

小柴胡汤下调 JAK2, STAT3 的表达治疗大鼠肝纤维化

李晋¹, 徐尚福², 金凤², 白国辉¹

(1. 遵义医学院医学与生物学研究中心, 贵州 遵义 563000;

2. 遵义医学院药理学教研室暨贵州省基础药理重点实验室, 贵州 遵义 563000)

[摘要] **目的:**探讨小柴胡汤对大鼠肝纤维化过程中肝组织 Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2) 及信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 表达的影响。**方法:**健康 SD 雄性大鼠, 适应性喂养 1 周后随机分为 5 组, 空白对照组, 模型组, 小柴胡汤高、中、低 (4, 2, 1 g·kg⁻¹) 剂量组。模型组大鼠采用 10% 四氯化碳皮下注射, 每周 2 次制备大鼠肝纤维化模型共 14 周, 于造模第 9 周小柴胡汤各剂量组给予小柴胡汤灌胃治疗 6 周。通过测定血清中丙氨酸转氨酶 (ALT) 及天冬氨酸转氨酶 (AST) 活性反映肝脏功能, HE 染色法观察肝组织病理学变化, 免疫组化方法观察肝组织金属蛋白酶组织抑制因子-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1) 的表达, Real-time RT-PCR 检测 JAK2, STAT3 mRNA 的表达。**结果:**与空白对照组比较, 四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠外周血 ALT, AST 明显升高, 病理学呈现肝纤维化表现; 肝组织 TIMP-1, JAK2 和 STAT3 表达明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组相比, 小柴胡汤中、高剂量组在血清学和病理学上均有明显改善; 与模型组相比, 小柴胡汤高剂量组肝组织 TIMP-1 表达明显降低, 小柴胡汤中、高剂量组 JAK2, STAT3 mRNA 的表达明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:**小柴胡汤可下调 JAK2 和 STAT3 的表达参与对大鼠肝纤维化的治疗。

[关键词] 肝纤维化; 小柴胡汤; 金属蛋白酶组织抑制因子-1; 激酶 2/信号转导及转录活化因子 3; 信号通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0118-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180118

[收稿日期] 20140516(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81360661); 贵州省科学技术基金项目(黔科合 J 字 LKZ[2010]43 号)

[第一作者] 李晋, 讲师, 硕士, 从事中西医结合治疗消化系统疾病研究, Tel: 0852-8609511, E-mail: lijn010502@163.com

- [2] 奚耕思, 张武会. 抑郁症发生机制研究进展[J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2011, 39(6): 64.
- [3] 魏立平, 吴玖涵. 用气相色谱法同时测定石菖蒲挥发油中 α -细辛醚和 β -细辛醚的含量[J]. 解放军药学报, 2005, 21(1): 62.
- [4] 赵春明, 张晓杰, 董海影, 等. β -细辛醚对抑郁模型大鼠行为及海马 MKP-1, MSK-1, CREB 和 Bel-2 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(16): 272.
- [5] 郭晓云, 江开达. 慢性轻度应激抑郁动物模型研究进展[J]. 国际精神病学杂志, 2007, 34(4): 216.
- [6] 董海影, 兴桂华, 张晓杰. 不同年龄组大鼠抑郁模型评价[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(6): 1796.
- [7] 樊蔚虹, 姚建平, 杨清, 等. 柴胡疏肝散干预卒中后抑郁模型大鼠海马神经细胞凋亡的机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 216.
- [8] Jason C Wester, Diego Contreras. Differential modulation of spontaneous and evoked thalamocortical network activity by acetylcholine level *in vitro* [J]. J Neurosci, 2013, 33(45): 17951.
- [9] Vera Galdes, Nataniel Goncalves-Rosa, Beihui Liu, et al. Chronic depression of hypothalamic paraventricular neuronal activity produces sustained hypotension in hypertensive rats [J]. Exp Physiol, 2014, 99(4): 89.
- [10] 胡莺燕, 方貽儒, 禹顺英, 等. MEK 基因多态性与抑郁症的关联性研究 [J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2010, 30(6): 616.
- [11] Duman C H, Schlesinger, Kodama M, et al. A role for MAP kinase signaling in behavioral models of depression and antidepressant treatment [J]. Biol Psychiatry, 2007, 61: 661.
- [12] 孙玉荣, 张晓杰, 姚宏波. β -细辛醚对抑郁症模型大鼠海马区 BDNF 的影响 [J]. 中国中医药咨讯, 2012, 4(3): 69.
- [13] Nir Lipsman, Tejas Sankar, Andres M, et al. Neuromodulation for treatment-refractory major depressive disorder [J]. C M A J, 2014, 186(1): 33.
- [14] 彭希. 逍遥散抗抑郁作用的 BDNF/MEK-ERK/CREB 分子机制实验研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.

