

# 栝楼薤白半夏汤预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤 JAK-STAT 细胞信号传导调节的研究

段雪涛, 晋红宾, 易亚乔, 张炳填\*  
(湖南中医药大学, 长沙 410007)

**[摘要]** 目的:探讨栝楼薤白半夏汤(GXBD)对大鼠心肌缺血再灌注损伤 Janus 激酶信号转导子与转录激活子(JAK-STAT)细胞信号传导的调节作用。方法:将 60 只雄性 SD 大鼠随机分为空白对照(A)组,缺血再灌注(B)组(I/R),缺血预处理(C)组(IPC),GXBD 预处理(D)组,AG490 处理(E)组,每组 8 只。结扎大鼠左冠状动脉前降支 30 min,再灌注 90 min 制作心肌缺血再灌注损伤模型。A,B,D,E 组每天 ig 1 次,连续 3 d,末次 ig 后 1 h 行冠脉结扎。A,B 组给等容量生理盐水,D,E 组分别以  $4.95 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  ig 给药,E 组 AG 490 以  $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量于造模前 1 h 舌下静脉注射,造模结束后,分别测定各组血清腺苷(Ado)和缓激肽(BK)水平,心肌梗死面积及心肌组织 JAK2,STAT3 的蛋白表达。结果:模型组和 AG490 组血清 Ado 和 BK 水平显著下降( $P < 0.05$ ),心肌梗死面积显著扩大( $P < 0.01$ ),JAK2,STAT3 蛋白表达显著减少( $P < 0.05$ );GXBD 组和 IPC 组均可使 Ado,BK,JAK2,STAT3 水平显著升高( $P < 0.05$ ),心肌梗死面积显著缩小( $P < 0.01$ )。结论:GXBD 能通过 JAK-STAT 细胞信号传导通路的介导,上调 JAK2,STAT3 的蛋白表达,升高 Ado,BK 含量,减少心肌梗死面积,对缺血再灌注心肌起保护作用。

**[关键词]** 栝楼薤白半夏汤; 心肌缺血再灌注损伤; JAK-STAT; 腺苷; 缓激肽; 心肌梗死面积

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)24-0147-04

## JAK-STAT Cell Signaling Pathways Adjusting by Gualou Xiebai Banxia Decoction Preconditioning in Myocardial Ischemia Reperfusion Injury

DUAN Xue-tao, JIN Hong-bin, YI Ya-qiao, ZHANG Bing-tian\*  
(Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore JAK-STAT cell signaling pathways adjusting by Gualou Xiebai Banxia decoction preconditioning in myocardial ischemia reperfusion injury. **Method:** Sixty male SD rats were randomly divided into blank control (A) group, ischemia /reperfusion (B) group (I/R), ischemia preconditioning (C) group (IPC), GXBD pretreatment (D) group, AG490 processing (E) groups, there were 8 rats in each group. Ligation of the left anterior descending coronary artery for 30 minutes and 90 minutes reperfusion was performed, to make myocardial ischemia reperfusion injury, A, B, group were given physiological saline, group D and E were treated with  $4.95 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  doses of GXBD and  $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  dose of AG490. before 1 h of modelling. The serum adenosine (Ado) and gentle shock peptide (BK) level were measured, myocardial infarction area and JAK2, STAT3 protein expression of the myocardial tissue were detected. **Result:** The serum Ado and BK level in the model group and AG490 group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), myocardial infarction area expanded significantly ( $P < 0.01$ ), JAK2, STAT3 protein expression significantly reduced ( $P < 0.05$ ); GXBD group and the IPC group

**[收稿日期]** 20110516(014)

**[基金项目]** 湖南省教育厅重点项目(06A053);湖南省自然科学基金(07JJ6049);湖南省教育厅资助一般项目(09C722)

**[第一作者]** 段雪涛,硕士研究生,从事金匱要略治则治法研究,Tel:15533263661, E-mail:duanqi2009@126.com

**[通讯作者]** \*张炳填,教授,博士生导师,从事中医临床基础研究,Tel:0731-85381239, E-mail:ZBT8212@yahoo.com.cn

could make Ado, BK, JAK2, STAT3 level significantly increased ( $P < 0.05$ ), myocardial infarction area reduced significantly ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** GXBD can raise the protein expression of JAK2, STAT3, Ado and BK level and reduce myocardial infarction area to protect ischemia-reperfusion myocardial injury.

