AAGTACAG-3'。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法<sup>[8]</sup> 分析 miR-21 和 STAT3 的相对表达量。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两两比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

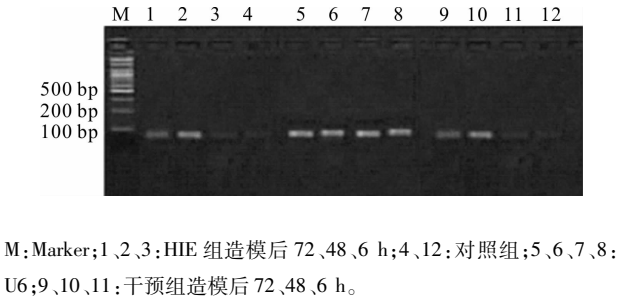
2.1 3 组新生大鼠海马组织病理学改变 结果见图 1。对照组新生大鼠海马组织中神经元、小胶质细胞的大小、形态均正常,未见细胞变性及水肿现象。造模后 48 h,HIE 组新生大鼠海马组织中神经元体积增大,中度水肿,着色不均;干预组新生大鼠海马组织中神经元体积增大,中、重度水肿,着色不均,可见细胞核固缩,并见小胶质细胞轻度增生,间质水肿。



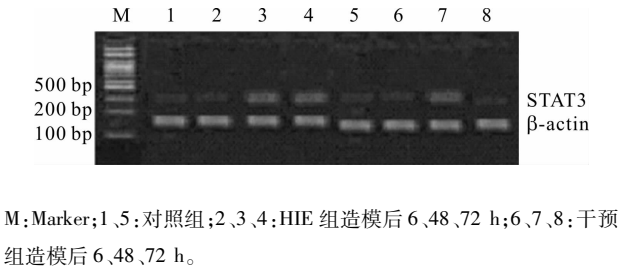
A: 对照组;B: HIE 组造模后 48 h;C: 干预组造模后 48 h。  
图 1 3 组新生大鼠海马组织病理学改变 (HE 染色, ×400)  
Fig.1 Histopathological changes in hippocampal tissues of neonatal rats in the three groups (HE staining, ×400)

2.2 3 组新生大鼠海马组织中 miR-21 和 STAT3 mRNA 相对表达量比较 结果见图 2、图 3 和表 1。

造模后 6、48、72 h,HIE 组和干预组大鼠海马组织中 miR-21、STAT3 mRNA 相对表达量显著高于对照组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05);干预组大鼠海马组织中 miR-21、STAT3 mRNA 相对表达量显著低于 HIE 组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。HIE 组和干预组大鼠造模后 48 h 海马组织中 miR-21、STAT3 mRNA 相对表达量显著高于造模后 6、72 h,差异有统计学意义 (*P* < 0.05);HIE 组和干预组大鼠造模后 6 h 与造模后 72 h 海马组织中 miR-21、STAT3 mRNA 相对表达量比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。



M:Marker;1,2,3:HIE 组造模后 72、48、6 h;4,12:对照组;5,6,7,8:U6;9,10,11:干预组造模后 72、48、6 h。  
图 2 3 组新生大鼠海马组织中 miR-21 的表达  
Fig.2 Expression of miR-21 in hippocampal tissues of neonatal rats in the three groups



M:Marker;1,5:对照组;2,3,4:HIE 组造模后 6、48、72 h;6,7,8:干预组造模后 6、48、72 h。  
图 3 3 组新生大鼠海马组织中 STAT3 mRNA 的表达  
Fig.3 Expression of STAT3 mRNA in hippocampal tissues of neonatal rats in the three groups

表 1 3 组新生大鼠海马组织中 miR-21 及 STAT3 mRNA 表达比较

Tab.1 Comparison of the expression of miR-21 and STAT3 mRNA in hippocampal tissues of neonatal rats among the three groups ( $\bar{x} \pm s$ )			
组别	<i>n</i>	miR-21	STAT3 mRNA
对照组	10	1.01 ± 0.22	1.52 ± 0.31
HIE 组			
造模后 6 h	10	3.87 ± 5.42 <sup>a</sup>	3.67 ± 5.13 <sup>a</sup>
造模后 48 h	10	6.33 ± 2.15 <sup>ac</sup>	5.01 ± 3.26 <sup>ac</sup>
造模后 72 h	10	3.16 ± 3.41 <sup>a</sup>	3.21 ± 0.12 <sup>a</sup>
干预组			
造模后 6 h	10	2.12 ± 2.43 <sup>ab</sup>	2.08 ± 4.12 <sup>ab</sup>
造模后 48 h	10	3.28 ± 4.65 <sup>abc</sup>	3.01 ± 3.26 <sup>abc</sup>
造模后 72 h	10	2.18 ± 4.46 <sup>ab</sup>	1.87 ± 0.12 <sup>ab</sup>

注:与对照组比较<sup>a</sup>*P* < 0.05;与 HIE 组比较<sup>b</sup>*P* < 0.05;与造模后 6、72 h 比较<sup>c</sup>*P* < 0.05。

3 讨论

缺氧缺血性脑损伤是一个复杂的病理生理过程,是造成神经细胞损伤坏死的重要原因<sup>[9-10]</sup>。研究表明,JAK/STAT 信号通路与缺氧缺血性脑损伤密切相关,并影响其发展与转归。STAT3 是 JAK/STAT 信号通路中的关键性基因,在 HIE、肿瘤、脑损伤等疾病的发生、发展中起主导作用<sup>[11]</sup>。miR-21 是重要的癌基因,在多种肿瘤的发生和发展中呈现高表达<sup>[12-13]</sup>。有研究显示,HIE 新生儿血清 miR-21 水平升高<sup>[4]</sup>。采用生物信息学方法对 miR-21 和 STAT3 靶向配对,进行相关性的预测,结果发现二者配对关系密切,STAT3 可以直接激活 miR-21<sup>[14-15]</sup>。

