

芍药汤调节湿热型溃疡性结肠炎大鼠 JAK2/STAT3 和 SOCS3 的分子机制

王移飞, 赵党生*, 王凤仪, 张小元, 李琳, 张磊, 蒲晓薇, 祖健
(甘肃中医药大学, 兰州 713000)

[摘要] **目的:**观察芍药汤通过治疗湿热型溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)大鼠模型,对结肠组织 JAK2/STAT3 和 SOCS3 的影响,从分子水平上探讨芍药汤治疗湿热型 UC 的机制。**方法:**Wistar 大鼠雌雄各 60 只,分为空白组、模型组、芍药汤高、中、低(24, 12, 6 g·kg⁻¹)剂量组、阳性药组(柳氮磺吡啶组, 1 g·kg⁻¹),通过高脂高糖辛辣食物加免疫复合法, 2, 4, 6-三硝基苯磺酸(TNBS)结合乙醇复合法复制湿热型 UC 大鼠模型,芍药汤高、中、低剂量灌服,柳氮磺吡啶组予柳氮磺吡啶研磨成粉灌服,空白组及模型组予等体积生理盐水灌胃,连续 21 d。采集结肠组织,运用苏木素-伊红(HE)染色观察病理切片、实时荧光定量 PCR 法(Real-time PCR)检测基因含量、蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白含量。**结果:**模型组产生炎症反应,镜下出现黏膜损伤、溃疡,提示造模成功。与空白组比较,模型组 JAK2, STAT3 蛋白及基因表达明显升高($P < 0.05$), SOCS3 明显下降($P < 0.05$);与模型组比较,各治疗组 JAK2, STAT3 蛋白及基因表达明显下降,其中芍药汤高剂量组最为显著($P < 0.01$), SOCS3 明显升高,芍药汤高剂量组最为显著($P < 0.05$)。**结论:**芍药汤能够改善湿热型 UC 大鼠结肠黏膜组织的病变程度,有效减轻炎症反应,与 SOCS3 抑制 JAK2/STAT3 信号通路,产生负反馈调节,降低其活化有关。

[关键词] 芍药汤; 溃疡性结肠炎; 湿热型; JAK/STAT3 信号通路; 细胞因子信号抑制物 SOCS3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)23-0097-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017230097

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170912.1408.026.html>

[网络出版时间] 2017-09-12 14:08

Effect of Shaoyatong in Adjusting Molecular Mechanism of JAK2/STAT3 and SOCS3 in Syndrome Ulcerative Colitis Rats

WANG Yi-fei, ZHAO Dang-sheng*, WANG Feng-yi, ZHANG Xiao-yuan, LI Lin,
ZHANG Lei, PU Xiao-wei, ZU Jian
(Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 713000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Shaoyatong on colon tissues JAK2/STAT3 and SOCS3, in order to discuss the mechanism of Shaoyatong by treating the rat model of syndrome type ulcerative colitis (UC). **Method:** A total of 120 Wistar rats, including 60 male rats and 60 female rats, were divided into 6 groups: blank group, model group, high-dose (24 g·kg⁻¹), medium-dose (12 g·kg⁻¹), low-dose (6 g·kg⁻¹) Shaoyatong groups, and western medicine group (sulfasalazine group, 1 g·kg⁻¹). High-fat, high-sugar, spicy food plus immune complex, TNBS (2, 4, 6-trinitro-benzene-sulfonic acid) and ethanol were used to replicate the syndrome type UC rat model. Wistar rats in different groups were given different treatments for consecutively 21 days. In Shaoyatong group, Wistar rats were given high, medium and low-dose Shaoyatong by gavage. In western medicine group, they were administered with sulfasalazine powder. In blank group and model group, they were

[收稿日期] 20170629(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(8150150228)

