

. 实验研究 .

CpG-ODN对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用

郑波 陈涛 毛华

【摘要】目的 探讨CpG-ODN对大鼠脑缺血/再灌注(I/R)损伤的保护作用及其机制。**方法** 将54只大鼠随机分为假手术组、脑I/R模型组、CpG-ODN组,每组18只。采用大脑中动脉线栓法构建大鼠脑I/R模型。CpG-ODN组造模前1h腹腔注射CpG-ODN(10 μg/25 g),脑I/R模型组注射等量生理盐水。再灌注12h采用Longa 5分评分法评估神经功能。再灌注24h采用TTC染色测定脑梗死体积,HE染色观察组织结构,TUNEL染色分析细胞凋亡,PCR检测酪氨酸激酶(JAK)、信号转导和转录激活因子(STAT)mRNA表达水平,免疫印迹法分析Caspase3、Caspase7、JAK、p-JAK、STAT和p-STAT蛋白水平。**结果** 与假手术组比较,脑I/R模型组神经功能障碍严重,脑梗死体积显著增大,脑组织发生水肿、坏死等病变;与脑I/R模型组比较,CpG-ODN组明显改善。与假手术组比较,脑I/R模型组脑组织细胞凋亡率和Caspase3、Caspase7蛋白水平明显升高($P<0.05$),脑I/R模型组JAK、STAT mRNA水平和蛋白磷酸化程度显著上调($P<0.05$);与脑I/R模型组比较,CpG-ODN组细胞凋亡率和Caspase3、Caspase7蛋白水平明显降低($P<0.05$),JAK、STAT mRNA和蛋白磷酸化程度均明显下降($P<0.05$)。**结论** CpG-ODN能有效保护大鼠脑I/R损伤,其机制可能与影响JAK、STAT蛋白磷酸化抑制细胞凋亡有关。

【关键词】 脑缺血/再灌注损伤;CpG-ODN;细胞凋亡;JAK;STAT;大鼠

【文章编号】 1009-153X(2018)03-0176-06 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743

Effect of OCpG-ODN on cerebral tissues injured by cerebral ischemia/reperfusion and JAK and STAT expressions in rats

ZHENG Bo, CHEN Tao, MAO Hua. Department of Neurosurgery, Jingzhou Central Hospital, Jingzhou 434100, China

【Abstract】 Objective To explore protective effect of oCpG-ODN on cerebral tissues injured by cerebral ischemia/reperfusion (I/R) and the expressions of Janus kinase (JAK) and signal transduction and activator of transcription (STAT) in rats. **Methods** Brain I/R model was constructed by middle cerebral artery occlusion (MCAO) method. Fifty-four SD rats were randomly divided into three groups of 18 animals each, i.e. sham operation group, brain I/R group, and CpG-oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) treatment group, in which 10 μg/25g CpG-ODN was intraperitoneally injected before the MCAO. Neurological function, cerebral infarction volume and morphological changes in the cerebral tissues were determined. The cells apoptosis and JAK and STAT mRNA levels and JAK, phosphorylated JAK, p-JAK, STAT, p-STAT and Caspase 3 and 7 proteins expressions in the infarct cerebral tissues were detected 24 hours after I/R. **Results** The cerebral dysfunction was significantly more severe and the volumes of the cerebral infarction was significantly bigger in the I/R group than those in CpG-ODN treatment group ($P<0.05$), which were significantly more severe and bigger than those in the sham operation group ($P<0.05$). The cell apoptosis rate, Caspase 3 and 7 proteins levels, the expression levels of mRNA of STA and JAK, and the levels of p-STA and p-JAK protein expressions were significantly higher in I/R group than those in the sham operation group and CpG-ODN treatment group. The levels of p-STA and p-JAK proteins expressions were significantly higher in CpG-ODN treatment group than those in the sham operation group ($P<0.05$). **Conclusion** It is suggested that CpG-ODN can effectively protect injured cerebral tissues after I/R possibly by promoting JAK and STAT protein phosphorylation and inhabiting cell apoptosis.

