

· 药理 ·

基于 miRNA-146a/JAK/STAT/SOCS-3 信号通路探讨安肠汤对 溃疡性结肠炎大鼠炎症免疫的影响

梁运特¹, 孙平良^{2*}

(1. 广西中医药大学 研究生院, 南宁 530200; 2. 广西中医药大学 第一附属医院, 南宁 530023)

[摘要] 目的:研究安肠汤低、中、高剂量对SD大鼠溃疡性结肠炎的抗炎作用,通过研究不同给药剂量对miRNA-146a/非受体酪氨酸蛋白激酶(JAK)/信号传导与转录激活因子(STAT)/细胞因子信号传导抑制蛋白-3(SOCS-3)信号通路及其下游蛋白的影响探讨安肠汤防治溃疡性结肠炎的可能机制。方法:实验大鼠分为正常组,模型组,美沙拉嗪组(1 g·kg⁻¹),安肠汤低、中、高剂量组(6, 12, 24 g·kg⁻¹),每组10只。除正常组外,其余各组均采用2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)/乙醇灌肠法建立溃疡性结肠炎大鼠模型,分别给药14 d。观察大鼠神态、大便性状、毛发等一般情况的变化,并参照疾病活动指数(DAI)表进行评分,苏木素-伊红(HE)染色观察各组大鼠结肠组织病理改变,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测大鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-10(IL-10), IL-17, IL-1 β , IL-6水平,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测结肠组织中JAK2,磷酸化STAT3(p-STAT3), STAT3, SOCS-3蛋白表达的变化,通过实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)测定大鼠结肠组织中JAK2, p-STAT3, STAT3, SOCS-3 mRNA以及血浆miRNA-146a的表达水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠JAK2, p-STAT3, STAT3蛋白表达及JAK2, p-STAT3, STAT3 mRNA表达明显增高($P < 0.05$),模型组大鼠miRNA-146a, SOCS-3 mRNA以及SOCS-3蛋白表达明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,给药组大鼠精神状态,进食量,毛色等情况均明显改善,DAI评分明显降低($P < 0.05$),给药组大鼠结肠溃疡组织明显改善,给药组大鼠结肠组织JAK2, p-STAT3, STAT3蛋白表达及JAK2, p-STAT3, STAT3 mRNA表达明显降低($P < 0.05$),给药组大鼠miRNA-146a, SOCS-3 mRNA以及SOCS-3蛋白表达明显增高($P < 0.05$)。结论:安肠汤可能通过影响miRNA-146a/JAK/STAT/SOCS-3信号转导通路相关基因及蛋白表达,抑制溃疡性结肠炎病情的发展。

[关键词] 溃疡性结肠炎; 安肠汤; 非受体酪氨酸蛋白激酶2(JAK2); 信号传导与转录激活因子3(STAT3); miRNA-146a

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)03-0030-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202302

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201027.1824.003.html>

[网络出版日期] 2020-10-28 9:28

Effect of Anchang Decoction on Inflammation and Immunity in Rats with Ulcerative Colitis Based on miRNA-146a/JAK/STAT/SOCS-3 Signal Pathway

LIANG Yun-te¹, SUN Ping-liang^{2*}

(1. Postgraduate College of Guangxi Chinese Medicine University, Nanning 530200, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guangxi Chinese Medicine University, Nanning 530023, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-inflammatory effects of low, middle, and high doses of Anchang decoction on ulcerative colitis in SD rats, and also explore the possible mechanism of Anchang decoction in the prevention and treatment of ulcerative colitis through the effect of different doses on miRNA-146a/non-receptor tyrosine protein kinase (JAK)/signal transduction and activator of transcription 3 (STAT3)/

[收稿日期] 20200813(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81660795)

[第一作者] 梁运特,在读硕士,主治医师,从事中医外科学的研究, E-mail: 526093203@qq.com

[通信作者] * 孙平良,博士,教授,主任医师,从事中医外科学的研究, Tel: 0771-5361257, E-mail: sunpl2000@163.com

cytokine signaling protein-3(SOCS-3) signal pathway and its downstream proteins. **Method:** The experimental rats were divided into control group, model group, mesalazine group($1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and Anchang decoction low ($6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), middle($12\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and high dose groups($24\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), with 10 rats in each group. Except for the control group, 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)/ethanol enema was used in all the other groups to establish a rat model of ulcerative colitis for 14 days respectively. The general changes of the mental state, stool traits, hair and other general conditions of the rats were observed, and score was graded with reference to the disease activity index (DAI) table. The pathological changes of colon tissue of rats in each group were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The levels of serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-10 (IL-10), interleukin-17(IL-17), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6(IL-6) were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of JAK2, phosphorylation STAT3 (p-STAT3), STAT3 and inhibitor of SOCS-3 in colon tissue were detected by Western blot. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the expression of JAK2, p-STAT3, STAT3, SOCS-3 mRNA in rat colon and miRNA-146a in rat plasma. **Result:** Compared with the normal group, the expression of JAK2, p-STAT3, STAT3 protein and the expression of JAK2, p-STAT3 and STAT3 mRNA in the model group increased ($P<0.05$), and the relative expression of miRNA-146a, SOCS-3 mRNA and SOCS-3 protein decreased in the model group ($P<0.05$). Compared with the model group, the mental state, food intake, coat color, etc. of rats in the administration groups were significantly improved, the DAI score was significantly reduced ($P<0.05$), the colonic ulcer tissues of rats in the administration groups were improved significantly, the expression levels of JAK2, p-STAT3, STAT3 protein and the expression of JAK2, p-STAT3 and STAT3 mRNA in the colon tissue of the administration groups were decreased ($P<0.05$), and the relative expression levels of miRNA-146a, SOCS-3 mRNA and SOCS-3 protein were increased in the administration groups ($P<0.05$). **Conclusion:** Anchang decoction can alleviate ulcerative colitis and reduce the activation of inflammatory factors by affecting the expression of genes and proteins related to miRNA-146a/JAK/STAT/SOCS-3 signal transduction pathway.

