

[文章编号] 1007-0893(2024)08-0029-04

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2024.08.008

基于 JAK2/STAT3 通路探究中药地黄对缺血性脑卒中后神经元凋亡的作用及机制

丁西西¹ 朴军颜²

(1. 河南中医药大学第三附属医院, 河南 郑州 450003; 2. 郑州市第六人民医院, 河南 郑州 450000)

[摘要] 目的: 探究中药地黄通过 Janus 激酶 2 (JAK2) / 信号转导及转录激活因子 3 (STAT3) 通路减少缺血性脑卒中后神经元凋亡的作用及相关机制。方法: 选取健康 SD 大鼠 40 只, 并随机均分为假手术组、模型组、地黄组与阳性对照组 4 组。采用改良线栓法构建大鼠中动脉闭塞缺血性脑卒中大鼠模型; 模型建立完成后进行相关给药处理。采用 Morris 水迷宫实验评估大鼠学习记忆能力; 采用 Zea-Longa 评分及氯化三苯基四氮唑 (TTC) 染色评估大鼠脑损伤情况; 采用末端脱氧核苷酸转移酶标记法 (TUNEL) 染色观察大鼠海马组织; 采用 Western blot 检测大鼠海马区凋亡相关蛋白 BAX、抑凋亡相关蛋白 Bcl-2、JAK2/STAT3 通路蛋白 p-JAK2 与 p-STAT3 蛋白表达情况。结果: 与模型组大鼠相比, 地黄组大鼠的穿台次数增加且逃避潜伏期缩短, 同时神经功能缺损评分明显降低 ($P < 0.05$), 脑组织梗死灶面积显著降低 ($P < 0.05$), 海马区神经元凋亡水平明显降低 ($P < 0.05$), 海马组织神经细胞中 Bcl-2 表达水平明显上升, BAX、p-JAK2 与 p-STAT3 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.05$)。结论: 中药地黄可改善缺血性卒中大鼠的认知障碍, 减轻神经元凋亡情况, 其机制可能与调控凋亡相关信号通路 JAK2/STAT3 有关。

[关键词] 缺血性卒中; 地黄; JAK2/STAT3 信号通路; 凋亡**[中图分类号]** R 743.3 **[文献标识码]** A

To Explore the Effect and Mechanism of Rehmannia on Neuronal Apoptosis after Ischemic Stroke Based on JAK2/STAT3 Pathway

DING Xixi¹, PIAO Junyan²

(1. Third Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Henan Zhengzhou 450003; 2. The Sixth People's Hospital of Zhengzhou, Henan Zhengzhou 450000)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of Rehmannia on neuronal apoptosis after ischemic stroke through Janus kinase 2 (JAK2) / signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway and its related mechanism. **Methods** A total of 40 healthy SD rats were selected and randomly divided into sham operation group, model group, Rehmannia group and positive control group. The rat model of ischemic stroke with middle cerebral artery occlusion was established by modified thread thrombus method. After the model was established, relevant drug administration was carried out. Morris water maze test was used to evaluate the learning and memory ability of rats. Zea-longa score and triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining were used to evaluate the brain injury of rats. The hippocampal tissues of rats were observed by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) staining. The expressions of apoptosis-related protein BAX, apoptosis-related protein Bcl-2, JAK2/STAT3 pathway proteins P-JAK2 and P-STAT3 were detected by Western blot. **Results** Compared with the model group rats, the Rehmannia group rats could increase the number of transplatform and shorten the escape latency, and the score of nerve function deficit was significantly decreased ($P < 0.05$), the infarct area of brain tissue was significantly decreased ($P < 0.05$), and the level of neuron apoptosis in hippocampus was significantly decreased ($P < 0.05$). The expression level of BCL-2 was increased and the protein expression levels of BAX, p-JAK2 and p-STAT3 in hippocampus nerve cells were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** The traditional Chinese medicine Rehmannia can improve the cognitive impairment and reduce the neuronal apoptosis in ischemic stroke rats, and its mechanism may be related to the regulation of apoptosis related signaling pathway JAK2/STAT3.

