

JAK-STAT 信号通路的激活对视网膜缺血-再灌注损伤的促进作用

杨乐 石蕊 申家泉 薛雨顺

710068 西安,陕西省人民医院眼科(杨乐、石蕊、薛雨顺);250021 济南,山东大学附属省立医院眼科(申家泉)

通信作者:薛雨顺,Email:xue257758@sina.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.08.004

【摘要】 背景 视网膜缺血-再灌注损伤(RIRI)是眼科临床上常见的多种视网膜血管性疾病共同的病理损伤过程,发病机制复杂。研究表明视网膜细胞凋亡和神经纤维变性是 RIRI 最终的共同通路。Janus 激酶信号转导子与转录激活子(JAK-STAT)信号通路是近年来新发现的一条信号转导途径,参与多种病理生理过程,但该通路与 RIRI 病理过程的关系尚不明确。目的 探讨 JAK-STAT 信号通路在大鼠 RIRI 过程中被激活的时程及其意义。方法 采用随机数字表法将 40 只正常清洁级成年 SD 大鼠随机分为 RIRI 6 h、12 h、24 h 和 48 h 组,大鼠的一侧眼采用前房生理盐水灌注法升高眼压以建立 RIRI 模型,正常对侧眼作为正常对照组。大鼠眼压升高至 110 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)并能持续 60 min 视为造模成功。分别于造模后 6、12、24 和 48 h 处死大鼠并摘除大鼠眼球,采用免疫组织化学法检测各组大鼠视网膜中 STAT3 和 JAK2 蛋白的表达强度并定位;采用实时荧光定量 PCR 法检测大鼠视网膜中 STAT3 mRNA 和 JAK2 mRNA 相对表达量的动态变化,并与正常对照组检测结果进行比较。结果 免疫组织化学检测显示,JAK2 和 STAT3 蛋白主要表达于视网膜内核层和视网膜神经节细胞(RGCs)层,正常对照组大鼠视网膜中 JAK2 和 STAT3 蛋白均呈弱阳性表达,呈黄色染色,RIRI 模型大鼠视网膜中 JAK2 和 STAT3 蛋白表达均明显增强,呈棕黄色染色。各组间大鼠视网膜中 JAK2 和 STAT3 蛋白表达强度的总体比较差异均有统计学意义($F=88.735,96.625$,均 $P<0.01$),RIRI 后各时间点组大鼠视网膜中 JAK2 和 STAT3 蛋白表达强度均明显高于正常对照组,RIRI 12 h 组大鼠视网膜中 JAK2 和 STAT3 蛋白表达强度达峰值,均明显高于正常对照组,差异均有统计学意义(JAK2: $t=4.308,5.559,5.315,4.726$,均 $P<0.01$;STAT3: $t=5.047,7.843,6.281,4.887$,均 $P<0.01$)。RIRI 模型眼视网膜内层增厚、组织疏松,可见细胞空泡样变性,及 RGCs 数量减少。实时荧光定量 PCR 显示,各组间大鼠视网膜中 JAK2 mRNA 和 STAT3 mRNA 总体比较差异均有统计学意义($F=111.239,129.539$,均 $P<0.01$),RIRI 6、12、24 和 48 h 组大鼠视网膜中 JAK2 mRNA 和 STAT3 mRNA 相对表达量较正常对照组均明显增加,差异均有统计意义(JAK2 mRNA: $t=3.504,5.102,4.679,4.213$,均 $P<0.01$;STAT3 mRNA: $t=6.541,8.787,5.693,5.898$,均 $P<0.01$)。结论 RIRI 模型鼠视网膜形态发生病理改变,RGCs 数量减少,同时大鼠视网膜中 JAK2 和 STAT3 表达上调,RIRI 大鼠视网膜中 JAK2 和 STAT3 的表达变化与视网膜形态损伤趋势一致,提示 JAK-STAT 通路参与 RIRI 的病理损伤过程。

【关键词】 视网膜;缺血-再灌注损伤;信号传导通路;视网膜神经节细胞;Janus 激酶信号转导子与转录激活子;SD 大鼠

基金项目:陕西省自然科学基金项目(2016JM8121)