[第一作者] 王移飞,在读硕士,从事中医四诊理论研究与分析, Tel:18809293202, E-mail:2553247625@qq.com

[通讯作者] *赵党生, 硕士, 教授, 主任医师, 从事脾胃病与肛肠疾病证候基础、治则治法研究, Tel:15002634558, E-mail:zds69@123.com

given isopyknic normal saline for intragastric administration. After collecting abdominal aorta serum and colon tissues, sue-eosin methyl (HE) staining was used to observe the pathological section; Real-time PCR method was used to detect the contents of genes. And Western blot method was used to detect the contents of protein. **Result:** The model group showed inflammatory reaction, mucosa damage and ulceration under the endoscope, which indicated the successful modeling. Compared with blank group, model group's JAK2 and STAT3 protein and gene expressions increased significantly ($P < 0.05$), while SOCS3 decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, in Shaoyaotang treatment groups, JAK2 and STAT3 protein and gene expressions were significantly decreased, and high-dose Shaoyaotang group showed the most obvious effect ($P < 0.01$); SOCS3 increased dramatically, and high-dose Shaoyaotang group showed the most obvious effect ($P < 0.05$). **Conclusion:** Shaoyaotang can improve the pathological changes in colon mucosal tissues of rats with syndrome type UC and reduce inflammation, which may be related to the inhibition of JAK/STAT3 signaling pathway by SOCS3, the generation of negative feedback regulation and the decrease in activation.

[**Key words**] Shaoyaotang; ulcerative colitis; syndrome; JAK/STAT3 signaling pathway; cytokine signaling inhibitor SOCS3

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 又称慢性非特异性溃疡性结肠炎, 是一种原因不明的大肠黏膜慢性溃疡性病变, 其炎症部位主要累及直肠黏膜、乙状结肠黏膜, 也可逆行向上扩展至左半结肠、右半结肠, 甚至全结肠和末端回肠, 临床症状以腹痛腹泻、黏液脓血便伴有里急后重为主, 呈慢性反复发作性^[1-2]。近年来 UC 发病率呈上升趋势, 肠管部过长时间的炎症大幅度的降低了患者的生活质量, 并增加其结肠癌的发病概率。患有溃疡性结肠炎者, 其结肠癌的发病率高出正常人 2.4 倍^[3]。所以研究 UC 的发病机制及治疗手段, 改善 UC 患者的生活质量及预后, 具有重要意义。JAK/STATs (Janus kinase/signal transducer and activators of transcription) 信号通路是近年来发现的一条由细胞因子刺激的一系列多效的级联反应, 不仅参与细胞的增殖、分化、凋亡, 并且在免疫系统发育和应答中发挥关键作用^[4-5]。Musso 等^[6] 研究发现, 在 UC 患者中, 在炎症组织黏膜中可检测出活化的 STAT3, 并且发现其活化范围局限于活动性炎症区域; 在胃肠道炎症的靶向研究中, Koukos 等^[7] 发现 miRNA (miR)-124 可直接靶向 STAT3 mRNA, 活动期 UC 患儿结肠组织中 miR-124 表达降低, STAT3 表达和活性增强, 提示可通过上调 miR-124 抑制 STAT3 活化, 进而抑制 UC 患者的结肠炎症; 细胞因子信号转导因子 (Suppressor of cytokine signaling, SOCS) 被认为 STATs 的靶基因, 可直接对抗 STATs 活化, 产生经典负反馈回路^[8]。赵青春^[9] 通过实验研究发现, 上调 SOCS3, 抑制 JAK2/STAT3 活化, 能够改善实验性结肠炎。所以, 通过对 JAK/STATs 信号通路的激

活, 研究 UC 大鼠的发病及治疗机制具有重要意义。

根据 UC 的发病特点及主要症状, 中医学认为湿热内蕴是 UC 急性期的主要发病机制, 以清热利湿法治疗湿热型 UC 具有显著疗效, 故选方《保命集》中的芍药汤, 其有清热利湿, 调气活血的功效, 临床众多医家治疗多有显著疗效^[10-12], 但其治疗机制尚无法明确阐明。本研究在湿热型 UC 大鼠模型的建立下, 通过芍药汤的治疗, 观察分析 JAK2, STAT3 及其信号转导因子 SOCS3 的影响, 从而进一步从分子水平来解释清热利湿法治疗 UC 的机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 Wistar 大鼠 96 只, 雌雄皆用, 体重 (200 ± 20) g, 由中国农业科学院兰州兽医研究所提供。食固体饲料, 食水自由, 并观察进食、饮水、活动、大小便情况, 均确认为健康大鼠后以备实验使用。许可证号 SYXK (甘) 2015-0005, 所有动物实验研究均符合甘肃中医药大学伦理委员会有关动物实验指导原则。