[Keywords] Ischemic stroke; Rehmannia; JAK2/STAT3 signaling pathway; Apoptosis**[收稿日期]** 2024 - 02 - 24**[作者简介]** 丁西西, 女, 主管中药师, 主要研究方向是中药学。

缺血性脑卒中是60岁以上老年人致残和死亡的主要原因, 约占所有脑卒中的85%^[1]。传统的临床治疗包括溶栓治疗和阿司匹林等药物治疗^[2]。中药地黄在治疗缺血性脑卒中作用机制研究方面主要表现在含有地黄的中草药方剂能抑制细胞氧化反应、促进神经元增殖分化、抑制细胞凋亡等作用^[3], 但其发挥神经保护作用的具体机制尚未深入阐明。Janus 激酶2 (Janus kinase 2, JAK2) / 信号转导及转录激活因子3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号通路是一种经典的凋亡反应条件通路, 此通路的激活可导致机体内神经细胞出现异常凋亡情况, 且与缺血性脑卒中紧密相关^[4]。综上所述, 为了探究地黄对缺血性脑卒中神经元凋亡的改善作用, 本研究通过对大鼠进行脑缺血再灌注术建立脑卒中模型, 基于JAK2/STAT3信号通路进行实验。

1 材料

1.1 实验药物

地黄由河南中医药大学第三附属医院中药房提供, 尼莫地平 (山东健康药业有限公司, 国药准字 H37022779)。β-actin、Bcl-2、BAX、p-JAK2 与 p-STAT3 抗体及鼠抗二抗 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 末端脱氧核苷酸转移酶标记法 (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL) 细胞凋亡原位检测试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 批号 Elab Fluor®594); 氯化三苯基四氮唑 (triphenyltetrazolium chloride, TTC) 试剂盒 (青岛捷世康生物科技有限公司, 型号 40T), Western Blot 凝胶试剂盒 (北京索莱宝科技公司)。

1.2 实验动物

健康 SD 雄性大鼠 40 只, 12 周龄, 体质量为 (240 ± 20) g, 购买于广东省医学实验动物中心 (动物许可证号 44002300054700), 采用标准饲料饲养, 控制生存条件为 22 °C 恒温、12 h 明暗交替、充足食物与水。

2 方法

2.1 模型大鼠的制备

SD 大鼠 40 只, 并随机分为假手术组、模型组、地黄组与阳性对照组 4 组, 每组 10 只。正常适应性喂养 7 d 后, 参考经典的 Zea-Longa 法建立模型^[5], 手术麻醉方式为 3% 戊巴比妥钠腹腔注射, 用量 1.0 mL · kg⁻¹。手术麻醉方式为 3% 戊巴比妥钠腹腔注射, 用量 1.0 mL · kg⁻¹。假手术组麻醉仅进行颈前皮肤正中切口, 不进行后续步骤。

2.2 给药干预

根据大鼠体重计算给药量后, 将地黄粉碎后加入生

理盐水煎煮, 冷却后灌胃, 术后 1 d 开始给药, 地黄组术后地黄灌胃给药 32 g · kg⁻¹, 灌胃体积 10 mL · kg⁻¹, 1 次 · d⁻¹, 连续 7 d; 阳性对照组术后灌胃给药尼莫地平溶液 1 mg · kg⁻¹, 灌胃体积 10 mL · kg⁻¹, 1 次 · d⁻¹, 连续 7 d。假手术组与模型组大鼠给予等量 0.9% 氯化钠注射液灌胃, 1 次 · d⁻¹, 连续 7 d。

2.3 大鼠神经功能检测

2.3.1 Morris 水迷宫法 让经过游泳训练的大鼠随机分布于水迷宫起始位置。通过水迷宫软件分析和图像自动采集系统观察并记录大鼠在水池中的游泳轨迹, 将一定时间内大鼠穿越原平台位置的次数视作穿台次数, 捕捉大鼠从入水至找到平台过程花费的时间, 即为逃避潜伏期, 术前进行测试, 在治疗 7 d 后再次进行测试^[6]。