Aggravation effects of JAK-STAT signaling pathway in retinal ischemia reperfusion injury Yang Le, Shi Rui, Shen Jiaquan, Xue Yushun

Department of Ophthalmology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China (Yang L, Shi R, Xue YS); Shandong Provincial People's Hospital, Jinan 250021, China (Shen JQ)

Corresponding author: Xue Yushun, Email: xue257758@sina.com

【Abstract】 **Background** Retinal ischemia reperfusion injury (RIRI) is a common pathological process of many retinal vascular diseases with comprehensive pathogenesis mechanism. Researches showed that apoptosis of retinal cells and nerve fiber loss is the finally common pathway of RIRI, and Janus kinase signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) pathway is a newly discovered signal transcript channel in recent years, which is involved in varieties of pathological processes. However, whether JAK-STAT pathway is associated with RIRI is still unelucidated. **Objective** This study was to investigate the time course of activation of JAK-STAT signal pathway

and its significance during RIRI. **Methods** Forty clear adult male Sprague-Dawley rats were randomized into RIRI 6-hour, 12-hour, 24-hour and 48-hour groups. RIRI models were induced in lateral eyes of the rats by perfusing normal saline solution into the anterior chamber to elevate intraocular pressure (IOP) to 110 mmHg for 60 minutes and then allowing reperfusion, and the fellow eyes of the rats served as normal control group. The rats were sacrificed and the eyeballs were enucleated at 6, 12, 24 and 48 hours after reperfusion. The expressions of JAK2 and STAT3 protein (absorbance) in the retinas were located and detected by immunohistochemistry, and the relative expression levels of JAK2 and STAT3 mRNA in the retinas were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The use and care of the rats followed the ARVO Statement. **Results** Immunohistochemistry showed that JAK2 and STAT3 were faintly expressed in inner nuclear layer and retinal ganglion cells (RGCs) in the normal control group and strongly expressed in various RIRI groups. Significant differences were found in the expression intensities of JAK2 and STAT3 protein among the five groups ($F = 88.735, 96.625$, both at $P < 0.01$). Compared with the normal control group, the expression intensities of JAK2 and STAT3 were enhanced in RIRI groups, with the peak values in RIRI 12-hour group (JAK2: $t = 4.308, 5.559, 5.315, 4.726$; all at $P < 0.01$. STAT3: $t = 5.047, 7.843, 6.281, 4.887$; all at $P < 0.01$). The thickening of inner retinal layer, loosening of retinal tissue, vacuolus degeneration of cells and decrease of RGCs were seen in the RIRI eyes. The relative expressing levels of the JAK2 mRNA and STAT3 mRNA in the retinas were significantly different among the groups ($F = 111.239, 129.539$; both at $P < 0.01$), and the relative expressing levels of JAK2 mRNA and STAT3 mRNA in the retinas were significantly increased in RIRI 6-hour, 12-hour, 24-hour and 48-hour groups in comparison with the normal control group (JAK2 mRNA: $t = 3.504, 5.102, 4.679, 4.213$; all at $P < 0.01$. STAT3 mRNA: $t = 6.541, 8.787, 5.693, 5.898$; all at $P < 0.01$). **Conclusions** The retinal morphology appears to be abnormal and RGCs are evidently decreased in rat eyes with RIRI, and the expressions of JAK2 and STAT3 in the retinas are simultaneously up-regulated, indicating that JAK-STAT signal pathway is involved during the RIRI process.

[**Key words**] Retina; Ischemia reperfusion injury; Signal transduction pathway; Retinal ganglion cells; Janus kinase signal transducer and activator of transcription; Rats, Sprague-Dawley

Fund program: Natural Science Foundation of Shaanxi Province (2016JM8121)