1.2 药物及试剂 芍药汤原料药材根据 2015 年版《中国药典》依法炮制, 由甘肃中医学院附属医院药剂科制剂室加工, (由芍药-当归-黄连-槟榔-木香-大黄-黄芩-肉桂-炙甘草 4:2:2:1:1:1:2:1:1)。5% 的 TNBS, 大鼠 IgG 抗原, 完全弗式佐剂 (美国 Sigma 公司, 批号分别为 SLBP0889V, 20170301, SLBP0432V), 柳氮磺吡啶 (上海信宜天平药业有限公司, 批号 09161210); 抗兔 JAK2, SOCS3 抗体 (英国 Abcam 公司, 批号分别为 GR43523-13, GR312354-1); 抗兔 STAT3 抗体 (美国 Gene Tex 公司, 批号 39953); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH, 中

国大连宝生物公司,批号 V20160825), trizol (美国 Ambion 公司,批号 152104) 水合氯醛(中国天津市凯信化学工业有限公司,批号 20150328), 无水乙醇(天津市富宇精细化工有限公司,批号 20160410), 猪油(中国江苏南顺食品有限公司,批号 K161209), 红星二锅头(中国北京红星股份有限公司,批号 20170103)。

1.3 仪器 DMIL-BFC295 型倒置显微镜, Leica DFC295 型凝胶成像系统(日本奥林巴斯公司); S1000 型逆转录 PCR 仪, 非标蛋白浓度仪, PowerPac 型转膜仪, Mri-PROTEAN 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); Applied biosystems 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Firsher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 湿热内蕴型 UC 大鼠模型的制备——病证结合模型^[13]

2.1.1 湿热内蕴证大鼠模型的复制方法 取 100 只 Wistar 大鼠高脂饲料的养, 根据大鼠体重隔日交替灌服猪油和白酒, 共 20 d; 在造模第 6 天及第 20 天于大鼠背部、腹股沟、足趾部多点注射抗原。

2.1.2 UC 大鼠模型的复制方法 在湿热内蕴证候模型成功后, 各组大鼠在第 21 天禁食不禁水 24 h, 用 10% 水合氯醛 3 mL·kg⁻¹ 腹腔注射麻醉后, 将直径 2 mm, 长 15 cm 的硅胶管由肛门轻柔插入 6 cm 处, 按 100 mL·kg⁻¹ 计算 TNBS(约等于 TNBS 原液 0.02 mL·kg⁻¹) + 50% 乙醇 0.25 mL 缓慢注入距肛门约 6 cm 处的肠腔内, 捏紧肛门, 倒置 8 min 即可。

2.2 分组、给药、标本采集

2.2.1 分组 将 120 只 Wistar 大鼠分为 6 组, 雌雄各半, 每组各 10 只, 为空白组, 模型组, 芍药汤高、中、低剂量组, 柳氮磺吡啶组。

2.2.2 给药 在造模完成后第 2 天, 芍药汤小中大剂量组按 6, 12, 24 g·kg⁻¹ 煎剂灌胃干预(相当于 60 kg 体重成人每日用量的 2, 5, 10 倍, 按人与动物体型系数换算), 柳氮磺吡啶组按 1 g·kg⁻¹ 剂量灌胃(相当于 60 kg 体重成人每日用量的 5 倍, 等效剂量按人与动物体型系数换算), 空白组及模型组灌胃给予等体积生理盐水, 连续 21 d。