2.3.2 Zea-Longa 评分 通过采用 Zea-Longa 评分法评估各组大鼠治疗 12 h、1 d、3 d、5 d、7 d 后的神经功能, 来评估其认知障碍情况, 评分标准为 0 分: 无神经功能缺损症状; 1 分: 提尾时栓塞动脉对侧前肢不能伸直; 2 分: 行走时向栓塞动脉对侧旋转; 3 分: 行走时向栓塞动脉对侧倾倒; 4 分: 不能自发行走, 意识丧失^[5]。

2.4 取材及处理

待 Zea-Longa 评分结束处死大鼠取海马组织保存。完成运动能力测试后 24 h, 每组大鼠以 6% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 断头处死, 取脑组织与海马组织, 以多聚甲醛固定, 以备检测病理学。

2.5 大鼠脑组织病理变化

取各组大鼠脑组织, 冷冻后放置于脑槽中进行切片, 厚度 2 mm, 将切片放置在恒温孵育箱中与 TTC 染色液共孵育 15 min, 取出后 10% 甲醛固定, 24 h 后在荧光倒置显微镜下进行拍照, 并通过 ImageJ 图像处理软件测量脑梗死体积。正常脑组织为红色, 梗死区脑组织为白色。

2.6 海马组织病理学检测

将各组大鼠海马组织包埋后进行石蜡切片、脱蜡、水合, 待细胞通透后加 TUNEL 反应液, 与底物 DAB 反应显色, 并在荧光倒置显微镜下观察 TUNEL 染色情况, 其中细胞核固缩并呈近褐棕色为染色阳性。

2.7 Western Blot 检测海马组织 Bcl-2、BAX、p-JAK2 与 p-STAT3 蛋白表达水平

取出部分大鼠海马组织, 提取总蛋白。将蛋白样本进行上样、电泳及转膜步骤。转膜结束后用磷酸盐缓冲生理盐水 (tris-buffered saline with tween 20, TBST) 清洗 3 次, 随后加入含有 BAX (1:1000)、Bcl-2 (1:1000)、p-JAK2 (1:1000)、p-STAT3 (1:1000) 及 β-actin (1:500) 一抗的封闭袋中 4 °C 封闭 8 h。TBST 清洗 3 次后加入二抗封闭 1 h, 洗膜后显影拍照。

2.8 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行数据处理，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 *t* 检验，计数资料用百分比表示，采用 χ^2 检验， $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。通过 ImageJ 等分析软件对图片进行分析， $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠学习与记忆能力情况比较

与假手术组相比，模型组大鼠逃避潜伏期较长，穿台次数较少，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)，提示脑缺血再灌注模型建立成功；与模型组相比，地黄组与阳性对照组大鼠逃避潜伏期明显缩短，穿台次数明显增加，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)，见表 1。

表 1 各组大鼠学习与记忆能力情况比较 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	造模前		干预后	
	逃避潜伏期 /s	穿台次数 /次	逃避潜伏期 /s	穿台次数 /次
假手术组	24.23 ± 1.78	11.35 ± 1.14	23.27 ± 2.53	12.73 ± 1.25
模型组	23.17 ± 2.10	13.07 ± 1.64	40.32 ± 3.66 ^a	6.53 ± 0.45 ^a
地黄组	24.46 ± 2.38	12.83 ± 0.86	30.10 ± 3.18 ^b	10.23 ± 1.36 ^b
阳性对照组	25.20 ± 3.05	12.54 ± 0.86	28.15 ± 2.67 ^b	10.46 ± 2.01 ^b