视网膜缺血-再灌注损伤 (retinal ischemia reperfusion injury, RIRI) 是眼科临床上常见的多种视网膜血管性疾病共同的病理损伤过程, 如视网膜中央动脉阻塞、急性闭角型青光眼等视网膜血管性病变, 临床表现为缺血性眼病视网膜血液再灌注后视网膜功能反而明显下降或进一步丧失。RIRI 的病理机制复杂, 研究表明视网膜细胞凋亡和神经纤维变性是 RIRI 最终的共同通路^[1-2]。Janus 激酶信号转导子与转录激活子 (Janus kinase signal transducer and activator of transcription, JAK-STAT) 信号通路是近年来新发现的信号转导途径, 广泛参与细胞的增生、分化、凋亡以及免疫调节等过程, 其不但参与血液系统、免疫系统、造血系统和肿瘤细胞的分化, 而且参与神经系统疾病的病理生理过程^[3-6]。该通路是否参与了 RIRI 病理损伤过程尚不清楚, 本研究拟通过观察 JAK2 与 STAT3 在大鼠 RIRI 过程中的表达变化, 探讨 JAK-STAT 信号通路在 RIRI 过程中可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 正常清洁级成年 SD 大鼠 40 只 (西安交通大学动物实验中心提供), 体质量 (200 ± 25) g, 雌雄不限。采用随机数字表法将大鼠随机分为

高眼压后 6 h、12 h、24 h 和 48 h 组, 每组 10 只, 任选一侧眼作为手术眼, 另一侧眼为正常对照, 不做任何处理。本研究方案通过西安交通大学医学院实验动物伦理委员会批准, 实验动物的喂养和使用遵循 ARVO 关于实验动物的伦理学声明。

1.1.2 主要试剂 质量分数 1% 异戊巴比妥钠 (异戊巴比妥钠 1 g 溶于 100 ml 蒸馏水); 兔抗鼠 STAT3 单克隆抗体、兔抗鼠 JAK2 多克隆抗体 (美国 Cell Signal 公司); 山羊抗兔 IgG 二抗、即用型链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物 (streptavidin-biotin complex, SABC) 免疫组织化学染色试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司); Trizol、实时荧光定量 PCR 试剂盒、JAK2 及 STAT3 GAPDH 引物 (日本 TakaRa 生物工程公司)。

1.2 方法

1.2.1 RIRI 模型的建立 参照文献 [7] 描述的方法建立大鼠 RIRI 模型。用 1% 异戊巴比妥钠 30 mg/kg 行大鼠腹腔内注射麻醉大鼠, 采用盐酸丙美卡因滴眼液点眼行眼表面麻醉。将连接生理盐水瓶输液管的 4 号半头皮针沿颞侧角膜缘穿刺进入大鼠眼前房, 将输液瓶升高至距大鼠 150 cm 处, 使大鼠眼压升高至 110 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa), 此时可见大鼠球结膜苍白, 虹膜色泽迅速变白, 直接检眼镜下可见视网膜苍白。持续形成高眼压后 60 min 拔出输液针头, 可见

虹膜及球结膜颜色迅速恢复正常,视网膜恢复橘红色,视为 RIRI 造模成功。

1.2.2 组织病理学观察模型鼠视网膜结构变化 取模型眼及自身对照眼常规石蜡包埋,平行于视神经矢状轴切片。在视神经周围 2 mm 内连续切片 4 张,切片厚度为 5 μm ,置于防脱预处理的载玻片上,60 $^{\circ}\text{C}$ 温箱烤片过夜,常规苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察视网膜组织结构变化。