2.2.3 标本采集 大鼠 UC 造模成功并治疗后, 各组动物于末次灌胃给药后禁食不禁水 24 h, 测体重作记录用 10% 水合氯醛(3 mL·kg⁻¹) 麻醉后, 在低温条件下快速剖取肛门上 8 cm 结肠组织, 以冰冷的生理盐水冲洗, 滤纸吸干, 纵向切开一部分置于 4% 的多聚甲醛密封避光 4 °C 保存, 另一部分置于无酶

冻存管 - 80 °C 保存待测。

2.3 大鼠疾病活动指数和结肠组织病理评分 造模成功后每日观察大鼠体重、活动状态、毛发色泽、稀疏程度、大便质地、肉眼血便情况, 根据疾病活动指数(disease activity index, DAI) 评分标准进行评分(表 1)。将 4% 的多聚甲醛密封避光 4 °C 保存的各组结肠, 进行常规脱水, 石蜡包埋, 切片, 苏木素-伊红(HE) 染色, 在光学显微镜下盲法观察, 参照 Gaudio 的结肠病理评分标准观察评分。

表 1 疾病活动指数

Table 1 Disease activity index

体重降低/%	大便隐血/肉眼血便	计分
0	正常	0
1~5	大便隐血	1
5~10	大便隐血	2
10~15	肉眼血便	3
>15	肉眼血便	4

2.4 采用实时荧光定量 PCR 法(Real-time PCR) 检测结肠黏膜组织中 JAK2, STAT3, SOCS3 mRNA 的表达 采用 trizol 试剂提取结肠黏膜细胞总 RNA, 紫外分光光度计检测 RNA 的质量和浓度。参照逆转录试剂盒说明, 进行逆转录, 合成 cDNA。使用大连宝生物公司(Takara) 设计引物序列, 引物序列如下 β -action (127 bp): 上游 5'-GGAGATTACTGCCC TGGCTCCTA-3', 下游 5'-GACTCATCGTACTCTGCT TGCTG-3'; JAK2 (101 bp): 上游 5'-TTTGAAGACA GGGACCCTACACAG-3', 下游 5'-TCATAGCGGC ATCTCCACA-3'; STAT3 (118 bp): 上游 5'-TTTGA GACAGAGGTGTACCACCAAG-3', 下游 5'-TCATAG CGGCACATCTCCACA-3'; SOCS3 (115 bp): 上游 5'-TCACCCACAGCAAGTTTCC-3', 下游 5'-TCCAGTA GAATCCGCTCTCC-3'; 按 Real-time PCR 试剂盒在进行 PCR 扩增, 反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 1 min 后采集信号, 重复 35 个循环, 得出内参及各指标 C_t 值。根据相对定量法 2^{-ΔΔC_t} 计算出 mRNA 的相对表达量。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot) 检测结肠组织中 JAK2, STAT3, SOCS3 蛋白的表达 采用 RIPA 蛋白提取液提取蛋白质, 提取的蛋白置 -70 °C 保存备用。用 BCA 法检测样品蛋白质浓度, 取蛋白质 100 μg 加入 2 × SDS 凝胶加样缓冲液中, 将样品经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶(层积胶 80 V, 30 min, 分离胶 120 V, 1 h) 电泳分离。胶中蛋白质在 70 mA

恒流状态下 4 ℃ 过夜电泳转移至硝酸纤维素膜。膜在 5% 脱脂奶粉 37 ℃ 封闭 2 h。加入一抗 JAK2, STAT3, SOCS3 (1:1 000), 分别与硝酸纤维素膜 4 ℃ 培育过夜。与辣根过氧化物酶标记的二抗 IgG (1:5 000) 37 ℃ 温浴 1 h。用 Western blot 印迹荧光发光检测试剂盒曝光、压片。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计软件处理, 采用单因素变量法进行方差分析, 采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以最小显著差法进行两两比较, 双侧检验以 $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