注：与假手术组同时段比较，^a $P < 0.05$ ；与模型组同时段比较，^b $P < 0.05$ 。

3.2 各组大鼠不同时间点 Zea-Longa 评分比较

与假手术组相比，各时间点模型组大鼠 Zea-Longa 评分显著升高，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)；与模型组相比，各时间点地黄组与阳性对照组大鼠 Zea-Longa 评分显著降低，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)，见表 2。

表 2 各组大鼠不同时间点 Zea-Longa 评分比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	Zea-Longa 评分				
	治疗 12 h	治疗 1 d	治疗 3 d	治疗 5 d	治疗 7 d
假手术组	0.73 ± 0.17	0.65 ± 0.24	0.68 ± 0.25	0.75 ± 0.11	0.54 ± 0.08
模型组	2.36 ± 0.23 ^c	2.78 ± 0.29 ^c	3.01 ± 0.37 ^c	3.21 ± 0.45 ^c	3.34 ± 0.50 ^c
地黄组	1.83 ± 0.30 ^d	1.77 ± 0.24 ^d	2.03 ± 0.22 ^d	1.79 ± 0.37 ^d	1.52 ± 0.21 ^d
阳性对照组	1.78 ± 0.24 ^d	1.81 ± 0.22 ^d	1.50 ± 0.25 ^d	1.31 ± 0.23 ^d	1.24 ± 0.38 ^d

注：与假手术组同时段比较，^c $P < 0.05$ ；与模型组同时段比较，^d $P < 0.05$ 。

3.3 TTC 染色检测各组大鼠脑组织梗死情况

TTC 病理染色结果显示，与假手术组相比，模型组大鼠脑组织白色梗死面积显著增加；与模型组相比，地黄组与阳性对照组大鼠脑组织梗死面积显著降低，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)，见封三图 1。

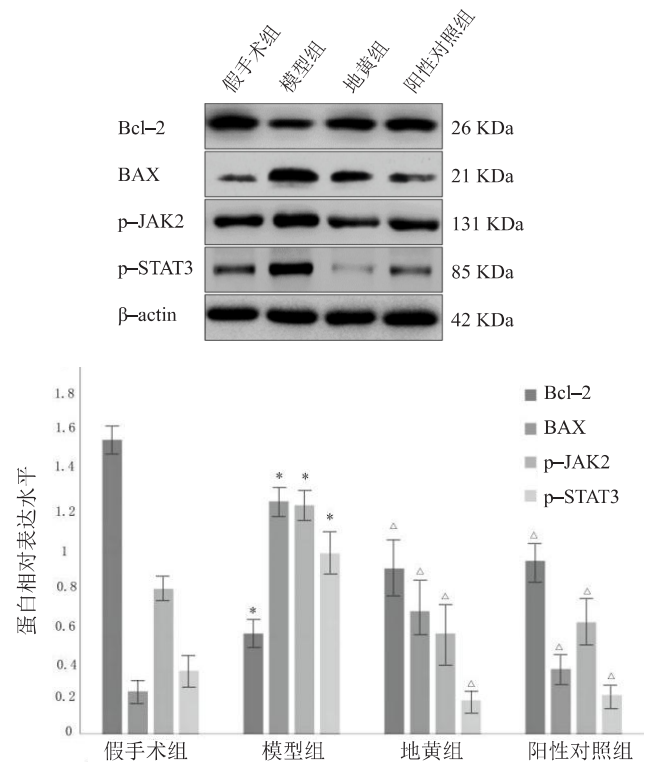
3.4 TUNEL 染色检测各组大鼠脑组织凋亡水平

TUNEL 病理染色结果显示，与假手术组相比，模型组大鼠海马区神经元数量显著降低，神经元凋亡水平显

著增加；与模型组相比，地黄组与阳性对照组大鼠海马区神经元数量明显增加，神经元凋亡水平明显降低，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)，见封三图 2。