[责任编辑 聂淑琴]

Xiaochaihu Tang Depress Expression of JAK2 and STAT3 of Liver Fibrosis in Rats

LI Jin¹, XU Shang-fu², JIN Feng², BAI Guo-hui¹

(1. Research Center for Medicine and Biology of Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China;

2. Department of Pharmacology of Zunyi Medical College/The Key Laboratory of Basic Pharmacology of Guizhou Province, Zunyi 563000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the expression of Janus kinase 2 (JAK2) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in hepatic fibrosis rat model impacted by Xiaochaihu Tang. **Method:** Hepatic fibrosis model was induced by 10% CCl₄ for 9 weeks in rat. The rats were treated by Xiao Chaihu Tang for 6 weeks at the beginning of the 9th week. Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum were measured to reflect liver function. The pathological characteristics of hepatic tissues were detected by HE staining. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 was observed by immunohistochemistry. The expression of JAK2 and STAT3 mRNA was detected by real-time RT-PCR. **Result:** Compared with the model group, serology and histology showed significant improvement. TIMP-1 was reduced in the high-dose group of Xiaochaihu Tang compared with the model group and the expression of JAK2 and STAT3 was downregulated obviously in the middle-dose group ($P < 0.05$) and the high-dose group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Xiaochaihu Tang can improve the liver fibrosis induced by CCl₄ and depress the expression of JAK2 and STAT3 in rat.

[Key words] hepatic fibrosis; Xiaochaihu Tang; TIMP-1; Janus kinase 2/ signal transducer and activator of transcription; signal pathway

肝纤维化是肝组织对慢性损伤的修复反应,以细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分的过度增生与异常沉积为主要特征。肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是肝纤维化时 ECM 的主要来源细胞,其增殖和激活是肝纤维化的中心环节^[1-2]。研究表明细胞因子、氧化应激以及 ECM 的改变等外部因素通过 JAK/STAT 信号转导通路激活 HSC^[3-4]。用药物抑制 HSC 激活、增殖以及诱导其凋亡,对于肝纤维化的治疗具有重要的价值。小柴胡汤是我国传统中药复方,其具有抗炎、保肝等作用^[5],但其作用机制尚不明确,尤其是小柴胡汤通过 JAK/STAT 通路激活 HSC 对肝纤维化影响的研究尚未见报道,因此本研究通过观察小柴胡汤对肝纤维化大鼠肝组织 JAK2, STAT3 表达的影响,探讨小柴胡汤治疗肝纤维化可能的机制。

1 材料

1.1 药品与试剂 四氯化碳(CCl₄,分析纯,国药集团化学试剂北京有限公司,批号 B1320008),兔抗大鼠金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP-1)多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号 990306W),免疫组化检测试剂盒[基因科技(上海)有限公司,

批号 2013061301], RNAiso plus(批号 AK9301)、Power SYBR Green PCR Master Mix(批号 BK5906)、PrimeScriptTM RT reagent Kit(批号 AK4002)及引物(均为 TakaRa 公司);小柴胡颗粒(主要成分为柴胡、黄芩、姜半夏、党参、生姜、甘草、大枣,辅料为蔗糖,四川禾润制药有限公司,批号 110505)。

1.2 动物 健康 SD 大鼠,雄性,体重(200 ± 20) g, SPF 级,购自第三军医大学大坪医院实验动物中心,合格证号 SCXK(渝)2007-0005。