1.2.3 免疫组织化学染色法检测和定位大鼠视网膜中 STAT3 和 JAK2 的表达 分别于造模后 6、12、24 和 48 h,各组任意颈椎脱臼法处死 5 只 SD 大鼠,摘除眼球后,常规石蜡包埋,平行于视神经矢状轴切片。在视神经周围 2 mm 内连续切片 4 张,切片厚度约为 5 μm ,用于免疫组织化学染色。石蜡切片脱蜡至水,热修复抗原,切片上滴加质量分数 3% H_2O_2 封闭抗原,分别滴加兔抗鼠 STAT3 单克隆抗体(1:200)和兔抗鼠 JAK2 多克隆抗体(1:200),4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育过夜,复温并 PBS 漂洗 3 次,每次 3 min;滴加山羊抗兔 IgG(1:200),室温孵育 50 min,常规 DAB 染色,封片。光学显微镜下观察,细胞核或细胞质和/或细胞膜上出现较多棕黄色颗粒者为阳性反应,无棕黄色颗粒出现为阴性表达。在 LEICA IM50 型全自动医学图像分析系统 400 倍光学显微镜下每张切片根据距视盘距离,平均选取 4 个视野进行分析,开启 Leica Qwin V3 免疫组织化学分析系统程序,并以无阳性产物处吸光度为背景值以获得平均吸光度(A)值。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 法检测视网膜组织中 JAK2 mRNA 和 STAT3 mRNA 的表达 各组分别任意颈椎脱臼法处死 5 只 SD 大鼠,摘除眼球后立即置于冰上,剪除角膜,去除晶状体和玻璃体,用显微镊剥离视网膜,置于经高压消毒并焦碳酸二乙酯(diethylpyocarbonate, DEPC)处理过的 EP 管中,立即置于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 深低温冰箱中保存。按 Trizol 试剂盒说明书提取大鼠视网膜组织总 RNA,采用实时荧光定量 PCR 法扩增目的基因。从基因库 GeneBank 中查出相关引物序列,由 TaKaRa 生物工程公司合成。JAK2 上游引物:5'-GGTTCATTCAGCAGTTCAGTCA-3';下游引物:5'-GCAGGCTCTCCAGGTTTATG-3'。STAT3 上游引物:5'-TACCACAAAAGTCAGGTTGCT-3';下游引物:5'-ACATCCCCAGAGTCCTTATCAA-3'。GAPDH 上游引物:5'-CGCATTGCCAGACATATCAGC-3';下游引物:5'-AGGTGAAGCAGGCTCAATCAA-3'。PCR 反应体系为 25 μl ,反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,循环 40 次。以 GAPDH 作为内

参照,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各目的基因的相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。本研究中各指标的数据资料经 Sapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组数据经 Levene 法检验证实方差齐性。采用完全随机分组单因素干预多水平研究设计,正常对照组以及 RIRI 6、12、24 和 48 h 组间视网膜中 JAK2 和 STAT3 蛋白表达强度(A 值)及其 mRNA 相对表达量的总体差异比较均采用单因素方差分析,组间多重比较均采用 Dunnett *t* 检验。采用双尾检验法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RIRI 模型鼠视网膜组织病理学变化

正常对照眼视网膜各层结构清晰,视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)排列整齐,细胞数目较多,无空泡变性。RIRI 模型眼视网膜内层增厚、视网膜组织结构疏松和空泡变性,RGCs 数量减少(图 1)。

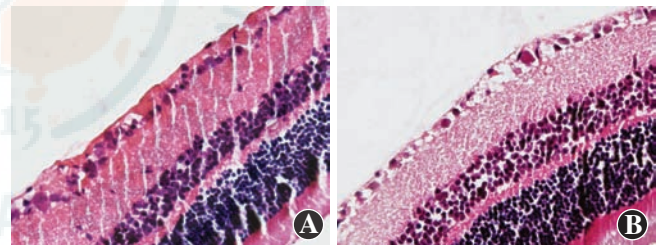


图 1 正常对照组和 RIRI 组大鼠视网膜组织病理学观察(DAB $\times 400$)

A:正常对照眼视网膜各层结构清晰,RGCs 排列整齐,细胞数目较多,无空泡变性 B:RIRI 组视网膜内层增厚、视网膜组织结构疏松和空泡变性,RGCs 数量减少

2.2 各组大鼠视网膜中 JAK2 及 STAT3 蛋白的表达

正常大鼠视网膜中 JAK2 及 STAT3 蛋白呈弱阳性表达,RIRI 模型鼠视网膜内核层细胞和 RGCs 细胞核呈黄色或棕黄色染色。RIRI 12 h 组大鼠视网膜中 JAK2 及 STAT3 表达最强(图 2,3)。正常对照组及 RIRI 6 h、12 h、24 h 和 48 h 组间视网膜中 JAK2 和 STAT3 蛋白表达强度的总体比较差异均有统计学意义(JAK2: $F=88.735, P=0.000$; STAT3: $F=96.625, P=0.000$);与正常对照组比较,RIRI 6 h 组大鼠视网膜中 JAK2 及 STAT3 蛋白表达强度(A 值)均增加,RIRI 12 h 组达峰值,RIRI 24 h 组和 RIRI 48 h 组大鼠视网膜中 JAK2 及 STAT3 蛋白表达强度逐渐减弱,但均强于正常对照组,差异均有统计学意义(JAK2: $t=4.308, 5.559, 5.315, 4.726$,均 $P<0.01$; STAT3: $t=5.047, 7.843, 6.281, 4.887$,均 $P<0.01$)(表 1)。