本研究结果显示,对照组新生大鼠海马组织形态学正常,HIE 组和干预组大鼠海马组织出现显著病理学改变,而干预组大鼠海马组织病理学改变较 HIE 组更严重;HIE 组大鼠海马组织中 STAT3 mRNA 相对表达量显著高于对照组,而干预组大鼠海马组织中 STAT3 mRNA 相对表达量显著低于 HIE 组。缺氧缺血后大鼠海马组织中 JAK/STAT3 信号通路被激活,STAT3 被激活后诱导细胞周期调控基因与抗凋亡基因的表达;miR-21 调控细胞增殖,减少细胞凋亡;因此,STAT3 和 miR-21 表达升高可能对脑神经细胞起到一定的保护作用;阻断 JAK/STAT3 信号通路后 STAT3 表达降低,失去对 miR-21 的有效调控,miR-21 也随之降低,此时,受到 miR-21 抑制的靶基因如 PDCD4、PTEN、TIMP3 等表达上调,脑神经细胞受到 PDCD4 等基因的调控,出现变性坏死;因此,阻断 JAK/STAT 信号通路可能会对脑组织造成进一步损害<sup>[16]</sup>。本研究结果与 LIN 等<sup>[5]</sup>实验结果基本一致。

综上所述,脑组织缺氧缺血时 STAT3 和 miR-21 表达上调,其可能对神经细胞起到应激性保护作用,这一作用可以被 JAK/STAT3 信号通路阻断剂 AG490 阻断。激活 JAK/STAT3 信号通路有望成为临床治疗 HIE 的新靶点。

参考文献:

[1] 李虹椿,李霞,马雪涛,等.米诺环素对新生鼠缺氧后脑室周围区域谷氨酸清除的影响[J].中国病理生理杂志,2016,32(2):290-295.

[2] 何畏,方伟蓉,李运曼. JAK/STAT 通路 & 脑缺血损伤研究进展[J]. 药学与临床研究,2015,23(2):164-167.

[3] 王来栓,邹亮燕. 间充质干细胞移植治疗新生儿缺氧缺血性脑病研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志,2018,33(2):81-85.

[4] 陈惠军,杨廷桐. 新生儿缺氧缺血性脑病血清中 miR-21 调控 HIF-1a 表达及临床意义[J]. 中国儿童保健杂志,2015,23(1):32-35.

[5] LIN Y,CAI B,XUE X H,et al. TAT-mediated delivery of neuroglobin attenuates apoptosis induced by oxygen-glucose deprivation via the Jak2/Stat3 pathway in vitro[J]. *Neurol Res*,2015,37(6):531-538.

[6] LIU R,XU N,YI W,et al. Electroacupuncture effects on cortical neurons,as well as Janus kinase 2-signal transducer and activator of transcription 3 signal transduction pathway,in a rat model of cerebral ischemia[J]. *Neural Regen Res*,2012,7(6):457-462.

[7] 孙向峰,侯梅,苑爱云,等. 丰富环境对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠学习记忆、海马区脑源性神经生长因子和突触素蛋白表达的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志,2017,32(4):296-299.

[8] LUO Y,YANG Z,SU L,et al. Non-CSCs nourish CSC sthrough interleukin-17 E-mediated activation of NF-κB and JAK/STAT3 signaling in human hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*,2016,375(2):390-399.

[9] 庞炜,曹帅帅,李树祎,等. 新生儿缺氧缺血脑损伤大鼠模型的制备[J]. 中国比较医学杂志,2016,26(6):61-66.

[10] 石计朋,栗延伟,郭丽娟,等. ω-3 多不饱和脂肪酸对脂多糖所致脑损伤新生大鼠海马组织中氧化应激产物和细胞凋亡的影响[J]. 新乡医学院学报,2018,35(6):455-458.

[11] SUN Y,NADAL-VICENS M,MISONO S,et al. Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms[J]. *Cell*,2001,104(3):365-376.

[12] 万冬,杨廷桐,秦玉凤,等. miRNA-21/PDCD4 环路在卵巢癌组织中的表达[J]. 肿瘤防治研究,2013,40(9):869-872.

[13] 王玉,席乐峰,杨廷桐. C-myc 与肺鳞癌中 miRNA-21 表达的关系[J]. 解剖学杂志,2013,36(4):758-761.

[14] ROZOVSKI U,CALIN G A,SETOYAMA T,et al. Signal tranducer and activator of transcription (STAT)-3 regulates microRNA gene expression in chronic lymphocytic leukemia cells[J]. *Mol Cancer*,2013,50(12):1476-1481.

[15] LI Y,WU R,LIU Z,et al. Enforced expression of microRNA-21 influences the replication of varicella-zoster virus by triggering signal transducer and activator of transcription 3[J]. *Exp Ther Med*,2014,7(5):1291-1296.

[16] 孔令平,刘爱芹,周旋,等. STAT-3 抑制剂 WP1066 增强顺铂对口腔鳞状细胞癌侵袭能力抑制作用的体外研究[J]. 天津医药,2016,44(1):38-42.

( 本文编辑:徐自超 英文编辑:徐自超 )