**[Key words]** Gualou Xiebai Banxia decoction (GXBD); myocardial ischemia reperfusion injury; JAK-STAT; adenosine; genthis shock peptide; myocardial infarction area

栝楼薤白半夏汤 (GXBD) 出自张仲景《金匱要略》治疗胸痹的一首名方,此方现在多用于心血管系统疾病。心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemic reperfusion injure MIRI) 的发病机理及保护心肌的研究是当今备受关注的热门课题,其中缺血性预处理 (ischemic preconditioning, IPC)<sup>[1]</sup> 保护心肌的细胞信号转导调节研究最具吸引力。研究证实 JAK-STAT 细胞信号传导通路与 MIRI 有关是 IPC 的中心环节<sup>[2]</sup>。本实验用 GXBD 预处理,观察处理后 JAK2, STAT3 蛋白表达,腺苷 (Ado)、缓激肽 (BK) 含量和心肌梗死面积变化,来阐明 GXBD 对心肌缺血再灌注损伤 JAK-STAT 细胞信号传导的调节作用。

## 1 材料

**1.1 动物** 3 月龄雄性 SD 大鼠,合格证号 SCXK (湘)2009-0004,体重 220 ~ 250 g 左右,由湖南中医药大学实验动物中心提供,饲养于湖南中医药大学动物实验室,室内洁净,自然采光,通风良好。

**1.2 药物与试剂** 栝楼薤白半夏汤 (栝楼 30 g,薤白 15 g,半夏 10 g,白酒 30 mL) 共 3 付。TTC (红四氮唑) 染色剂 (上海山浦化工有限公司,批号 20110128);腺苷和缓激肽 (ELISA) 试剂盒 (RD 公司,批号 20110315,20110326);JAK2 (北京博奥森生物技术有限公司,批号 100790);显示剂 (中杉金桥生物技术有限公司,批号 K115622C);STAT3 (武汉博士德生物有限公司,批号 279503);二抗 (武汉博士德生物有限公司,批号 06C21CJ);酪氨酸磷酸化抑制剂 AG490 (JAK 抑制剂/tyrphostin AG490, AG490, 碧云天生物科技有限公司,批号 1104261023)。

## 2 方法

**2.1 动物造模** 大鼠麻醉后固定,记录标准 II 导联心电图。颈部去毛,分离颈部皮肤,气管切开,立即与人工呼吸机 (频率 54 次/min,流量 20 mL·kg<sup>-1</sup>) 相连通。然后于胸骨左缘剪去毛,在胸骨左缘 2 mm 第 2,3 肋骨处开胸,小心撕开胸膜及心包膜于心耳下左冠状动脉前降支上 1/3 穿线,然后在心脏上放

根垫线,把穿线打活结以阻断冠脉血流,以心电图出现 ST 段弓背样抬高为结扎成功,松开活结抽出垫线与穿线,恢复血流再灌,以抬高的 ST 段缓慢下降为再灌注成功。

**2.2 分组与给药** 按照随机数字表中区组随机法将动物随机分为 5 组,每组 8 只 (死亡后即剔除)。分组情况如下:①空白对照组:在冠状动脉左前降支只穿线不结扎;②缺血再灌注 (I/R) 组:结扎 30 min,再灌注 90 min;③缺血预处理 (IPC) 组:缺血 5 min,再灌注 15 min,反复 3 次,立即重复②组试验方法;④栝楼薤白半夏汤 (GLXB) 预处理组:栝楼薤白半夏汤水煎液 (4.95 g·kg<sup>-1</sup>) ig 3 d,末次 ig 后 1 h,行冠脉结扎,ig 容量 10 mL·kg<sup>-1</sup>,然后重复②组试验方法;⑤JAK 阻断剂 AG490 组:在冠状动脉结扎前 1 h,舌下静脉注射 AG490<sup>[3]</sup> (剂量 2 mg·kg<sup>-1</sup>),余处理同④组;给药方法:①,②,③组每日 ig 等量生理盐水。

## 2.3 指标检测

**2.3.1 心肌梗死面积测定** 实验结束时处死动物迅速取下心脏,剪去心房和右室,冷冻切片,将切片浸入 2% TTC 的磷酸缓冲液中 (pH 7.4) 37 °C 孵育 30 min,然后用 10% 的甲醛固定 24 h 以增强染色颜色对比,经以上处理,心肌组织被分区:浅红色为缺血未梗死心肌,灰白色为梗死心肌。之后用 Motic 显微摄影仪图像分析软件计算梗死面积。

