

黄芪建中汤对脾胃虚寒型胃溃疡模型大鼠 JAK2/STAT3 信号通路的影响

白敏¹, 段永强^{1,2*}, 杨晓轶¹, 王强¹, 李钦³, 巩子汉¹, 马骏¹, 王斑¹

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 敦煌医学与转化教育部重点实验室, 兰州 730000;
3. 甘肃卫生职业学院, 兰州 730000)

[摘要] 目的:探讨黄芪建中汤对脾胃虚寒型胃溃疡(GU)模型大鼠 Janus 蛋白酪氨酸激酶 2(JAK2)/信号转导和转录活化因子 3(STAT3)信号通路的影响。方法:将 60 只 SPF 级 Wistar 大鼠随机分为正常组和模型组,模型组大鼠采用综合造模法重建脾胃虚寒型 GU 模型,将模型大鼠按随机数字表法分为模型组、安胃疡组和黄芪建中汤高、中、低剂量组,每组 10 只。正常组和模型组大鼠给予 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹蒸馏水灌胃,黄芪建中汤高、中、低剂量组分别给予 16, 8, 4 g·kg⁻¹·d⁻¹黄芪建中汤灌胃,阳性药组给予 0.14 g·kg⁻¹·d⁻¹安胃疡灌胃,持续治疗 21 d。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测各组大鼠胃组织中白细胞介素-10(IL-10),白细胞介素-17(IL-17)含量,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测胃组织 JAK2, STAT3 mRNA 表达水平,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测胃组织 JAK2, STAT3 蛋白表达以及磷酸化水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠一般生存状况相对较差,胃组织匀浆液中 IL-10 含量明显降低,IL-17 含量明显升高($P < 0.05$),胃组织 JAK2, STAT3 蛋白表达水平升高不明显,而 JAK2, STAT3 mRNA 表达及蛋白磷酸化水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,治疗组大鼠 IL-10 含量升高,IL-17 含量降低, JAK2, STAT3 mRNA 表达及蛋白磷酸化水平均降低,其中尤以黄芪建中汤高剂量组明显($P < 0.05$)。结论:黄芪建中汤具有改善脾胃虚寒型胃溃疡模型大鼠的生存状况的作用,其机制可能与干预 JAK2/STAT3 通路激活所介导的胃黏膜免疫屏障功能障碍有关。

[关键词] 黄芪建中汤;胃溃疡;免疫屏障;Janus 蛋白酪氨酸激酶 2(JAK2)/信号转导和转录活化因子 3(STAT3)信号通路

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)20-0032-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201908

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200721.0956.004.html>

[网络出版日期] 2020-7-21 14:31

Effect of Huangqi Jianzhongtang on JAK2/STAT3 Signal Pathway in Rats with Spleen-Stomach Deficiency Cold Type Gastric Ulcer

BAI Min¹, DUAN Yong-qiang^{1,2*}, YANG Xiao-yi¹, WANG Qiang¹, LI Qin³, GONG Zi-han¹, MA Jun¹,
WANG Ban¹

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

2. Key Laboratory of Dunhuang Medicine and Transformation Under Ministry of Education, Lanzhou 730000, China; 3. Gansu Province Health School, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Huangqi Jianzhongtang on Janusprotein tyrosine kinase 2/signal transducers and transcriptional activator protein 3 (JAK2/STAT3) signal pathway in rats with spleen-stomach deficiency cold type gastric ulcer (GU). **Method:** A total of 60 SPF level Wistar rats were randomly divided into two groups: blank group and model group. Model rats were used to reconstruct the spleen-

[收稿日期] 20200216(008)

[基金项目] 甘肃省中医方药挖掘与创新转化重点实验室开放基金项目(ZYFYZH-KJ-2016-006);甘肃省教育厅高等学校科研基金项目(2018A-044);甘肃中医药大学科创基金项目(KCYB2018-1)

