

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)24-0062-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.24.014



依达拉奉调控 JAK2 / STAT3 信号通路对氧化应激损伤 HT22 细胞的影响*

苏玉珠, 刘嘉欣[△]

(广州中医药大学第一附属医院·广东省中医临床研究院, 广东 广州 510405)

摘要:目的 探讨依达拉奉(EDA)对氧化应激损伤小鼠海马神经细胞 HT22 的影响。方法 以无糖培养基, 于 37℃, 1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂ 条件下培养 HT22 细胞 8 h, 弃无糖培养基, 加入(含药)完全培养基, 在正常氧环境下复氧 6 h, 即得氧化应激损伤细胞模型。实验分为模型组(完全培养基)、EDA 组(含 1 mmol/L EDA 的完全培养基), 并设对照(细胞持续在正常气体条件下培养)。采用 CCK-8 法检测细胞存活情况并计算细胞存活率, 检测细胞中乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)水平, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况并计算凋亡率, 采用 Western blot 法检测 Janus 激酶 2(JAK2)、信号传导和转录激活因子 3(STAT)、磷酸化 Janus 激酶 2(p-JAK2)、磷酸化信号传导和转录激活因子 3(p-STAT3)蛋白表达水平。结果 与模型组比较, EDA 组细胞存活率显著升高, 细胞凋亡率显著降低, LDH 及 MDA 水平显著降低($P < 0.01$); SOD 水平显著升高, p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 蛋白表达比值均显著降低($P < 0.01$)。结论 EDA 对氧糖剥夺再灌注诱导的 HT22 细胞氧化应激损伤有明显的防护作用, 其作用机制可能与抑制 JAK2/STAT3 信号通路有关。

关键词:依达拉奉; 氧糖剥夺再灌注; HT22 细胞; 细胞损伤; 氧化应激; JAK2/STAT3 信号通路

Effect of Edaravone on Oxidative Stress Injury in HT22 Cells Injury by Regulating JAK2 / STAT3 Signaling Pathway

SU Yuzhu, LIU Jiaxin

(The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine · Guangdong Clinical Research Academy of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China 510405)

Abstract: Objective To investigate the effect of edaravone (EDA) on the oxidative stress injury in HT22 mouse hippocampal neurons. **Methods** HT22 cells were cultured in sugar-free medium at 37 °C, 1% O₂, 5% CO₂, and 94% N₂ for 8 h, the above medium was then discarded and a complete medium containing the drug was added, and HT22 cells were reoxygenated in a normal

*基金项目: 广东省中医药局科研项目[20221152]。

第一作者: 苏玉珠, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为临床药学, (电子信箱)499482701@qq.com。

[△]通信作者: 刘嘉欣, 女, 大学本科, 主管中医师, 研究方向为临床药学, (电子信箱)26828070@qq.com。

3.4 方法评价

综上所述, 本研究中建立了人参叶配方颗粒的 HPLC 指纹图谱, 该方法专属性强、重复性好, 并筛选出山柰酚-3-O-槐糖苷为制剂的关键性成分, 该研究可为其质量控制及综合评价提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020:9.
- [2] 侯万超, 李赛男, 郭力菲, 等. 利用液质联用技术分析人参叶中化学成分[J]. 北方园艺, 2018(4):145-151.
- [3] 纪瑞锋, 袁媛, 刘娟. 人参叶与人参化学及药理活性差异分析[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(5):2269-2272.
- [4] 张慧娥, 杜连云, 初孟瑶, 等. 人参叶通过抑制细胞活性氧的积累延缓皮肤衰老[J]. 食品工业科技, 2024, 45(3):328-337.
- [5] 姜波, 李云涛, 郭建敏, 等. 人参叶葡萄籽胶囊抗氧化活

性研究[J]. 食品工业, 2023, 44(6):77-79.

- [6] 韦晓晨, 陈婷, 孙加节, 等. 人参叶多糖对 1~28 日龄粤黄鸡免疫性能的影响[J]. 动物营养学报, 2019, 31(5):2330-2339.
- [7] 丁奇, 冯斯文, 许功灏, 等. 人参茎叶总皂苷对急性肺损伤小鼠肠道菌群和短链脂肪酸代谢的影响[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(5):1319-1329.
- [8] 成之福, 李维娜, 王毅华. 人参叶的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国现代中药, 2007(6):22-24.
- [9] 梁晓宁, 袁颖, 窦德强. 石柱和抚松产人参叶指纹图谱分析[J]. 天津中医药大学学报, 2017, 36(3):219-222.
- [10] 田来. 中药配方颗粒临床应用研究及思考[J]. 品牌与标准化, 2022(5):96-98.
- [11] 黄凯伟, 任应宗, 张辉, 等. 化橘红(柚)饮片、标准汤剂和配方颗粒相关性研究[J]. 中国药业, 2023, 32(17):57-62.