3 结果

3.1 芍药汤对湿热型 UC 大鼠 DAI 的影响 与空白组比较, 造模成功后模型组及各中药组、柳氮磺吡啶组出现明显的体重减轻, 毛发稀疏, 色泽暗淡, 精神状态差, 扎堆蜷卧明显, 肛门异常污秽, 大便黏腻、恶臭, 出现不同程度的灰黑便; 经过 1 周的治疗, 中药高剂量组、柳氮磺吡啶组大鼠状态较前改善, 仍有扎堆现象, 模型组, 芍药汤低、中剂量组如前; 经过 3 周的治疗后, 芍药汤高剂量组、柳氮磺吡啶组与模型组比较, 大鼠状态明显改善, 无明显扎堆蜷卧现象, 肛门污秽已不明显, 体重明显升高, 大便质地均为颗粒样便, 无明显灰黑便。与空白组比较, 模型组 DAI 评分明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比较, 芍药汤 24 g·kg⁻¹ 组及柳氮磺吡啶组 DAI 评分明显降低 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 芍药汤对湿热型 UC 大鼠 DAI 评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 2 Effect of Shaoyao tang on DAI score of syndrome UC rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	DAI/分
空白	-	0.21 ± 0.04
模型	-	2.56 ± 0.78 ¹⁾
芍药汤	6	2.14 ± 0.49
	12	2.07 ± 0.46
	24	0.87 ± 0.33 ²⁾
柳氮磺吡啶	1	0.78 ± 0.37 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组相比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 芍药汤对湿热型 UC 大鼠的结肠病理的影响

空白组黏膜表面上皮完整无缺损, 隐窝内外无坏死, 固有层腺体结构明显, 排列整齐, 黏膜下层无充血、水肿, 炎性细胞无坏死, 杯状细胞丰富; 模型组黏膜表层严重缺损, 表面少有上皮覆盖, 隐窝内外均有溃破、坏死, 形成溃疡, 累及各层肠壁, 杯状细胞较空白组明显减少, 并伴有大量的炎性细胞浸润; 芍药汤

高剂量组、柳氮磺吡啶组结肠黏膜可见腺体增生活跃, 有少量腺体及杯状细胞, 腺体变形, 排列紊乱, 数目减少等萎缩改变, 芍药汤高剂量组黏膜固有层可见少量炎性细胞浸润, 柳氮磺吡啶组仍有大量炎性细胞浸润; 芍药汤中、低剂量组黏膜表层不完整, 仍有多于高剂量组的炎性细胞浸润于固有膜及表面上皮, 但明显少于柳氮磺吡啶组, 有少量腺体增生, 杯状细胞减少。见图 1。

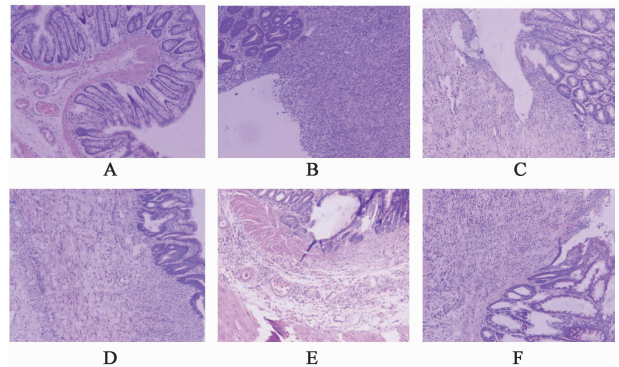


图 1 各组结肠黏膜镜下观察 (HE, ×100)
Fig. 1 Result of observation of colonic mucosa in each group (HE, ×100)