1.3 仪器 CFX Connect 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad), DM 4000B 显微镜(德国 Leica), AU-5421 全自动生化分析仪(美国 Beckman Coulter)。

2 方法

2.1 模型建立与分组给药 大鼠适应性饲养 1 周后,随机分为空白对照组(control),模型组(model),小柴胡颗粒低(XCHT, 1 g·kg⁻¹)、中(XCHT, 2 g·kg⁻¹)、高(XCHT, 4 g·kg⁻¹)剂量治疗组^[6],每组 10 只。大鼠 sc 10% CCl₄ 5 mL·kg⁻¹,每周 2 次,共 14 周诱导肝纤维化模型,空白对照组以同样方法 sc 等量生理盐水。第 8 周末随机抽取空白对照组和模型组大鼠进行病理学检测观察造模是否成功。第 9 周

开始治疗组按 10 mL·kg⁻¹每天 1 次 ig 给药 6 周(空白对照组和模型组给予等量蒸馏水)。第 14 周末将全部大鼠隔夜禁食,次日以乙醚麻醉腹主动脉采集外周血并处死,迅速切取 2 块肝组织,一块用 10% 的甲醛固定后制备石蜡切片,另一块 -80 ℃ 冰箱保存用于 Real time RT-PCR。

2.2 血清指标的检测 外周血 3 000 r·min⁻¹, 10 min 离心后,血清采用全自动生化分析仪检测丙氨酸转氨酶(ALT)及天冬氨酸转氨酶(AST)含量。

2.3 肝组织病理学检查 10% 甲醛固定标本,石蜡包埋。常规 HE 染色,光镜下观察肝组织纤维化程度和炎症浸润程度。

2.4 检测肝组织中 TIMP-1 的表达 按照免疫组化方法说明书进行。石蜡切片常规脱蜡脱水,3% H₂O₂ 去除内源性过氧化物酶,0.1 mol·L⁻¹ 枸橼酸盐缓冲液微波处理 5 min,山羊血清封闭非特异性抗原,滴加兔抗大鼠 TIMP-1 抗体(1:200 稀释),4 ℃ 过夜,次日二抗孵育 30 min,DAB 显色、脱水、透明,中性树胶封片,采集图片。

2.5 检测肝组织中 JAK2 和 STAT3 mRNA 的表达 按 Trizol 试剂盒说明书提取大鼠肝组织总 RNA,纯化后进行样品纯度鉴定。两步法逆转录-聚合酶链反应如下: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'-TTTGAAGACAGGGACCCTACACAG-3';下游引物:5'-TGATAGCGGCACATCCACA-3',扩增片段 101 bp。STAT3 上游引物:5'-TTTGAGACAGAGGTGTACCACCAAG-3',扩增片段 118 bp。GAPDH 上游引物:5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3';下游引物:5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3',扩增片段 138 bp。PCR 反应体系为 25 μL,第一步,95 ℃ × 3 min;第二步,95 ℃ × 10 s,退火温度 × 1 min,循环 40 次。结果采用相对定量法分析处理^[7]。以 PCR 扩增过程中荧光信号强度达到阈值所需要的循环系数(Ct)为统计参数,基因的表达 = 2^{-dCt}(dCt = Ct 平均值 - Ct 中间值);相对定量 = 目的基因的表达/内参基因的表达 × 100%,将空白对照组的 mRNA 表达量设定为 100%。

2.6 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 血清学检测 模型组大鼠血清 ALT 较空白对照组明显升高($P < 0.01$),与模型组相比,小柴胡汤

低、中剂量组 ALT 降低($P < 0.05$),小柴胡汤高剂量组 ALT 明显降低($P < 0.01$)。与空白对照组相比,模型组大鼠血清 AST 明显升高($P < 0.01$),与模型组相比,小柴胡汤中、高剂量组 AST 明显降低,表 1。