[第一作者] 白敏,在读硕士,从事脾胃学术思想与临床应用研究,E-mail:1115487589@qq.com

[通信作者] *段永强,教授,博士生导师,从事中医老年病、脾胃病和敦煌古医方的研究,E-mail:dyqgs2008@163.com

stomach deficiency cold type GU model by comprehensive modeling method. Model rats were divided into model group, Anweiyang group and high, medium and low-dose Huangqi Jianzhongtang groups according to the random number table, with 10 rats in each group. Rats in blank group and model group were given $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ distilled water, and 16, 8, 4 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ Huangqi Jianzhongtang, respectively. Rats in the positive control group were given $0.14 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ Anweiyang for 21 days. The gene expressions of JAK2 and STAT3 in the ulcer tissue were detected by Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), the protein expressions and phosphorylation levels of JAK2 and STAT3 in the ulcer tissue were detected by Western blot, and the contents of interleukin-10 (IL-10) and interleukin-17 (IL-17) in the gastric tissue of each group were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Compared with the blank group, the general survival condition of the model group was worse, the content of IL-10 in gastric homogenate was significantly reduced, while the content of IL-17 was significantly increased ($P<0.05$), the protein expressions of JAK2 and STAT3 in gastric tissue was not significantly increased, whereas the gene expressions and phosphorylation levels of JAK2 and STAT3 were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the content of IL-10 increased, but the content of IL-17 decreased, the gene expressions of JAK2 and STAT3 and the level of protein phosphorylation decreased in the treatment group, especially in the high-dose Huangqi Jianzhongtang group, with statistically significant differences ($P<0.05$). **Conclusion:** Huangqi Jianzhongtang can improve the survival condition of rats with spleen stomach deficiency cold type gastric ulcer, and its mechanism may be related to the intervention of gastric mucosal immune barrier dysfunction mediated by JAK2/STAT3 pathway activation.

[Key words] Huangqi Jianzhongtang; gastric ulcer; immune barrier; Janusprotein tyrosine kinase 2/signal transducers and transcriptional activator protein 3 (JAK2/STAT3) pathway

胃溃疡(GU)是影响胃肠道常见疾病之一,发病率较高,临床治疗不当可能引发出血、穿孔等并发症,严重影响人们的生活质量^[1-2]。目前现代医学针对该病主要通过使用奥美拉唑等质子泵抑制剂和雷尼替丁等组胺H2受体拮抗剂抑制胃酸分泌^[3],临床治疗思路方法局限。而中医药对该病的治疗优势独特,传统医学根据其临床症状多将其归于“胃脘痛”一病,临床辨证论治疗效显著,故本研究建立病证结合实验动物模型,以期临床防止该病提供科学依据。

黄芪建中汤出自汉代张仲景《金匮要略·血痹虚劳篇》:“虚劳里急,诸不足,黄芪建中汤主之”,专用以治疗虚性病证。黄芪建中汤于“里急”之后提及“诸不足”,提示此方所治为脾胃虚弱、中气不足所致胃脘痛症。脾胃虚弱,气血无以荣之,见腹中拘急不舒,脘挛疼痛。该方由黄芪、饴糖、桂枝、白芍、生姜、大枣、甘草组成,功专温中补虚、和胃止痛,常常作为治疗脾胃虚寒型GU的基础方药。现代药理学研究表明,黄芪建中汤可以调节胃黏膜保护/损伤性因子,影响炎症因子的释放,进而改善胃肠道的免疫状态促进胃黏膜恢复^[4-5]。然而鲜有关于黄芪建中汤治疗脾胃虚寒型GU的具体分子机制

研究,故本课题旨在通过研究黄芪建中汤对脾胃虚寒型GU大鼠一般生存状况,胃组织匀浆液中白细胞介素-10(IL-10),白细胞介素-17(IL-17)含量,以及胃组织内JAK2,信号传导及转录激活蛋白-3(STAT3)基因蛋白表达以及磷酸化水平的影响来探讨黄芪建中汤治疗脾胃虚寒型GU的作用机制。

