

AG490 抑制 STAT3 信号通路活性对豚鼠形觉剥夺性近视巩膜重塑的调控

朱子诚 吴章友 温跃春 柯根杰

【摘要】 背景 近年来研究发现, JAK/信号转导及转录激活蛋白 3(STAT3) 信号转导通路在近视形成和发展中发挥重要作用, AG490 是 JAK 的一种特异抑制剂, 因此可抑制 JAK2/STAT 信号转导, 但 AG490 是否能抑制或延缓近视的进展尚不清楚。目的 探讨玻璃体腔注射酪氨酸激酶选择性抑制剂 AG490 后 STAT3 信号通路的活性及其对豚鼠形觉剥夺性近视(FDM)过程中巩膜重塑的影响。方法 采用随机数字表法将 40 只豚鼠随机分为正常对照组、模型对照组、PBS 对照组和 AG490 治疗组, 其中模型对照组、PBS 对照组和 AG490 治疗组均用半透明眼罩遮盖右眼 4 周以制备 FDM 模型, 自遮盖当天向 PBS 对照组和 AG490 治疗组豚鼠实验眼玻璃体腔分别注射 PBS 或 AG490 各 5 μ l, 每 2 天注射 1 次, 至遮盖结束。分别于实验前及实验后 4 周检测各组豚鼠双眼的屈光度和眼轴长度, 实验 4 周时摘取实验眼眼球制备巩膜组织切片, 采用常规组织病理学检查观察实验眼巩膜的形态学改变, 采用免疫组织化学及逆转录 PCR(RT-PCR) 技术检测各组实验眼巩膜组织中 STAT3、p-STAT3、基质金属蛋白酶 2(MMP-2) 蛋白及其 mRNA 的表达。结果 与正常对照组比较, 模型对照组、PBS 对照组和 AG490 治疗组豚鼠实验眼的近视屈光度增加, 眼轴明显增长, AG490 治疗组眼轴长度分别短于模型对照组和 PBS 对照组, 4 个组间差异均有统计学意义(屈光度: $F = 89.063, P = 0.000$; 眼轴长度: $F = 96.145, P = 0.000$)。正常对照组豚鼠巩膜组织中 STAT3、MMP-2、p-STAT3 表达极微弱, AG490 治疗组巩膜组织中 STAT3、p-STAT3、MMP-2 相对表达量(A 值)分别为 0.064 ± 0.016 、 0.019 ± 0.002 和 0.155 ± 0.052 , 分别低于模型对照组的 0.129 ± 0.008 、 0.071 ± 0.021 、 0.425 ± 0.004 和 PBS 对照组的 0.130 ± 0.004 、 0.069 ± 0.002 、 0.421 ± 0.042 , 差异均有统计学意义(STAT3: $t = 4.641, 9.364$, 均 $P < 0.01$; p-STAT3: $t = 4.638, 4.488$, 均 $P < 0.05$; MMP-2: $t = 9.123, 9.029$, 均 $P < 0.05$), AG490 治疗组的表达仍高于正常对照组($t = 2.674, 2.251, 2.682$, 均 $P < 0.05$)。AG490 治疗组巩膜组织 STAT3 mRNA 和 MMP-2 mRNA 的相对表达量分别为 0.295 ± 0.032 和 0.569 ± 0.019 , 明显低于模型对照组的 0.547 ± 0.015 和 0.782 ± 0.051 以及 PBS 对照组的 0.544 ± 0.015 和 0.779 ± 0.048 , 差异均有统计学意义(STAT3 mRNA: $t = 10.115, 11.703$, 均 $P < 0.01$; MMP-2 mRNA: $t = 9.218, 9.494$, 均 $P < 0.01$), 但与正常对照组 STAT3 mRNA 水平比较仍有明显上调, 差异均有统计学意义($t = 2.576, 3.565$, 均 $P < 0.05$)。结论 AG490 可一定程度上阻断 FDM 眼巩膜组织中 STAT3 信号转导通路的激活, 进而调控其下游靶基因 MMP-2 的转录和表达, 减缓 FDM 眼巩膜的重塑过程, 从而一定程度上抑制轴性近视的进展。

【关键词】 近视/预防和控制; 巩膜; 眼/生长和发育; 形觉剥夺; Janus 激酶 2/拮抗剂和抑制剂; STAT3 转录因子/拮抗剂和抑制剂; 信号转导/药物作用; 动物模型; 豚鼠

Arresting effect of AG490 inhibiting activation of STAT3 signaling pathway on sclera remodeling in guinea pigs with form-deprived myopia Zhu Zicheng, Wu Zhangyou, Wen Yuechun, Ke Genjie. Department of

Ophthalmology, Anhui Province Hospital Affiliated Anhui Medical University, Hefei 230001, China

Corresponding author: Zhu Zicheng, Email: zczhu123@163.com

【Abstract】 **Background** JAK/ signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signal pathway plays a critical role during the sclera remodeling of experimental myopia. As a tyrosine kinase inhibitor, AG490 can

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.06.003

基金项目:安徽省卫生厅医学科研课题项目(13zc046)

作者单位:230001 合肥,安徽医科大学附属医院眼科

通信作者:朱子诚, Email: zczhu123@163.com

inhibit the activation of this pathway. But whether AG490 plays a role in delaying the development of myopia is not completely clear. **Objective** This study was to investigate the inhibition of AG490 to activation of STAT3 signaling pathway and the sequential arresting effect on the sclera remodeling in form-deprived myopia (FDM) models.