**2.3.2 Ado 和 BK 测定** 术后腹主动脉取血,然后用低速自动平衡离心机离心 20 min,转速 3 000 r·min<sup>-1</sup> 取上清液用 ELISA 法测定其含量。

**2.3.3 JAK2, STAT3 蛋白表达** 术后取心肌组织,标本经 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,用 SABC 法切片脱蜡至水,灭活内源性酶,热修复抗原,滴加 BSA 封闭液,后滴加稀释的一抗, PBS 洗后,滴加二抗,再有 PBS 洗,后滴加 DAB 显色,水洗终止显色,苏木素复染,封片。结果阳性表达的部位显棕黄色,细胞核紫蓝色,其他部位无色。用 Motic 显微摄影仪及图像分析软件测量免疫组化染色的平均

灰度值。

**2.4 统计学方法** 采用 SPSS 16.0 操作软件, 计量资料数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较用单因素的方差分析, 方差齐时每两组之间的比较用 LSD 法, 方差不齐时采用非参数检验。  $P < 0.05$  有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 各组大鼠血清 Ado, BK 和心肌组织梗死面积的比较** I/R 组和 AG490 组血中 Ado, BK 含量下降, 出现了大范围的心肌梗死面积; IPC 组和 GXBD 预处理组心肌梗死面积显著减少, 与 I/R 组和

AG490 组比较 ( $P < 0.01$ ), Ado, BK 含量显著升高与 I/R 组和 AG490 组比较 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

**3.2 各组大鼠心肌组织 JAK2, STAT3 蛋白表达的比较** 空白对照组大鼠心肌组织 JAK2, STAT3 蛋白表达部位有大量的棕黄色颗粒呈强阳性表达, I/R 组和 AG490 组 JAK2, STAT3 的棕黄色颗粒状蛋白表达物明显减少, IPC 组和 GXBD 预处理组有大量 JAK2, STAT3 棕黄色颗粒状蛋白表达物出现呈阳性表达, 与 I/R 组和 AG490 组比较 ( $P < 0.05$ )。见图 1, 表 2。

表 1 各组大鼠血清 Ado, BK 及心肌组织梗死面积的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量	Ado	BK	心肌梗死面积
	/g·kg <sup>-1</sup>	/nmol·L <sup>-1</sup>	/nmol·L <sup>-1</sup>	/μm <sup>2</sup>
空白对照	-	5.33 ± 0.96	46.36 ± 9.51	-
I/R	-	2.97 ± 0.71	17.57 ± 7.24	32 490 ± 11 873
IPC	-	4.15 ± 0.76 <sup>1,3)</sup>	31.34 ± 12.63 <sup>1,3)</sup>	8 960 ± 3 461 <sup>2,4)</sup>
GXBD	4.95	3.68 ± 0.59 <sup>1,3)</sup>	29.21 ± 12.47 <sup>1,3)</sup>	9 923 ± 3 548 <sup>2,4)</sup>
AG490	0.002	2.90 ± 0.59	15.76 ± 7.06	21 750 ± 1 703

注: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 AG490 组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (表 2 同)。

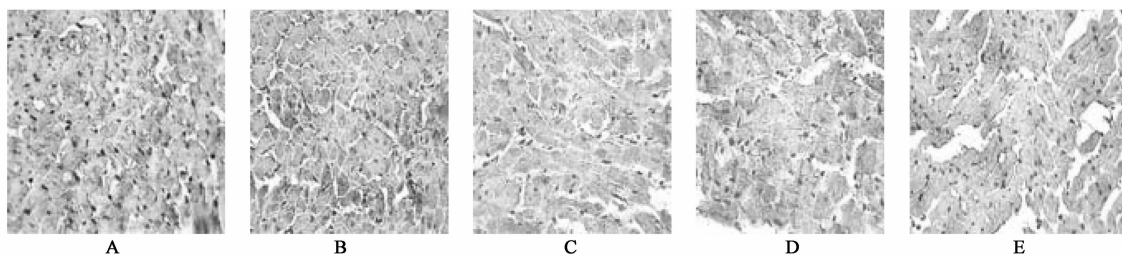


图 1 各组大鼠心肌组织 JAK2, STAT3 蛋白表达的比较 (免疫组化染色, ×400)

表 2 各组大鼠心肌组织 JAK2, STAT3 蛋白表达的变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量	灰度	
	/g·kg <sup>-1</sup>	JAK2	STAT3
空白对照	-	174.48 ± 9.58	181.02 ± 6.04
I/R	-	136.56 ± 12.11	165.01 ± 3.56
IPC	-	158.60 ± 12.54 <sup>1,3)</sup>	173.66 ± 4.19 <sup>1,3)</sup>
GXBD	4.95	157.28 ± 13.84 <sup>1,3)</sup>	171.95 ± 4.53 <sup>1,3)</sup>
AG490	0.002	143.26 ± 4.33	160.28 ± 11.12