表 1 小柴胡汤对四氯化汤诱导大鼠肝纤维化血清 ALT, AST 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹
空白对照	-	108.22 ± 25.66	42.78 ± 8.53
模型	-	151.75 ± 25.29 ¹⁾	122.86 ± 22.12 ¹⁾
小柴胡汤	1	131.63 ± 45.76	86.38 ± 26.68 ²⁾
	2	110.29 ± 15.11 ³⁾	76.00 ± 39.15 ²⁾
	4	99.90 ± 20.44 ³⁾	50.80 ± 13.11 ³⁾

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 小柴胡汤对肝组织 JAK2, STAT3 mRNA 表达的影响 Real-Time RT-PCR 检测结果显示,与空白对照组相比,模型组 JAK2 与 STAT3 mRNA 表达均明显升高($P < 0.05$)。小柴胡汤各剂量组不同程度均下调 JAK2 和 STAT3 mRNA 的表达,尤其是小柴胡汤高剂量组($P < 0.01$, 表 2)。

表 2 小柴胡汤对肝纤维化大鼠肝脏 JAK2, STAT3 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	JAK2/%	STAT3/%
空白对照	-	100.00 ± 40.33	100.00 ± 33.93
模型	-	214.52 ± 62.08 ¹⁾	382.43 ± 116.49 ²⁾
小柴胡汤	1	158.63 ± 55.71	280.27 ± 101.50
	2	131.95 ± 42.58 ³⁾	169.43 ± 97.96 ³⁾
	4	110.27 ± 19.77 ⁴⁾	113.53 ± 46.86 ⁴⁾

3.3 肝脏病理学改变 HE 染色显示,空白对照组肝小叶结构完整,形态正常。模型组肝小叶失去正常结构,多数肝细胞发生脂肪变性,汇管区及中央静脉周围大量炎性细胞浸润,胶原纤维增生及假小叶形成。小柴胡汤中、高剂量组均较模型组明显减轻,而小柴胡汤高剂量组效果更为明显。小柴胡汤高剂量组肝细胞坏死及变性程度明显减轻,汇管区及中央静脉周围炎性细胞浸润减少,小叶间隔胶原纤维明显减少,未见假小叶结构(图 1)。

3.4 小柴胡汤对肝组织 TIMP-1 表达的影响 TIMP-1 阳性颗粒主要分布在肝细胞、枯否细胞、HSC、窦内皮细胞、胆管上皮以及纤维间隔中成纤维细胞的胞浆中。空白对照组有少量 TIMP-1 表达,与空白对照组比较,模型组 TIMP-1 表达明显增多。小柴胡汤高剂量组 TIMP-1 较模型组明显降低,其他剂量组下调 TIMP-1 的作用不明显(图 2)。

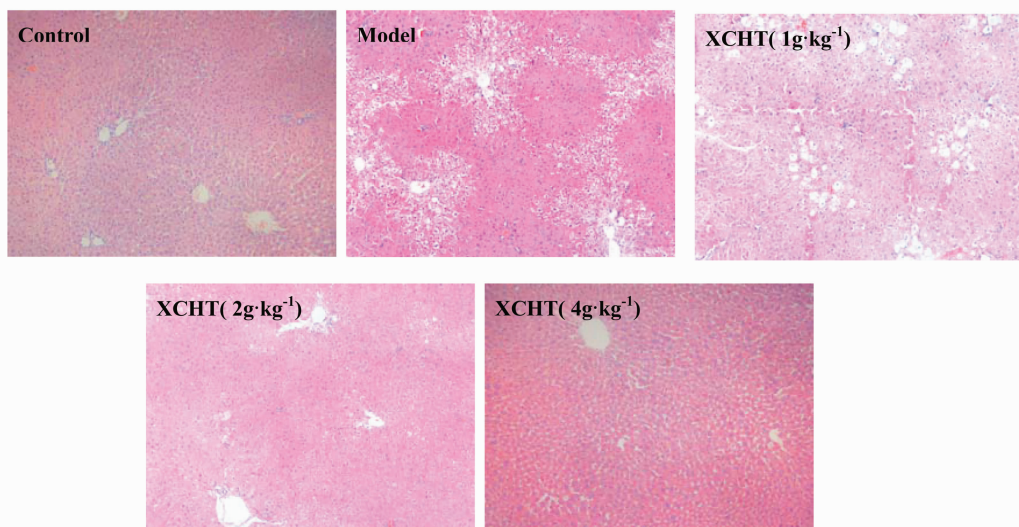


图1 小柴胡汤对四氯化碳诱导肝纤维化大鼠肝脏病理形态学改变的影响(HE染色, ×100)