Methods Forty guinea pigs were randomly divided into the normal control group, model control group, PBS control group and AG490 treatment group. FDM models were established by the occlusion of the right eyes of guinea pigs for consecutive 4 weeks using translucent goggles in the model control group, PBS control group and AG490 treated group, and 25 μ l PBS or AG490 were respectively injected into vitreous since the first day of modeling in two-day interval till the fourth week in the PBS control group and AG490 treated group. Refractive state and axial length were examined with retinoscopy and A-scan ultrasonography before and 4 weeks after experiment. The experimental eyes were extracted in the fourth week, and the expressions of scleral STAT3, p-STAT3, metal matrix proteinase-2 (MMP-2) proteins and STAT3 mRNA, MMP-2 mRNA were detected by immunocytochemistry and semi-quantitative reverse transcription PCR (RT-PCR) respectively. The use and care of experimental animals followed ARVO. **Results**

Compared to the normal control group, the negative refraction power and axial length were significantly increased in the model control group, PBS control group and AG490 treated group, and the axial length in the AG490 treated group was smaller than those in the model control group and PBS control group, showing significant differences among the 4 groups (refraction: $F=89.063, P=0.000$; axial length: $F=96.145, P=0.000$). The expressions of STAT3, MMP-2 and p-STAT3 in scleral tissue were weaker in the normal control group. The expressional values (*A* values) of STAT3, p-STAT3 and MMP-2 were $0.064 \pm 0.016, 0.019 \pm 0.002$ and 0.155 ± 0.052 in the AG490 treated group, which were lower than $0.129 \pm 0.008, 0.071 \pm 0.021, 0.425 \pm 0.004$ of the model control group and $0.130 \pm 0.004, 0.069 \pm 0.002, 0.421 \pm 0.042$ of the PBS control group (STAT3: $t=4.641, 9.364$, both at $P<0.01$; p-STAT3: $t=4.638, 4.488$, both at $P<0.05$; MMP-2: $t=9.123, 9.029$, both at $P<0.05$), however, these expressions were still higher than those of the normal control group ($t=2.674, 2.251, 2.682$, all at $P<0.05$). The expressional levels (*A* values) of STAT3 mRNA and MMP-2 mRNA in the AG490 treated group were 0.295 ± 0.032 and 0.569 ± 0.019 , which were significantly lower than 0.547 ± 0.015 and 0.782 ± 0.051 in the model group as well as 0.544 ± 0.015 and 0.779 ± 0.048 in the PBS control group (STAT3 mRNA: $t=10.115, 11.703$, both at $P<0.01$; MMP-2 mRNA: $t=9.218, 9.494$, both at $P<0.01$). The expressional levels (*A* values) of STAT3 mRNA and MMP-2 mRNA in the AG490 treated group were still higher than those in the normal control group ($t=2.576, 3.565$, both at $P<0.05$).

Conclusions AG490 can ultimately inhibit the development of axial myopia by arresting the activation of STAT3 signaling pathway in the FDM eyes and further regulating the expression of MMP-2 in sclera and delaying the remodeling of sclera.

[Key words] Myopia/prevention & control; Sclera; Eye/growth & development; Form deprivation; Janus kinase 2/antagonists & inhibitors; STAT3 transcription factor/antagonists & inhibitors; Signal transduction/drug effects; Disease models, animal; Guinea pig

既往研究表明, JAK/信号转导及转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号转导通路参与豚鼠形觉剥夺性近视的形成与发展, 激活的 STAT3 信号通路可能通过对基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP-2) 基因的直接转录激活作用参与近视眼巩膜的主动重塑过程^[1-3], 提示阻断 STAT3 信号通路的激活有可能对异常巩膜重塑发挥抑制作用, 从而抑制近视的发展。AG490 是一种人工合成的苯亚甲基丙二腈脂类衍生物, 分子式为 $C_{17}H_{14}N_{203}$, 结构类似酪氨酸, 是 JAK 酪氨酸激酶选择性抑制剂, 可以阻断 JAK 激酶活化, 进而影响 STAT 激活, 因此可抑制 JAK2/STAT 信号转导^[4]。本研究采用玻璃体腔注射给药的方式, 观察 AG490 对豚鼠实验性

近视的抑制作用, 同时采用免疫组织化学及逆转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) 技术检测豚鼠巩膜组织内 AG490 对 STAT3、p-STAT3 及其下游靶基因 MMP-2 表达的影响, 进一步明确 STAT3 信号通路在近视巩膜重塑中的作用及 AG490 对近视的抑制作用, 为抑制近视形成药物的进一步开发研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及仪器 AG490 (美国 Calbiochem 公司); 鼠抗人 STAT3 单克隆抗体 (sc-8019)、鼠抗人 p-STAT3 (结合位点 Tyr-705) 单克隆抗体 (sc-8059) (美

国 Santa Cruz 公司);兔抗人 MMP-2 多克隆抗体 (BA3716) (武汉博士德公司);RT-PCR、cDNA 试剂盒 (大连宝生物工程有限公司)。带状检影仪 (苏州六六视觉科技股份有限公司);A 型超声 (美国博士伦公司)。

1.1.2 实验动物 清洁级 1 周龄三色豚鼠 40 只, 体重 100 ~ 140 g, 雌雄兼用, 排除眼部疾患, 在安徽医科大学附属省立医院医学科研大楼动物中心饲养, 室内采用冷白色荧光灯光源, 12 h 光照/12 h 黑暗, 室内温度为 25 °C。在光照时间内供给动物充足的食物和水。实验动物的使用和喂养遵循 ARVO 有关动物使用条款。本研究经安徽医科大学附属省立医院伦理委员会审查批准。采用随机数字表法将 40 只豚鼠随机分为正常对照组、模型对照组 (遮盖 4 周)、PBS 对照组 (遮盖 4 周+PBS 玻璃体腔注射) 和 AG490 治疗组 (遮盖 4 周+25 μmol/L AG490 玻璃体腔注射), 每组 10 只。除正常对照组外, 各组动物均以右眼为实验眼, 制备形觉剥夺性近视 (form deprivation myopia, FDM) 模型。