3.5 各组海马组织 Bcl-2、BAX、p-JAK2 与 p-STAT3 蛋白表达水平比较

Western Blot 结果显示，与假手术组相比，模型组大鼠海马组织神经细胞中 Bcl-2 表达水平明显降低，BAX、p-JAK2 与 p-STAT3 蛋白表达水平显著升高；与模型组大鼠相比，地黄组与阳性对照组大鼠海马组织神经细胞中 Bcl-2 表达水平明显上升，BAX、p-JAK2 与 p-STAT3 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.05$)，见图 3。



注：与假手术组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，[△] $P < 0.05$ 。

图 3 各组海马组织 Bcl-2、BAX、p-JAK2 与 p-STAT3 蛋白表达电泳图

4 讨论

脑卒中是一种常见的疾病，是影响我国中老年人群健康的重要疾病，疾病分型中以缺血性脑卒中最为常见^[7]。《中国脑卒中防治报告 2020》中提示，脑卒中危险因素流行趋势明显，我国脑卒中疾病负担有增长的态势，虽然发病率略微下降，但患病率仍处于上升阶段^[8]。近些年传统中药在缺血性脑卒中的治疗中发挥了一定的优势，为此，本研究通过探究中药地黄在缺血性脑卒中的作用并探究其相关机制。本研究通过 Zea-Longa 改良线栓法进行了缺血性脑卒中模型大鼠的制备，实验结果表明，模型组大鼠脑组织出现较为严重的梗死，提示术后认知功能障碍大鼠模型制备成功。

中药地黄是为玄参科植物地黄的干燥块根，大量临床研究证据证明地黄类方药具有抑制氧化应激反应、抗衰老、抑制细胞凋亡的作用^[9]，在治疗缺血性脑卒中方面具有独特的优势。有研究表明，对缺血性脑卒中患者给予地黄进行辅助治疗，能够改善神经营养水平，稳定斑块^[10]。另一项研究显示，给予地黄能够显著改善缺血性脑卒中患者的神经功能障碍情况^[11]。缺血性脑卒中往往会造成患者的认知功能障碍，常常表现为在生活与学习中的功能缺失，研究表明，当缺血性脑卒中患者大脑中动脉发生闭塞，其会发生不同程度的认知障碍。在本研究中，给予地黄治疗后，缺血性脑卒中模型大鼠的前爪伸展情况良好，肢体偏瘫情况得到了改善，行走倾斜或意识丧失情况减少。水迷宫试验证明地黄干预后能够使大鼠的逃避潜伏期缩短，穿台次数增加，表明其学习与记忆能力得到了一定的恢复。

JAK2是在脑组织中高表达的Janus激酶家族成员^[12]，STAT3为在中枢神经系统中高表达的STATs蛋白家族成员^[13]。研究显示，JAK2/STAT3信号通路是介导脑缺血后脑组织细胞损伤、调节细胞因子反应的关键通路，参与调控脑细胞的凋亡进程^[14]。在本研究中，缺血性脑卒中大鼠海马区p-JAK2与p-STAT3蛋白表达水平显著升高，提示JAK2/STAT3信号通路激活，同时下游凋亡相关蛋白BAX表达量显著升高，抑凋亡蛋白Bcl-2表达量显著降低，提示海马区凋亡水平上升。大量研究表明，在凋亡发生发展过程中，BAX表达明显增加^[15]，而Bcl-2已被证实在凋亡途径中发挥抑制作用，其主要作用是抑制细胞色素C从线粒体释放，而细胞色素C是细胞凋亡形成的重要因素^[16]。TUNEL染色结果显示缺血性脑卒中大鼠海马区神经元细胞排列紊乱，细胞核出现固缩状态，出现明显凋亡症状，证实了缺血性脑卒中大鼠神经元凋亡水平增加这一现象。当给予地黄后，大鼠海马区神经元细胞凋亡情况得到了显著改善，BAX与Bcl-2的表达同样证明了地黄能够改善神经元凋亡情况，同时JAK2/STAT3信号通路中的磷酸化蛋白p-JAK2与p-STAT3蛋白表达水平显著降低，提示地黄的抑凋亡作用可能是通过阻滞JAK2/STAT3信号通路而产生的。