【Key words】 Cerebral ischemia/reperfusion injury; CpG-oligodeoxynucleotide; Apoptosis; Janus Kinase; Signal transducer and activator of transcription; Neuroprotective effects

脑卒中是严重威胁人们健康和生命安全的重大疾病,发生脑缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)的病死率约为10%,致残率高达50%以上^[1]。研究发现细胞凋亡是脑I/R损伤引起组织细胞死亡的重要

原因之一^[2]。酪氨酸激酶(janus kinase, JAK)/信号转导和转录激活因子(signal transducer and activator of transcription, STAT)通路参与细胞分化、细胞凋亡等过程,其异常激活可诱导细胞凋亡^[3]。研究发现, CpG-寡脱氧核苷酸(CpG-oligodeoxynucleotide, CpG-ODN)能够改善细胞存活,减弱I/R造成的心肌损伤^[4]。因此,本文探讨CpG-ODN对大鼠脑I/R损伤的保护作用及其与JAK/STAT信号通路的关系。

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2018.03.012

作者单位:434100 湖北,荆州市中心医院神经外科(郑波、陈涛、毛华)

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 60只成年雄性健康SD大鼠, SPF级, 体重(210±10)g, 购自上海市医学实验动物中心, 合格证号: SCXK-(沪)2016-0001。随机分为3组: CpG-ODN组[术前1h腹腔注射CpG-ODN 1826 (tIrl-1826, InvivoGen公司), 剂量10 μg/25 g^[5]]、假手术组、脑I/R模型组(腹腔注射等量生理盐水)。

1.2 动物造模 按照文献[6]中大脑中动脉线栓(middle cerebral artery occlusion, MACO)法构建脑I/R模型。模型成功标志: 大鼠清醒后, 出现对侧以前肢为重的偏瘫, 转圈; MRI可见MCAO线栓明显阻断动脉血流, 拔掉栓线则可见血流恢复, 验证脑I/R模型建立的可靠性。假手术组, 不植入脑栓尼龙线, 其余步骤同模型组。本研究选取40只大鼠制备I/R模型, 制备成功36只, 死亡4只, 模型组和CpG-ODN组各18只。其余20只大鼠中, 随机选取18只纳入假手术组。

1.3 神经功能评分 参照参考文献[7]中方法对各组大鼠神经功能进行评分。再灌注12h采用Longa 5分评分法评估神经功能。0分, 无神经功能缺损症状; 1分, 轻微神经功能缺损, 不能完全伸展左侧前爪; 2分, 中度局灶性神经功能缺损, 向左侧转圈; 3分, 重度局灶性神经功能缺损, 向左侧倾倒; 4分, 不能自发行走, 意识水平下降。

1.4 脑组织梗死体积测定 再灌注24h每组随机取6只大鼠颈部脱臼处死, 取脑组织, 置于-20℃冰箱中25min; 然后, 将脑组织切为5片, 采用四氮唑红(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色测定脑梗死体积。将脑组织置于1% TTC溶液中37℃孵育15min。红色为无梗死组织, 白色为梗死组织, ImageProPlus软件检测各切片梗死面积。脑梗死体积=(手术对侧半球体积-手术侧半球未梗死体积)/手术对侧半球体积×100%。

1.5 脑组织形态和细胞凋亡检测 再灌注24h后, 每组随机选取6只大鼠腹腔注射2.5%戊巴比妥钠(40mg/kg)麻醉, 4%多聚甲醛初步固定脑组织后, 取脑组织, 置于4%多聚甲醛溶液中固定24h, 常规石蜡包埋, 切片。HE染色后光学显微镜下观察。采用脱

氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL)法检测细胞凋亡。按照TUNEL法原位检测细胞凋亡试剂盒(Roche)说明书进行操作。在显微镜下随机取5个视野进行拍照, 采用ImageProPlus进行分析。细胞凋亡率=凋亡细胞数量/总细胞数量×100%。

1.6 JAK、STAT mRNA和蛋白表达水平检测 再灌注24h后每组随机取6只大鼠颈部脱臼处死, 迅速取脑组织, 保存于液氮中, 分别提取RNA, 反转试剂盒(Takara)合成cDNA。利用定量PCR仪(Bio-Rad)检测JAK、STAT mRNA表达水平, 具体方法参照文献[8]。采用2^{-ΔΔCT}法对PCR结果进行分析。STAT、JAK及GAPDH引物序列见表1。研磨粉碎大鼠脑组织样品, 加入蛋白裂解缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司), 提取各组脑组织总蛋白, 采用BCA试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)测定各组大鼠脑组织中蛋白总量。以GAPDH蛋白表达水平作为内参, Western blot检测脑组织Caspase3、Caspase7、JAK、p-JAK、STAT和p-STAT蛋白水平, 采用Tanon软件采集图像并进行分析。