1.2 方法

1.2.1 FDM 模型的建立与取材 参照文献 [1-2, 4] 描述的方法制作 FDM 模型, 将直径为 15 mm 的半透明眼罩用 502 胶粘于豚鼠眼周围的皮肤上, 遮盖时间均为 4 周。按照分组情况, 于遮盖当天开始 (4 周结束) 通过外眦角预留的小孔用连有直径 0.45 mm 针头的 25 μl 微量注射器经角巩膜缘后 1.0 mm 向玻璃体腔分别注射 PBS 或 AG490, 注射量均为 5 μl, 每隔 2 天注射 1 次, 共 10 次。末次注射后 24 h 摘除眼罩行视网膜检影验光及眼轴测量。予以氯胺酮深度麻醉后快速摘除右侧眼球, 取各组巩膜组织制备切片。取各组常规组织病理学检查和免疫组织化学检测后剩余的眼部组织, 分离巩膜置 -80 °C 冰箱中保存备用, 用于 STAT3 mRNA 和 MMP-2 mRNA 测定。

1.2.2 免疫组织化学染色检测巩膜组织中 STAT3、p-STAT3 和 MMP-2 蛋白的表达 各组均处死 6 只豚鼠, 立即摘除右侧眼球, 质量分数 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋, 于眼球近后极部连续切片 7 张, 每张切片厚 5 μm, 其中 1 张用于苏木精-伊红染色, 1 张作为阴性对照, 5 张用于免疫组织化学染色。石蜡切片常规脱水、水化, 按一抗说明书要求进行抗原修复, 分别滴加 STAT3 (1:150)、p-STAT3 (1:150)、MMP-2 (1:200) 一抗, 置于 37 °C 中孵育 2 h, PBS 冲洗, 分别滴加鼠抗人 IgG 二抗 (1:100), 37 °C 孵育 30 min, DAB 显色, 苏木素复染, 常规脱水、透明、封片。免疫组织化学检测结果以背景清晰、细胞质或细胞核中出现黄色或

棕黄色着染为阳性。阳性细胞结果判定标准: 细胞质中有黄色或棕黄色颗粒者为 STAT3 和 MMP-2 阳性细胞, 细胞核中有黄色或棕黄色颗粒者为 p-STAT3 阳性细胞。任意选取后部巩膜各 10 个部位进行图像扫描, 对图像进行分析, 目的蛋白的相对表达量用吸光度 (A) 表示。图像评价遵循双盲原则。

1.2.3 RT-PCR 法检测巩膜中 STAT3 mRNA 和 MMP-2 mRNA 的表达 按 Trizol 说明书提取巩膜组织总 RNA, 逆转录后用 MMP-2、STAT3 基因引物进行 PCR 扩增, 以 β-actin 作参照。引物序列由北京奥科公司设计合成 (表 1)。STAT3 PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 45 s, 57 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 32 个循环, 72 °C 再延伸 5 min 至 4 °C。MMP-2 PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 34 个循环, 72 °C 再延伸 5 min 至 4 °C。取产物 5 μl 与上样缓冲液混合后进行质量分数 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 用 GEL DOC2000 凝胶成像系统扫描分析仪分析, 分别计算 STAT3 mRNA 和 MMP-2 mRNA 的相对表达量。

表 1 目的基因引物序列

基因	引物序列	产物大小 (bp)
MMP-2	F: 5'-CTCGTCGGACCTCTCAGGGT-3'	340
	R: 5'-GGTTCCTGTCCCACTTGGGC-3'	
STAT3	F: 5'-GGAGGAGGCATTCGGAAGTA-3'	120
	R: 5'-CTGCAGGTCGTTGGTGT CAC-3'	
β-actin	F: 5'-CGTTGACATCCGTAAGGACCTC-3'	535
	R: 5'-GGTGGAGAGTGAGCCAGGA-3'	

注: MMP: 基质金属蛋白酶; STAT: 信号转导及转录激活蛋白

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计学软件 (序列号: 9A657E90-E2B7-44DE-8929-055948162595, 美国 IBM 公司) 进行统计分析。本研究测量指标的数据资料经 W 检验证实呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用完全随机分组 4 个水平单因素干预实验设计, 正常对照组、模型对照组、PBS 对照组和 AG490 治疗组间各检测指标的总差异比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Tukey post hoc 检验。采用双尾检测法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组豚鼠实验眼屈光度和眼轴长度的比较

正常对照组、模型对照组、PBS 对照组、AG490 治

豚鼠实验眼屈光度明显不同, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 89.063, P = 0.000$), 其中模型对照组、PBS 对照组、AG490 治疗组实验眼的近视屈光度增加, 与正常对照组比较差异均有统计学意义 ($t = 12.353, 10.732, 16.266$, 均 $P < 0.05$), AG490 治疗组较模型对照组和 PBS 对照组眼近视屈光度分别减少了 2.404 D 和 2.405 D, 差异均有统计学意义 ($t = 8.389, 9.680$, 均 $P < 0.05$), 而模型对照组和 PBS 对照组间豚鼠实验眼屈光度差异无统计学意义 ($t = 0.647, P = 0.584$) (表 2)。