[Key words] ulcerative colitis; Anchang decoction; non-receptor tyrosine protein kinase2 (JAK2); signal transduction and activator of transcription-3(STAT3); miRNA-146a

溃疡性结肠炎(UC)临床表现是以反复发作的腹痛腹泻、黏液脓血便为主,伴发热、身体消瘦等症状,本病程漫长、难以治愈,发病率逐年上升,严重影响患者的身心健康^[1]。microRNA(miRNA)是一类由内源基因编码、长度约为20~24个核苷酸的小RNA,当炎症细胞受到某种刺激后会诱导miRNA的向上或向下调整,从而影响多种生物功能,起到促进炎症或抗炎的双向调节作用^[2-3]。BASCUNÁN等^[4]研究发现腹腔外周血中miRNA-146a, miRNA-155和miRNA-21表达变化参与了炎症性肠病的免疫过程。FENG等^[5]发现miRNA-146a在UC患者中被下调,与血清炎症因子水平和UC患者严重程度呈负相关。SALAS等^[6]研究表明炎症相关miRNA-146a在UC中的表达与炎症相关通路密切相关。有研究发现非受体酪氨酸蛋白激酶(JAK)/信号传导与转录激活因子(STAT)通路靶向治疗炎性肠病, STAT1, 磷酸化 STAT1

(p-STAT1)及磷酸化STAT3(p-STAT3)在UC大鼠的表达均有所增加^[6-7],而细胞因子信号传导抑制蛋白-3(SOCS-3)通过负性调节JAK/STAT信号通路参与细胞代谢的生理病理过程^[8-10]。因此,基于miRNA-146a/JAK/STAT/SOCS-3信号通路研究UC大鼠的防治机制具有重要意义。

安肠汤是广西省名老中医肖振球教授治疗溃疡性结肠炎的经验方,其认为UC当属中医“痢疾”范畴,以脾肾阳虚为本,以湿、毒、瘀为标,而湿邪停滞肠腑,郁而化热,致脂膜损伤,络破血溢为标所引起,强调正虚邪恋是本病发病的根本因素,治疗以扶正祛邪为法,从而创制了安肠汤。本课题组从1990年开始安肠汤临床研究至今,透射电镜观察发现经治疗后UC患者结肠黏膜上皮细胞形态得到明显改善,说明安肠汤可促进溃疡修复及愈合^[1]。在前期承担广西科技厅“治疗UC复方中药安肠胶囊的开发”项目中发现,安肠汤显著提高免疫低下大

鼠腹腔内巨噬细胞吞噬功能,有较好抗UC大鼠肠道真菌以及降低乙酸和血清内毒素含量的作用^[11-12],能调节UC大鼠肠黏膜组织中牛磺酸、苏氨酸等多种代谢产物^[13-14]。本研究基于溃疡性结肠炎大鼠模型,通过安肠汤的治疗观察分析miRNA-146a/JAK/STAT/SOCS-3信号转导通路中相关蛋白的影响,进一步从分子水平探讨安肠汤治疗溃疡性结肠炎的作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康SPF级SD大鼠60只,雄雌各半,体质量180~220 g,均购自长沙天勤生物技术有限公司,合格证号SCXK(湘)2014-0011。饲养于广西中医药大学医学分子实验室,许可证号SYXK(桂)2010-0001;实验温度20~23℃,实验室湿度50%~60%。实验方案经广西中医药大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准[批准号为2013(KF)-E-003]。

1.2 药物 安肠汤方药组成及临床用量:补骨脂25 g,黄芪20 g,党参15 g,白头翁15 g,茯苓15 g,槟榔15 g,熟附子15 g,地榆15 g,赤芍15 g,鸡内金10 g,薏苡仁10 g,干姜10 g,白术10 g,木香10 g,延胡索10 g,甘草片10 g,每日1剂,水煎分2次口服。以上药材均由广西中医药大学附属第一医院陈超副主任药师鉴定均为正品,安肠汤原药材依据2015年版《中国药典》进行炮制,由广西中医药大学附属第一医院药剂科加工制备。美沙拉嗪肠溶片(佳木斯鹿灵制药有限公司,国药准字H19980149,批号150808)。本次实验用药处方及用量全部经过广西中医药大学附属第一医院药学部审核。

1.3 试剂 水合氯醛溶液(成都市科龙化工试剂厂,批号2013101801,250 g/瓶);PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser, PrimeScript™ RT Master Mix, TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)(日本Takara公司,批号分别为AI80462A, AJ60584, AJ91433A);5% 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)溶液(南宁市托普邦生物科技有限公司,批号P2297-10 mL);甲醛(成都市科龙化工试剂厂,批号20130817);TransScript® -Uni One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix(北京全式金生物技术有限公司,批号N20909);TriQuick Reagent, 高效RIPA组织/细胞裂解液,蛋白酶抑制剂混合液(100×PIC),BCA,脱脂奶粉,苏木素-伊红(HE)染色试剂盒, TBST(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为20200212, 69067530, P6730,

70015639, EZ5619C137, G1120, T1081);ECL化学发光底物(超敏)(Biosharp公司,批号20190103);trizol(美国Thermo公司,批号50175111);大鼠免疫球蛋白(Ig)G抗原,完全弗式佐剂(美国Sigma公司,批号分别为SLBP0889V, SLBP0432V);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)兔多克隆抗体(南宁市托普邦生物科技有限公司,批号AB-P-R001);抗兔JAK2, SOCS3抗体(美国Abcam公司,批号分别为GR43523-13, GR312354-1);STAT3抗体(美国Gene Tex公司,批号39953)。