1 材料

1.1 动物 2月龄SPF级Wistar大鼠60只,雌雄各半,体质量(200 ± 20)g,购自甘肃中医药大学SPF级实验室,动物合格证号SCXK(甘)2015-0002。于甘肃中医药大学SPF级实验室常规饲养,相对湿度45%~55%,室温(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,12h光暗周期循环,常规标准饲料喂养,自由水食,适应性喂养3d后进行实验,实验动物处理遵守实验动物伦理原则。

1.2 药物与试剂 安胃疡胶囊(九惠制药有限公司,批号171103),将安胃疡0.14g溶于双蒸水10mL中,制备 $0.014 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 安胃疡试剂;生大黄(购自甘肃中医药大学附属医院,由甘肃中医药大学李越峰教授鉴定为正品),生大黄按质量以10倍水浸泡2h,煮5min,制成 $1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 大黄水煎液备用。黄芪建中汤组方药物(购自甘肃中医药大学附属医院,由甘肃中医药大学李越峰教授鉴定为正品),实

验处方:黄芪5 g,桂枝9 g,白芍18 g,生姜9 g,大枣4枚,炙甘草9 g,胶饴30 g(参照“十三五”教材,《方剂学》第10版,中国中医药出版社,李冀主编),制备方法:除胶饴外,其他药材按质量以10倍水浸泡2 h,电热套提取2次,合并所提取药液烱化饴糖,浓缩至每1 mL药液含生药1.6 g。大鼠IL-10,大鼠IL-17酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海将来实业股份有限公司,批号均为08/2019);反转录试剂盒(美国Promega公司,批号0000366052);实时荧光定量聚合酶链式(Real-time PCR)试剂盒(日本TaKaRa公司,批号AI82513A);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国ImmunoWay公司,批号B1501);Anti-JAK2抗体, Anti-JAK2(phospho Y705)抗体, Anti-STAT3抗体, Anti-STAT3(phospho Y705)抗体(美国Abcom公司,批号分别为GR3253328-1, GR3184958-12, GR3220487-3, GR287047-47);辣根过氧化物酶(HRP)-羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(博士德生物工程有限公司,批号BST13C23C54);苏木素-伊红(HE)染色剂,分化液,返蓝液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号分别为G1005, G1005-3, G1005-4)。

1.3 仪器 SCIENTZ-48型高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司);BIOMATE 3S型核酸蛋白测定仪, S1000™型逆转录仪, CFX96™ Optics Module Real-time PCR仪, Chemi DOC XRS+凝胶成像分析系统, Benchmark Plus酶联免疫检测仪; JY-SPAT型电泳槽, PowerPac™ Universal Power Supply型电泳及转印电源(美国Bio-Rad公司); CT14RD型高速低温离心机(上海天美生化仪器设备工程公司)。

2 方法

2.1 动物模型复制 参照文献[6-7]方法造模,分两步法进行造模,首先除正常组外,其余大鼠全部采取饥饱失常法+苦寒泻下法进行造模,造模10 d期间,隔天给食,每次以100%大黄水煎液灌胃 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, 10 d造模结束后,禁食不禁水24 h,隔日以10%水合氯醛溶液按 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射将大鼠麻醉,麻醉后将大鼠常规固定于手术台上,于大鼠左上腹备毛、常规消毒处理后,自剑突下沿腹中线切开腹壁约1.5~2 cm切口,拉出全胃,使胃前壁窦体部充分暴露,将自制内口径为5 mm,长为2~3 cm的圆柱状塑料管按置于胃窦部浆膜层处,按置部位应尽量避开胃窦表面血管以防止出血,吸取100%冰乙酸 $20\text{ }\mu\text{L}$ 注入圆柱状塑料管中,持续烧灼40 s,

灼伤后将残留乙酸用移液器吸出,再用磷酸盐缓冲液(PBS)局部清洗,处理完毕后将胃小心还纳于腹腔并覆盖大网膜,然后逐层缝合腹膜、腹膜肌层以及皮肤,再次对伤口进行消毒。模型评价标准^[6-7]为首先确认造模期间测量大鼠肛温、进食量、体质量,结合大鼠一般生存状况评定脾胃虚寒模型是否成功;手术结束3 d后,随机抽取5只大鼠用10%水合氯醛溶液腹腔注射麻醉,处死,取材肉眼观察大鼠胃黏膜溃疡状况以及溃疡面积,并于镜下观察胃黏膜组织结构变化,以确认模型复制成功。