正常对照组、模型对照组、PBS 对照组和 AG490 治疗组豚鼠实验眼的眼轴长度明显不同, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 96.145, P = 0.000$), 其中模型对照组、PBS 对照组、AG490 治疗组豚鼠实验眼的眼轴长度均明显长于正常对照组, 差异均有统计学意义 ($t = -11.546, -13.286, -15.140$, 均 $P < 0.05$); 模型对照组与 PBS 对照组比较差异无统计学意义 ($t = -1.021, P = 0.415$), 而 AG490 治疗组豚鼠实验眼眼轴明显短于模型对照组和 PBS 对照组, 差异均有统计学意义 ($t = 15.495, 14.567$, 均 $P < 0.05$) (表 2)。

表 2 各组豚鼠眼屈光度和眼轴长度的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	屈光度 (D)	眼轴长度 (mm)
正常对照组	10	+1.689 ± 0.014	7.116 ± 0.040
模型对照组	10	-3.472 ± 0.017 ^a	8.155 ± 0.000 ^a
PBS 对照组	10	-3.473 ± 0.007 ^a	8.157 ± 0.004 ^a
AG490 治疗组	10	-1.068 ± 0.012 ^{abc}	7.433 ± 0.036 ^{abc}
<i>F</i>		89.063	96.145
<i>P</i>		0.000	0.000

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型对照组比较, ^b $P < 0.05$; 与 PBS 对照组比较, ^c $P < 0.05$ (单因素方差分析, Tukey post hoc 检验)

2.2 各组豚鼠实验眼巩膜的组织病理学检查

苏木精-伊红染色结果显示, 正常对照组巩膜组织厚度正常, 纤维排列整齐 (图 1A); 模型对照组实验眼后极部巩膜厚度明显变薄, 且胶原纤维断裂、稀疏 (图 1B), PBS 对照组实验眼则出现部分巩膜变薄、纤维稀疏等, 与模型对照组表现类似 (图 1C), AG490 治疗组豚鼠实验眼巩膜组织厚度接近正常对照组 (图 1D)。

2.3 各组豚鼠实验眼巩膜组织中 STAT3、p-STAT3、MMP-2 蛋白的表达

正常对照组巩膜组织内 STAT3 极少表达, 而模型对照组和 PBS 对照组巩膜组织中 STAT3 表达较强, 呈棕黄色染色, AG490 治疗组巩膜组织中 STAT3 表达强度较模型对照组、PBS 对照组减弱, 其相对表达量 (A

值) 的差异均有统计学意义 ($t = 4.641, 9.364$, 均 $P < 0.01$); 模型对照组和 PBS 对照组间 STAT3 表达量比较差异无统计学意义 ($t = -0.749, P > 0.05$), AG490 治疗组 STAT3 表达量仍较正常对照组高, 组间比较差异有统计学意义 ($t = 2.674, P < 0.05$) (图 2, 表 3)。

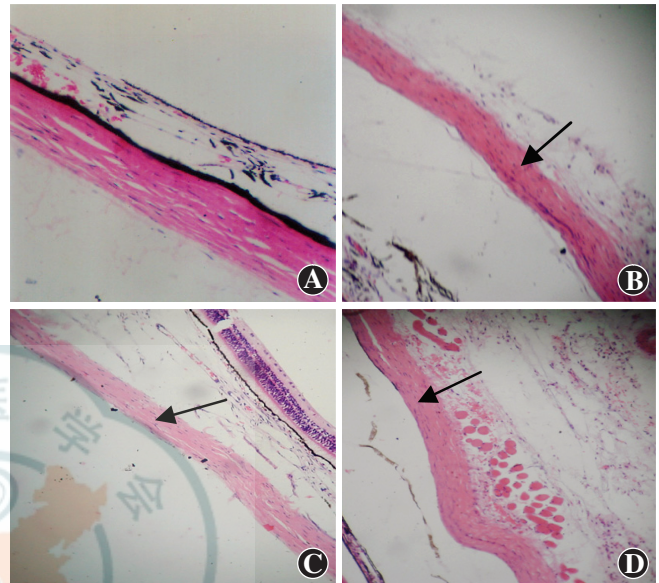


图 1 各组豚鼠实验眼后极部巩膜组织的组织病理学改变 (HE × 200) A: 正常对照组巩膜厚度正常, 纤维组织排列均匀 B: 模型对照组实验眼巩膜组织变薄 (箭头) C: PBS 对照组巩膜组织节段性变薄, 纤维排列紊乱 (箭头) D: AG490 治疗组巩膜组织厚度接近正常对照组 (箭头)