3.3 对湿热型 UC 大鼠结肠 JAK2, STAT3, SOCS3 mRNA 的影响

与空白组相比较, 模型组中的 JAK2, STAT3 基因含量明显上升 ($P < 0.01$), 负反馈调节因子 SOCS3 基因表达明显下降 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 柳氮磺吡啶组 JAK2, STAT3 基因含量明显降低 ($P < 0.01$), SOCS3 的基因表达上升 ($P < 0.01$); 与模型组相比较, 芍药汤高、中、低剂量组 JAK2, STAT3 基因含量明显降低, 表达明显减弱 ($P < 0.01$), 而 SOCS3 的基因表达明显上升, 活化程度明显升高 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 对湿热型 UC 大鼠结肠 JAK2, STAT3, SOCS3 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Effect of colonic JAK2, STAT3 and SOCS3 mRNA of syndrome UC rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	JAK2	STAT3	SOCS3
空白	-	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
模型	-	3.84 ± 0.10 ²⁾	6.70 ± 1.80 ²⁾	0.63 ± 0.15 ¹⁾
芍药汤	6	1.58 ± 0.39	4.25 ± 1.31	5.98 ± 0.79
	12	0.60 ± 0.06	2.92 ± 0.68	7.81 ± 0.97
	24	0.28 ± 0.02 ³⁾	1.15 ± 0.41 ³⁾	9.33 ± 0.17 ³⁾
柳氮磺吡啶	1	0.23 ± 0.14 ³⁾	3.14 ± 2.12 ³⁾	8.09 ± 0.94 ³⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

3.4 对湿热型 UC 大鼠结肠的 JAK2, STAT3, SOCS3 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组 JAK2, STAT3 蛋白含量明显上升 ($P < 0.05$), 活化程度高, 作为负反馈调节蛋白的 SOCS3 蛋白表达明显下降 ($P < 0.05$); 与模型组相比较, 芍药汤高、中、低剂量组及柳氮磺吡啶组 JAK2, STAT3 蛋白含量均降低, 表达明显减弱, 以高剂量组、中剂量组、柳氮磺吡啶组最为显著 ($P < 0.05, P < 0.01$), 而 SOCS3 的蛋白表达明显上升, 活化程度均升高, 以高、中剂量组、柳氮磺吡啶组最为显著 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见

图 2, 表 4。

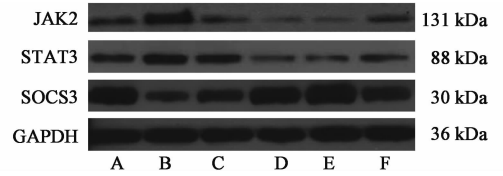


图 2 对湿热型 UC 大鼠的结肠组织 JAK2, STAT3, SOCS3 蛋白的影响

Fig. 2 Effect of colonic JAK2, STAT3 and SOCS3 of syndrome UC rats

表 4 对湿热型 UC 大鼠的 JAK2, STAT3, SOCS3 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of colonic JAK2, STAT3 and SOCS3 of syndrome UC rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	JAK2/GAPDH	STAT3/GAPDH	SOCS3/GAPDH
空白	-	1	1	1
模型	-	1.991 ± 0.031 ¹⁾	1.279 ± 0.016 ¹⁾	0.561 ± 0.003 ¹⁾
芍药汤	6	0.948 ± 0.006 ²⁾	1.153 ± 0.013	0.686 ± 0.005
	12	0.610 ± 0.004 ³⁾	0.739 ± 0.010 ²⁾	0.914 ± 0.003 ²⁾
	24	0.507 ± 0.001 ³⁾	0.705 ± 0.001 ²⁾	1.018 ± 0.031 ²⁾
柳氮磺吡啶	1	0.945 ± 0.027 ²⁾	0.875 ± 0.010 ²⁾	0.801 ± 0.016 ²⁾

4 讨论

细胞因子信号转导抑制蛋白-3 属于细胞因子信号转导抑制蛋白(SOCS)家族, 它是一类可以对多种细胞因子和激素产生的信号转导过程进行负性调节的蛋白, 有相关研究表明其 N 末端具有一个激酶抑制区(KIR)作为假底物, 对 JAK 产生竞争性拮抗作用, 从而抑制 JAK 的活性。另外, SOCS 家族所共有的 SH-2 核心区也可以通过与 JAK 磷酸化的酪氨酸残基结合抑制其活性^[14-16]。其又作为 SOCS 家族重要成员, 参与了多种信号通路的转导调控, 众多研究表明在参与多种炎症因子和抗炎因子的转导表达, 免疫分子信号传导负调控机制中发挥着重要作用^[17]。而近年来研究发现 UC 发病机制中的相关信号通路, 与 SOCS3 的高度调节有关^[18-20]。CHEN 等^[18]的研究发现在 UC 模型 + 空载体组中, 白细胞介素-6(IL-6) 和 STAT3 表达随病变程度增加而增加, SOCS3 的表达减弱, 活化度降低; León 等^[19]发现在建立肠道性炎症病模型后, 通过检测细胞因子和黏膜损伤标志物证实, 在受影响区域 SOCS3 有所增加。本研究结果显示, 湿热型 UC 模型的 SOCS3 的结肠黏膜组织 mRNA 含量、蛋白表达量有所下降, 而湿热型 UC 大鼠经芍药汤治疗后, SOCS3 的结肠黏膜组织 mRNA 含量、蛋白表达量明显上升, 以芍药汤高剂量组尤为显著, 说明芍药汤能够上调

