

# 藏红花素通过抑制JAK2/STAT3信号通路减轻脑缺血再灌注大鼠海马神经元损伤

李晓蕾,朱海生,麻瑞娟,姚利\*,胡科,冯丽娜,王旭东

邯郸市中心医院,河北邯郸 056000

\*通信作者:姚利,E-mail:lfxyxiaoyu@163.com

收稿日期:2023-08-01;接受日期:2023-12-09

基金项目:河北省邯郸市科学技术研究与发展计划项目(21422083116)

DOI:10.3724/SP.J.1329.2024.03005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



**摘要 目的** 研究藏红花素(CRO)对脑缺血再灌注(CI/R)大鼠海马神经元损伤的影响并探索其潜在机制。**方法** 将144只雄性SD大鼠按照随机数字表法分为假手术(Sham)组,模型(CI/R)组,CRO低、中、高剂量(CRO-L、CRO-M、CRO-H)组和尼莫地平(NMP)组6组,每组24只。采用线栓法制备CI/R大鼠模型,各组分别于造模前7d开始1次/d腹腔注射(ip)给药(CRO-L、CRO-M、CRO-H组分别ip给药10、20、40 mg/kg,NMP组ip给药1 mg/kg,Sham组和CI/R组ip给予生理盐水5 mL/kg)。再灌注24 h后,通过Morris水迷宫实验检测大鼠学习记忆能力,TTC染色检测脑梗死率,HE染色法行海马CA1区和CA3区神经元病理学检查,TUNEL染色法行海马CA1区和CA3区神经元凋亡检查,ELISA法检测海马组织白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、IL-8、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )含量,Western blot法检测海马组织Janus激酶2/信号转导与转录激活子3(JAK2/STAT3)信号通路相关蛋白相对表达量。**结果** 与Sham组比较,CI/R组学习记忆能力明显降低,脑梗死率明显升高( $P<0.05$ );海马CA1区和CA3区神经元呈现数量减少、间隙增大、空泡样变、核膜核仁边界模糊、炎性细胞浸润等病理改变,凋亡率明显升高( $P<0.05$ );海马组织IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$ 含量明显升高( $P<0.05$ );p-JAK2、p-STAT3、高迁移率族蛋白B1(HMGB1)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、激活型半胱氨酸蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)相对表达量和p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3、Bax/Bcl-2表达比值均明显升高,Bcl-2相对表达量明显降低( $P<0.05$ )。与CI/R组比较,CRO-M组、CRO-H组和NMP组大鼠学习记忆能力显著改善、脑梗死率明显降低( $P<0.05$ );海马CA1区和CA3区神经元病理学改变明显改善、凋亡率明显降低( $P<0.05$ );海马组织IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$ 含量明显降低( $P<0.05$ );p-JAK2、p-STAT3、HMGB1、Bax、Cleaved Caspase-3相对表达量和p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3、Bax/Bcl-2表达比值均明显降低( $P<0.05$ )。CRO上述作用呈现一定的剂量依赖性,且CRO-H组对CI/R大鼠学习记忆能力、海马CA1区和CA3区神经元病理学改变和凋亡率、炎症因子含量、JAK2/STAT3信号通路相关蛋白表达的影响显著优于NMP组( $P<0.05$ )。**结论** CRO可能通过抑制JAK2/STAT3信号通路活化,减轻炎症和神经元凋亡,从而对CI/R大鼠海马神经元损伤起到保护作用。

**关键词** 脑缺血再灌注;藏红花素;海马神经元;JAK2/STAT3信号通路;炎症;凋亡

缺血性脑卒中居人类致残、致死疾病谱第二位,其临床治疗首选溶栓或外科手术等方案迅速恢

复血流灌注,然而缺血性脑卒中治疗时间窗较窄,恢复血供过程往往伴随脑组织及神经功能二次损

引用格式:李晓蕾,朱海生,麻瑞娟,等.藏红花素通过抑制JAK2/STAT3信号通路减轻脑缺血再灌注大鼠海马神经元损伤[J].康复学报,2024,34(3):242-250,261.

LI X L,ZHU H S,MA R J,et al. Crocin alleviates hippocampal neuron injury in rats with cerebral ischemia-reperfusion by inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. Rehabil Med, 2024, 34(3):242-250,261.

DOI:10.3724/SP.J.1329.2024.03005

©《康复学报》编辑部,开放获取CC BY-NC-ND 4.0协议

© Rehabilitation Medicine, OA under the CC BY-NC-ND 4.0

伤,即脑缺血再灌注(cerebral ischemia reperfusion, CI/R)损伤<sup>[1]</sup>。学习记忆能力受损是CI/R的最主要症状之一,海马区是负责学习和记忆的脑区,而海马神经元对CI/R损伤极为敏感<sup>[2]</sup>。CI/R损伤机制较为复杂,其中炎症反应和神经元凋亡在CI/R损伤的发生发展机制中扮演着重要角色<sup>[3]</sup>。Janus激酶2(janus kinase 2, JAK2)及其下游蛋白信号转导与转录激活子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)等在炎症反应、细胞凋亡等过程中发挥着重要的信号传导作用<sup>[4-5]</sup>。研究证实,给药抑制JAK2/STAT3信号通路及其介导的炎症反应和神经元凋亡可有效减轻CI/R损伤<sup>[6-7]</sup>。

中医认为,“气虚血瘀、风痰阻络”为缺血性脑卒中的主要病机,当以“益气活血、化痰通络、醒脑开窍”等方案治疗。藏红花取鸢尾科植物番红花的干燥柱头入药,具有活血化瘀、凉血解毒、散郁开结等功效。藏红花素(Crocin, CRO)为藏红花的主要活性成分,化学结构属于水溶性类胡萝卜素,现代药理学研究发现,CRO具有良好的抗炎、抗氧化、抑凋亡等作用<sup>[8]</sup>。本课题组既往研究发现,CRO对CI/R大鼠皮质神经元损伤具有保护作用,其机制与抑制JAK2/STAT3信号通路有关<sup>[9]</sup>。尼莫地平(nimodipine, NMP)是一种二氢吡啶类钙离子拮抗剂,是临床防治缺血性神经损伤的一线药物,常作为阳性对照药物用于缺血性脑血管病防治药物的研究<sup>[10]</sup>。本研究通过制备CI/R大鼠模型,以NMP作为阳性对照药物,探讨CRO对CI/R大鼠海马神经元损伤的影响及潜在机制,为CI/R的临床治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

