

肝复健方对瘦素调控肝纤维化大鼠 JAK2/STAT3 信号通路的影响

娄莹莹¹ 李佃贵^{2*} 周文平² 裴林³ 王春浩¹ 康良¹ 徐伟超¹

(1. 河北医科大学研究生学院, 河北省石家庄市中山路 361 号, 050017;

2. 河北医科大学中医院; 3. 河北省中医药研究院)

基金项目: 河北省科学技术研究与发展计划项目(10206427D)

* 通讯作者: yingzi135823@sina.com, (0311)66792866

[摘要] 目的 探讨肝复健方抗肝纤维化(HF)的可能作用机制。方法 将 60 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、肝复健方低剂量组、肝复健方中剂量组、肝复健方高剂量组、秋水仙碱组各 10 只,除正常组外其余各组腹腔注射猪血清 0.5 ml/只制备 HF 模型,每周 2 次,共 8 周。造模成功后,肝复健方低、中、高剂量组分别给予含 1.4 g/ml、2.8 g/ml、4.2 g/ml 肝复健方水煎剂灌胃;秋水仙碱组给予秋水仙碱片混悬液 0.154 mg/kg;正常组和模型组给予 10 ml/kg 生理盐水灌胃。RT-PCR 法检测瘦素(Leptin)及 Leptin 受体(Ob-Rb)mRNA 的表达,Western blot 法检测酪氨酸蛋白激酶 2(JAK2)、信号转导和转录激活蛋白 3(STAT3)的表达。结果 与正常组比较,其余各组大鼠 Leptin mRNA、Ob-Rb mRNA、JAK2、STAT3 表达明显增强($P < 0.05$);肝复健方低、中、高剂量组和秋水仙碱组较模型组大鼠上述各项指标明显降低($P < 0.05$),并且肝复健方高剂量组较肝复健方中、低剂量组和秋水仙碱组降低明显($P < 0.05$)。结论 肝复健方抗 HF 的作用可能与其抑制 Leptin、Ob-Rb 表达,进而抑制 JAK2/STAT3 信号通路有关。

[关键词] 肝复健方;肝纤维化;瘦素;JAK2/STAT3 信号通路

Effect of Ganfujian Formula on the JAK2/STAT3 Signaling Pathway in Leptin-Induced Liver Fibrosis in Rats

LOU Yingying¹, LI Dianguai², ZHOU Wenping², PEI Lin³, WANG Chunhao¹, KANG Liang¹, XU Weichao¹

(1. Graduate School of Hebei Medical University, Hebei Province 050017; 2. TCM Hospital of Hebei Medical University; 3. Hebei Academy of TCM)

ABSTRACT Objective To research the possible mechanism of Ganfujian Formula (formula for liver recovery) for liver fibrosis. **Methods** The SD rats were randomized into the normal group, model group, Ganfujian Formula low-dose group, Ganfujian Formula middle-dose group, Ganfujian Formula high-dose group and colchicines group, with 10 in each. The liver fibrosis model was established with intraperitoneal injection of 0.5 ml pig serum twice weekly for 8 weeks in each group except the normal group. Both the normal and model groups were gavaged with 10 ml/kg normal saline respectively. The Ganfujian Formula low-dose, middle-dose and high-dose groups were gavaged with 1.4 g/ml, 2.8 g/ml and 4.2 g/ml Ganfujian Formula decoction respectively. The colchicine group was given 0.154 mg/kg suspension liquid of colchicine tablets. The expressions of leptin mRNA and leptin receptor (Ob-Rb) mRNA were detected with reverse transcription-polymerase chain reaction. The expressions of Janus kinase 2 (JAK-2) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) were detected with Western blot. **Results** Comparing with the normal group, the expressions of leptin mRNA, Ob-Rb mRNA, JAK2 and STAT3 were significantly increased in other groups ($P < 0.05$). Comparing with the model group, the expressions of leptin mRNA, Ob-Rb mRNA, JAK2 and STAT3 were significantly decreased in the Ganfujian Formula low-dose, middle-dose and high-dose groups and colchicine group ($P < 0.05$), especially in the Ganfujian Formula high-dose group ($P < 0.05$). **Conclusion** The possible mechanism of Ganfujian Formula for liver fibrosis is inhibiting the expressions of leptin and Ob-Rb and thereby inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway.