1.4 仪器 T18型组织匀浆机(IKA公司);TU-100 C型恒温金属浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);单道移液器,5418R型低温离心机(德国Eppendorf公司);一次性使用真空采血管(江西精致科技有限公司),抗凝管EDTA. K2,超声清洗机(郑州园田清洁设备有限公司);PowerPac Basic型电泳仪, Mini Trans-Blot Cell型蛋白转印模块(湿转)(美国Bio-Rad公司);TD4型普通离心机(上海卢湘仪公司);DW-86L728J型Haier医用低温保存箱(青岛海尔特种电器);FC-1100型超微量核酸检测仪(杭州遂真生物技术有限公司);G8830-64001型Ariamx实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Agilent Technologies公司);4375786型Veriti™ 96-Well Thermal Cycler(美国Applied Biosystems®公司);4323032型0.2 mL Real-time PCR透明八排管八连管盖(美国ABI公司);SIM-F140AY65型制冰机(广西中医药大学第一附属医院医学生物实验室)。

2 方法

2.1 造模方法 参照文献建立UC大鼠模型^[15],在禁食但不禁饮24 h后,实验大鼠以水合氯醛溶液(10%,按大鼠体质量0.003 mL·g⁻¹计算用量)进行腹腔内麻醉,顺着大鼠肛门插入灌肠管约7 cm,并注入TNBS/乙醇(按大鼠体质量100 mg·kg⁻¹ TNBS+等体积50%乙醇计算用量)造模,等待药液完全进入肠道后,将大鼠继续提尾倒立2 min,保证药液充分吸收。正常组大鼠用等体积的0.9%氯化钠注射液注入,造模完成且大鼠麻醉清醒后,可自由进饮进食。判断正虚邪恋型UC大鼠模型成功的标准^[16],①反复出现大便溏泄,甚至有脱肛症状;②形体消瘦、食欲及体质量均下降;③出现畏寒弓背,群体蜷缩聚堆;④精神神态萎靡,毛色枯槁;⑤易疲劳、嗜卧。以①~③项为主证,④~⑤项为兼证,具备2项主证及2项兼证即可认为正虚邪恋型大鼠模型复制

成功。

2.2 分组及给药 造模成功后大鼠随机分为模型组、美沙拉嗪组、安肠汤低、中、高剂量组,以及正常组,10只/组。美沙拉嗪组大鼠以美沙拉嗪混悬液($1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)剂量灌胃(用药剂量参照人与动物体型系数换算,相当于体质量为60 kg成人每日用量5倍),安肠汤剂量按照低、中、高剂量组6,12,24 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 分别给予煎剂灌胃(用药剂量参照人与动物体型系数换算,相当于体质量为60 kg成人每日用量2,5,10倍),正常组和模型组大鼠灌胃给予等体积生理盐水。给药周期为14 d。

2.3 标本采集与处理 所有组大鼠经14 d灌胃用药后,禁食不禁水24 h,用水合氯醛麻醉并剖腹取腹主动脉血5~7 mL,静置30 min,3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min分离血清(离心半径13.5 cm),并于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待测。在距离肛门约8 cm处取结肠病变最明显的组织,以0.9%氯化钠注射液冲洗干净后,切取病变处结肠组织,一部分冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,另一部分固定于4%多聚甲醛密封避光 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待测。

2.4 检测指标与方法

2.4.1 大鼠一般情况观察和结肠组织病理 造模成功后,每日记录大鼠体质量变化、观察精神状态、大便性状、有无血便、毛发荣枯等情况,参照疾病活动指数(DAI)表进行评估,见表1。病变组织经4%多聚甲醛固定后,依次进行石蜡包埋、切片、常规二甲苯脱蜡、各级乙醇浸洗,HE染色等步骤,在光镜

下盲法观测组织形态学改变并拍照。

表1 疾病活动指数

Table 1 Disease activity index

体质量降低/%	大便性状	大便隐血/肉眼血便	计分/分
0	正常	无粪便隐血	0
1~5	正常	无粪便隐血	1
5~10	软便,不成形	粪便隐血阳性	2
10~15	软便,不成形	粪便隐血阳性	3
>15	腹泻	可见肉眼血便	4

2.4.2 Real-time PCR检测JAK2, p-STAT3, STAT3, SOCS-3 mRNA以及miRNA-146a的表达 取UC大鼠结肠组织50~100 mg,加入TriQuick Reagent 1 mL,匀浆机混匀后加入三氯甲烷0.2 mL; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ (离心半径13.5 cm),加入异丙醇0.5 mL,静置10 min;加入75%乙醇1 mL沉淀, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干沉淀,加DEPC水0.03 mL溶解后进行RNA提纯,随后按照逆转录试剂盒说明书逐步进行操作,实验所得cDNA冷冻于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。取出血浆0.3 mL,按照trizol试剂说明提取总RNA并检测RNA质量和浓度,使用生工生物工程(上海)股份有限公司设计的引物序列,见表2。按试剂盒说明书逐步进行逆转录操作,所得cDNA保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s;重复40个循环($95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s)后采集信号,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据分析。

表2 PCR引物序列

Table 2 Primer sequence of PCR

引物	序列(3'-5')	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$	长度/bp
STAT3	上游 ACCAACGACCTGCAGCAATA	59.96	154
	下游 ACACTCCGAGGTCAGATCCA	59.96	
SOCS3	上游 TCTTTACCACCGACGGAACC	59.68	124
	下游 GTACCAGCGGGATCTTCTCG	59.97	
JAK2	上游 TTTGAAGACAGGGACCCTACACAG	60.61	101
	下游 TCATAGCGGCATCTCCACA	58.90	
miR-146a	上游 GGGACCTGTGAAGTTCAGTT	58.98	118
	下游 TTTGAGGGTGCAGCGAACTT	59.92	
GAPDH	上游 ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	59.92	253
	下游 TTTGAGGGTGCAGCGAACTT	59.92	

2.4.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测JAK2, p-STAT3, STAT3, SOCS-3蛋白的表达 组织剪成细小的碎片,取20~40 mg放入2 mL离心管,置于冰盒上,加入RIPA-PMSF-PIC 200~400 μL ,用匀浆机匀