选择144只SPF级7周龄雄性SD大鼠,体质量220~240 g,购自赛业(固安)生物科技有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(冀)2021-003。在温度23~25℃、相对湿度45%~65%、光照黑暗各12 h循环的清洁环境中分笼饲养,进食饮水不限。本研究获得邯郸市中心医院伦理委员会批准[审批号:HDZXLL(K)2021-014]。

### 1.2 主要实验仪器与试剂

CRO(纯度≥98%)(货号:WKQ-0000584)购自四川维克奇生物科技有限公司;NMP(货号:2022C00417)购自辰欣药业股份有限公司;四氮唑红(TTC)染液(货号:T8170)、RIPA裂解液(货号:

R0010)、ECL发光液(货号:PE0010)均购自北京索莱宝生物科技有限公司;HE染色试剂盒(货号:C0105S)购自上海碧云天生物科技有限公司;TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(货号:G1501)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )(货号:H002-1-2)、IL-8(货号:H008-1-2)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )(货号:H052-1-2)试剂盒和BCA法蛋白浓度检测试剂盒(货号:A045-4-2)均购自南京建成生物工程研究所;JAK2(货号:bs-23003R)、STAT3(货号:bs-55208R)、p-STAT3(货号:bs-25609R)、GAPDH(货号:bs-41373R)抗体和免疫球蛋白G(IgG)二抗(货号:bs-0295G)均购自北京博奥森生物技术公司;p-JAK2(货号:AF3022)、高迁移率族蛋白B1(HMGB1)(货号:AF7020)、B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)(货号:AF6139)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)(货号:AF0120)、激活型半胱氨酸蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)(货号:AF7022)抗体均购自美国Affinity公司。RM2145型切片机、DM6B型荧光显微镜均购自德国徕卡公司;BX43型光学显微镜购自日本奥林巴斯公司;FS3型全波长酶标仪购自美国MD公司;24DN型电泳槽、40型电转仪均购自北京六一公司。

### 1.3 实验分组与给药预处理

144只SD大鼠适应性饲养1周并进行数字编码,按照随机数字表法分为6组:假手术组(Sham组),模型组(CI/R组),CRO低、中、高剂量组(CRO-L、CRO-M、CRO-H组)组和阳性对照组(NMP组),每组24只。6组均于造模前7 d开始1次/d腹腔注射(ip)给药:CRO-L、CRO-M、CRO-H组分别ip给药10、20、40 mg/kg<sup>[11]</sup>,NMP组ip给药1 mg/kg<sup>[12]</sup>,Sham组和CI/R组ip给予生理盐水5 mL/kg。

### 1.4 脑缺血再灌注模型制备

末次给药12 h后,除Sham组外,其余5组均采用线栓法阻断大脑中动脉2 h制备CI/R大鼠模型:腹腔注射戊巴比妥钠(浓度3%,剂量40 mg/kg)实施麻醉,取仰卧位,剔除颈毛并碘伏消毒后,沿颈正中切口约1.5 cm,分离右侧颈总动脉和颈内外动脉,夹闭颈总动脉近心端,结扎颈外动脉后,于颈外动脉(距颈内、颈外动脉分叉处约0.5 cm处)插入线栓进入颈内动脉至大脑中动脉处,固定线栓,松开夹闭颈总动脉的动脉夹,造成脑缺血2 h后拔出线栓恢复血流再灌注;Sham组除不插入线栓外,其余操作同模型组。通过Longa神经功能评分对造模结果进行判断<sup>[13]</sup>,无神经功能缺失症状为0分,缺血对侧前

肢不能伸展为1分,行走时向缺血对侧转圈为2分,跌倒为3分,不能行走为4分,评分2分以上则认为造模成功。

### 1.5 Morris水迷宫实验检测大鼠学习记忆能力

**1.5.1 定位巡航实验检测大鼠学习能力** 再灌注24 h后,随机从各组取出8只大鼠,分别于Morris水迷宫第I、II、IV象限面向器壁放入水中(恒温25℃),记录大鼠寻找到位于第III象限的平台所需时间(如果120 s内未找到则引导大鼠找到平台并停留15 s,时间则记为120 s),即逃避潜伏期。每天上午、下午分别检测2次,取平均值,共检测4 d。

**1.5.2 空间探索实验检测大鼠记忆能力** 去除安装在第III象限的平台,在第5 d,将每只大鼠分别在Morris水迷宫第I象限面向器壁放入水中,记录120 s内穿过原平台位置的次数。

### 1.6 TTC染色检测脑梗死率

颈椎脱臼处死大鼠后断头取脑,-20℃冷冻15 min后,均匀厚度切成5片,置于2% TTC染色液中恒温37℃孵育0.5 h(每5 min翻面1次),脑梗死区呈苍白色,采用ImageJ软件分析大鼠脑梗死百分率。

### 1.7 HE染色法观察海马CA1区和CA3区神经元病理改变

再灌注24 h后,另从各组随机取8只大鼠,颈椎脱臼处死后断头取脑,置于福尔马林溶液中固定5 d,经脱水、石蜡包埋、4 μm切片、贴片、脱蜡处理后行HE染色,显微镜下观察海马CA1区和CA3区神经元病理改变。

### 1.8 TUNEL染色法观察海马CA1区和CA3区神经元凋亡

取脱蜡处理后的脑组织切片,按照试剂盒说明行TUNEL双荧光染色[4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)可将正常细胞染成蓝色荧光,荧光素标记脱氧尿苷三磷酸(FITC-12-dUTP)可将凋亡细胞核染成绿色荧光],通过荧光显微镜观察海马CA1区和CA3区神经元状况。每只大鼠取5张TUNEL染色切片,分别取5个CA1区和5个CA3互不重叠的视野,分别计数视野内神经元总数和凋亡神经元数,取平均值,然后计算海马CA1区和CA3神经元凋亡率。

神经元凋亡率=凋亡神经元数/神经元总数×100%

### 1.9 ELISA法检测海马组织IL-1β、IL-8、TNF-α含量

再灌注24 h后,取各组剩余的8只大鼠,颈椎脱臼处死后断头取脑,取部分海马组织进行研磨匀浆,3 500 r/min离心(离心半径10 cm)10 min取上清,采用ELISA法检测海马组织IL-1β、IL-8、TNF-α含量。