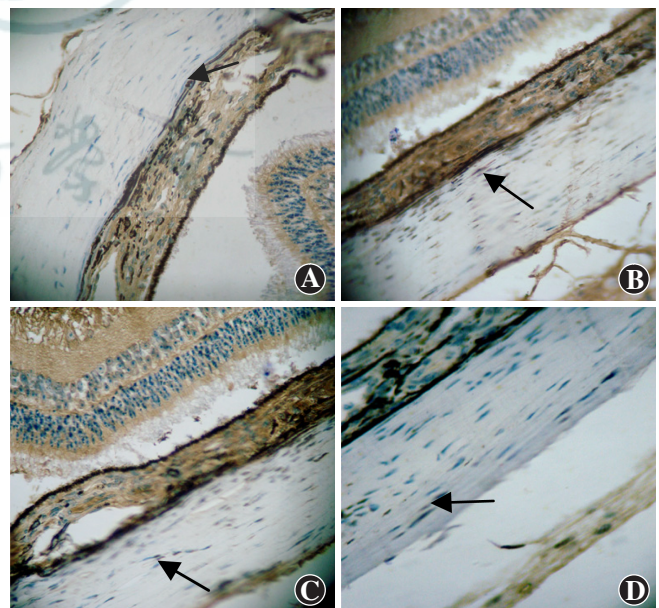


图 2 各组豚鼠实验眼后极部巩膜 STAT3 蛋白表达 (DAB × 400) A: 正常对照组巩膜纤维细胞中有很少的 STAT3 蛋白表达 (箭头) B: 模型对照组巩膜纤维细胞中可见较多的 STAT3 蛋白表达, 呈棕黄色染色 (箭头) C: PBS 对照组巩膜纤维细胞中 STAT3 蛋白表达较强, 呈棕黄色染色 (箭头) D: AG490 治疗组巩膜纤维细胞中 STAT3 蛋白表达强度明显弱于模型对照组和 PBS 对照组, 阳性细胞数减少 (箭头)

正常对照组巩膜组织内未发现 p-STAT3 阳性着色,而模型对照组和 PBS 对照组巩膜纤维细胞核呈棕黄色染色,2 个组巩膜纤维细胞中 p-STAT3 相对表达量(A 值)的差异无统计学意义($t=1.732, P=0.225$),而 AG490 治疗组巩膜纤维细胞中 p-STAT3 表达强度明显较模型对照组和 PBS 对照组减弱,其相对表达量(A 值)的差异均有统计学意义($t=4.638, 4.488$, 均 $P<0.05$),AG490 治疗组巩膜纤维细胞中 p-STAT3 相对表达量仍明显高于正常对照组,差异有统计学意义($t=2.251, P<0.05$)(图 3,表 3)。

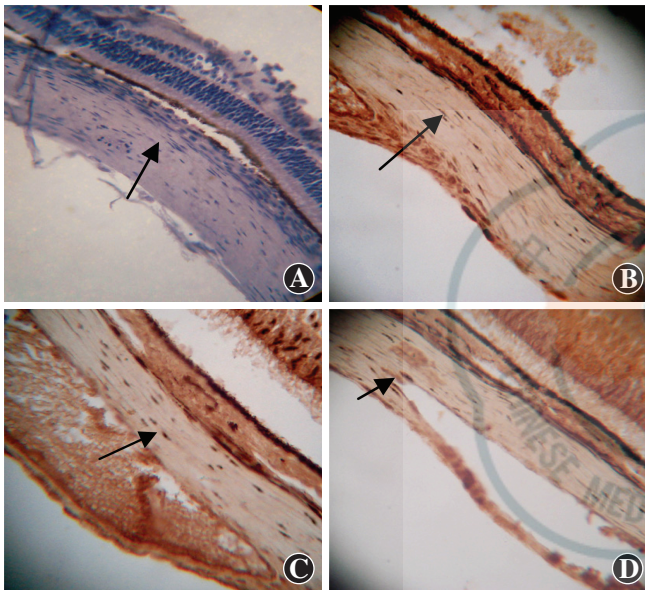


图 3 各组豚鼠实验眼后极部巩膜 p-STAT3 蛋白表达(DAB ×400)
A:正常对照组巩膜 p-STAT3 蛋白有极少量表达,呈淡黄色染色(箭头) B:模型对照组巩膜纤维细胞中 p-STAT3 蛋白呈强阳性表达,呈棕黄色染色(箭头) C:PBS 对照组巩膜纤维细胞中 p-STAT3 蛋白表达较强,呈棕色染色(箭头) D:AG490 治疗组巩膜纤维细胞中 p-STAT3 蛋白表达较弱(箭头)

表 3 各组豚鼠实验眼巩膜中 STAT3、p-STAT3 和 MMP-2 蛋白相对表达量的比较($\bar{x} \pm s, A$)

组别	样本量	STAT3	p-STAT3	MMP-2
正常对照组	10	0.002±0.001	0.000±0.000	0.052±0.002
模型对照组	10	0.129±0.008 ^a	0.071±0.021 ^a	0.425±0.004 ^a
PBS 对照组	10	0.130±0.004 ^a	0.069±0.002 ^a	0.421±0.042 ^a
AG490 治疗组	10	0.064±0.016 ^{abc}	0.019±0.002 ^{abc}	0.155±0.052 ^{abc}
F		48.301	52.961	27.118
P		0.000	0.000	0.000

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与模型对照组比较,^b $P<0.05$;与 PBS 对照组比较,^c $P<0.05$ (单因素方差分析,Tukey post hoc 检验)
MMP:基质金属蛋白酶;STAT:信号转导及转录激活蛋白

正常对照组巩膜纤维细胞中 MMP-2 蛋白呈弱表达,着色不明显,而模型对照组和 PBS 对照组巩膜纤

维细胞中 MMP-2 蛋白均呈强表达,呈棕黄色染色,2 个组巩膜纤维细胞中 MMP-2 蛋白的表达量(A 值)差异无统计学意义($t=1.264, P>0.05$),而 AG490 治疗组巩膜纤维细胞中 MMP-2 呈弱表达,其相对表达量(A 值)与模型对照组、PBS 对照组比较差异均有统计学意义($t=9.123, 9.029$, 均 $P<0.05$),AG490 治疗组巩膜纤维细胞中 MMP-2 表达量仍明显高于正常对照组,差异有统计学意义($t=2.682, P<0.05$)(图 4,表 3)。