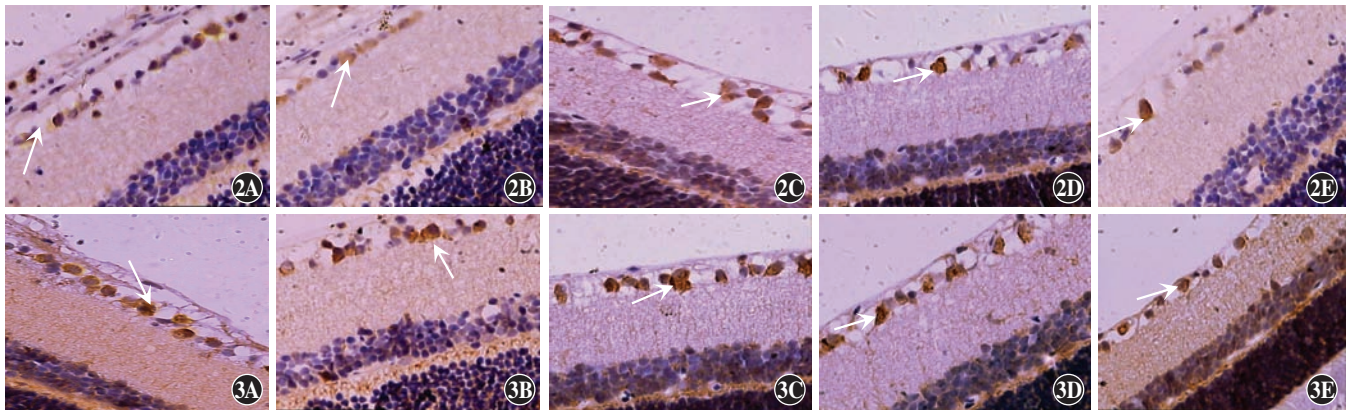


图 2 各组大鼠视网膜中 STAT3 的表达及定位 (DAB ×400) A: 正常对照组大鼠视网膜 RGCs 层细胞中 STAT3 呈微弱表达, 为淡黄色染色 (箭头) B: RIRI 6 h 组大鼠视网膜 RGCs 层细胞中 STAT3 呈中等强度表达, 为棕黄色染色 (箭头) C: RIRI 12 h 组大鼠视网膜 RGCs 层细胞中 STAT3 呈强阳性表达, 为棕黄色染色 (箭头) D: RIRI 24 h 组大鼠视网膜 RGCs 层细胞中 STAT3 呈强阳性表达, 为棕黄色染色 (箭头) E: RIRI 48 h 组大鼠视网膜 RGCs 层细胞中 STAT3 呈中等强度阳性表达, 表达强度弱于 RIRI 12 h 组, 为棕黄色染色 (箭头) **图 3 各组大鼠视网膜中 JAK2 的表达及定位 (DAB ×400)** A: 正常对照组大鼠视网膜 RGCs 层中 JAK2 呈弱阳性表达, 为淡黄色染色 (箭头) B: RIRI 6 h 组大鼠视网膜 RGCs 层中呈强阳性表达, 为棕黄色染色 (箭头) C: RIRI 12 h 组大鼠视网膜 RGCs 层中 JAK2 呈强阳性表达, 为棕黄色染色 (箭头) D: RIRI 24 h 组大鼠视网膜 RGCs 层中 JAK2 呈强阳性表达, 为棕黄色染色 (箭头) E: RIRI 48 h 组大鼠视网膜 RGCs 层中 JAK2 呈中等强阳性表达, 为棕黄色染色 (箭头)