综上所述，本研究通过建立缺血性脑卒中大鼠模型，并应用中药地黄改善其海马区神经细胞的凋亡进程，从而发挥改善大鼠海马组织损伤后的认知功能障碍情况，其机制可能与调控凋亡相关信号通路JAK2/STAT3有关。

[参考文献]

- [1] RABINSTEIN A A. Update on Treatment of Acute Ischemic Stroke [J]. *Continuum (Minneap Minn)*, 2020, 26 (2): 268-286.
- [2] HERPICH F, RINCON F. Management of Acute Ischemic Stroke [J]. *Crit Care Med*, 2020, 48 (11): 1654-1663.
- [3] 魏智慧, 刘飞祥, 潘小龙, 等. 地黄类方药联合间充质干细胞治疗缺血性脑卒中的作用机制 [J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27 (19): 3070-3076.
- [4] LI Q, CHENG Y, ZHANG S, et al. TRPV4-induced Müller cell gliosis and TNF- α elevation-mediated retinal ganglion cell apoptosis in glaucomatous rats via JAK2/STAT3/NF- κ B pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18 (1): 271.
- [5] LI Y, TAN L, YANG C, et al. Distinctions between the Koizumi and Zea Longa methods for middle cerebral artery occlusion (MCAO) model: a systematic review and meta-analysis of rodent data [J]. *Sci Rep*, 2023, 13 (1): 10247.
- [6] VORHEES C V, WILLIAMS M T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1 (2): 848-858.
- [7] 刘锐, 朱武生, 刘新峰. 中国缺血性卒中血管内治疗的成就与挑战 [J]. *国际脑血管病杂志*, 2021, 29 (11): 801-804.
- [8] 王陇德, 彭斌, 张鸿祺, 等. 《中国脑卒中防治报告 2020》概要 [J]. *中国脑血管病杂志*, 2022, 19 (2): 136-144.
- [9] 姬令山, 秦合伟, 王改凤, 等. 地黄饮子通过调控 miR-34a-5p 影响细胞凋亡及炎症反应治疗阿尔茨海默病的机制 [J]. *北京中医药大学学报*, 2022, 45 (1): 53-61.
- [10] 刘泉宏, 高俊丽, 郭学斌, 等. 六味地黄汤合八珍汤配合康复训练治疗缺血性脑卒中恢复期疗效观察 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2022, 31 (16): 2273-2276.
- [11] 孙羿帼, 顾超, 马静毅, 等. 地黄益智方治疗卒中后认知障碍非痴呆肾精亏虚证的临床研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 2022, 45 (7): 663-669.
- [12] YANG N N, YANG J W, YE Y, et al. Electroacupuncture ameliorates intestinal inflammation by activating α 7nAChR-mediated JAK2/STAT3 signaling pathway in postoperative ileus [J]. *Theranostics*, 2021, 11 (9): 4078-4089.
- [13] CHEN X M, YU Y H, WANG L, et al. Effect of the JAK2/STAT3 signaling pathway on nerve cell apoptosis in rats with white matter injury [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23 (1): 321-327.
- [14] ZENG J, ZHAO Y L, DENG B W, et al. Role of JAK2/STAT3 signaling pathway in microglia activation after hypoxic-ischemic brain damage [J]. *Zhongguo Gu Shang*, 2020, 33 (2): 190-194.
- [15] 肖瑶, 任吉祥, 冯丽娜, 等. 基于 p63 MAPK 探究抵当汤对急性出血性脑卒中大鼠凋亡相关基因 Bax/Bcl-2/Caspase3 表达的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41 (11): 2372-2376.
- [16] 郭娜娜, 薛伟, 井冬青, 等. 银杏叶提取物 EGb761 通过凋亡和细胞色素 c 信号通路减轻大鼠脑缺血 - 再灌注损伤 [J]. *南开大学学报 (自然科学版)*, 2022, 55 (2): 7-12.