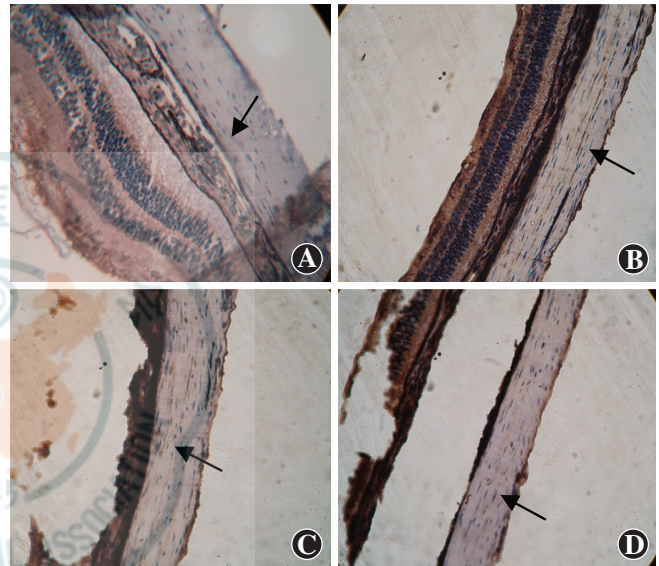


图 4 各组豚鼠实验眼后极部巩膜 MMP-2 蛋白表达(DAB ×400)
A:正常对照组巩膜纤维细胞中 MMP-2 蛋白呈极弱表达(箭头) B:模型对照组巩膜纤维细胞中 MMP-2 蛋白表达阳性,呈棕色染色(箭头) C:PBS 对照组巩膜纤维细胞中 MMP-2 蛋白呈阳性表达(箭头) D:AG490 治疗组巩膜纤维细胞中 MMP-2 蛋白呈弱表达(箭头)

2.4 各组豚鼠实验眼巩膜纤维细胞中 STAT3 mRNA 和 MMP-2 mRNA 的相对表达

正常对照组巩膜组织中 STAT3 mRNA 的相对表达量(A 值)较少,AG490 治疗组巩膜组织中 STAT3 mRNA 相对表达量均明显低于模型对照组和 PBS 对照组,差异均有统计学意义($t=10.115, 11.703$, 均 $P<0.01$),模型对照组和 PBS 对照组间巩膜组织中 STAT3 mRNA 的相对表达量差异无统计学意义($t=0.641, P>0.05$),AG490 治疗组巩膜组织中 STAT3 mRNA 相对表达量仍高于正常对照组,差异有统计学意义($t=2.576, P<0.05$)(图 5,表 4)。

正常对照组巩膜组织中 MMP-2 mRNA 的相对表达量(A 值)较少,AG490 治疗组巩膜组织中 MMP-2 mRNA 相对表达量明显低于模型对照组和 PBS 对照组,差异均有统计学意义($t=9.218, 9.494$, 均 $P<0.01$),模型对照组与 PBS 对照组间 MMP-2 mRNA 的

相对表达量差异无统计学意义 ($t = 1.745, P = 0.141$), AG490 治疗组巩膜组织中 MMP-2 mRNA 相对表达量仍高于正常对照组, 差异有统计学意义 ($t = 3.565, P < 0.05$) (图 5, 表 4)。

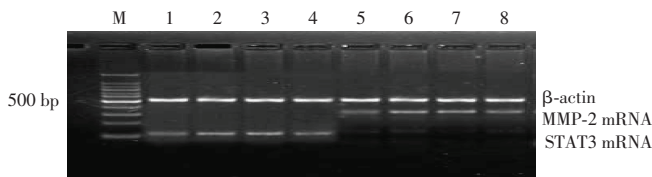


图 5 各组豚鼠实验眼巩膜组织中 STAT3 mRNA 和 MMP-2 mRNA 的相对表达 1: 正常对照组 STAT3 mRNA 表达 2: 模型对照组 STAT3 mRNA 相对表达 3: PBS 对照组 STAT3 mRNA 相对表达 4: AG490 治疗组 STAT3 mRNA 相对表达 5: 正常对照组 MMP-2 mRNA 表达 6: 模型对照组 MMP-2 mRNA 相对表达 7: PBS 对照组 MMP-2 mRNA 相对表达 8: AG490 治疗组 MMP-2 mRNA 相对表达 MMP: 基质金属蛋白酶; STAT: 信号转导及转录激活蛋白

表 4 各组豚鼠实验眼巩膜组织中 STAT3 mRNA 和 MMP-2 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s, A$)

组别	样本量	STAT3 mRNA	MMP-2 mRNA
正常对照组	10	0.048 ± 0.001	0.351 ± 0.015
模型对照组	10	0.547 ± 0.015 ^a	0.782 ± 0.051 ^a
PBS 对照组	10	0.544 ± 0.015 ^a	0.779 ± 0.048 ^a
AG490 治疗组	10	0.295 ± 0.032 ^{abc}	0.569 ± 0.019 ^{abc}
F		56.362	41.583
P		0.000	0.000

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型对照组比较, ^b $P < 0.05$; 与 PBS 对照组比较, ^c $P < 0.05$ (单因素方差分析, Tukey post hoc 检验) MMP: 基质金属蛋白酶; STAT: 信号转导及转录激活蛋白

3 讨论

STAT3 是一组具有数个相同结构域构成的 DNA 结合蛋白家族 STATs 成员之一, 作为 JAK/STAT3 信号通路中重要的 JAKs 底物, STAT3 在细胞因子的信号转导中发挥关键作用。通过生长因子-STAT3 信号转导通路可激活 STAT3 蛋白, 而 STAT3 一旦磷酸化, 即会成为具有自我催化功能的底物, 并通过自身的 SH2 结构域形成同源或异源二聚体, 然后迅速转位入核, 与其特异的 DNA 序列结合, 调控靶基因的转录。尽管在生理状态下生长因子诱导的 STAT 信号通路激活处在严格的调控之下, 但是慢性或持续的激活可能会扰乱生长因子-STAT 信号通路内环境的稳定, 最终导致靶组织的病理改变^[5-9]。由 STAT3 信号转导和活化转录机制可知, 阻断 STAT3 信号转导途径的任一环节均可抑制其上游众多酪氨酸激酶信号的传递以及下游多种靶基因的转录, 从而成为防治众多疾病的候选靶目标。