SOCS3 在湿热型 UC 大鼠体内的表达。

JAK2 作为 JAKs 家族的重要成员之一, 广泛分布于人体内。与 UC 发病机制有密切联系的信号通路为 JAK/STAT3, 其基本传递过程为: 细胞因子与其受体结合后引起相关受体分子二聚化, 使受体偶联的 JAKs 相互接近并通过交互的酪氨酸磷酸化, 形成相应的 STAT3 停靠位点, 通过 SH2 结构域与受体结合并在 JAKs 的作用下实现磷酸化活化, 随后 STAT3 形成的同/异源二聚体并入核, 与相应靶基因启动子结合, 激活相应基因转录和表达^[20]。史伟等^[21]认为 JAK2 可与 STAT 家族多个成员如 STAT3 构成信号转导通路, 可直接或间接性的参与细胞生命活动、炎症反应。Im 等^[22]通过对 UC 患者的结肠黏膜蛋白水平测定表明, STAT3 参与了 UC 结肠黏膜的炎症反应。罗云春等^[23]发现溃结方可显著降低 UC 大鼠结肠黏膜组织中的 JAK2 和 STAT3 蛋白的表达。本研究结果显示, 与空白组比较, 模型组的 JAK2, STAT3 结肠黏膜组织 mRNA 含量及蛋白表达量明显升高, 经过芍药汤治疗后 JAK2, STAT3 结肠黏膜组织 mRNA 含量及蛋白表达量明显下降, 以芍药汤高剂量组最为显著, 说明 UC 的发病使 JAK2/STAT3 信号通路激活, 芍药汤能够调控 JAK2, STAT3 在 UC 大鼠体内的表达, 抑制 JAK2/STAT3 信号通路的活化, 从而抑制其在湿热型 UC 大鼠体

内的表达。

综上所述,湿热型 UC 大鼠 JAK2/STAT3 信号通路激活,其基因及蛋白表达量上升,SOCS3 表达量降低,经过芍药汤治疗后湿热型 UC 大鼠 JAK2/STAT3 信号通路被抑制,JAK2,STAT3 基因和蛋白表达量明显降低,SOCS3 的表达量明显上升。由此可以发现芍药汤可通过调控信号负调控转录因子 SOCS3,对 JAK2 产生竞争性拮抗作用,抑制 JAK2 磷酸化,阻止 STAT3 与相应的靶基因启动因子相结合,使 JAK2/STAT3 基因转录表达受到限制,从而改善湿热型 UC 大鼠的炎症反应,促进结肠黏膜组织修复与再生,这可能是芍药汤治疗湿热型 UC 的机制之一。同时也说明了运用具有清热利湿法的代表方芍药汤可治疗治疗湿热型 UC 大鼠,进一步为中医辨证治疗 UC 在分子水平的研究机制提供了一定的理论基础。

[参考文献]

[1] Bannwart C F, Nakaira-Takahagi E, Golim M A, et al. Downregulation of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) pathway by silibinin in human monocytes challenged with *Paracoccidioides brasiliensis* [J]. *Life Sci*, 2010, 86 (23/24):880-886.

[2] Kaser A, Zeissig S, Blumberg R S. Inflammatory bowel disease[J]. *Annu Rev Immunol*, 2010, 2(8):573-621.