1.7 统计学分析 采用SPSS 22.0软件进行分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用t检验, P<0.05表示差异有统

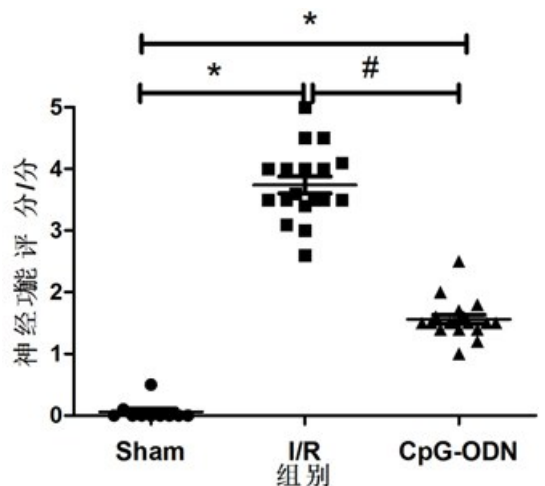


图1 CpG-ODN对大鼠脑缺血/再灌注损伤后神经功能的影响

与假手术组比较, * P<0.05; 与I/R模型组比较, # P<0.05; Sham. 假手术组; I/R. 脑缺血/再灌注损伤模型组;

表1 引物序列

基因	正向引物 5'-3'	反向引物 5'-3'
STAT	GGGACCTGGCAGCAAATG	GGTGTCAAGCAGGATAGAT
JAK	GCGGCAGAAAACAGTCGCT	GGTGGTTGATTGTATTCTGAC
GAPDH	GGGCATCTTGGGCTACAC	GGTCCAGGGTTTCTTACTCC

计学意义。

2 结果

2.1 CpG-ODN 对大鼠脑 I/R 损伤后神经功能和脑梗死体积的影响 与假手术组比较, I/R 模型组大鼠神经功能评分显著增加 ($P < 0.05$); 与 I/R 模型组比较, CpG-ODN 组神经功能评分明显降低 ($P < 0.05$), 见图 1。与假手术组比较, I/R 模型组大鼠脑组织梗死体积显著增大 ($P < 0.05$); 与 I/R 模型组比较, CpG-ODN 组大鼠脑组织梗死体积明显减小 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.2 CpG-ODN 对大鼠 I/R 损伤后脑组织结构的影响 假手术组大鼠脑组织结构正常, 细胞排列紧密规则; I/R 模型组脑组织左侧区域出现坏死, 胞间缝隙增大, 胞浆空透, 出现水肿, 组织中星状细胞增多。与 I/R 模型组比较, CpG-ODN 组脑组织左侧坏死体积明显减小, 细胞缝隙明显变小, 无明显水肿。见图 3。

2.3 CpG-ODN 对大鼠脑 I/R 损伤后脑细胞凋亡的影响 与假手术组比较, I/R 模型组大鼠脑组织细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$)。与 I/R 模型组比较, CpG-ODN 组大鼠脑组织细胞凋亡率显著下降 ($P < 0.05$)。见图 4。

2.4 CpG-ODN 对大鼠脑 I/R 损伤后 Caspase3、Caspase7 蛋白表达的影响 与假手术组比较, I/R 模型组脑组织 Caspase3、Caspase7 蛋白水平明显上调 ($P < 0.05$); 与 I/R 模型组比较, CpG-ODN 组脑组织 Caspase3、Caspase7 蛋白水平均显著下调 ($P < 0.05$)。见图 5。

2.5 CpG-ODN 对大鼠脑 I/R 损伤后 JAK 和 STAT mRNA 水平的影响 与假手术组比较, I/R 模型组 JAK、STAT mRNA 水平明显上调 ($P < 0.05$); 与 I/R 模型组比较, CpG-ODN 组 JAK、STAT mRNA 水平均显著下调 ($P < 0.05$)。见图 6。