AG490 可抑制 JAK2/STAT3 信号转导, 进而抑制

细胞的生长和转化^[10-14]。研究表明, AG490 抑制 JAK/STAT 信号通路不影响视网膜神经节细胞的生存^[15], 与我们以往研究中 AG490 对正常的豚鼠巩膜成纤维细胞生长无明显影响的结果相似^[16]。因此, 尽管特异性的 STAT3 抑制剂可能比 AG490 更有效, 但 AG490 仍可能是众多药物中比较有开发前景的药物。为此, 本研究中进一步观察 AG490 对豚鼠 FDM 巩膜中 STAT3 信号通路活性的影响以及下游靶基因 MMP-2 的调控作用。

本研究表明, AG490 玻璃体腔注射后能在一定程度上抑制 FDM 豚鼠眼轴的延长, 并可使 FDM 模型眼近视屈光度降低, 故认为 AG490 作为一种 JAK 抑制剂, 不能完全阻断 STAT3 信号通路的激活, 因为除了 JAK/STAT3 信号途径外, 还有一些活化的生长因子受体具有内源性酪氨酸激酶活性和各种应激刺激, 如调节、眼压等可直接将 STAT3 蛋白磷酸化; 其次, 本研究给药间隔为每 2 天 1 次, 由于 STAT3 是 JAK2 通路的下游蛋白, 故 AG490 对 STAT3 蛋白磷酸化的抑制可能是通过 JAK2 来完成的, 所以其对 STAT3 蛋白磷酸化的抑制作用晚于对 JAK2 蛋白激酶磷酸化的抑制。这些研究结果提示, AG490 抑制 STAT3 蛋白激活具有时相效应, 时间过短效应可能不能完全显现; 再者 AG490 抑制 STAT3 信号通路的激活呈剂量依赖性, 本研究所应用的 25 μmol/L AG490 可能剂量不足, 故对眼轴与屈光的变化无法呈现出完全抑制, 增加剂量或选取直接定向于 STAT3 蛋白并阻断其功能的 RNA 干扰技术是否可完全抑制近视的发展, 尚需进一步研究。

我们以往的研究发现, FDM 诱导巩膜组织内 STAT3 蛋白的合成和激活以及 MMP-2 的表达上调^[1-2], 提示 FDM 中 STAT3 信号通路可能参与近视的形成和发展; MMP-2 作为 STAT3 信号通路的下游靶基因, 在 FDM 中引起 STAT3 信号通路激活并调控 MMP-2 表达上调的一种可能情况是异常的刺激信号, 如异常的视觉信息、眼轴延长的扩张力、巩膜蠕变、眼压变化等作为直接的刺激信号可以引起 STAT3 蛋白激活, 进而转位入核, 与 MMP-2 基因启动子内特定的结合位点结合, 调控 MMP-2 基因的转录与表达; 另一种情况可能是形觉剥夺诱导豚鼠视网膜、视网膜色素上皮-脉络膜源性生长因子上调, 如胰岛素样生长因子^[17]、肝细胞生长因子^[18]、成纤维细胞生长因子^[19]、血管内皮生长因子^[20]等作为上游活化因子, 通过 JAK2/STAT3 信号途径使 STAT3 磷酸化, 活化的 STAT3 形成二聚体, 迅速转位到细胞核内, 与 MMP-2 基因启动子上特定的反应元件结合, 启动和调控 MMP-2 基因的转录与

表达,从而打破巩膜内 MMP-2/组织金属蛋白酶抑制剂-2 的稳态平衡体系,导致巩膜细胞外基质的重塑,眼轴延长,形成近视。本研究结果显示,豚鼠实验眼造模后屈光度较正常豚鼠眼明显增加,眼轴长度较正常豚鼠眼明显延长,模型对照组豚鼠巩膜组织中 STAT3、p-STAT3 蛋白的表达量较正常豚鼠眼显著增高,MMP-2 的表达也相应增高,同时转录水平的 STAT3 和 MMP-2 也显著增加,再次表明在近视发展过程中,异常的视觉信息直接和间接激活了巩膜组织内 STAT3 信号转导通路,进而调控其下游靶基因 MMP-2 的转录及表达是巩膜持续主动重塑过程的主要机制之一。AG490 治疗组与模型对照组和 PBS 对照组比较眼轴长度明显缩短,说明 AG490 可能抑制了异常巩膜重塑的进展。本研究中还发现,AG490 治疗组巩膜组织中 STAT3 和 MMP-2 蛋白及其 mRNA 表达较模型对照组和 PBS 对照组均显著降低,表明 AG490 可以有效地阻断 FDM 豚鼠巩膜中 STAT3 信号通路的激活,进而下调其下游靶基因 MMP-2 的表达,抑制异常巩膜重塑的进一步发展,但 AG490 治疗组 STAT3 和 MMP-2 的表达仍高于正常对照组,在一定程度上也提示 AG490 作为 JAK2 特异性抑制,不能特异性地完全阻断 STAT3 信号蛋白磷酸化,也解释了本研究中 AG490 仅部分抑制 FDM 豚鼠眼轴的生长以及 AG490 治疗组 STAT3 和 MMP-2 的表达仍高于正常对照组的现象。