浆至无沉淀,匀浆时匀浆5 s左右放回冰盒冷却再继续匀浆。 $12\ 000\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心5 min,取上清采用BCA法测定蛋白含量。将质量浓度定量至 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,加入4 \times 蛋白上样buffer, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性10 min。所得变

性后的蛋白置于-80℃保存待用。使用90V恒压电泳分离样品胶层后,再换用120V恒压电泳1~1.5h。300mA恒流转膜90min。用TBST配制8%脱脂奶粉封闭3h。按抗体说明书上的使用方法逐步进行一抗JAK2(1:1000),p-STAT3(1:1000),STAT3(1:1000),SOCS-3(1:1000)和二抗(1:4000)孵育,冲洗,对膜显色后成像,通过Image J软件对蛋白条带灰度值进行分析。

2.4.4 ELISA检测相关炎症因子含量 按照ELISA试剂盒说明进行操作,各组UC大鼠血清TNF-α,IL-10,IL-17,IL-1β,IL-6含量。

2.5 统计学处理 采用SPSS 17.0软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间采用单因素方差分析,组间比较采用t检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对UC大鼠DAI的影响 正常组大鼠精神状态良好,动作反应灵活,毛色润泽,大便正常,体质量正常增长。与正常组比较,其余组在造模后开始出现不同程度厌食,精神萎靡,活动减少,毛色枯燥,大便稀烂带脓血,肛门红肿污秽,体质量降低。随着安肠汤各剂量组、美沙拉嗪组给药治疗后,大鼠精神状态较前改善,进食量渐增,毛色慢慢润泽,肛门红肿消退,大便逐渐恢复至正常,体质量回升。其中美沙拉嗪组以及安肠汤高剂量组改善最为明显。与正常组比较,模型组DAI评分明显升高($P<0.05$);与模型组比较,安肠汤高剂量组及美沙拉嗪组DAI评分明显降低($P<0.05$)。见表3。

表3 安肠汤对UC大鼠DAI评分的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

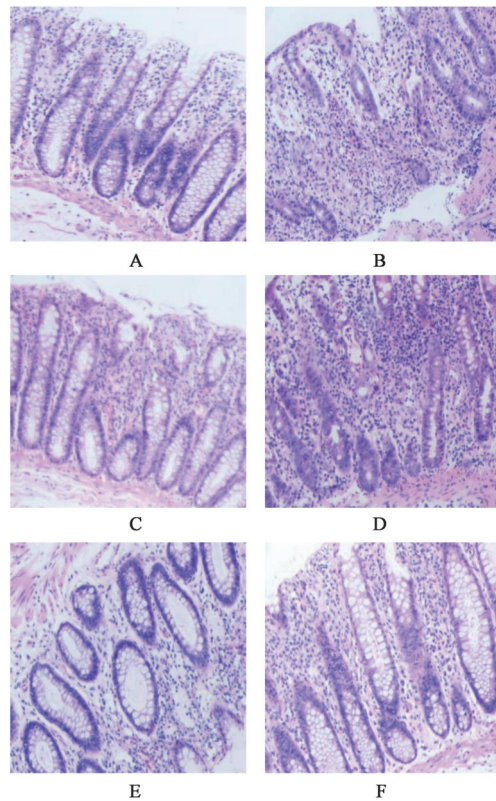
Table 3 Effect of Anchang decoction on DAI score of UC rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	DAI/分
正常		0.42±0.03
模型		3.83±0.87 ¹⁾
安肠汤	6	2.34±0.51
	12	1.66±0.63
	24	0.87±0.34 ²⁾
美沙拉嗪	1	0.77±0.36 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$ (表4~6同)。

3.2 对UC大鼠结肠组织的病理改变的影响 正常组大鼠结肠黏膜正常,表面光整,未见溃疡缺损,无坏死;模型组黏膜表面严重溃疡缺损,隐窝可见溃破坏死,累及各层肠壁;安肠汤中、高剂量组、美沙

拉嗪组结肠黏膜表面均可见腺体的增生,腺体排列较紊乱;安肠汤低剂量组黏膜表面不完整,较高剂量组可见更多的炎性细胞浸润于固有膜及表面上皮。见图1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 美沙拉嗪组;D. 安肠汤低剂量组;E. 安肠汤中剂量组;F. 安肠汤高剂量组(图2同)

图1 安肠汤对UC大鼠结肠黏膜组织形态的影响(HE,×100)

Fig. 1 Effect of Anchang decoction on morphology of colonic mucosa in UC rats(HE,×100)

3.3 对UC大鼠miRNA-146a/JAK/STAT/SOCS-3通路相关基因表达的影响 与正常组比较,模型组中的JAK2,p-STAT3,STAT3 mRNA表达明显升高($P<0.05$),而SOCS-3 mRNA,miRNA-146a表达明显降低($P<0.05$);与模型组比较,给药组JAK2,p-STAT3,STAT3 mRNA表达明显降低($P<0.05$),SOCS-3 mRNA,miRNA-146a表达明显升高($P<0.05$)。见表4。

3.4 对UC大鼠结肠组织JAK2,p-STAT3,STAT3,SOCS-3蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组JAK2,p-STAT3,STAT3蛋白含量明显升高($P<0.05$),SOCS-3蛋白表达明显降低($P<0.05$);与模型组相比较,安肠汤各剂量组及美沙拉嗪组JAK2,p-STAT3,STAT3蛋白含量均明显降低($P<0.05$),SOCS-3蛋白表达明显升高($P<0.05$)。见表5,图2。