(收稿日期: 2024-02-21; 修回日期: 2024-10-19)

oxygen environment for 6 h to construct an oxidative stress injury cell model. HT22 cells were divided into the model group (complete medium), the EDA group (complete medium containing 1 mmol / L EDA), and the control group (continuously cultured under normal gas condition). The CCK - 8 method was used to detect cell survival, and the cell survival rate was calculated; the lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) levels in cells were detected; the flow cytometry was used to detect cell apoptosis, and the apoptosis rate was calculated; the Western blot was used to detect the expression levels of Janus kinase 2 (JAK2), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), phosphorylated - Janus kinase 2 (p - JAK2), and phosphorylated - signal transducer and activator of transcription 3 (p - STAT3). **Results** Compared with those in the model group, the cell survival rate significantly increased, cell apoptosis rate significantly decreased, LDH and MDA levels significantly decreased ($P < 0.01$), SOD level significantly increased, p - JAK2 / JAK2 and p - STAT3 / STAT3 significantly decreased in the EDA group ($P < 0.01$). **Conclusion** EDA has a obvious protective effect on the oxidative stress injury induced by oxygen - glucose deprivation / reperfusion in HT22 cells, and its mechanism may be related to the inhibition of the JAK2 / STAT3 signaling pathway.

Key words: edaravone; oxygen - glucose deprivation / reperfusion; HT22 cell; cell injury; oxidative stress; JAK2 / STAT3 signaling pathway

脑卒中为急性脑血管疾病,属脑部血管或供应脑的颈动脉病变导致的脑局灶性血液循环障碍疾病^[1]。我国缺血性脑卒中的发病人数占脑卒中发病总人数的60%~80%,氧化应激反应是脑缺血再灌注损伤的重要原因^[2]。依达拉奉(EDA)为强效自由基清除剂,可通过抑制脂质过氧化反应,从而抑制脑细胞的氧化损伤^[3]。关于EDA如何调控Janus激酶2(JAK2)/信号传导和转录激活因子3(STAT3)改善脑缺血再灌注损伤的报道较少。为此,本研究中探讨了EDA对氧糖剥夺再灌注诱导的小鼠海马神经细胞HT22氧化应激损伤的防护作用及其作用机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

仪器:SW - CJ型超净台(苏州净化设备有限公司);AE2000型倒置相差显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司);GenSpeed 416型低速离心机(美国基因有技术公司);LJ - NC600L型凝胶成像系统(美国Bio - Rad公司);SuPerMax 3000FA型多功能酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司);RG - 5000T型紫外可见近红外分光光度计(中天睿光<天津>科技公司);Aria II型流式细胞仪(美国BD公司)。

试剂:EDA(成都普菲德生物科技有限公司,批号为20230315,纯度>98%);磷酸盐缓冲液(PBS,批号为8235181),胰酶(批号为23147851);胎牛血清(批号为8239712),DMEM高糖培养基(批号为828414),均购于美国Gibco公司;CCK - 8试剂盒(日本同仁化学研究所,批号为GB1120);PCR检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号为m981691);JAK2(批号为2315654),STAT3(批号为2395147),p - JAK2(批号为2361312),p - JAK2(批号为2369851),均购于江苏亲科生物研究中心有限公司;抗 β - actin抗体(美国Sigma公司,批号为8237461);乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物

歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA),均购自上海碧云天生物技术有限公司(批号分别为20220867,20220913,20226134)。

细胞:HT22细胞(美国菌种保藏中心,批号为20230123)。

1.2 方法

模型复制及分组:将对数生长期的HT22细胞原培养液更换为无糖培养基,于37℃,1%O₂、5%CO₂、94%N₂环境下培养8h,弃去无糖培养基,加入(含药)完全培养基,在正常氧环境下复氧6h,即得氧化应激损伤细胞模型。实验分为模型组(完全培养基)、EDA组(含1mmol/L EDA的完全培养基),并设对照组(细胞持续在正常气体条件下培养)。