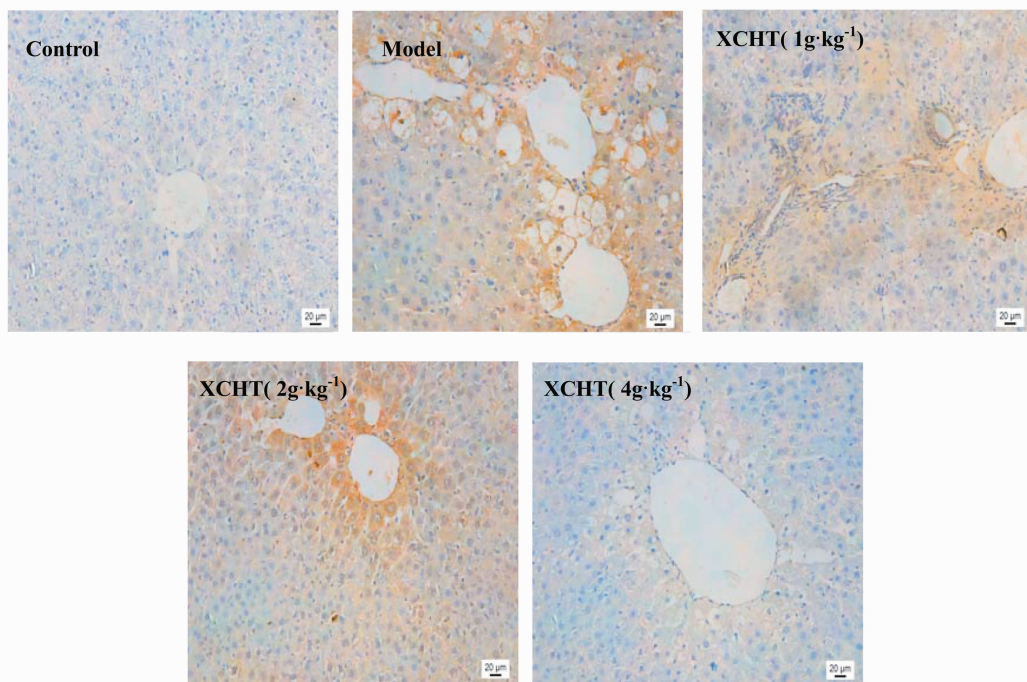


图2 小柴胡汤对肝组织TIMP-1表达的影响(免疫组化染色, ×200)

4 讨论

小柴胡汤出自《伤寒论》,由柴胡、黄芩、人参、姜半夏、甘草、生姜、大枣7味药组成,具显著的抗炎、保肝利胆、解热镇痛等作用。近年来对小柴胡汤的应用进行了大量临床及实验研究,其中在肝脏疾病治疗方面,它相对于西药毒副作用少,疗效缓慢而持久,可以有效提高肝病患者的生存质量和治疗效果^[5]。本研究中采用小柴胡汤2,4 g·kg⁻¹剂量组血清ALT,AST较模型组降低,且高剂量组效果更优;HE染色显示小柴胡汤中、高剂量组均较模型组明

显减轻;而小柴胡汤低剂量组作用不明显,可能是药的浓度过低,达不到理想的治疗效果。提示小柴胡汤对肝纤维化具有一定治疗作用。

近年来,肝纤维化病理机制研究取得了突破进展,TIMP-1是金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs)家族中作用最强的成员,在肝纤维化形成过程中TIMP-1表达增强,TIMP-1增加的程度可反映肝纤维化的严重程度^[8]。本研究显示,模型组肝组织TIMP-1表达较空白对照组明显增多;与模型组比较,小柴胡汤高剂