总之,本研究结果表明近视发展过程中 AG490 可一定程度地阻断异常视觉信息对巩膜内 STAT3 信号转导通路的激活,进而调控其下游靶基因 MMP-2 的转录与表达,抑制近视巩膜重塑,为进一步了解调控该信号转导通路、加深对近视发病机制的进一步认识和寻求近视的防治措施提供了新的思路。

参考文献

- [1] 朱子诚,张金嵩,王应飞,等. 信号转导子与转录激活子 3 在豚鼠形觉剥夺性近视发展中的表达特征[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(27): 5361-5363.
- [2] 朱子诚,张金嵩,陈悦,等. STAT3 和其靶基因 MMP-2 在豚鼠形觉剥夺性近视中的表达及相关性研究[J]. 广西医科大学学报, 2008, 25(2): 214-215.
- [3] 朱子诚,张金嵩. 豚鼠形觉剥夺性近视中视网膜 STAT3 活性蛋白的表达[J]. 安徽医学, 2009, 30(8): 860-862. doi:10.3969/j.issn.1000-0399.2009.08.007.
- [4] Kwak HB, Sun HM, Ha H, et al. AG490, a Jak2-specific inhibitor, induces osteoclast survival by activating the Akt and ERK signaling pathways[J]. Mol Cells, 2008, 26(5): 436-442.
- [5] Siegel AM, Heimall J, Freeman AF, et al. A critical role for STAT3 transcription factor signaling in the development and maintenance of human T cell memory[J]. Immunity, 2011, 35(5): 806-818. doi:10.1016/j.immuni.2011.09.016.
- [6] Chen Z, Huang C, Yang YL, et al. Inhibition of the STAT3 signaling pathway is involved in the antitumor activity of cepharanthine in SaOS2 cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2012, 33(1): 101-108. doi:10.1038/aps.2011.164.
- [7] Wang ZF, Li Q, Liu SB, et al. Aspirin-triggered lipoxin A4 attenuates mechanical allodynia in association with inhibiting spinal JAK2/STAT3 signaling in neuropathic pain in rats[J]. Neuroscience, 2014, 273: 65-78. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.04.052.
- [8] Lesina M, Wörmann SM, Neuhöfer P, et al. Interleukin-6 in inflammatory and malignant diseases of the pancreas[J]. Semin Immunol, 2014, 26(1): 80-87. doi:10.1016/j.smim.2014.01.002.
- [9] Wunderlich CM, Hövelmeyer N, Wunderlich FT. Mechanisms of chronic JAK-STAT3-SOCS3 signaling in obesity[J/OL]. JAKSTAT, 2013, 2(2): e23878[2014-10-24]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3710326/. doi:10.4161/jkst.23878.
- [10] Chang L, Yang R, Wang M, et al. Angiotensin II type-1 receptor-JAK/STAT pathway mediates the induction of visfatin in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy[J]. Am J Med Sci, 2012, 343(3): 220-226. doi:10.1097/MAJ.0b013e31822993ff.
- [11] Yang Y, Duan W, Jin Z, et al. JAK2/STAT3 activation by melatonin attenuates the mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. J Pineal Res, 2013, 55(3): 275-286. doi:10.1111/jpi.12070.
- [12] Caceres-Cortes JR. A potent anti-carcinoma and anti-acute myeloblastic leukemia agent, AG490[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2008, 8(7): 717-722.
- [13] Heo JY, Kim HJ, Kim SM, et al. Embelin suppresses STAT3 signaling, proliferation, and survival of multiple myeloma via the protein tyrosine phosphatase PTEN[J]. Cancer Lett, 2011, 308(1): 71-80. doi:10.1016/j.canlet.2011.04.015.
- [14] Seki Y, kai H, Shibata H, et al. Role of the JAK/Stat pathway in rat carotid artery remodeling after vascular injury[J]. Circ Res, 2000, 87(1): 12-18.
- [15] Huang Y, Cen LP, Choy KW, et al. JAK/STAT pathway mediates retinal ganglion cell survival after acute ocular hypertension but not under normal conditions[J]. Exp Eye Res, 2007, 85(5): 684-695.
- [16] 朱子诚,柯根杰,温跃春,等. AG490 对豚鼠巩膜成纤维细胞生长的影响[J]. 眼科新进展, 2012, 32(6): 521-524.
- [17] Pinzon-Guzman C, Xing T, Zhang SS, et al. Regulation of rod photoreceptor differentiation by STAT3 is controlled by a tyrosine phosphatase[J]. J Mol Neurosci, 2015, 55(1): 152-159. doi:10.1007/s12031-014-0397-1.
- [18] Trovato M, Torre ML, Ragonese M, et al. HGF/c-met system targeting PI3K/AKT and STAT3/phosphorylated-STAT3 pathways in pituitary adenomas; an immunohistochemical characterization in view of targeted therapies[J]. Endocrine, 2013, 44(3): 735-743. doi:10.1007/s12020-013-9950-x.
- [19] Bohrer LR, Chuntova P, Bade LK, et al. Activation of the FGFR-STAT3 pathway in breast cancer cells induces a hyaluronan-rich microenvironment that licenses tumor formation[J]. Cancer Res, 2014, 74(1): 374-386. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2469.
- [20] Cao HH, Tse AK, Kwan HY, et al. Quercetin exerts anti-melanoma activities and inhibits STAT3 signaling[J]. Biochem Pharmacol, 2014, 87(3): 424-434. doi:10.1016/j.bcp.2013.11.008.

(收稿日期:2015-01-14)

(本文编辑:刘艳)