表 4 安肠汤对 UC 大鼠结肠组织 JAK2, STAT3, p-STAT3, SOCS-3 mRNA 以及血浆 miRNA-146a 的相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Anchang decoction on expression of JAK2, p-STAT3, STAT3, SOCS3 in colon tissue and miRNA-146a in plasma of UC rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	JAK2	STAT3	p-STAT3	SOCS-3	miRNA-146a
正常		0.72±0.22	1.04±0.30	1.03±0.28	1.18±0.29	1.04±0.36
模型		1.63±0.35 ¹⁾	2.12±0.30 ¹⁾	1.60±0.26 ¹⁾	1.01±0.40 ¹⁾	0.93±0.58 ¹⁾
美沙拉嗪	6	1.17±0.24 ²⁾	1.47±0.29 ²⁾	1.26±0.20 ²⁾	1.60±0.38 ²⁾	1.28±0.22 ²⁾
安肠汤	12	1.38±0.38 ²⁾	1.70±0.48 ²⁾	1.46±0.28 ²⁾	1.46±0.28 ²⁾	1.21±0.37 ²⁾
	24	1.27±0.26 ²⁾	1.59±0.20 ²⁾	1.36±0.25 ²⁾	1.52±0.35 ²⁾	1.22±0.32 ²⁾
	1	1.11±0.32 ²⁾	1.40±0.35 ²⁾	1.21±0.18 ²⁾	1.86±0.33 ²⁾	1.34±0.38 ²⁾

表 5 安肠汤对 UC 大鼠结肠组织中 JAK2, p-STAT3, STAT3, SOCS-3 蛋白表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Anchang decoction on expression of JAK2, p-STAT3, STAT3, SOCS-3 protein in colon tissue of UC rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	JAK2/GAPDH	p-STAT3/GAPDH	STAT3/GAPDH	SOCS-3/GAPDH
正常		1.34±0.12	0.52±0.05	0.58±0.04	0.67±0.02
模型		3.14±0.22 ¹⁾	2.80±0.16 ¹⁾	1.59±0.12 ¹⁾	0.53±0.06 ¹⁾
美沙拉嗪	6	2.36±0.17 ²⁾	2.14±0.06 ²⁾	1.35±0.07 ²⁾	1.17±0.03 ²⁾
安肠汤	12	2.01±0.18 ²⁾	2.40±0.22 ²⁾	1.38±0.11 ²⁾	0.78±0.06 ²⁾
	24	1.86±0.14 ²⁾	2.14±0.15 ²⁾	1.34±0.07 ²⁾	1.06±0.10 ²⁾
	1	1.79±0.18 ²⁾	1.70±0.23 ²⁾	1.29±0.08 ²⁾	1.68±0.08 ²⁾

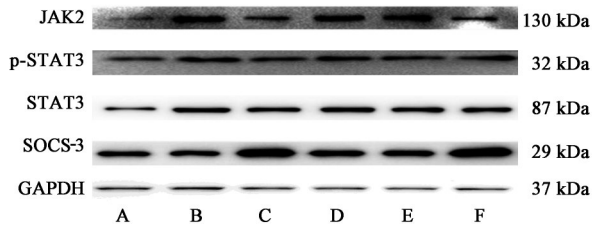


图 2 小鼠结肠组织 JAK2, STAT3, SOCS-3, p-STAT3 的蛋白电泳
Fig. 2 Electrophoresis of protein levels of JAK2, STAT3, SOCS-3, p-STAT3 in mouse colon tissue

3.5 对 UC 大鼠血清 TNF- α , IL-10, IL-17, IL-1 β , IL-6 含量的影响 与正常组比较,模型组 UC 大鼠血清 TNF- α , IL-17, IL-1 β , IL-6 含量明显升高 ($P<0.05$), UC 大鼠血清 IL-10 含量明显降低 ($P<0.05$),差异有明显统计学意义;与模型组比较,各给药组大鼠血清 TNF- α , IL-17, IL-1 β , IL-6 含量均明显降低 ($P<0.05$),大鼠血清 IL-10 含量明显升高 ($P<0.05$),差异有明显统计学意义。见表 6。

表 6 安肠汤对 UC 大鼠血浆中 TNF- α , IL-10, IL-17, IL-1 β , IL-6 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 6 Effect of Anchang decoction on levels of TNF- α , IL-10, IL-17, IL-1 β and IL-6 in plasma of UC rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF- α	IL-10	IL-17	IL-1 β	IL-6
正常		237.89±22.85	14.54±2.36	754.75±137.51	44.75±6.51	70.84±11.76
模型		528.27±23.94 ¹⁾	19.22±4.17 ¹⁾	3 195.96±349.41 ¹⁾	123.96±6.42 ¹⁾	182.95±11.43 ¹⁾
美沙拉嗪	6	296.57±32.85 ²⁾	37.14±3.86 ²⁾	1 141.38±108.86 ²⁾	65.38±5.85 ²⁾	86.21±10.87 ²⁾
安肠汤	12	375.36±59.81 ²⁾	21.10±2.66 ²⁾	1 950.57±237.07 ²⁾	101.57±6.06 ²⁾	141.91±17.53 ²⁾
	24	368.47±19.17 ²⁾	22.44±4.43 ²⁾	1 608.34±142.32 ²⁾	88.34±6.31 ²⁾	115.04±10.82 ²⁾
	1	341.11±22.01 ²⁾	26.57±3.46 ²⁾	1 475.01±146.64 ²⁾	75.01±5.63 ²⁾	103.40±11.06 ²⁾

4 讨论

安肠汤组方中干姜归脾胃经,温中祛寒;附子大辛大热,入心脾肾诸经,温肾壮阳,二者合用,温壮脾肾之力尤大,共为君药。补骨脂性温,归脾肾经,温补脾肾,善补命门;党参、黄芪甘温,补中益气;白术苦温,燥湿健脾;茯苓甘淡性平,能健脾渗

湿;薏苡仁甘淡,能健脾止泻共为臣药。鸡内金性甘平,能健胃消食;赤芍苦酸,能凉血活血,解痉止痛;延胡索,辛苦温,活血行气止痛;地榆苦酸涩,归肝大肠经,能清热解毒,凉血止痢,共为佐药。甘草片调和诸药为使。诸药合用,共奏健脾益气,温补脾肾,清肠祛湿,活血化瘀,行气导滞之功,因而符