### 4 讨论

目前研究 Janus 激酶信号转导子与转录激活子 (JAK-STAT) 信号转导通路广泛参与细胞的增殖、分化、凋亡以及免疫调节、炎症、肿瘤等多种生理、病理生理过程, JAK 有 JAK1, 2, 3 和 TYK2, STAT 在哺乳动物身上有 7 个成员分别为 STA T 1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6。细胞外信号首先活化蛋白激酶 JAK, 活

化的 JAK 进一步使胞质中的转录因子 STAT 磷酸化而被激活, 将上游信号传递到胞核并通过诱导靶基因转录引起不同的生物学效应<sup>[4]</sup>。缺血预处理达到一定程度就会释放许多心肌保护性介质如 Ado 和 BK。Ado 能持久扩张冠脉, 改善心肌供血, 抑制内皮素的释放, 防止血小板聚集, 拮抗儿茶酚胺, 增强心脏功能<sup>[5]</sup>。BK 能促进 NO 合成, 抑制过氧化物形成<sup>[6]</sup>。

心肌缺血再灌注损伤属于中医胸痹、心痛、心悸等范畴。其病机特点是本虚标实, 病位在心, 本虚以心阳气虚为主, 标以痰实为主。栝楼薤白半夏汤功用为开胸散结, 化痰通络。据现代药理研究方中各药确实对心肌缺血再灌注有保护作用<sup>[7-9]</sup>。

本实验结果显示栝楼薤白半夏汤预处理和缺血预处理后 JAK2, STAT3 蛋白表达增强, 心梗死面

积显著降低,Ado,BK 水平增高,与 I/R 比较差异有统计学意义。AG490 是一种选择性拮抗 JAK2 酪氨酸磷酸化的抑制剂,可有效阻断其下游信号转导和转录激活因子 STAT 的活化<sup>[10]</sup>。应用 JAK-STAT 通道抑制剂 AG490 后 JAK2,STAT3,心肌梗死面积,Ado,BK 水平与 I/R 比较无显著变化。说明栝楼薤白半夏汤可以通过提高 JAK-STAT 通道相关蛋白的表达发挥对心肌缺血再灌注损伤的保护作用,其确切的机制有待进一步探讨。

### [参考文献]

[ 1 ] Murry C E, Jennings R B, Reimer K A. Preconditioning with is—chemia;a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium[J]. Circulation,1986,74(5):1124.  
[ 2 ] Smith R M, Suleman N, Lacerda L, et al. Genetic depletion of cardiac myocyte STAT -3 abolishes classical preconditioning [ J ]. Cardiovasc Res, 2004, 63 (4):611.  
[ 3 ] Rakesh K. Singh, Cuihong Jia, Francesca Garcia, et al. Activation of the JAK-STAT pathway by olanzapine is necessary for desensitization of serotonin 2A receptor-stimulated phospholipase C signaling in rat frontal cortex but not serotonin 2A receptor-stimulated hormone release

[J]. J Psychopharmacol, 2010, 24(7): 1079.  
[ 4 ] 黄文林,朱孝峰. 信号转导[M]. 北京:人民卫生出版社,2005.  
[ 5 ] Solenkova N V, Solodushko V, Cohen M V, et al. Endogenous adenosine protects preconditioned heart during early minutes of reperfusion by activating Akt [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 290 (1):441291.  
[ 6 ] 姚玉宇,马根山,刘乃丰,等. 组织激肽释放酶、缓激肽对心肌梗死后心力衰竭心室重构的作用[J]. 现代医学,2008,36(6):393.  
[ 7 ] 滕勇荣,王连侠,张永清. 瓜蒌药理研究进展[J]. 齐鲁药事,2010,29(7):417.  
[ 8 ] 苏丽梅,袁德俊,蒋红兰. 薤白药理研究进展[J]. 今日药学,2009,19(1):28.  
[ 9 ] 李斌,程秀民,周永研,等. 半夏的研究进展[J]. 中国民族民间医药,2010,1:47.  
[10] Gorina R, Petegnief V, Chamorro A, et al. AG490 Prevents cell death after exposure of rat astrocytes to hydrogen peroxide or proinflammatory cytokines: involvement of the Jak2/STAT pathway [ J ]. Neurochem, 2005, 92(3): 505.

[责任编辑 聂淑琴]

---

## 简 讯

本刊近日接到美国化学文摘社中国文献处理中心通知,《中国实验方剂学杂志》自 2012 年 18 卷第 1 期起继续作为美国化学文摘收录期刊。