表 1 各组大鼠视网膜中 JAK2 和 STAT3 蛋白相对表达强度 ($\bar{x} \pm s, A$ 值)

| 组别 | 样本量 | JAK2 | STAT3 |
|-------------|-----|----------------------------|----------------------------|
| 正常对照组 | 20 | 0.112 ± 0.014 | 0.129 ± 0.014 |
| RIRI 6 h 组 | 5 | 0.209 ± 0.023 ^a | 0.361 ± 0.036 ^a |
| RIRI 12 h 组 | 5 | 0.253 ± 0.025 ^a | 0.527 ± 0.015 ^a |
| RIRI 24 h 组 | 5 | 0.231 ± 0.032 ^a | 0.473 ± 0.038 ^a |
| RIRI 48 h 组 | 5 | 0.212 ± 0.014 ^a | 0.222 ± 0.036 ^a |
| F 值 | | 88.735 | 96.625 |
| P 值 | | 0.000 | 0.000 |

注: 与各自的正常对照组比较, ^a $P < 0.01$ (单因素方差分析, Dunnett t 检验) JAK: 酪氨酸激酶; STAT: 转录激活子; RIRI: 视网膜缺血-再灌注损伤

表 2 各组大鼠视网膜中 JAK2 mRNA 和 STAT3 mRNA 的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 眼数 | JAK2 mRNA | STAT3 mRNA |
|-----------|----|----------------------------|----------------------------|
| 正常对照组 | 20 | 0.437 ± 0.041 | 0.987 ± 0.036 |
| RIRI 6 h | 5 | 0.842 ± 0.032 ^a | 1.445 ± 0.047 ^a |
| RIRI 12 h | 5 | 1.665 ± 0.042 ^a | 2.012 ± 0.089 ^a |
| RIRI 24 h | 5 | 1.212 ± 0.067 ^a | 1.923 ± 0.064 ^a |
| RIRI 48 h | 5 | 1.045 ± 0.079 ^a | 1.609 ± 0.055 ^a |
| F 值 | | 111.239 | 129.539 |
| P 值 | | 0.000 | 0.000 |

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.01$ (单因素方差分析, Dunnett t 检验) JAK: 酪氨酸激酶; STAT: 转录激活子; RIRI: 视网膜缺血-再灌注损伤

2.3 各组大鼠视网膜中 JAK2 mRNA 及 STAT3 mRNA 的表达

正常对照组大鼠视网膜中 JAK2 mRNA 及 STAT3 mRNA 表达较弱, 各时间点 RIRI 模型鼠视网膜中 JAK2 mRNA 及 STAT3 mRNA 的表达均明显上调, JAK2 mRNA 及 STAT3 mRNA 均在 RIRI 后 12 h 表达最强。各组间 JAK2 mRNA 及 STAT3 mRNA 总体比较差异均有统计学意义 ($F = 111.239, 129.539$, 均 $P < 0.01$); 其中 RIRI 6 h、12 h、24 h 和 48 h 组大鼠视网膜中 JAK2 和 STAT3 mRNA 均较正常对照组明显增加, 差异均有统计意义 (JAK2 mRNA: $t = 3.504, 5.102, 4.679, 4.213$, 均 $P < 0.01$; STAT3 mRNA: $t = 6.541, 8.787, 5.693, 5.898$, 均 $P < 0.01$) (表 2)。

3 讨论

RIRI 常发生于缺血性视神经病变、视网膜中央动脉阻塞、急性闭角型青光眼等视网膜血管阻塞所引起的缺血性眼病, 表现为视网膜血管血液再灌注后视网膜组织损伤不缓解, 反而造成视网膜形态的继续破坏, 加剧 RGCs 的凋亡, 视网膜功能进一步损害, 并最终导致视力丧失^[8]。目前 RIRI 的发生机制尚不明确, 主要的学说有氧自由基损伤、细胞内钙超载、兴奋性氨基酸、细胞凋亡等^[9]。Miyaki 等^[10]的研究显示, 在 RIRI 中细胞凋亡是 RGCs 损伤的主要形式。本实验采用升高眼压的方法建立大鼠 RIRI 模型, 光学显微镜下显示 RIRI 后视网膜内层增厚、视网膜组织结构疏松和空泡变性, RGCs 数量减少, 与文献报道一致^[11-12]。

JAK-STAT 信号转导系统是近年来新发现的一条信号转导途径, 涉及细胞增生、肿瘤形成、细胞分化及凋亡以及免疫调节等过程。Negoro 等^[13]研究发现, 心