合本研究之正虚邪恋型UC大鼠模型的治疗。

越来越多的研究证明,miRNA在细胞分化、生物发育及多种疾病发生发展过程中发挥巨大作用^[17],如RASHAD等^[18]提出血清miRNA-27a和miRNA-18b表达水平的变化可以作为丙型肝炎病毒相关肝细胞癌的潜在预测生物标志物。MIN等^[19]认为循环唾液miRNA hsa-miR-221可作为小儿患者手足口病的临床验证诊断标志。BACKES等^[20]认为血清中特殊的miRNA可以作为疾病潜在的标志物。周毅骏等^[21]表明雷公藤多苷片能干预miRNA-146a的表达,进而影响炎症通路相关因子的释放。在前期研究中,本课题组发现miRNA-146a在溃疡性结肠炎大鼠组织与血浆中呈低表达,且与炎症程度密切相关^[22]。本研究结果同样证实miRNA-146a能影响相关信号通路转导及炎症因子的表达。

JAK2和STAT3广泛分布于生物体中,是JAK/STAT信号通路中的关键调控因子,与疾病发生发展密切相关^[23-25]。HUYNH等^[26]认为药物可通过JAK/STAT3信号轴靶向治疗恶性肿瘤。JOHNSON^[27]等也肯定了IL-6/JAK/STAT3信号轴在癌症中靶向作用。在JAK/STAT信号通路中,SOCS首先通过结合受体上的磷酸酪氨酸物理性阻断STATs等信号转导体向受体的募集。其次,SOCS蛋白可以直接结合JAKs或受体来特异性抑制JAK激酶活性。再者,SOCS与延伸蛋白BC复合物和cullin 2相互作用,促进JAKs和可能的受体的泛素化,从而抑制JAK的活性,通过以上3种方式关闭JAK/STAT通路^[28]。如DURHAM等^[29]研究表明靶向SOCS蛋白可以抑制疾病中的JAK/STAT信号传导。WANG等^[30]认为细胞因子信号转导(SOCS)基因在脊椎动物中家族存在抑制的作用。本研究结果显示,与正常组比较,模型组大鼠结肠黏膜组织的JAK2, p-STAT3, STAT3 mRNA含量及蛋白表达量明显升高,SOCS-3 mRNA及其蛋白含量降低,经过复方安肠汤治疗后JAK2, p-STAT3, STAT3 mRNA含量及蛋白表达量明显下降,SOCS-3 mRNA及其蛋白含量较模型组明显上升,以安肠汤高剂量组最为显著,说明安肠汤能正向促进SOCS-3在正虚邪恋型UC大鼠体内的表达,而抑制JAK2/STAT3信号通路的转导。

血清内TNF- α , IL-10, IL-17, IL-1 β , IL-6含量可以反应UC大鼠的炎症状态^[31-37],其中IL-17一种由活化的T细胞产生的致炎细胞因子,可刺激机体产

生多种细胞因子如IL-6, IL-8等,从而促进炎症的产生^[38]。而IL-10已被证实可抑制多种炎性和免疫反应^[39-40]。本研究结果显示,模型组大鼠血清中TNF- α , IL-17, IL-1 β , IL-6较正常组明显升高,经过各组治疗后TNF- α , IL-17, IL-1 β , IL-6含量均降低,而IL-10含量增高,以美沙拉嗪组和安肠汤高剂量组最为显著,说明美沙拉嗪肠溶片和复方安肠汤都能够控制炎症的发生。

本研究结果证实,与正常组比较,模型组大鼠miRNA-146a表达水平显著降低,JAK2/STAT3信号通路中JAK2, p-STAT3, STAT3蛋白表达显著增高,SOCS-3表达水平降低,炎症相关因子如TNF- α , IL-17, IL-1 β , IL-6水平升高,IL-10含量降低,而经过给药组治疗后,大鼠miRNA-146a表达水平增高,JAK2, p-STAT3, STAT3蛋白以及TNF- α , IL-17, IL-1 β , IL-6表达水平显著降低,SOCS-3及IL-10表达水平增高,且与安肠汤的给药浓度有关。综上所述,当正虚邪恋型UC大鼠发病时,JAK2/STAT3信号通路相关基因及蛋白被激活,miRNA-146a, SOCS-3 mRNA及SOCS-3表达量降低,炎症症状加重,而经过安肠汤治疗后,由于miRNA-146a, SOCS-3 mRNA及SOCS-3的表达量增加,从而抑制了JAK2, p-STAT3, STAT3 mRNA和相应的蛋白表达,改善正虚邪恋型UC大鼠的炎症反应。由此可见安肠汤可通过miRNA-146a/JAK/STAT/SOCS-3信号通路干预UC病情的发展,从而为临床使用中医药治疗UC提供一定的理论基础。

[参考文献]

- [1] 孙平良. 基于代谢组学的溃疡性结肠炎大鼠肠道微生态变化及安肠汤干预机制研究[D]. 南宁:广西医科大学, 2017.
- [2] LU T X, ROTHENBERG M E. MicroRNA [J]. J Allergy Clin Immunol, 2018, 141(4): 1202-1207.
- [3] FABIAN M R, SONENBERG N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC [J]. Nat Struct Mol Biol, 2012, 19(6): 586-593.
- [4] BASCUÑÁN K A, PÉREZ-BRAVO F, GAUDIOSO G, et al. A miRNA-based blood and mucosal approach for detecting and monitoring celiac disease [J]. Dig Dis Sci, 2020, 65(7): 1982-1991.
- [5] FENG J, ZHU Y, CHEN L, et al. Clinical significance of microRNA-146a in patients with ulcerative colitis [J]. Ann Clin Lab Sci, 2020, 50(4): 463-467.
- [6] SALAS A, HERNANDEZ-ROCHA C, DUIJVESTIJN