量组 TIMP-1 表达明显降低,更进一步证实小柴胡汤对肝纤维化具有一定治疗作用。目前已经明确 HSC 的激活以及由此产生的一系列复杂生物学效应在肝纤维化发生、发展过程中所处的重要地位。JAK/STAT 信号通路是细胞因子信号由胞膜向核内传递的主要途径,瘦素(leptin)、血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)等与 HSC 膜上特异性受体结合后,受体亚单位发生同源或异源寡聚化,激活与受体偶联的 JAKs,并使受体胞浆段的酪氨酸磷酸化为含 SH2 的蛋白停泊位点,为 JAKs 招募并激活下游信号蛋白分子。同时通过 JAKs 触发 STAT 蛋白 C 末端酪氨酸残基(Tyr705)丝氨酸残基(Ser727)磷酸化,激活 STATs 蛋白,形成同源或异源 STATs 蛋白二聚体,进而移位到细胞核内,与相应靶基因的启动子结合,转录目的基因,从而活化 HSC^[9-11]。本研究显示,四氯化碳诱导大鼠肝纤维化过程中可引起大鼠肝组织 JAK2, STAT3 mRNA 表达升高,而小柴胡汤治疗后可下调其表达,说明 JAK2/STAT3 信号通路参与肝纤维化的形成,小柴胡汤可抑制该通路的信号传递。

综上所述,小柴胡汤对肝纤维化具有一定治疗作用,其作用机制可能与降低肝组织 JAK2 和 STAT3 的表达,阻断 JAK2/STAT3 信号通路,从而抑制 HSC 的活化有关。实验的不足之处在于未使用阻断剂或基因沉默/敲除技术进一步证明小柴胡汤的作用机制,并且小柴胡汤是否参与调节 HSC 的其他相关通路,也值得进一步研究。

[参考文献]

[1] Jiao J, Friedman S L, Aloman C. Hepatic fibrosis [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2009, 25(3): 223.
[2] Puche J E, Saiman Y, Friedman S L. Hepatic stellate

cells and liver fibrosis [J]. Compr Physiol, 2013, 3(4): 1473.
[3] Mair M, Blasa L, Osterreicher C H, et al. JAK-STAT signaling in hepatic fibrosis [J]. Front Biosci, 2011, 16: 2794.
[4] Lakner A M, Moore C C, Gullledge A A, et al. Daily genetic profiling indicates JAK/STAT signaling promotes early hepatic stellate cell transdifferentiation [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(40):5047.
[5] 胡小剑, 刘晓秋. 小柴胡汤对四氯化碳/乙醇诱发小鼠肝癌肝-脑损伤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 207.
[6] 帅峰. 中药小柴胡汤对肝纤维化大鼠 MMPs 与 TIMPs mRNA 的影响 [J]. 安徽医药, 2009, 13(2): 139.
[7] 杨竞, 徐洋, 金涛, 等. 白藜芦醇通过抑制 TGF- β_1 /Smad2 信号通路抗糖尿病肾病[J]. 中国新药与临床, 2013, 32(4): 307.
[8] 伍朝君, 朱舟, 邓志刚. 八味柔肝颗粒对肝纤维化大鼠肝组织 TGF- β_1 , α -SMA 及 TIMP-1 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 217.
[9] Handy J A, Fu P P. Adiponectin inhibits leptin signaling via multiple mechanisms to exert protective effects against hepatic fibrosis [J]. Biochem J, 2011, 440(3): 385.
[10] Choi S S, Syn W K. Leptin promotes the myofibroblastic phenotype in hepatic stellate cells by activating the hedgehog pathway [J]. J Biol Chem, 2010, 285(47): 36551.
[11] 李焯, 夏纪毅, 陈文, 等. 灵芪调肝胶囊对大鼠肝星状细胞 JAK/STAT 信号通路的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2013, 21(9): 663.

[责任编辑 聂淑琴]

欢迎投稿

欢迎订阅