2.2 分组及给药 采用随机数字表法,将60只SPF级Wistar大鼠适应性饲养3 d后分为正常组、模型组、安胃疡阳性药组、黄芪建中汤高、中、低剂量组,共6组,每组10只。除正常组大鼠正常饲养外,其余大鼠全部参考文献按上述方法造模,正常组大鼠在造模期间每天以 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 蒸馏水灌胃,不作任何其他处理。造模大鼠于造模成功后,即第12日起,正常组及模型组均给予蒸馏水2 mL灌胃,安胃疡组每日以 $0.14\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量给药,黄芪建中汤高、中、低剂量组分别以 $16, 8, 4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量给药(给药组均采用人与动物体表面积折算法计算,折算系数0.018,安胃疡剂量相当于人的等效剂量,黄芪建中汤高、中、低剂量组分别为人的等效剂量的2, 1, 1/2倍),连续给药21 d。

2.3 标本采集 于末次灌胃给药后,各组大鼠禁食禁水24 h后,以10%水合氯醛溶液 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射将大鼠麻醉,常规消毒后,自胸骨剑突下沿腹中线剪开,完整取出胃部,沿胃大弯侧剪开,生理盐水清洗干净后,剪取GU病灶组织低温冰箱($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)冻存,以备炎症因子、基因以及蛋白表达水平的检测。

2.4 大鼠一般症状与体征 实验过程中,观察各组大鼠的整体精神状态、活动状况、毛发光泽、粪便性状等。

2.5 胃黏膜组织病理学检查 取固定后的胃组织,石蜡包埋、切片,依次进行二甲苯梯度脱蜡、乙醇脱水、苏木素染色、分化液分化、流水冲洗、乙醇梯度脱水、伊红染色、乙醇梯度脱水、二甲苯透明、中性树脂封片。显微镜下观察大鼠胃组织溃疡状况。

2.6 ELISA检测溃疡病灶组织中IL-10, IL-17含量 采用上海将来实验股份有限公司的大鼠IL-10,大鼠IL-17 ELISA试剂盒对GU病灶组织内炎症因子IL-10, IL-17进行含量测定,严格按照说明书操作,配制组织匀浆液,离心取上清备用,准确布板、加

样,加样孔做3个重复,实验完毕后使用酶标仪测定450 nm波长,绘制标准曲线,最后计算各组样品浓度。

2.7 Real-time PCR检测溃疡病灶组织 JAK2, STAT3 mRNA表达水平 取GU病灶组织0.1 g,加入trizol 600 μL 提取总RNA。采用超微分光光度计测定其浓度以及吸光度 A_{260}/A_{280} ,质量浓度调至1500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右, A_{260}/A_{280} 均在1.8~2.0为宜。采用反转录试剂盒配置20 μL 体系将RNA反转录为cDNA以备PCR扩增反应。实验所用引物均由宝生物工程(大连)有限公司合成。JAK2(270 bp)上游5'-GCTCCTCCTCCTTGACGACTTT-3',下游5'-ACCTTATTCCGCTTCCGAGTTA-3'; STAT3(463 bp)上游5'-TGGGTCTGCTAGACAAT-3',下游5'-CGTTGGTTCACACAGAT-3'; GAPDH(156 bp)上游5'-TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC-3',下游5'-AAGATGGTGTATGGGCTTCCCG-3'。反转录反应体系、上样以及反应条件严格按照Promega公司反转录试剂盒说明书操作。选取GAPDH作为内参基因,扩增过程严格按照TaKaRa公司Real-time PCR试剂盒说明书设置,相同基因每组设4重复,6次平行实验,得到各扩增反应的 C_t 值。仔细布板以方便数据分析,将得到的目的基因和GAPDH的 C_t 值采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的mRNA相对表达量。