### 1.10 Western blot法检测海马组织JAK2/STAT3信号通路相关蛋白相对表达量

取部分海马组织,加RIPA裂解液后冰上研磨匀浆,12 000 r/min离心(离心半径10 cm、4℃)30 min取上清,BCA法测定蛋白浓度,10% SDS凝胶电泳分离蛋白、转膜、5%脱脂奶粉溶液37℃封闭1.5 h, TBST溶液浸洗5 min×3次,4℃孵育一抗[JAK2(1:800稀释)、p-JAK2(1:1 000稀释)、STAT3(1:800稀释)、p-STAT3(1:800稀释)、HMGB1(1:1 000稀释)、Bcl-2(1:1 000稀释)、Bax(1:1 000稀释)、cleaved Caspase-3(1:1 000稀释)、GAPDH(1:2 000)]过夜, TBST溶液浸洗5 min×3次,室温孵育二抗IgG(1:3 500)1.5 h, TBST溶液浸洗5 min×3次后ECL显色,运用ImageJ软件计算蛋白条带灰度值。

### 1.11 统计学方法

运用SPSS 25.0软件进行数据分析。计量资料符合正态分布,数据采用( $\bar{x} \pm s$ )表示。Morris水迷宫实验逃避潜伏期采用重复测量方差分析;其他数据多组间比较采用单因素方差分析,方差齐时两两比较行最小显著差异法(LSD-*t*)检验,方差不齐时行Tamhane's T2检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 6组学习记忆能力比较

与Sham组比较,第1~4天检测CI/R组大鼠逃避潜伏期明显升高,第5天检测穿越平台次数明显降低( $P < 0.05$ )。与CI/R组比较,第4天检测CRO-L组、CRO-M组、CRO-H组和NMP组大鼠逃避潜伏期明显降低( $P < 0.05$ ),第5天检测穿越平台次数(CRO-L组除外)明显升高( $P < 0.05$ ),CRO-L组、CRO-M组、CRO-H组间上述效应呈剂量依赖性( $P < 0.05$ )。与NMP组比较,第3~4天检测CRO-H组大鼠逃避潜伏期明显降低,第5天检测穿越平台次数明显升高( $P < 0.05$ )。见图1、表1。

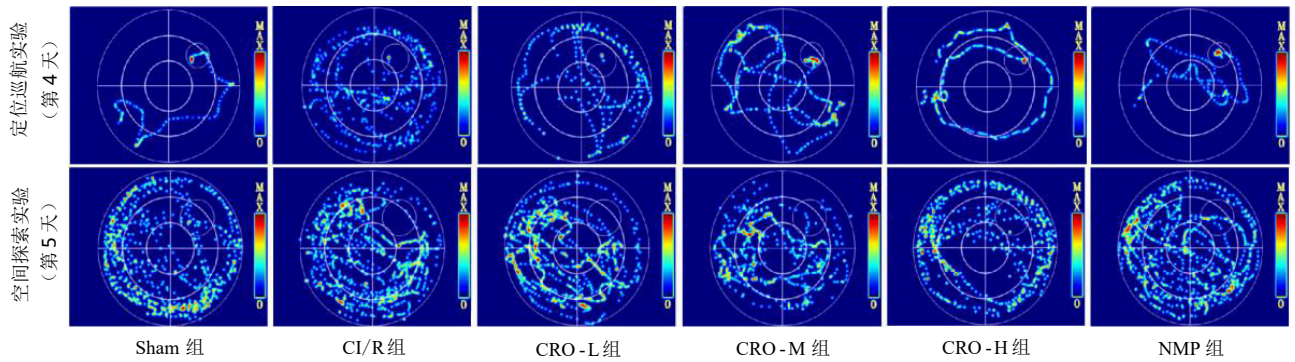


图1 6组 Morris 水迷宫实验对比图

Figure 1 Contrast map of Morris water maze experiment in six groups

表1 6组逃避潜伏期和穿越平台次数比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 Comparison of escape latency and platform crossing times in six groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	逃避潜伏期/s				穿越平台次数/次
		第1天	第2天	第3天	第4天	
Sham组	8	75.09±8.47	58.82±8.03	39.42±4.35	23.85±3.17	5.50±0.62
CI/R组	8	98.41±12.25 <sup>1)</sup>	81.56±10.74 <sup>1)</sup>	67.28±8.13 <sup>1)</sup>	59.61±7.42 <sup>1)</sup>	1.94±0.25 <sup>1)</sup>
CRO-L组	8	87.92±11.69	74.09±9.15	60.25±7.68	51.44±6.07 <sup>2)</sup>	2.17±0.29
CRO-M组	8	84.46±10.85 <sup>2)</sup>	69.15±8.43 <sup>2)</sup>	52.06±7.04 <sup>2)3)</sup>	34.26±4.68 <sup>2)3)</sup>	3.08±0.40 <sup>2)3)</sup>
CRO-H组	8	83.07±11.02 <sup>2)</sup>	63.82±7.67 <sup>2)3)</sup>	42.51±4.93 <sup>2)3)4)5)</sup>	28.14±3.59 <sup>2)3)4)5)</sup>	4.25±0.58 <sup>2)3)4)5)</sup>
NMP组	8	86.73±11.74	70.05±8.62 <sup>2)</sup>	54.82±7.23 <sup>2)</sup>	35.09±4.83 <sup>2)</sup>	3.47±0.46 <sup>2)</sup>

注:与Sham组比较,1)  $P<0.05$ ;与CI/R组比较,2)  $P<0.05$ ;与CRO-L组比较,3)  $P<0.05$ ;与CRO-M组比较,4)  $P<0.05$ ;与NMP组比较,5)  $P<0.05$ 。

Note: Compared with the sham group, 1)  $P<0.05$ ; compared with the CI/R group, 2)  $P<0.05$ ; compared with the CRO-L group, 3)  $P<0.05$ ; compared with the CRO-M group, 4)  $P<0.05$ ; compared with the NMP group, 5)  $P<0.05$ .