- M, et al. JAK-STAT pathway targeting for the treatment of inflammatory bowel disease[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(6):323-337.
- [7] 殷媛,王成,戴欣,等. 肠炎和肠炎相关结直肠癌 miRNA 表达检测及生物信息学分析[J]. *中国癌症杂志*, 2016, 26(11):916-921.
- [8] 王移飞,赵党生,王凤仪,等. 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[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(23):97-102.
- [9] SHEN L, ZHOU T, WANG J, et al. Daphnetin reduces endotoxin lethality in mice and decreases LPS-induced inflammation in Raw264. 7 cells via suppressing JAK/STATs activation and ROS production [J]. *Inflamm Res*, 2017, 66(7):579-589.
- [10] CHEN L L, ZHANG H J, CHAO J, et al. Essential oil of *Artemisia argyi* suppresses inflammatory responses by inhibiting JAK/STATs activation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 204:107-117.
- [11] 耿曙光,孙平良,袁代解,等. 安肠汤对溃疡性结肠炎大鼠肠道真菌基因表达的影响[J]. *中医杂志*, 2017, 58(24):2132-2136.
- [12] 钟元帅,韦日娜,孙平良,等. 溃疡性结肠炎 SD 大鼠肠道乙酸、血清内毒素水平变化及安肠汤干预研究[J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(4):780-782.
- [13] 耿曙光,袁代解,黄宗武,等. 基于气相色谱-质谱的大鼠溃疡性结肠炎模型结肠组织代谢组学特征[J]. *广东医学*, 2016, 37(8):1113-1117.
- [14] 孙平良,耿曙光,袁代解,等. 安肠汤对溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜组织中内源性代谢物的影响[J]. *中医杂志*, 2016, 57(19):1678-1683.
- [15] 李茹柳,迟莉,郭文峰,等. 造模因素对 TNBS 致大鼠溃疡性结肠炎模型的影响[J]. *中药药理与临床*, 2007, 23(6):81-83.
- [16] 刘金响,史英,刘海涛,等. 大鼠溃疡性结肠炎中医证候动物模型研究进展[J]. *安徽中医药大学学报*, 2020, 39(2):93-96.
- [17] 涂玥,万毅刚,顾一煌,等. 非编码 RNA 调控自噬的分子机制及中药的干预作用[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(21):4545-4551.
- [18] RASHAD N M, EL-SHAL A S, SHALABY S M, et al. Serum miRNA-27a and miRNA-18b as potential predictive biomarkers of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 447(1/2):125-136.
- [19] MIN N, VALE P D S, WONG A A, et al. Circulating salivary miRNA hsa-miR-221 as clinically validated diagnostic marker for hand, foot, and mouth disease in pediatric patients [J]. *EBio Medicine*, 2018, 31:299-306.
- [20] BACKES C, MEESE E, KELLER A. Specific miRNA disease biomarkers in blood, serum and plasma: challenges and prospects[J]. *Mol Diagn Ther*, 2016, 20(6):509-518.
- [21] 周毅骏,钦丹萍,杨新艳,等. 雷公藤多苷片对溃疡性结肠炎大鼠 miR-146a、miR-146b 及 TLR4/MyD88 依赖信号通路的调控作用研究[J]. *中草药*, 2016, 47(10):1723-1730.
- [22] 刘佳丽,杨坤,徐爱玲,等. miRNA-146a 在溃疡性结肠炎大鼠结肠组织与血浆中浓度表达意义[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(1):115-118, 276.
- [23] 王峥嵘,范焕芳,张倩,等. β -榄香烯阻断 JAK2-STAT3 信号通路促进紫杉醇对肺癌细胞增殖和凋亡作用研究[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(7):1600-1604.
- [24] 贾茹,张影茹,邵诗芸,等. 补肾解毒散结方调控 JAK/STAT3 信号通路抑制大肠癌侵袭转移的研究[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(3):1433-1436.
- [25] 齐世美,李强,姜琦,等. 白杨素通过 JAK-STATs 信号通路抑制内毒素诱导的巨噬细胞炎症反应[J]. *南方医科大学学报*, 2018, 38(3):243-250.
- [26] HUYNH J, ETEMADI N, HOLLANDE F, et al. The JAK/STAT3 axis: a comprehensive drug target for solid malignancies[J]. *Semin Cancer Biol*, 2017, 45:13-22.
- [27] JOHNSON D E, O'KEEFE R A, GRANDIS J R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(4):234-248.
- [28] YOSHIMURA A, ITO M, CHIKUMA S, et al. Negative regulation of cytokine signaling in immunity [M]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10(7):a028571.
- [29] DURHAM G A, WILLIAMS J, NASIM M T, et al. Targeting SOCS proteins to control JAK-STAT signalling in disease[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2019, 40(5):298-308.
- [30] WANG B, WANGKAHART E, SECOMBES C J, et al. Insights into the evolution of the suppressors of cytokine signaling (SOCS) gene family in vertebrates [J]. *Mol Biol Evol*, 2019, 36(2):393-411.
- [31] MOSCHEN A R, TILG H, RAINE T. IL-12, IL-23 and IL-17 in IBD: immunobiology and therapeutic targeting [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(3):185-196.
- [32] QIDWAI T, KHAN F. Tumour necrosis factor gene polymorphism and disease prevalence [J]. *Scand J Immunol*, 2011, 74(6):522-547.
- [33] DENTON C P, ONG V H, XU S, et al. Therapeutic interleukin-6 blockade reverses transforming growth factor-beta pathway activation in dermal fibroblasts: insights from the faSScinate clinical trial in systemic sclerosis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77(9):1362-1371.