2.6 CpG-ODN 对大鼠脑 I/R 损伤后 JAK 和 STAT 蛋白磷酸化水平的影响 I/R 模型组 JAK、STAT 蛋白磷酸化水平明显高于假手术组 ($P < 0.05$); CpG-ODN 组 JAK、STAT 蛋白磷酸化水平显著低于假手术组 ($P < 0.05$)。见图 7。

3 讨论

CpG-ODN 是 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLR) 的配体。TLR 介导的先天性免疫反应和炎症反应在脑 I/R 损伤中发挥重要作用^[9]。研究发现, CpG-ODN 能通过上调白细胞介素 (interleukin,

IL)-10 减轻 I/R 引起的心肌损伤, 通过激活 PI3K/Akt 信号通路减小 I/R 后心肌梗死体积, 增强心肌功能, 提高生存率^[10]。本研究发现脑 I/R 模型组大鼠再灌注 24 h 后, 神经功能评分基本在 3 分以上, 大鼠行走时向右侧不自主倾斜或跌倒, 昏迷, 甚至死亡; CpG-ODN 组大鼠再灌注 24 h 后, 神经功能评分基本在 1~2 分, 部分大鼠右前爪不能完全伸直; 进一步观察发现, 与假手术组比较, 脑 I/R 模型组脑组织梗死体积显著增大, 脑组织发生水肿、坏死等病理变化; 与脑 I/R 模型组比较, CpG-ODN 组大鼠 I/R 后, 脑组织梗死体积明显减小, 脑组织病理损伤明显减轻。这些结果提示 CpG-ODN 对脑 I/R 损伤具有保护作用, 表现在神经功能障碍改善、脑梗死体积减小、病理损伤症状减轻等方面。

细胞凋亡是 I/R 损伤造成脑组织细胞死亡的主要原因, 在脑 I/R 损伤过程中发挥着重要作用^[11]。本研究发现, 与假手术组比较, 脑 I/R 模型组脑组织细胞凋亡显著增加; 与脑 I/R 模型组比较, CpG-ODN 组脑组织细胞凋亡明显降低; 进一步研究发现, I/R 模型组大鼠脑组织 Caspase3、Caspase7 蛋白水平明显高于假手术组; CpG-ODN 组大鼠脑组织 Caspase3、Caspase7 蛋白水平均显著低于 I/R 模型组。这些结构提示 CpG-ODN 能通过抑制细胞凋亡对脑 I/R 损伤的起到保护作用。

JAK/STAT 通路是细胞因子介导的信号传导通路之一, 直接将信号刺激从细胞膜传导至细胞核, 激活靶基因转录, 参与细胞凋亡、分化等多种生理过程。研究表明, JAK/STAT 通路异常激活与 I/R 后肝损伤、肾损伤、肠损伤、心肌损伤等多种疾病相关^[12]。王世玉等^[13]研究发现, 脑 I/R 能激活脑组织 JAK/STAT 通路, 抑制 JAK/STAT 通路则明显减轻 I/R 神经功能损伤。徐海发等^[14]发现重组人粒细胞集落刺激因子能通过抑制 JAK/STAT 通路而减轻 I/R 神经损伤。本研究发现, 与假手术组比较, 脑 I/R 模型组大鼠脑组织 JAK、STAT mRNA 水平显著升高; 与 I/R 模型组比较, CpG-ODN 组大鼠脑组织 JAK、STAT mRNA 水平明显下调。JAK 和 STAT 以无活性、非磷酸化形式存在于正常脑组织中, 脑组织发生损伤时, JAK 和 STAT 发生级联磷酸化反应, 激活相关基因的转录及表达。我们推测 CpG-ODN 通过抑制 JAK 和 STAT 磷酸化, 抑制 I/R 损伤引起的脑组织细胞凋亡, 进而发挥对脑 I/R 损伤的保护作用。