肌梗死区及其边缘区域组织中均有 STAT3 的磷酸化, JAK2 抑制剂 AG490 能抑制 STAT3 的磷酸化, 增强心肌 caspase3 活性和 bax 的表达, 同时心肌梗死区边缘心肌细胞的凋亡量明显增加, 说明 JAK-STAT 通路的激活能阻止梗死后的心肌细胞凋亡。Wen 等^[14] 采用免疫组织化学法和 Western blot 法检测小鼠持久性局灶性脑缺血后 STAT3 的磷酸化水平, 发现缺血后 6 h 缺血区组织中可检测到磷酸化的 STAT3, 缺血后 24 h 其水平达峰, 而在缺血区的对侧组织中未检测到磷酸化 STAT3, 同时发现在缺血区周围 60% 的 TUNEL 阳性细胞可表达磷酸化 STAT3p-STAT3 抗体, 提示 STAT3 与脑缺血后中枢神经细胞凋亡之间存在一定的关联。

JAK-STAT3 信号通路是否参与了急性 RIRI 病理生理过程目前尚不十分清楚。本研究通过免疫组织化学法及实时荧光定量 PCR 法测定 JAK2 和 STAT3 在 RIRI 大鼠视网膜中的动态表达变化, 发现正常大鼠视网膜内 STAT3 和 JAK2 呈弱表达, RIRI 模型鼠视网膜内核层和 RGCs 层 STAT3 及 JAK2 表达明显增强, 视网膜内层组织结构疏松及 RGCs 减少。实时荧光定量 PCR 结果显示, 造模后各时间点大鼠视网膜中 STAT3 和 JAK2 mRNA 表达量较正常对照组增加, 造模后 6 h 大鼠视网膜中 STAT3 和 JAK2 mRNA 的表达明显上调, 造模后 12 h 达峰, 造模后 24 h 逐渐下降, 提示 JAK-STAT 通路参与 RIRI 的病理损伤过程, 从 STAT3 及 JAK2 在大鼠视网膜中表达的动态变化与 RGCs 凋亡发生的时间顺序推测, JAK-STAT 途径的激活过程与 RGCs 凋亡有关。

Boyd 等^[15] 在 RGCs 体外培养液中加入白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10), 发现 RGCs 的凋亡率从 (68.5±3.4)% 降至 (28.2±2.3)% , STAT3 蛋白持续升高 30 min, 提示 IL-10 通过 JAK-STAT 通路对 RGCs 发挥保护作用。Ji 等^[16] 采用免疫组织化学法和 Western blot 法检测发现, 大鼠眼压升高后 6~24 h RGCs 层和内核层磷酸化 STAT3 呈阳性表达, 激活的 STAT3 主要分布在 Müller 细胞、RGCs 和星形胶质细胞, 大鼠玻璃体腔内注射睫状神经营养因子后磷酸化 STAT3 呈高表达且持续 2 周, 由此推测 JAK-STAT 通路与慢性高血压 RGCs 凋亡有关。本研究的局限性在于仅从形态学方面观察了 RGCs 的凋亡, 并未对凋亡的 RGCs 进行定量检测。此外, 在 RIRI 复杂的发病机制中 JAK-STAT 通路如何参与 RGCs 凋亡的调控尚有待进一步研究。

参考文献

[1] Chen B, Tang L. Protective effects of catalase on retinal ischemia/

reperfusion injury in rats [J]. *Exp Eye Res*, 2011, 93 (5) : 599-606. DOI:10.1016/j.exer.2011.07.007.

[2] 李娟娟, 李燕, 汤志伟. Cx3cr1 抗体玻璃体腔注射对视网膜缺血-再灌注损伤大鼠视网膜神经元的保护作用及机制 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2016, 34 (1) : 35-41. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.01.007.

Li JJ, Li Y, Tang ZW. The protective effects and mechanisms of cx3cr1 antibody on retinal neuron in rats with ischemia reperfusion injury by intravitreal injection [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2016, 34 (1) : 35-41. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.01.007.

[3] Nicolae A, Xi L, Pham TH, et al. Mutations in the JAK/STAT and RAS signaling pathways are common in intestinal T-cell lymphomas [J]. *Leukemia*, 2016, 30 (11) : 2245-2247. DOI:10.1038/leu.2016.178.