细胞活力:采用CCK - 8法。按 8×10^4 个/mL细胞密度接种于96孔板,按“模型复制及分组”项下方法操作。处理完成后取出96孔板,弃去培养基吸掉,向每孔中加入110 μ L含10% CCK - 8的完全培养基,37℃下孵育2h,采用酶标仪在450nm波长处检测各孔的吸光度值(OD)。每组设置3个复孔并设置空白调零孔。

细胞凋亡:采用流式细胞术。按“模型复制及分组”项下方法操作。胰酶消化后,收集 5×10^5 个细胞,加入500 μ L的Binding Buffer重悬,加入5 μ L Annexin V - FITC,混匀,加入5 μ L Propidium Iodide,混匀,室温避光反应15min,采用流式细胞仪(激发波长488nm,发射波长530nm)检测细胞凋亡情况,并计算凋亡率。

LDH、SOD、MDA水平检测:按每 8×10^4 个/mL细胞密度接种6mL至60mm培养皿中,传代培养,按“模型复制及分组”项下方法操作。处理完成后,收集细胞及上清液,按试剂盒说明书方法测定LDH、SOD活性及MDA含量。

JAK2、STAT3蛋白表达:采用Western blot法。按“模型复制及分组”项下方法操作。弃去培养基,将培养皿

转移至冰上,提取细胞总蛋白,按BCA法测定蛋白含量,加入适量的上样缓冲液,变性时间为10 min。每孔上20 μ L的蛋白样品,聚偏氟乙烯转膜,以5%牛血清白蛋白溶液封闭2 h,加入JAK2抗体、STAT3抗体(1:1 000, V/V),4 $^{\circ}$ C下孵育12~16 h, TBST洗涤3次;将辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(1:3 000, V/V)于室温下孵育1 h, TBST洗涤3次。曝光显影条带,收集结果,并采用Quantity One软件进行灰度扫描及图像分析。

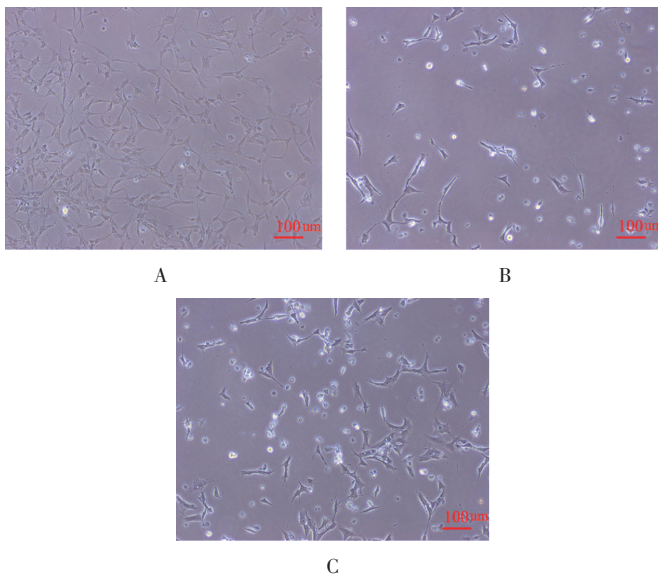
1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,多组间比较行单因素方差分析,组间比较行LSD-t检验。检验水准 $\alpha = 0.05, P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞活力

与对照组比较,模型组细胞活力显著减弱($P < 0.01$);与模型组比较,EDA组细胞活力显著增强($P < 0.01$)。详见图1、表1。



A. 对照组 B. 模型组 C. EDA组

图1 细胞形态

A. Control group B. Model group C. EDA group

Fig. 1 Cell morphology

表1 各组细胞活力比较($\bar{X} \pm s, n = 3$)

Tab. 1 Comparison of cell viability among different groups ($\bar{X} \pm s, n = 3$)

组别	OD值	细胞存活率(%)
对照组	1.34 \pm 0.04	100.00
模型组	0.76 \pm 0.05*	56.72*
EDA组	0.98 \pm 0.06#	73.13#

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.01$ 。表2、表3同。

Note: Compared with those in the control group,* $P < 0.01$. Compared with those in the model group,# $P < 0.01$ (for Tab. 1 - 3).