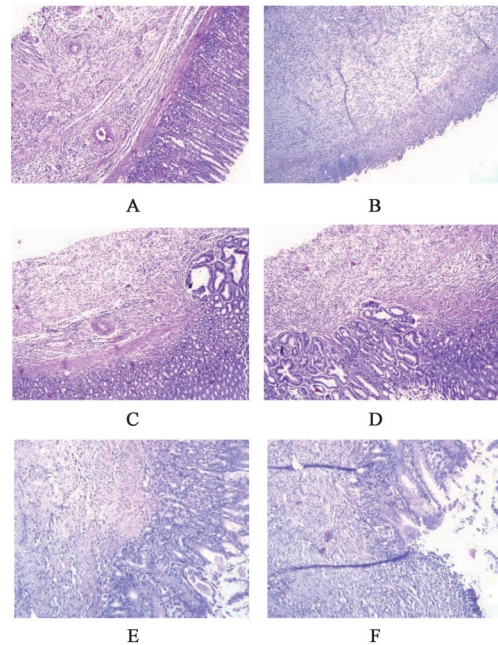
2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测胃组织 JAK2, STAT3蛋白表达及磷酸化水平 取GU病灶组织0.1 g,加入组织裂解液(REPA 588 μL +PMSF 12 μL)600 μL ,剪碎、匀浆、离心取上清,取50 μL 做BCA试剂盒对蛋白提取液进行定量分析,随后准确上样,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,120 V恒压转膜,室温封闭3 h,一抗[GAPDH, 1:5 000; JAK2, 1:5 000; p-JAK2, 1:5 000; STAT3, 1:1 000; p-STAT3, 1:2 000]4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜,1 \times TBST洗膜3次,每次摇床10 min,二抗(1:5 000)室温孵育2 h,1 \times TBST洗膜3次,每次摇床10 min,最后采用化学发光底物进行化学发光,显影后用Quantity one图像分析软件进行扫描分析,并使用Image J软件进行数据分析。

2.9 统计学方法 采用SPSS 22.0统计软件对数据进行处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较先进行方差齐性检验,方差齐者两两比较应用LSD- t 检验,方差不齐用Tamhane's T_2 法比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般状况观察 正常组大鼠始终表现为反应灵敏,皮毛浓密光泽,活动正常。而模型组大鼠从第5天开始表现为眯眼、倦卧嗜睡、被毛稀疏失泽,反应迟钝。各药物干预组大鼠在治疗第7天开始观测到被毛稀疏失泽、反应迟钝、少食怠动、消瘦倦卧、逐渐减轻,15 d时各药物干预组大鼠反应迟钝、少食怠动、消瘦倦卧、逐渐减轻等活动度趋于正常,尤其以黄芪建中汤高剂量组大鼠一般生存状况改善明显。

3.2 对GU大鼠胃黏膜形态改变的影响 正常组大鼠胃黏膜组织正常,上皮层、肌层以及浆膜层结构明显,胃黏膜上皮细胞呈单层柱状排列,未见充血水肿,固有层未见明显炎性浸润;与正常组比较,模型组大鼠失去正常组织结构,溃疡局部炎性坏死,肌层损伤,上皮细胞几乎全部脱落,炎性细胞浸润明显;各治疗组均明显可见溃疡周围正常上皮增殖迁移,对溃疡部位形成不同程度覆盖,固有腺体多呈囊性扩张,炎性细胞散在。见图1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 安胃疡组; D. 黄芪建中汤高剂量组; E. 黄芪建中汤中剂量组; F. 黄芪建中汤低剂量组

图1 黄芪建中汤对GU大鼠胃黏膜组织的影响(HE, $\times 100$)

Fig. 1 Effect of Huangqi Jianzhongtang on gastric mucosa of GU rats(HE, $\times 100$)

3.3 对GU大鼠胃组织中IL-10, IL-17含量的影响 与正常组比较,脾胃虚寒型GU大鼠胃组织IL-10含量明显降低,IL-17含量明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,黄芪建中汤高剂量组和安胃疡组大鼠胃组