## 2.2 6组脑梗死率比较

与Sham组比较,CI/R组脑梗死率明显升高( $P<0.05$ )。与CI/R组比较,CRO-M组、CRO-H组和NMP组脑梗死率明显降低( $P<0.05$ ),CRO-L组、CRO-M组、CRO-H组间上述效应呈剂量依赖性。与NMP组比较,CRO-H组脑梗死率明显降低( $P<0.05$ )。见图2和图3。

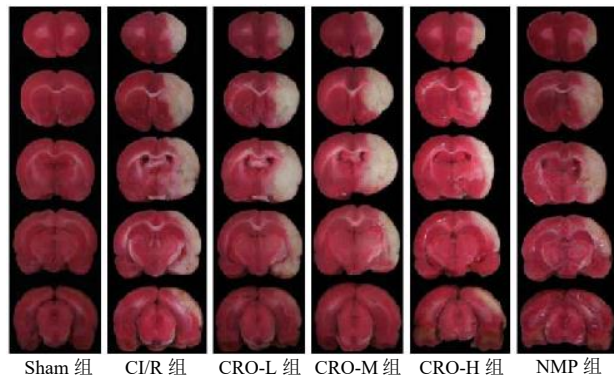
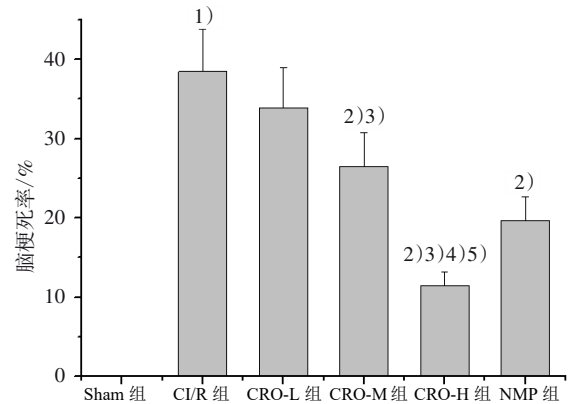


图2 6组脑组织 TTC 染色图

Figure 2 TTC staining figure of brain tissue in six groups



注:与Sham组比较,1)  $P<0.05$ ;与CI/R组比较,2)  $P<0.05$ ;与CRO-L组比较,3)  $P<0.05$ ;与CRO-M组比较,4)  $P<0.05$ ;与NMP组比较,5)  $P<0.05$ 。

Note: Compared with the sham group, 1)  $P<0.05$ ; compared with the CI/R group, 2)  $P<0.05$ ; compared with the CRO-L group, 3)  $P<0.05$ ; compared with the CRO-M group, 4)  $P<0.05$ ; compared with the NMP group, 5)  $P<0.05$ .

图3 6组脑梗死率比较

Figure 3 Comparison of cerebral infarction rate in six groups

### 2.3 6组海马CA1区和CA3区神经元病理改变的比较

Sham组海马CA1区和CA3区神经元形态结构正常。CI/R组海马CA1区和CA3区神经元病理改变明显,表现为数量减少、间隙增大、空泡样变、核

膜核仁边界模糊、炎性细胞浸润等。与CI/R组比较,CRO各剂量组和NMP组海马CA1区和CA3区神经元病理改变呈不同程度改善,CRO-L组、CRO-M组、CRO-H组间上述效应呈剂量依赖性,且CRO-H组改善效果优于NMP组。见图4。

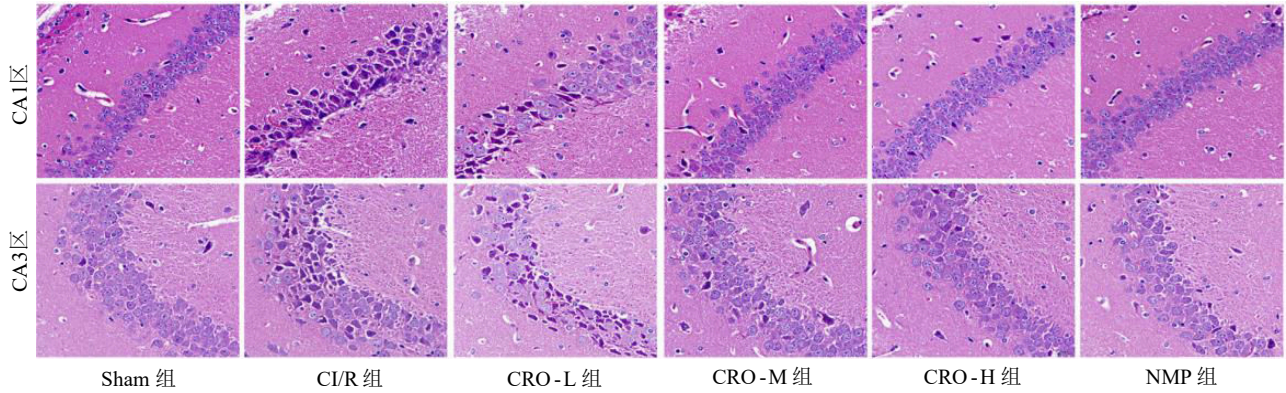


图4 6组海马CA1区和CA3区神经元HE染色图(×200)

Figure 4 HE staining figure of hippocampus neurons in CA1 and CA3 regions in six groups (×200)

### 2.4 6组海马CA1区和CA3区神经元凋亡比较

Sham组大鼠海马CA1区和CA3区仅可见少量凋亡神经元。与Sham组比较,CI/R组海马CA1区和CA3区神经元凋亡率明显升高( $P<0.05$ )。与CI/R组比较,CRO-L组、CRO-M组、CRO-H组和NMP组海马CA1区(CRO-L组除外)和CA3区神经元凋亡率明显降低( $P<0.05$ ),CRO-L组、CRO-M组、CRO-H组间上述效应呈剂量依赖性( $P<0.05$ )。与NMP组比较,CRO-H组大鼠海马CA1区和CA3区神经元凋亡率明显降低( $P<0.05$ )。见图5和图6。

### 2.5 6组海马组织IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$ 含量比较

与Sham组比较,CI/R组海马组织IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$ 含量明显升高( $P<0.05$ )。与CI/R组比较,CRO-L组、CRO-M组、CRO-H组和NMP组IL-1 $\beta$ (CRO-L组除外)、IL-8、TNF- $\alpha$ (CRO-L组除外)含量明显降低( $P<0.05$ ),CRO-L组、CRO-M组、CRO-H组间上述效应呈剂量依赖性( $P<0.05$ )。与NMP组比较,CRO-H组IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$ 含量明显降低( $P<0.05$ )。见表2。