综上所述, CpG-ODN 能够有效保护 I/R 对大鼠脑组织造成的损伤, 其机制可能是通过降低 JAK 和

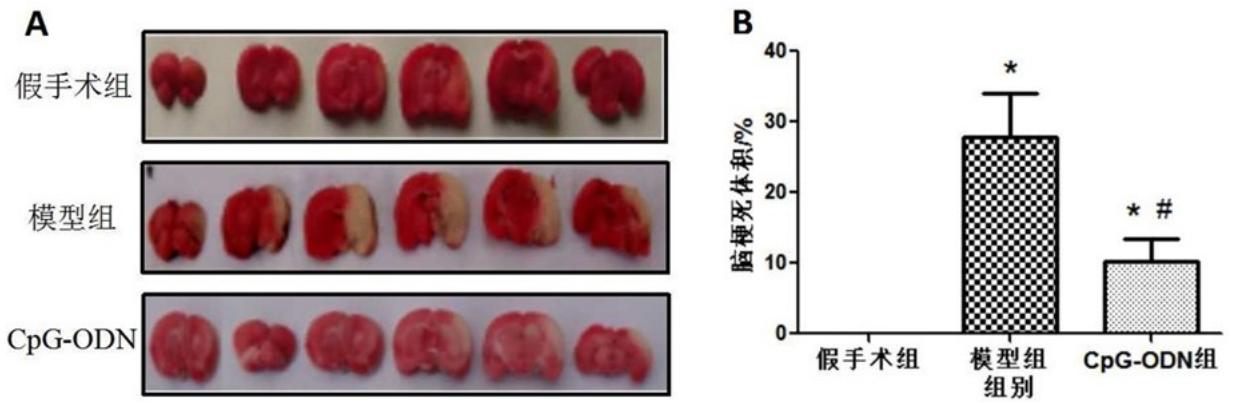


图2 CpG-ODN对大鼠脑缺血/再灌注损伤后脑梗死体积的影响
与假手术组比较,* $P < 0.05$; 与模型组比较,# $P < 0.05$

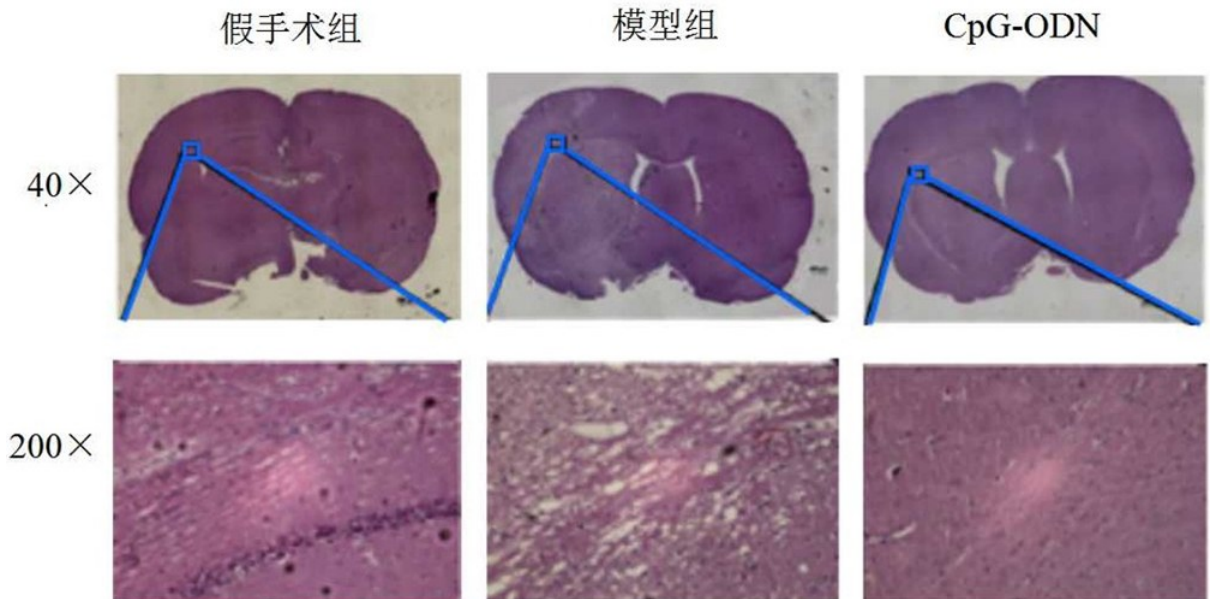


图3 CpG-ODN对大鼠脑缺血/再灌注损伤后脑组织结构的影响(HE染色)