织 IL-10 含量明显升高, IL-17 含量明显降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 黄芪建中汤对 GU 大鼠胃组织 IL-10, IL-17 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-10	IL-17
正常	-	84.34±2.51	20.26±1.16
模型	-	50.84±1.54 ¹⁾	51.25±5.54 ¹⁾
安胃疡	0.14	70.08±6.08 ²⁾	30.41±4.00 ²⁾
黄芪建中汤	16.00	69.86±5.68 ²⁾	23.89±2.78 ²⁾
	8.00	65.71±3.53	32.41±3.73 ²⁾
	4.00	59.32±7.17	45.27±5.82

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2,3 同)。

3.4 对 GU 大鼠胃组织中 JAK2, STAT3 mRNA 表达水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠胃组织 JAK2, STAT3 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$);

与模型组比较,各治疗组大鼠胃组织 JAK2, STAT3 mRNA 表达均有下降趋势,其中尤以黄芪建中汤高剂量组明显 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 黄芪建中汤对 GU 大鼠胃组织 JAK2, STAT3 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	JAK2	STAT3
模型	-	1.93±0.13 ¹⁾	1.88±0.18 ¹⁾
安胃疡	0.14	1.32±0.17	1.41±0.07 ²⁾
黄芪建中汤	16.00	1.13±0.04 ²⁾	1.18±0.17 ²⁾
	8.00	1.33±0.27	1.51±0.22 ²⁾
	4.00	1.89±0.07	1.58±0.27

注:设正常组 JAK2, STAT3 mRNA 相对表达量均为 1。

3.5 对 GU 大鼠胃组织 JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3 蛋白表达水平的影响 与正常组比较,脾胃虚寒型 GU 大鼠胃组织中 STAT3 蛋白总量变化不明显,组间差异无明显统计学意义,而 p-STAT3 蛋白表

达水平明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,黄芪建中汤大剂量组和阳性对照组大鼠胃组织中 STAT3 蛋白总量表达水平变化不明显,而 p-STAT3 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。见表 3,图 2。

表 3 黄芪建中汤对 GU 大鼠胃组织 JAK2, STAT3 蛋白及其磷酸化水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-JAK2/JAK2	p-STAT3/STAT3
正常	-	0.79±0.05	0.51±0.03
模型	-	1.17±0.07 ¹⁾	1.09±0.07 ¹⁾
安胃疡	0.14	1.02±0.06 ²⁾	0.76±0.05 ²⁾
黄芪建中汤	16.00	0.96±0.09 ²⁾	0.71±0.06 ²⁾
	8.00	1.09±0.06	0.87±0.04 ²⁾
	4.00	1.16±0.13	0.98±0.13

4 讨论

GU 作为消化系统常见疾病之一,以胃黏膜的溃疡性损伤为主要特征^[8]。典型的 GU 临床表现具有慢性、周期性、节律性上腹痛的特点。目前,现代医学多认为 GU 是指致溃疡的攻击因子与防御因子失衡,胃黏膜在被胃酸、胃蛋白酶自身消化而造成

的溃疡。而中医理论认为该病的产生与多种原因有关,外邪犯胃(如药物,饮酒,幽门螺旋杆菌感染等),或饮食劳倦、情志不遂、寒温失宜等,促使脾胃功能减退,运化失司,气、血、津、液等精微物质化生无源,胃络失于温养而致中焦虚寒为其重要病机之一。针对该类病人的治疗,临床则多选用功专温中

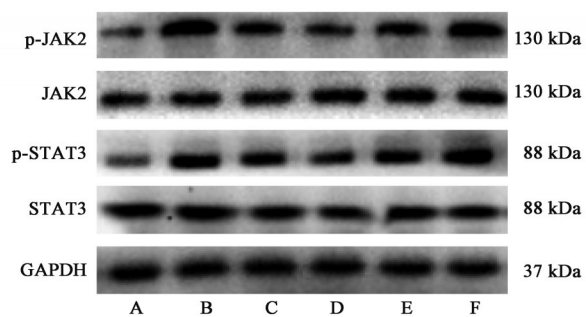


图2 各组大鼠胃组织 p-JAK2, JAK2, p-STAT3, STAT3 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of p-JAK2, JAK2, p-STAT3 and STAT3 protein expression in gastric tissue of rats in each group