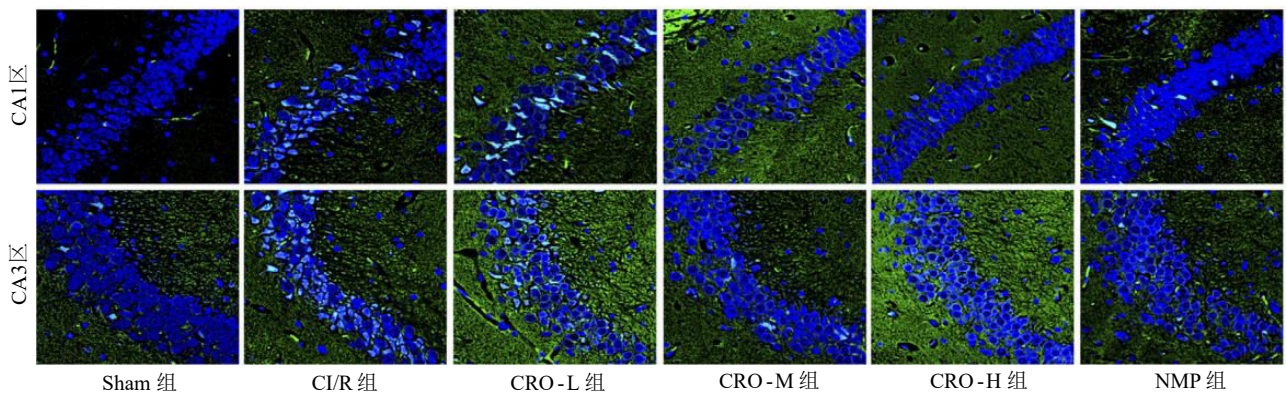
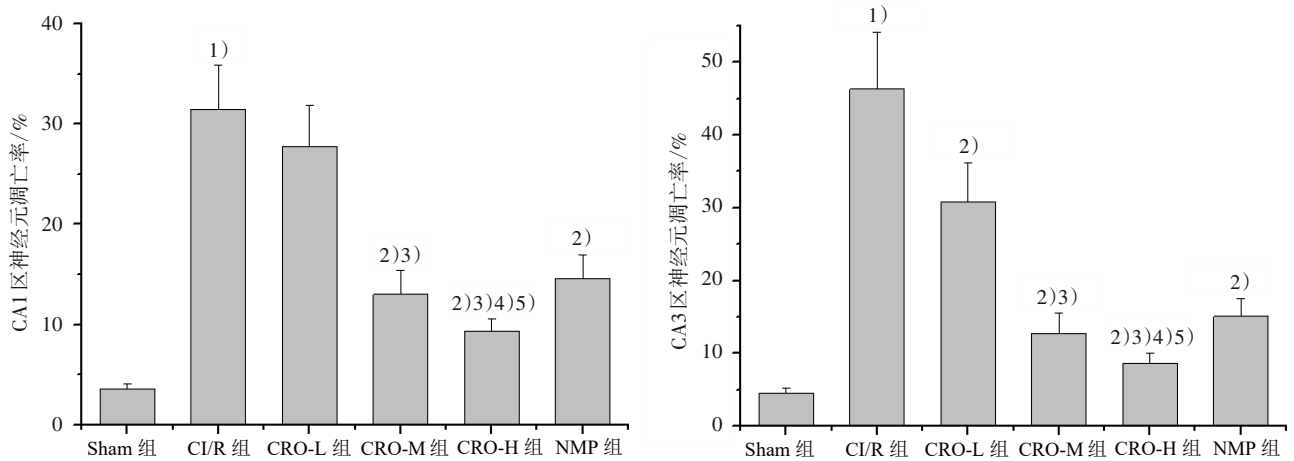


图5 6组海马CA1区和CA3区神经元TUNEL染色图(×200)

Figure 5 TUNEL staining figure of hippocampus neurons in CA1 and CA3 regions in six groups (×200)



注:与 Sham 组比较, 1)  $P < 0.05$ ; 与 CI/R 组比较, 2)  $P < 0.05$ ; 与 CRO-L 组比较, 3)  $P < 0.05$ ; 与 CRO-M 组比较, 4)  $P < 0.05$ ; 与 NMP 组比较, 5)  $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the Sham group, 1)  $P < 0.05$ ; compared with the CI/R group, 2)  $P < 0.05$ ; compared with the CRO-L group, 3)  $P < 0.05$ ; compared with the CRO-M group, 4)  $P < 0.05$ ; compared with the NMP group, 5)  $P < 0.05$ .

图 6 6组海马 CA1 区和 CA3 区神经元凋亡率比较

Figure 6 Comparison of apoptosis rate of hippocampus neurons in CA1 and CA3 regions in six groups

表 2 6组海马组织 IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$  含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

pg/mL

Table 2 Comparison of content of IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  in hippocampus in six groups ( $\bar{x} \pm s$ )

pg/mL

组别	n	IL-1 $\beta$	IL-8	TNF- $\alpha$
Sham 组	8	21.47 $\pm$ 2.80	15.63 $\pm$ 2.19	43.85 $\pm$ 5.74
CI/R 组	8	53.06 $\pm$ 7.14 <sup>1)</sup>	44.82 $\pm$ 6.50 <sup>1)</sup>	116.23 $\pm$ 20.07 <sup>1)</sup>
CRO-L 组	8	47.19 $\pm$ 6.25	36.51 $\pm$ 5.24 <sup>2)</sup>	97.84 $\pm$ 18.53
CRO-M 组	8	36.58 $\pm$ 5.07 <sup>2)3)</sup>	28.23 $\pm$ 4.43 <sup>2)3)</sup>	73.19 $\pm$ 12.61 <sup>2)3)</sup>
CRO-H 组	8	28.34 $\pm$ 4.10 <sup>2)3)4)5)</sup>	21.36 $\pm$ 3.08 <sup>2)3)4)5)</sup>	56.40 $\pm$ 8.52 <sup>2)3)4)5)</sup>
NMP 组	8	34.91 $\pm$ 5.26 <sup>2)</sup>	30.75 $\pm$ 4.63 <sup>2)</sup>	69.48 $\pm$ 11.95 <sup>2)</sup>

注:与 Sham 组比较, 1)  $P < 0.05$ ; 与 CI/R 组比较, 2)  $P < 0.05$ ; 与 CRO-L 组比较, 3)  $P < 0.05$ ; 与 CRO-M 组比较, 4)  $P < 0.05$ ; 与 NMP 组比较, 5)  $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the sham group, 1)  $P < 0.05$ ; compared with the CI/R group, 2)  $P < 0.05$ ; compared with the CRO-L group, 3)  $P < 0.05$ ; compared with the CRO-M group, 4)  $P < 0.05$ ; compared with the NMP group, 5)  $P < 0.05$ .