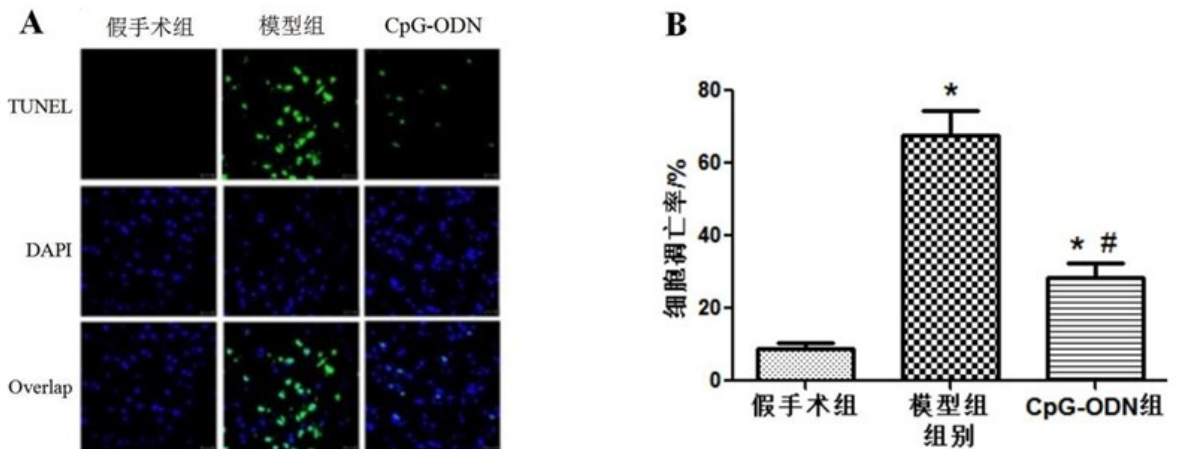


图4 CpG-ODN对大鼠脑缺血/再灌注损伤后脑组织细胞凋亡的影响
与假手术组比较,* $P < 0.05$; 与模型组比较,# $P < 0.05$

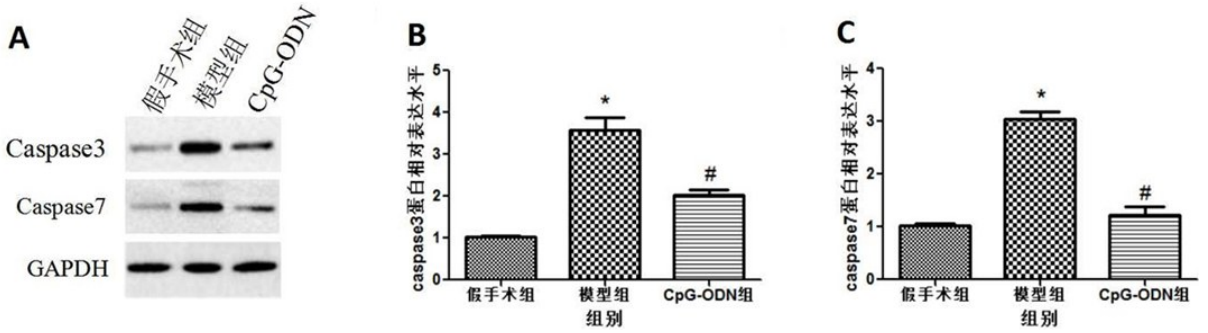


图5 CpG-ODN对大鼠脑缺血/再灌注损伤后脑组织 Caspase3、Caspase7 蛋白水平的影响与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$