补虚,和胃止痛的黄芪建中汤治疗。目前,已经有临床研究证实黄芪建中汤用于脾胃虚寒型GU患者,相较于常规西药治疗,具有用药安全,疗效显著,复发率低的优势^[9-10]。而实验研究亦证实,黄芪建中汤可以有效调节胃黏膜微环境多种因子的变化,进而参与神经、免疫等的调节,进而促使溃疡愈合^[11-12]。

CD4⁺T细胞作为人体两种主要T淋巴细胞之一,广泛分布于T细胞表面,积极参与着机体的免疫反应。当CD4⁺细胞接触抗原刺激后,会在不同条件下分化成不同亚型的T细胞。其中有实验证明辅助性T细胞17(Th17)主要分泌IL-17级联式放大炎症反应,而调节性T细胞则主要分泌IL-10发挥抗炎作用并诱导机体免疫耐受^[13-14]。目前,已经有大量临床研究证实,GU的发生与溃疡组织以及血清中炎症因子的紊乱关系密切,其中IL-17含量的异常升高以及IL-10含量减少为主要表现之一^[15-16]。

JAK/STAT信号通路可以由干扰素,生长因子、细胞因子等多种因子所激活然后向细胞核传递信号。JAK2作为非受体酪氨酸蛋白激酶家族的成员,能够在多种因子的刺激下诱导STAT3磷酸活化,STAT3作为STAT家族重要成员之一,在不同组织和细胞中广泛的参与了各种生物学事件。有研究显示STAT3磷酸活化过程是Th17细胞生成所必需的,与此同时,过度表达的STAT3能够促使T细胞向Th17样细胞转变,而这可能是溃疡组织中IL-10明显下调,IL-17明显升高的一个至关重要的因素^[17-20]。此外,已经有研究表明GU修复过程中伴随着炎症因子IL-2R,IL-4分泌水平的改变,而IL-2R,IL-4分泌与上述T细胞关系密切^[21]。现代药理学研究表明,黄芪建中汤除可以有效缓解胃肠道组织平滑肌痉挛、调节胃酸分泌以外,以具有明显

促使肉芽组织修复、抗炎和抑菌的作用,进而从根本上改善胃黏膜微环境以有效促进溃疡愈合^[22-24]。本研究以JAK2/STAT3磷酸活化所介导的胃黏膜免疫功能紊乱为切入点,进一步探讨黄芪建中汤治疗脾胃虚寒型GU的分子机制及药理靶向作用。

本实验结果显示,模型组大鼠胃组织中JAK2, STAT3 mRNA蛋白显著表达,进而促使IL-10显著降低,IL-17显著升高,这可能是脾胃虚寒型GU发生、迁延不愈的重要因素之一。与模型组比较,治疗组大鼠的一般生存状况以及胃黏膜病理形态得到不同程度的改善,胃组织中JAK2, STAT3 mRNA及蛋白磷酸化水平有不同程度下降,ELISA结果表明IL-10含量不同程度下降,IL-17含量不同程度升高,其中尤以黄芪建中汤高剂量组改善最为显著。这可能与高剂量黄芪建中汤有效抑制了JAK2/STAT3信号通路的激活,STAT3磷酸活化水平下降,进而调节IL-10和IL-17等细胞因子之间的协调平衡,减轻了由此产生的级联式炎症放大反应,提高胃黏膜免疫屏障的防御功能,调节机体的免疫功能,促进黏膜组织细胞的修复,进而发挥保护胃黏膜作用。

[参考文献]