## 2.6 6组海马组织 JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白相对表达量比较

与 Sham 组比较, CI/R 组海马组织 p-JAK2、p-STAT3、HMGB1、Bax、cleaved Caspase-3 相对表达量及 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3、Bax/Bcl-2 表达比值明显升高 ( $P < 0.05$ ), Bcl-2 相对表达量明显降低 ( $P < 0.05$ )。与 CI/R 组比较, CRO-L 组、CRO-M 组、CRO-H 组和 NMP 组 p-JAK2、p-STAT3、HMGB1 (CRO-L 组除外)、Bax (CRO-L 组除外)、cleaved

Caspase-3 相对表达量及 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3、Bax/Bcl-2 表达比值明显降低 ( $P < 0.05$ ), Bcl-2 (CRO-L 组除外) 相对表达量明显升高 ( $P < 0.05$ ); CRO-L 组、CRO-M 组、CRO-H 组间上述效应呈剂量依赖性 ( $P < 0.05$ )。与 NMP 组比较, CRO-H 组 p-JAK2、p-STAT3、HMGB1、Bax、cleaved Caspase-3 相对表达量及 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3、Bax/Bcl-2 表达比值明显降低 ( $P < 0.05$ )。见图 7—9。

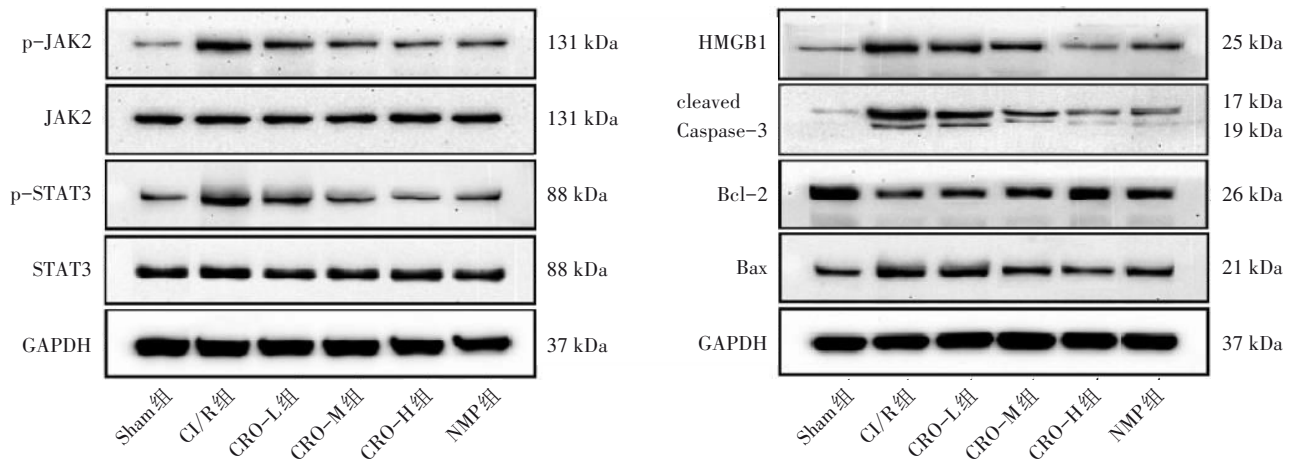
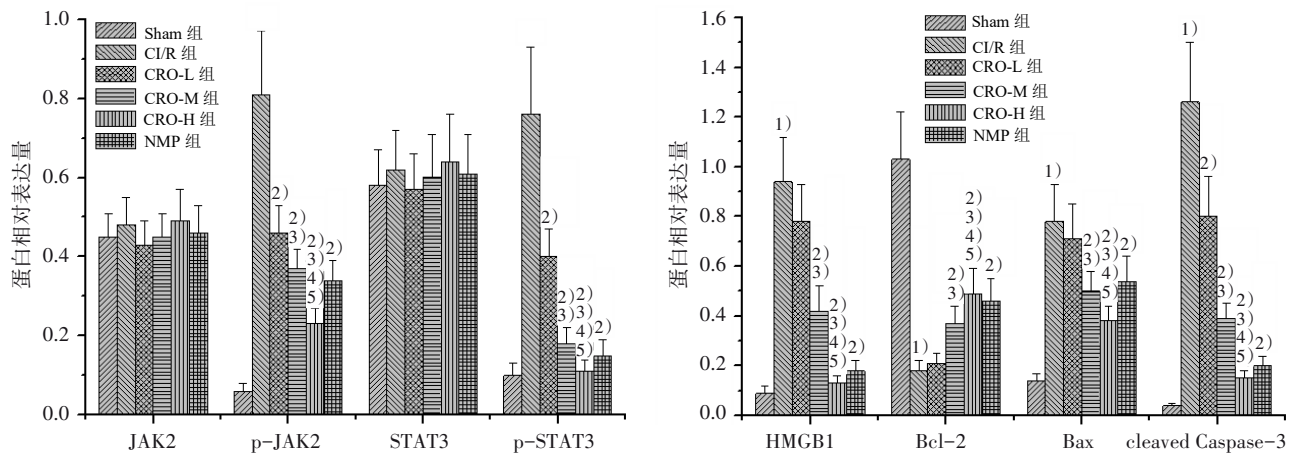


图7 6组海马组织JAK2/STAT3信号通路相关蛋白条带图

Figure 7 Bands figure of JAK2/STAT3 signaling pathway related proteins in hippocampus in six groups



注:与Sham组比较,1)  $P < 0.05$ ;与CI/R组比较,2)  $P < 0.05$ ;与CRO-L组比较,3)  $P < 0.05$ ;与CRO-M组比较,4)  $P < 0.05$ ;与NMP组比较,5)  $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the Sham group, 1)  $P < 0.05$ ; compared with the CI/R group, 2)  $P < 0.05$ ; compared with the CRO-L group, 3)  $P < 0.05$ ; compared with the CRO-M group, 4)  $P < 0.05$ ; compared with the NMP group, 5)  $P < 0.05$ .

图8 6组海马组织JAK2/STAT3信号通路相关蛋白相对表达量比较

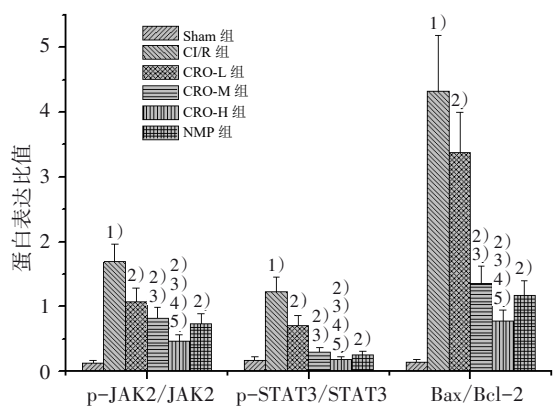
Figure 8 Comparison of relative expression of JAK2/STAT3 signaling pathway related proteins in hippocampus in six groups