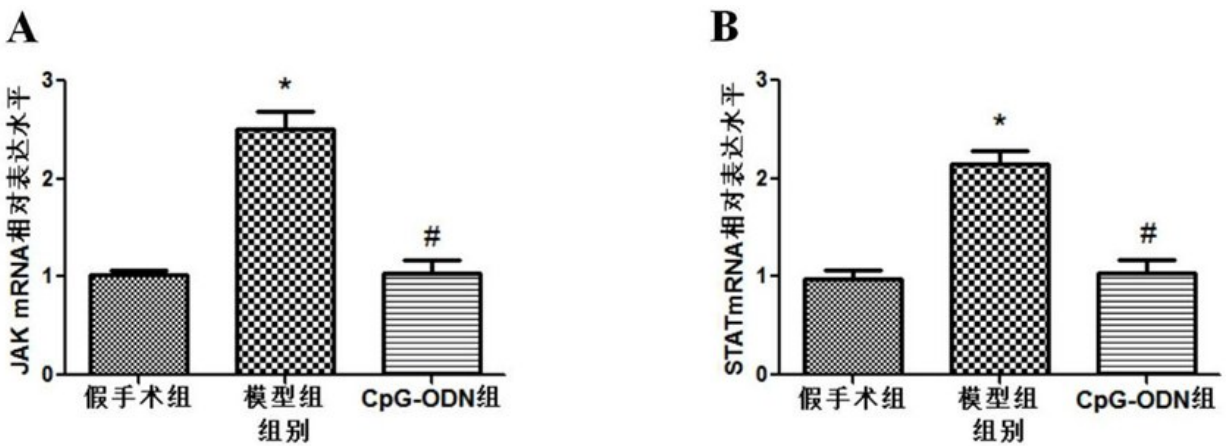


图6 CpG-ODN对大鼠脑缺血/再灌注损伤后脑组织 JAK、STAT mRNA 水平的影响与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$

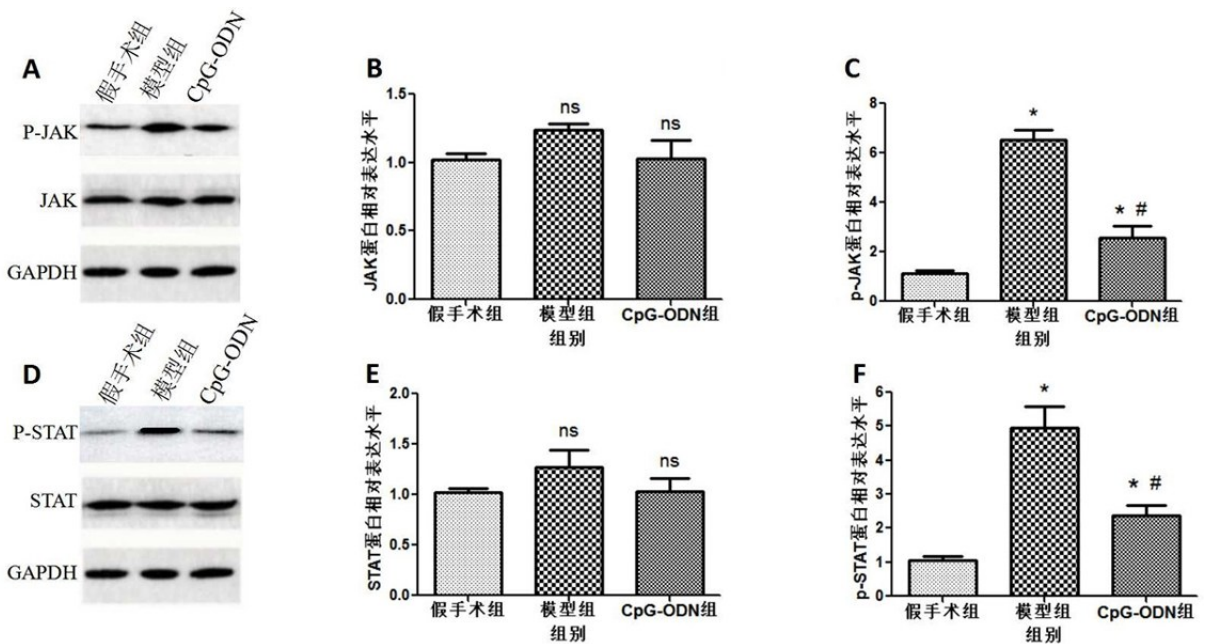


图7 CpG-ODN对大鼠脑缺血/再灌注损伤后脑组织 JAK、p-JAK、STAT、p-STAT 蛋白表达的影响与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$