- [1] 杨庆,陈颖,王娅杰,等. 复方梭子蟹胶囊对大鼠胃溃疡模型的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(15):160-165.
- [2] ROBERTS THOMSON I C. The rise and fall of peptic ulceration: a disease of civilization? [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2018, 33(7):1321-1326.
- [3] CARLOTTO J, MARIA-FERREIRA D, DE SOUZA L M, et al. A polysaccharide fraction from "ipê-roxo" (*Handroanthus heptaphyllus*) leaves with gastroprotective activity [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 226:15239.
- [4] 李云梅,张秀,伍文斌. 黄芪建中汤对消化系统临床应用的研究进展[J]. 江西中医药, 2015, 46(7):78-80.
- [5] 谢昭敏,陈楚华,吴志雄. 黄芪建中汤辅助治疗对脾胃虚寒型Hp阳性慢性萎缩性胃炎的影响[J]. 赣南医学院学报, 2018, 38(6):545-548.
- [6] 陈小野. 实用中医证候动物模型学[M]. 北京:北京医科大学协和医科大学联合出版社, 1993:149.
- [7] OKABE S, AMAGASE K. An overview of acetic acid ulcer models-the history and state of the art of peptic ulcer research[J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28(8):1321-1341.

- [8] DAVID G. History of Helicobacter pylori, duodenal ulcer, gastric ulcer and gastric cancer [J]. World J Gastroenterol, 2014(18):5191-5204.
- [9] 王韶康,姜玥,段永强,等. 王道坤以自拟愈溃系列经验方治疗消化性溃疡验案拾萃[J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(8):111-113.
- [10] 何俊敏,杨宏. 黄芪建中汤治疗胃溃疡(脾胃虚寒型)的临床效果及复发情况分析[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(9):132.
- [11] 曲培向. 黄芪建中汤对大鼠胃溃疡愈合及TERT表达的影响[D]. 呼和浩特:内蒙古大学, 2015.
- [12] 曾梅艳,宋厚盼,陈小娟,等. 基于以方测证理论法探讨脾胃虚寒型十二指肠溃疡实验模型的构建及模型评价研究[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(1):183-184.
- [13] UENO A, GHOSH A, HUNG D, et al. Th17 plasticity and its changes associated with inflammatory bowel disease [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(43):12283-12295.
- [14] YAMADA A, ARAKAKI R, SAITO M, et al. Role of regulatory T cell in the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(7):2195-2205.
- [15] 陈思宇,张强,李妍. 消化性溃疡患者血清 α 防御素, visfatin, IL-17的表达及意义[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(9):33-39.
- [16] 李宝玲,张建国,李东玲. 温胃舒颗粒联合艾司奥美拉唑治疗胃溃疡的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2018, 33(5):1089-1092.
- [17] JIN-YOUNG L, BARBORA O, MARC D. Signal transducers and activators of transcription (STAT) regulatory networks in marine organisms: from physiological observations towards marine drug discovery[J]. Marine Drugs, 2015, 13(8):4967-4984.
- [18] ZHENG Y, WANG Z, DENG L, et al. Modulation of STAT3 and STAT5 activity rectifies the imbalance of Th17 and Treg cells in patients with acute coronary syndrome[J]. Clin Immunol, 2015, 157(1):65-77.
- [19] TAKAHASHI R, NISHIMOTO S, MUTO G, et al. SOCS1 is essential for regulatory T cell functions by preventing loss of Foxp3 expression as well as IFN- and IL-17A production[J]. J Exp Med, 2011, 208(10):2055-2067.
- [20] YANG X O, PANOPOULOS A D, NURIEVA R, et al. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells [J]. J Biol Chem, 2007, 282(13):9358-9363.
- [21] 巩子汉,王艳威,段永强,等. 白及多糖对胃溃疡模型大鼠血清IL-2R、IL-4及胃组织Caspase-8水平的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(10):35-40.
- [22] 宗亮. 黄芪建中汤治疗虚寒型十二指肠溃疡疗效探究[J]. 中西医结合心血管病杂志, 2016, 4(20):181-184.
- [23] 汪婷婷,张卫平,申国明,等. 黄芪建中汤对脾气虚证大鼠Leptin-NPY/VIP/GAS信号传导通路及胸腺指数、脾指数的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(12):31-35.
- [24] 曲培向. 黄芪建中汤对大鼠胃溃疡愈合及TERT表达的影响[D]. 呼和浩特:内蒙古大学, 2015.

[责任编辑 周冰冰]