### 3 讨论

#### 3.1 CRO减轻CI/R大鼠海马神经元损伤,改善学习记忆能力

本实验采用线栓法阻断大脑中动脉2h的方法构建CI/R大鼠模型,该造模方法操作简单、重复性好、病理特点与人类近似,是公认的CI/R动物模型制备方法<sup>[14]</sup>。结果显示,CI/R大鼠学习记忆能力明

显降低,脑梗死率明显升高,海马CA1区和CA3区神经元呈现数量减少、间隙增大、空泡样变、核膜核仁边界模糊、炎性细胞浸润等病理改变,这与SUN等<sup>[15]</sup>研究结果一致。CRO预处理可明显改善CI/R大鼠学习记忆能力,降低脑梗死率,改善海马CA1区和CA3区神经元病变,并且CRO上述作用呈现剂量依赖性,CRO-H组上述效应优于NMP组,提示CRO对CI/R大鼠海马神经元损伤具有保护作用。



注:与Sham组比较,1)  $P < 0.05$ ;与CI/R组比较,2)  $P < 0.05$ ;与CRO-L组比较,3)  $P < 0.05$ ;与CRO-M组比较,4)  $P < 0.05$ ;与NMP组比较,5)  $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the sham group, 1)  $P < 0.05$ ; compared with the CI/R group, 2)  $P < 0.05$ ; compared with the CRO-L group, 3)  $P < 0.05$ ; compared with the CRO-M group, 4)  $P < 0.05$ ; compared with the NMP group, 5)  $P < 0.05$ .

图9 6组海马组织 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3、Bax/Bcl-2 比值比较

Figure 9 Comparison of ratio of p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3, Bax/Bcl-2 in hippocampus in six groups

有文献报道CI/R过程将刺激小胶质细胞活化而释放IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$ 等炎症因子,进而引发炎症反应<sup>[16]</sup>。IL-8、TNF- $\alpha$ 能够刺激自身及其他炎症因子进一步释放,而IL-1 $\beta$ 可促进炎症细胞浸润,进而加重炎症损伤<sup>[17]</sup>。神经元凋亡是由多种蛋白参与调控的程序化死亡过程,缺血半暗带神经元过度凋亡是CI/R后神经元丢失的重要原因。Bcl-2家族蛋白中Bcl-2、Bax通过调节线粒体膜通透性转变孔(mPTP)开放度参与线粒体凋亡途径的调控。Bax可上调mPTP开放度使细胞色素C(Cyt-C)等物质由线粒体进入细胞质,Cyt-C可诱导Caspase-3活化,而Caspase-3为细胞凋亡的关键启动和执行蛋白<sup>[18]</sup>。Bcl-2可与Bax结合成无活性的二聚体,抑制Bax对mPTP开放度的上调作用,因此Bcl-2表现为抑凋亡作用<sup>[19]</sup>。本研究发现,CRO预处理可降低CI/R模型大鼠海马组织IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$ 含量和CA1区、CA3区神经元凋亡率,降低Bax、cleaved Caspase-3表达量及Bax/Bcl-2比值,提高Bcl-2表达量,并且CRO上述作用呈现剂量依赖性,CRO-H组上述效应优于NMP组,提示CRO对CI/R大鼠海马组织炎症反应和神经元凋亡具有抑制作用,其机制可能与调控凋亡相关蛋白表达有关。

### 3.2 CRO对CI/R大鼠海马神经元的保护作用可能与调节JAK2/STAT3信号通路有关

JAK2/STAT3通路是细胞增殖、分化、凋亡及炎症反应等生理病理过程的信号传导通路。CI/R过程可刺激JAK2磷酸化活化,STAT3为JAK2下游靶蛋白,p-JAK2可识别STAT3中SH2结构域并诱导STAT3磷酸化<sup>[20]</sup>。p-STAT3核转位后可诱导IL-1 $\beta$ 、IL-8等炎症因子转录表达<sup>[21]</sup>。HMGB1是哺乳动物细胞普遍存在的一种核蛋白,具有促进炎症因子转录表达的生物学作用,而p-STAT3可诱导HMGB1表达上调<sup>[22]</sup>。有文献报道p-STAT3通过调控Bax和Bcl-2表达而诱导细胞凋亡<sup>[23]</sup>。学习记忆能力降低与海马神经元凋亡及炎症损伤密切相关,通过抑制JAK2/STAT3信号通路及其介导的炎症反应和神经元凋亡,减轻海马神经元损伤,可有效改善脑缺血再灌注大鼠、阿尔兹海默病大鼠等学习记忆能力<sup>[24-25]</sup>。本研究发现,CRO预处理可降低CI/R模型大鼠海马组织p-JAK2、p-STAT3、HMGB1表达量及p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3比值,并且CRO上述作用呈现剂量依赖性,CRO-H组上述效应优于NMP组,提示CRO对JAK2/STAT3信号通路活化具有抑制作用,这可能是CRO抑制CI/R大鼠海马组织炎症反应和神经元凋亡,进而改善学习记忆能力的重要分子机制。

### 4 小结

CRO对CI/R大鼠海马神经元损伤具有保护作用,可能与抑制JAK2/STAT3信号通路活化、减轻炎症反应和神经元凋亡有关。本实验结果为CRO用于防治CI/R损伤提供了伦理支持。但本实验未考察JAK2/STAT3信号通路激活剂、抑制剂对CRO保护CI/R大鼠海马神经元作用的影响,仍具有一定的局限性,课题组后续拟对本研究中的不足之处开展进一步探讨。

### 参考文献

- 王璐,张士滨,华志鹏,等. 脑缺血再灌注损伤发病机制研究进展[J]. 中风与神经疾病杂志, 2023, 40(2): 168-170.  
WANG L, ZHANG S B, HUA Z P, et al. Research progress on pathogenesis of cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. J Apoplexy Nerv Dis, 2023, 40(2): 168-170.
- SHI G, FENG J, JIAN L Y, et al. DNA hypomethylation promotes learning and memory recovery in a rat model of cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Neural Regen Res, 2023, 18(4): 863-868.
- 谢明,钟朕,欧阳训彦,等. 川芎嗪防治大鼠脑缺血/再灌注损伤后炎症反应与细胞凋亡的作用[J]. 解剖学报, 2021, 52(6): 845-854.  
XIE M, ZHONG Z, OUYANG X Y, et al. Effect of tetramethylpyrazine on inflammatory reaction and apoptosis after cerebral isch-