2.2 细胞LDH、SOD及MDA水平

与对照组比较,模型组细胞的LDH和MDA水平均显著升高,SOD水平显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,EDA组细胞的LDH和MDA水平均显著降低,SOD水平显著升高($P < 0.01$)。详见表2。

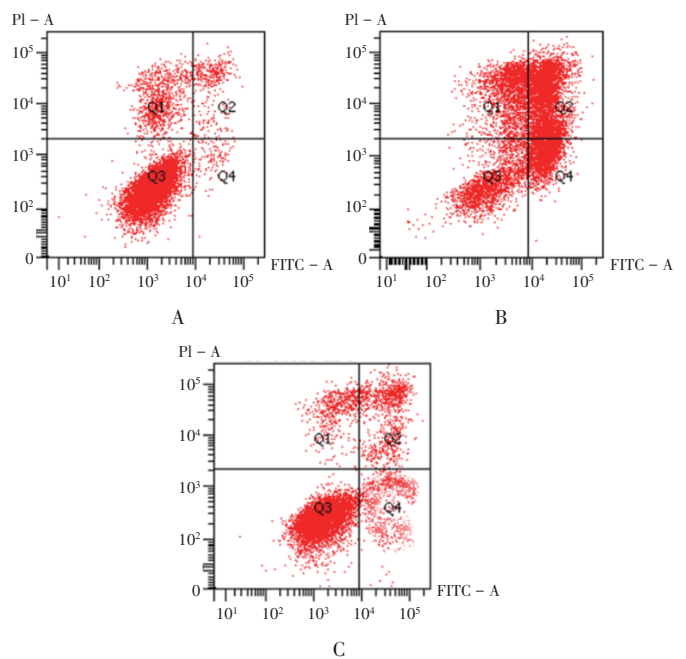
表2 各组细胞LDH、SOD、MDA水平比较($\bar{X} \pm s, n = 3$)

Tab. 2 Comparison of LDH, SOD and MDA levels among different groups ($\bar{X} \pm s, n = 3$)

组别	LDH(U/L)	SOD(U/mL)	MDA(mol/L)
对照组	202.98 \pm 7.87	912.64 \pm 13.47	0.58 \pm 0.12
模型组	320.33 \pm 9.25*	587.25 \pm 15.69*	3.18 \pm 0.42*
EDA组	270.47 \pm 8.87#	783.65 \pm 13.39#	1.91 \pm 0.27#

2.3 细胞凋亡情况

与对照组[(6.89 \pm 0.62)%]比较,模型组细胞凋亡率[(45.78 \pm 0.81)%]显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,EDA组细胞凋亡率[(23.56 \pm 0.77)%]显著降低($P < 0.01$)。详见图2。



A. 对照组 B. 模型组 C. EDA组

图2 流式细胞凋亡图

A. Control group B. Model group C. EDA group

Fig. 2 Results of flow cytometry detection

2.4 细胞JAK2、STAT3、p-JAK2及p-STAT3蛋白表达水平

与对照组比较,模型组细胞p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3蛋白表达比值显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,EDA组细胞p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3蛋白表达比值显著降低($P < 0.01$)。详见图3、表3。



图3 蛋白电泳图

Fig. 3 Protein electropherograms

表3 各组细胞JAK2/STAT3信号通路蛋白表达比较($\bar{X} \pm s, n = 3$)

Tab. 3 Comparison of JAK2 / STAT3 signaling pathway - related protein expression among different groups ($\bar{X} \pm s, n = 3$)

组别	p - JAK2 / JAK2	p - STAT3 / STAT3
对照组	0.21 ± 0.02	0.14 ± 0.03
模型组	0.54 ± 0.03*	0.48 ± 0.05*
EDA组	0.35 ± 0.02#	0.27 ± 0.03#

3 讨论

缺血性脑卒中可直接损伤脑组织,导致局部脑组织血液循环发生障碍^[4]。患者预后常伴有语言和运动等神经功能损伤症状,严重影响其生活质量^[5]。缺血再灌注损伤的病理机制复杂,目前多认为氧化应激发挥着重要作用^[6]。因此,迅速缓解缺血再灌注损伤的氧化应激反应十分重要。EDA属自由基清除剂,有较高脂溶性,可通过血脑屏障进入脑组织,在清除脑部自由基的同时,抑制脂质过氧化物的生成,减轻机体炎性反应,缓解氧化应激对相关组织细胞的刺激,进而改善神经功能^[7-8]。LDH是存在于细胞质的酶,当细胞膜受到损伤时,LDH会释放到培养基中,其水平可作为衡量凋亡细胞和受损细胞数量的指标^[9]。SOD具有抗氧化能力,其活性可反映机体清除自由基的能力^[10]。MDA是机体脂质过氧化的产物,其含量可反映细胞氧化应激的损伤程度^[11]。本研究中EDA组细胞上述指标较模型组均明显改善;且细胞活性及凋亡情况也明显改善。