STAT 磷酸化水平,抑制 JAK/STAT 信号通路,进而抑制细胞凋亡,起到对脑 I/R 损伤的保护作用。

【参考文献】

- [1] 王陇德,王金环,彭斌,等.《中国脑卒中防治报告 2016》概要 [J]. 中国脑血管病杂志, 2017, 14(4): 217-224.
- [2] Gao XJ, Xie GN, Liu L, *et al.* Sesamol attenuates oxidative stress, apoptosis and inflammation in focal cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(1): 841-847.
- [3] La FM, Schenk M, Cosolo A, *et al.* JAK/STAT signalling mediates cell survival in response to tissue stress [J]. *J Cell Sci*, 2016, 143(16): 2907-2019.
- [4] Lim EJ, Park DW, Jeong TW, *et al.* TRAIL is involved in CpG ODN-mediated anti-apoptotic signals [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(4): 1213-1219.
- [5] Cao Z, Ren D, Ha T, *et al.* CpG-ODN, the TLR9 agonist, attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury: involving activation of PI3K/Akt signaling [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1832(1): 96-104.
- [6] 廖小明,孙军,唐永刚,等. PPAR γ 激动剂吡格列酮对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后 JAK2/STAT3 信号转导通路的影响 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2012, 38(10): 593-596.
- [7] 何前松,况时祥,王少峡,等. 丹参多酚酸对脑缺血再灌注损伤糖尿病大鼠神经功能及微管相关蛋白 2 表达的影响 [J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2015, 24(10): 877-881.
- [8] 彭海英,马育华,高伟. 实时荧光定量 RT-PCR 检测 STAT3 mRNA 在食管鳞状细胞癌中的表达 [J]. 山东医学高等专科学校学报, 2015, 37(5): 367-370, 401.
- [9] Zhu L, Ye T, Tang Q, *et al.* Exercise preconditioning regulates the toll-like receptor 4/Nuclear Factor- κ B signaling pathway and reduces cerebral ischemia/reperfusion inflammatory injury: a study in rats [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2016, 25(11): 2770-2779.
- [10] Markowski P, Boehm O, Goelz L, *et al.* Pre-conditioning with synthetic CpG-oligonucleotides attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via IL-10 up-regulation [J]. *Basic Res Cardiol*, 2013, 108(5): 1-16.
- [11] 张雯,宋俊科,杜冠华. 缺血再灌注损伤与细胞凋亡信号转导通路 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(7): 565-569.
- [12] Ottani A, Giuliani D, Neri L, *et al.* NDP- α -MSH attenuates heart and liver responses to myocardial reperfusion via the vagus nerve and JAK/ERK/STAT signaling [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 769: 22-32.
- [13] 王世玉,崔昕龙,薛富善,等. PI3K/Akt 或 JAK/STAT-3 信号通路在肢体缺血联合吗啡后处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用 [J]. 中华麻醉学杂志, 2017, 37(3): 361-365.
- [14] 徐海发,蒋晶晶,马静萍. 重组人粒细胞集落刺激因子对大鼠脑缺血再灌注损伤后 p-JAK2 及 p-STAT3 信号通路的影响 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2014, 21(4): 273-277.

(2017-08-27 收稿, 2017-12-27 修回)

(上接第 175 页)

- [4] AK Chan, HS Birk, JK Yue, *et al.* Bilateral external ventricular drain placement and intraventricular irrigation combined with concomitant serial prone patient positioning: a novel treatment for gravity-dependent layering in bacterial ventriculitis [J]. *Cureus*, 2017, 9(4): 1175.
- [5] Brouwer MC, van de Beek D. Management of bacterial central nervous system infections [J]. *Handb Clin Neurol*, 2017, 140: 349-364.
- [6] Dandurand C, Letourneau L, Chaalala C, *et al.* Pyogenic ventriculitis as clinical presentation of diverticulitis [J]. *Can J Neurol Sci*, 2016, 43(4): 576-577.
- [7] 张晓东,刘守勋,赵海康. 颅脑手术后并发脑室炎的诊断及治疗 [J]. 中国现代医学杂志, 2003, 13(12): 107-108.
- [8] 曹海泉,何永生,黄光富. 导管相关性脑室炎的诊断及治疗研究进展 [J]. 中华神经医学杂志, 2007, 6(12): 1293-1296.
- [9] 李小勇,王忠诚,李银平,等. 脑积水脑室-腹腔分流相关性脑室炎治疗方案的探讨 [J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17: 558-560.
- [10] 赵飞. 利用细菌性脑膜炎鼠模型评价侧脑室给药的治疗效果 [D]. 上海交通大学, 2015.
- [11] 胡学强,王世芳,陆正齐. 尿激酶联合自体血浆治疗实验性兔脑室出血 [J]. 中国脑血管病杂志, 2004, 1(7): 313-316.

(2017-10-09 收稿, 2017-11-18 修回)