[4] 刘春来, 刘红雨, 陈军. SOCS 家族分子在肿瘤发生发展中的作用 [J]. *中国肺癌杂志*, 2016, 19 (9) : 620-625. DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2016.09.11.

Liu CL, Liu HY, Chen J. The role of SOCS in the development of tumors [J]. *Chin J Lung Cancer*, 2016, 19 (9) : 620-625. DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2016.09.11.

[5] Liu S, Mi WL, Li Q, et al. Spinal IL-33/ST2 signaling contributes to neuropathic pain via neuronal CaMKII-CREB and astroglial JAK2-STAT3 cascades in mice [J]. *Anesthesiology*, 2015, 123 (5) : 1154-1169. DOI:10.1097/ALN.0000000000000850.

[6] Xue ZJ, Shen L, Wang ZY, et al. STAT3 inhibitor WP1066 as a novel therapeutic agent for bCCI neuropathic pain rats [J]. *Brain Res*, 2014, 1583 : 79-88. DOI:10.1016/j.brainres.2014.07.015.

[7] 王传富, 潘晓晶, 金梅玲, 等. 脑神经生长素治疗兔急性高血压视网膜损伤 [J]. *中华眼底病杂志*, 2000, 16 (2) : 88-90.

Wang CF, Pan XJ, Jin ML, et al. Experimental study of the effects of CNG on the optic nerve injured by acute ocular hypertension [J]. *Chin J Ocular Fundus Dis*, 2000, 16 (2) : 88-90.

[8] Kim BJ, Braun TA, Wordinger RJ, et al. Progressive morphological changes and impaired retinal function associated with temporal regulation of gene expression after retinal ischemia/reperfusion injury in mice [J/OL]. *Mol Neurodegener*, 2013, 8 : 21 [2016-10-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3695831/>. DOI:10.1186/1750-1326-8-21.

[9] 吴江, 李一壮, 钱涛. 自由基与视网膜缺血-再灌注损伤 [J]. *眼科研究*, 2003, 21 (2) : 213-216.

Wu J, Li YZ, Qian T. Free radicals and retinal ischemia-reperfusion injury [J]. *Chin Ophthalmol*, 2003, 21 (2) : 213-216.

[10] Miyaki K, Matsubara A, Nishiwaki A, et al. Pitavastatin attenuates leukocyte-endothelial interactions induced by ischemia-reperfusion injury in the rat retina [J]. *Curr Eye Res*, 2009, 34 (1) : 10-17. DOI: 10.1080/02713680802579196.

[11] 施宇华, 丁颖, 黄振平, 等. 缺血后适应对视网膜缺血-再灌注损伤的保护作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2014, 32 (1) : 46-50. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.01.010.

Shi YH, Ding Y, Huang ZP. Protection of ischemic postconditioning from retinal ischemia reperfusion injury in rat [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2014, 32 (1) : 46-50. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.01.010.

[12] 胡世兴, 王萧, 林少春, 等. 缺血再灌注损伤诱导大鼠视网膜细胞凋亡 [J]. *中华眼底病杂志*, 2002, 18 (4) : 296-298.

Hu SX, Wang X, Lin SC, et al. Ischemia-reperfusion insult induced apoptosis of rats' retinal cells [J]. *Chin J Ocul Fund Dis*, 2002, 18 (4) : 296-298.

[13] Negoro S, Kunisada K, Tone E, et al. Activation of JAK/STAT pathway transduces cytoprotective signal in rat acute myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 47 (4) : 797-805.

[14] Wen TC, Peng H, Hata R, et al. Induction of phosphorylated-Stat3 following focal cerebral ischemia in mice [J]. *Neurosci Lett*, 2001, 303 (3) : 153-156.

[15] Boyd ZS, Kriatchko A, Yang J, et al. Interleukin-10 receptor signaling through STAT-3 regulates the apoptosis of retinal ganglion cells in response to stress [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44 (12) : 5206-5211.

[16] Ji JZ, Elyaman W, Yip HK, et al. CNTF promotes survival of retinal ganglion cells after induction of ocular hypertension in rats; the possible involvement of STAT3 pathway [J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 19 (2) : 265-272.

(收稿日期: 2017-01-09)

(本文编辑: 尹卫靖 张宇)