JAK2是蛋白-酪氨酸激酶家族的成员,是许多生理和病理过程的重要调节器^[12]。其他信号分子如STAT1、STAT3、STAT5和p-STAT3也受到JAK2调控。JAK2/STAT3信号通路可调控细胞凋亡和氧化应激^[13]。研究表明,抑制JAK2/STAT3信号通路,可减少炎症因子和凋亡相关蛋白的表达,增加神经细胞的存活数量,减轻脑缺血损伤程度^[14]。本研究中,与模型组比较,EDA组JAK2、STAT3的磷酸化水平明显降低,提示EDA可抑制氧糖剥夺再灌注模型中JAK2/STAT3信号通路的激活。

综上所述,EDA对氧糖剥夺再灌注诱导的HT22细

胞氧化应激损伤有明显的保护作用,其作用机制可能与抑制JAK2/STAT3信号通路有关。

参考文献

- [1] 朱博雅,谭晓东,顾耀华,等. 脑卒中危险因素对脑血管功能影响[J]. 中国公共卫生,2022,38(10):1264-1268.
- [2] 李燕,杨柳,朱诗苗. 有氧运动联合高压氧治疗脑卒中后认知功能障碍的疗效及对氧化应激的影响[J]. 医学信息,2022,35(17):114-116.
- [3] 王慧娟,霍会永,刘运平,等. 依达拉奉联合阿替普酶对急性缺血性脑卒中患者炎症因子、氧化应激及免疫功能的影响[J]. 河北医药,2022,44(15):2296-2298.
- [4] 刘乐. 基于贝叶斯网络模型的缺血性脑卒中患者短期预后不良风险预测研究[D]. 南昌:南昌大学,2023.
- [5] EREN F, YILMAZ SE. Neuroprotective approach in acute ischemic stroke: A systematic review of clinical and experimental studies[J]. Brain Circ,2022,8(4):172-179.
- [6] CIANCARELLI I, MORONE G, IOSA M, et al. Influence of Oxidative Stress and Inflammation on Nutritional Status and Neural Plasticity: New Perspectives on Post-Stroke Neurorehabilitative Outcome[J]. Nutrients,2022,15(1):108.
- [7] 夏宛军,鲍正社. 依达拉奉右莰醇对急性脑梗死患者神经功能、氧化应激及炎症因子的影响[J]. 湖南师范大学学报(医学版),2022,19(2):133-136.
- [8] 谢明,朱俊德,周璐,等. 依达拉奉对大鼠脑缺血再灌注损伤后氧化应激及凋亡的影响[J]. 神经解剖学杂志,2021,37(4):418-424.
- [9] YAN QY, YIN Y, LI XC, et al. Exosome-shuttled MYCBPAP from bone marrow mesenchymal stem cells regulates synaptic remodeling and ameliorates ischemic stroke in rats[J]. J Chem Neuroanat,2023,132:102309.
- [10] ZHOU R, LIN K, LENG C, et al. Chebulic Acid Prevents Hypoxia Insult via Nrf2 / ARE Pathway in Ischemic Stroke[J]. Nutrients,2022,14(24):5390.
- [11] SU D, ZHANG R, WANG X, et al. A new multi-parameter imaging platform for in vivo drug efficacy evaluation of ischemic stroke[J]. Talanta,2023,266:125133.
- [12] HOU YY, WANG K, WAN WJ, et al. Resveratrol provides neuroprotection by regulating the JAK2 / STAT3 / PI3K / AKT / mTOR pathway after stroke in rats[J]. Genes Dis,2018,5(3):245-255.
- [13] 刘亚丽,李雅丽,李春彦,等. CPU0213激活JAK2/STAT3通路减轻大鼠心肌缺血再灌注及氧化应激损伤[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2020,36(11):1009-1015.
- [14] ZHANG W, XU MJ, CHEN FY, et al. Targeting the JAK2 - STAT3 pathway to inhibit cGAS - STING activation improves neuronal senescence after ischemic stroke [J]. Exp Neurol,2023,368:114474.

(收稿日期:2023-09-18;修回日期:2024-06-28)