[3] Jess T, Rungoe C, Peyrin-Biroulet L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis; a Meta-analysis of population-based cohort studies [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2012, 10(6):639-645.

[4] NI A, MP Z. JAK/STAT signalling in drosophila; insights into conserved regulatory and cellular functions [J]. *Development*, 2006, 133(14):2605-2616.

[5] Shashidhar S Jatiani, Baker S J, Silverman L R, et al. JAK/STAT pathways in cytokine signaling and myeloproliferative disorders approaches for targeted therapies[J]. *Genes Cancer*, 2010, 1(10):979-993.

[6] Musso A, Dentelli P, Alessandra C, et al. Signal transducers and activators of transcription 3 signaling pathway: an essential mediator of inflammatory bowel disease and other forms of intestinal inflammation[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2005, 11(2):91-98.

[7] Koukos G, Polytarchou C, Kaplan J L, et al. MicroRNA-123 regulates STAT3 expression and is down-regulated in colon tissues of pediatric patients with ulcerative colitis[J]. *Gastroenterology*, 2013, 145(4):842-852.

[8] 薛翔, 聂时南. JAK/STAT3 信号通路及其胃肠道疾

病中作用的研究进展[J]. *胃肠病学*, 2014, 19(5):302-305.

[9] 赵青春. 基于 IL-6/STAT3/SOCS3 通路研究清肠化湿方治疗溃疡性结肠炎的作用机制[D]. 南京:南京中医药大学, 2015.

[10] 陈伟. 加味芍药汤对湿热内蕴型慢性溃疡性结肠炎患者血浆 TXB2 与 6-Keto-PGF1 α 的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2006, 13(7):10-11.

[11] 陈文杰, 杨勤. 加味芍药汤口服联合灌肠治疗溃疡性结肠炎的疗效观察[D]. 南京:南京中医药大学, 2013.

[12] 陈锦锋, 陈建林, 韩宇斌, 等. 芍药汤合白头翁汤治疗轻中度溃疡性结肠炎(湿热内蕴型)30 例疗效观察[J]. *新中医*, 2008, 40(7):47-48.

[13] 翁一洁, 郑学宝. 湿热型溃疡性结肠炎大鼠模型的建立与研究[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(10):2522-2525.

[14] Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins cytokine signalling and immune regulation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(6):454-465.

[15] Croker B A, Kiu H, Nicholson S E. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2008, 19(4):414-422.

[16] 薛帆, 崔雪薇, 张春东. 细胞因子信号传导抑制蛋白-3 (SOCS-3) 作用的研究进展[J]. *中国当代医药*, 2011, 2(18):178-179.

[17] 牛丽娜, 陈显久. SOCS3 结构和作用机制研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2014, 22(11):2757-2760.

[18] CHEN Y Y, MA Z B. IL-6/STAT3/SOCS3 signaling pathway playing a regulatory role in ulcerative colitis carcinogenesis [J]. *Int J Clin Med*, 2015, 8(8):12009-12017.

[19] León A J, Gómez E, Garrote J A, et al. High levels of proinflammatory cytokines, but not markers of tissue injury, in unaffected intestinal areas from patients with IBD[J]. *Mediators Inflamm*, 2009(2):1-10.

[20] 薛翔, 聂时南. JAK/STAT3 信号通路及其在胃肠道疾病中作用的研究进展[J]. *胃肠病学*, 2014, 19(5):301-305.

[21] 史伟, 葛文松. 健脾溃结方对脾虚性溃疡性结肠炎患者免疫功能影响的分析[J]. *中国实用医药*, 2007, 2(9):60-62.

[22] Im E, Jung J, Pothoulakis C. Disruption of pten speeds onset and increases severity of spontaneous colitis in II 10(-/-) mice [J]. *Gastroenterology*, 2014, 147(3):667-679, e10.

[23] 罗云春, 易文, 姚宇宙, 等. 溃结方对溃疡性结肠炎大鼠炎症反应因子与肠黏膜修复作用的研究[J]. *世界中医药*, 2016, 11(11):2375-2379.

[责任编辑 邹晓翠]