- [34] RIDKER P M, MACFADYEN J G, GLYNN R J, et al. Inhibition of interleukin-1 β by canakinumab and cardiovascular outcomes in patients with chronic kidney disease[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 71(21): 2405-2414.
- [35] 展俊平, 孟庆良, 孟婉婷, 等. 补阳还五汤对类风湿关节炎小鼠 MPO, NE mRNA 表达及 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17 的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(24): 158-163.
- [36] 马克龙, 韩志君, 潘敏, 等. 肉桂醛对白念珠菌定植下 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠治疗作用及对 dectin-1/TLRs/NF- κ B 信号通路的影响[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(13): 3211-3219.
- [37] 屈映, 张书信, 傅丽元, 等. 荆芥、防风对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 AQP4 和 AQP8 表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(15): 3719-3725.
- [38] DA SILVA M S, SÁNCHEZ-FIDALGO S, TALERO E, et al. Anti-inflammatory intestinal activity of *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & Grimes in TNBS colitis model[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(2): 467-75.
- [39] 尹凤荣, 战蓉蓉, 王冬, 等. TL1A 通过调控 IL-17 和 IFN- γ 促进慢性实验性结肠炎相关肠纤维化的发生[J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(6): 1096-1103.
- [40] 白敏, 段永强, 杨晓铁, 等. 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[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(20): 32-38.

[责任编辑 周冰冰]

· 书讯 ·

新中国医学科技发展与医学教育档案管理方法 ——评《新中国医学档案》

新中国以来,随着经济发展以及国家综合实力的提升,我国的医学科技得到蓬勃发展,医学教育档案的管理方法也不断更新升级。科技发展促使医学科技不断迈入新阶段,而医学教育档案是专业技术人员进行继续医学教育的重要记录材料,做好这项工作,有利于规范教育档案的管理,总结医学教育的成功经验和失误教训,对提高继续教育质量和效果起着不可替代的重要作用。《新中国医学档案》以时间为序,梳理了新中国医学科技成果,通过回首新中国以来重要的医学科技成果,可以看到新中国医学科技发展的一个个脚印,感悟到祖国医学科技前进的有力步伐。在理论以及实践上,对研究以及探索新中国医学科技发展及医学教育档案管理方法都具有重要的借鉴价值。

《新中国医学档案》定位是科普读物,主要提供给普通读者阅读,于2012年由浙江工商大学出版社出版发行,慕景强编著。作者多年来从事该领域的科学研究,具有丰富的理论以及实践经验,同时查阅大量国内外相关研究成果,集众家所长编撰了该书,使得本书知识丰富,内容严谨且系统,编排考究,可以使读者系统地了解新中国以来我国医学科技发展的历程,一经出版就受到普通大众的喜爱及追捧。

《新中国医学档案》共六章,对1949年至2009年新中国医学的六个发展历程进行探究,对这六个阶段中发生的重要医学事件以及医学改革进行探究,在此基础上对每个时间的历史价值以及对医学的意义进行综合性评价。这些事件的回顾是对新中国医学科技发展的总结,也可以帮助读者借助这些医学档案,结合我国国情以及世界医学科学发展现状,预测未来医学科技走向以及趋势,进而利用医学科技手段,进行医学教育档案的管理方法更新,做到与时俱进,科技与医学完美融合,共同发展。档案的价值主要是对过往进行总结,同时为现阶段发展提供服务,展望未来。妥善做好档案管理工作,能够为继续医学教育事业的健康稳定发展奠定良好基础。

《新中国医学档案》以时间为线,对新中国以来的医学科技发展阶段以及重要医学事件进行系统梳理,使全篇内容都整齐划一,进而让读者详细了解我国的医学科技发展史。如,第一章1949—1959年新纪元的医学发展中,该书提到了新中国建立初期为了有备无患,东北化学制药厂联合国内顶级专家试制了氯霉素,为这一时期的国民健康奠定了重要基础。此后,梁其琛进行了我国首例心脏直视手术,这是一台看得见心脏的手术,是我国医学的重大突破,为现代医学的发展筑牢根基。再比如,第六章提出在医学上返老还童不是梦,这是因为付小兵率先发现人体表皮细胞存在逆分化现象,为细胞学做出重大突破。此外,该书提到我国成功定位了鼻咽癌易感基因,曾益新课题组获重大科研突破。这些阶段性医学重大突破都是重要的医学档案,通过阅读这些档案,档案管理人员可以更好地了解我国的医学发展历程,进而采取有效的方法来管理医学教育档案。

医学科学和技术对于实现战略性的健康目标十分重要。医学科学技术的发展是确保医学进步以及促进人类健康的重要基础。新中国成立以来,中国医学科技工作者在基础医学、预防医学、临床医学以及其他医学科学技术领域进行了大量研究,为促进经济建设以及人们健康做出了重要贡献。而医学教育档案的管理在医务人员的教育工作中起着重要作用,恰当地采取科学的管理方法对提高医务人员的工作能力以及水平有较大帮助。

《新中国医学档案》利用简洁且激动人心的语言,深入浅出地讲解了我国自建国以来的医学发展档案,具有较强的思想性以及系统性。该书将我国建国以来的医学发展进程分为若干阶段,使用幽默风趣的语言对重大的医学科研成果进行讲解,并配以相应的事件插图,在图文并茂的基础上,对这些事件进行系统地生动地阐述,进而振奋人们的心灵,让读者为我国的医学发展感到由衷的自豪,激发民族自豪感。

《新中国医学档案》一书内容全面、系统、深入,充分借鉴国内外研究经验,注重专业领域深度挖掘和解读。立足医学档案的视角,对新中国的医学重要发展阶段进行系统分析。该书的编撰与出版融合了国内知名医学专家的智慧。阅读本书能够让医学工作者通过系统且有意义的医学事件与内容丰富的拓展阅读融会贯通,在实践中有利于医学教育档案管理人员掌握我国的医学科技发展史,并学会主动运用最新的科技方法来管理医学教育档案。

(作者刘丽娜,衡水市人民医院,河北衡水 053000)