- emia reperfusion injury in rats [J]. *Acta Anat Sin*, 2021, 52(6): 845-854.
- [4] WANG H, LIU M L, CHU C, et al. Paeonol alleviates placental inflammation and apoptosis in preeclampsia by inhibiting the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2022, 38(11):1103-1112.
- [5] REN Y, XIE W, YANG S, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 inhibits inflammation and apoptosis in high glucose-stimulated microvascular endothelial cell damage by regulating the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(4): 10802-10810.
- [6] LIU H, LI J L, JIANG L, et al. Dexmedetomidine pretreatment alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting neuroinflammation through the JAK2/STAT3 pathway [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2022, 55:e12145.
- [7] CHEN J X, HUANG C Q, YE L C, et al. Effect of matrine on JAK2/STAT3 signaling pathway and brain protection in rats with cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2020, 29(8):959-966.
- [8] JIN W Y, ZHANG Y Y, XUE Y R, et al. Crocin attenuates isoprenaline-induced myocardial fibrosis by targeting TLR4/NF- $\kappa$ B signaling: connecting oxidative stress, inflammation, and apoptosis [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2020, 393(1): 13-23.
- [9] 麻瑞娟, 朱海生, 李晓蕾, 等. 基于 JAK2/STAT3 通路探讨藏红花素对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的影响[J]. *解剖学研究报告*, 2022, 44(6): 577-584.
- MA R J, ZHU H S, LI X L, et al. Effect of crocin on focal cerebral ischemia-reperfusion injury based on JAK2/STAT3 pathway [J]. *Anat Res*, 2022, 44(6): 577-584.
- [10] 张菁华, 许可, 刘胜贤, 等. 天麻钩藤饮对脑缺血再灌注损伤模型大鼠 NMDAR/ERK 信号通路及海马钙化的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(23): 5844-5848.
- ZHANG J H, XU K, LIU S X, et al. Effects of Tianma Gutengyin on NMDAR/ERK signal pathway and hippocampal calcification in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Chin J Gerontol*, 2022, 42(23): 5844-5848.
- [11] 杨欢欢, 段毅. 藏红花素通过 Nrf2/HO-1 通路对脑缺血再灌注大鼠血脑屏障的保护作用[J]. *天津中医药*, 2022, 39(8): 1069-1076.
- YANG H H, DUAN Y. Protective effect of crocin on the blood-brain barrier of rat with cerebral ischemia reperfusion through Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Tianjin J Tradit Chin Med*, 2022, 39(8): 1069-1076.
- [12] 马大亮, 崔红莉, 荣卫江, 等. 柴胡皂苷 A 减轻脑缺血再灌注大鼠海马神经元损伤[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2021, 39(5): 569-574.
- MA D L, CUI H L, RONG W J, et al. Saikosaponin A attenuates hippocampal neuron damage in rats with cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Chin J Clin Anat*, 2021, 39(5): 569-574.
- [13] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [14] 王琮, 陈宇, 张阿龙, 等. 局灶性脑缺血动物模型制作方法研究进展[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2021, 42(6): 506-509.
- WANG C, CHEN Y, ZHANG A L, et al. Research progress on animal models of focal cerebral ischemia [J]. *J Qiqihar Med Univ*, 2021, 42(6): 506-509.
- [15] SUN C Q, FUKUSHI Y, WANG Y, et al. Astrocytes protect neurons in the hippocampal CA3 against ischemia by suppressing the intracellular  $Ca^{2+}$  overload [J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 280.
- [16] 熊莉, 彭丽佳, 邵建林. 小胶质细胞在脑缺血再灌注损伤中的治疗作用和进展[J]. *局解手术学杂志*, 2020, 29(11): 932-936.
- XIONG L, PENG L J, SHAO J L. Therapeutic effect and progress of microglia on cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *J Reg Anat Oper Surg*, 2020, 29(11): 932-936.
- [17] WANG Z, DU X Y, YU D Y, et al. Sufentanil alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting inflammation and protecting the blood-brain barrier in rats [J]. *Eur J Histochem*, 2022, 66(1): 3328.
- [18] CHENG G, XUE Y Y, FANG F, et al. Promotion of Ros-mediated Bax/Cyt-c apoptosis by polyphyllin II leads to suppress growth and aggression of glioma cells [J]. *Transl Cancer Res*, 2021, 10(9): 3894-3905.
- [19] 钟小兰, 班努·库肯, 景江新. 过表达 Bax 抑制剂 1 通过抑制线粒体通透性转换孔开放及细胞凋亡减轻心肌缺血再灌注损伤[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(3): 222-231.
- ZHONG X L, BANNU K K, JING J X. Overexpression of Bax inhibitor-1 reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening and apoptosis [J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(3): 222-231.
- [20] GUO X W, SHEN X Y, YONG Z J. MiR-101 protects against the cerebral I/R injury through regulating JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2021, 17: 2791-2802.
- [21] 唐丽萍, 曾于恒, 王容容, 等. 基于 JAK2/TAT3 信号通路探讨杏仁胃舒汤治疗慢性非萎缩性胃炎大鼠机制[J]. *陕西中医*, 2022, 43(11): 1501-1505.
- TANG L P, ZENG Y H, WANG R R, et al. The mechanism of Xiangren Weishu Decoction on chronic non-atrophic gastritis rats based on JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Shaanxi J Tradit Chin Med*, 2022, 43(11): 1501-1505.
- [22] DENG W J, FAN C H, SHEN R L, et al. Long noncoding MIAT acting as a ceRNA to sponge microRNA-204-5p to participate in cerebral microvascular endothelial cell injury after cerebral ischemia through regulating HMGB1 [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(5): 4571-4586.
- [23] ZHU J Y, ZHU Z, REN Y P, et al. LINGO-1 shRNA protects the brain against ischemia/reperfusion injury by inhibiting the activation of NF- $\kappa$ B and JAK2/STAT3 [J]. *Hum Cell*, 2021, 34(4): 1114-1122.
- [24] CHEN X X, LI P, HUANG R M, et al. Ulinastatin affects focal cerebral ischemia-reperfusion injury via SOCS1-mediated JAK2/STAT3 signalling pathway [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2023, 50(1): 107-116.
- [25] 刘静, 杜艳军, 周清莲, 等. 针灸对阿尔茨海默病大鼠海马区蛋白酪氨酸激酶-2/信号转导和转录激活因子-3 信号通路的影响[J]. *针刺研究*, 2019, 44(2): 79-84.
- LIU J, DU Y J, ZHOU Q L, et al. Acupuncture plus moxibustion intervention improves learning-memory ability by suppressing hippocampal JAK2/STAT3 signaling in Alzheimer's rats [J]. *Acupunct Res*, 2019, 44(2): 79-84.

(下转第 261 页)