Keywords Ganfujian Formula; liver fibrosis; leptin; JAK2/STAT3 signaling pathway

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是肝脏细胞外基质(ECM)合成和降解失衡,导致其过度沉积的结果,作为慢性肝病向肝硬化转变的关键阶段,越来越受到重视和关注^[1]。瘦素(Leptin)与 HF 的形成有着密切的关系,Leptin 与瘦素受体(Ob-Rb)结合后,

主要通过经典的酪氨酸蛋白激酶/信号转导和转录激活蛋白(JAK/STAT)途径而发挥促 HF 效果^[2]。既往研究证实,肝复健方具有明显的阻断病毒性乙型肝炎慢性化、减轻 HF 及保护肝功能的作用^[3-6]。本研究进一步观察其对 HF 大鼠肝脏 Leptin mRNA

NA、OB-Rb mRNA、JAK2、STAT3 蛋白表达的影响,以探求其治疗 HF 作用机制。

1 材料

1.1 动物

清洁级 SD 大鼠 60 只,雄性,体重(200±20)g,由河北医科大学实验动物中心提供,动物合格证号:1105033。

1.2 主要试剂

无菌未灭活猪血清(北京燕生政博生物科技有限责任公司);RNA 提取试剂 Trizol Reagent(In-vitrogen 公司产品);焦炭酸二乙酯(DEPC,美国 Sigma 公司);逆转录试剂(RT Reagents)、聚合酶链反应试剂(PCR Reagents)、DNA Marker 均购自美国 TaKaRa 公司;JAK2、STAT3、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)均购自美国 Santa Cruz 公司。

1.3 药物

肝复健方由茵陈 15g、田基黄 15g、绞股蓝 12g、虎杖 12g、黄连 12g、鳖甲 15g、穿山甲珠 6g、三棱 6g、红景天 15g、丹参 12g 等组成,生药购自河北省中医院中药房,河北省中医院煎药房煎煮,灭菌分装,4℃ 保存。秋水仙碱片,0.5mg/片,通化百信药业有限公司生产,批号 0806010148。

1.4 主要仪器

756MC 型紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);PE9600 型 PCR 扩增仪(美国 PE 公司);电泳仪及电泳槽(北京六一仪器厂);紫外透射仪(北京鼎国昌盛生物技术有限公司);超低温保存箱(MDF-382E,日本 Sanyo 公司);高速冷冻离心机(1-15K,美国 Sigma 公司)。

2 方法

2.1 模型建立

参考文献[7-8],大鼠适应性喂养 1 周后,采用腹腔注射猪血 0.5ml/只,每周 2 次,时间固定为周一、周五上午 9 点,共注射 8 周。光镜下观察肝组织普通病理变化,肝组织汇管区中纤维组织增生,同时纤维组织与中央静脉周围增生并向肝小叶内延伸,肝小叶结构破坏,证明造模成功。

2.2 动物分组及给药

采用随机数字表法将大鼠分为 5 组,每组 10 只。造模成功后,肝复健方低、中、高剂量组分别给予含 1.4g/ml、2.8g/ml、4.2g/ml 肝复健方水煎剂灌胃;秋水仙碱组给予秋水仙碱片混悬液 0.154mg/kg;正常组和模型组给予 10ml/kg 生理

盐水灌胃。各组大鼠均每日灌胃 1 次,共 12 周。

2.3 检测指标及方法

各组大鼠选取同一部位肝组织,迅速将组织置于 4℃ DEPC 水中洗去血液后,置冻存管中保存于液氮中。

2.3.1 RT-PCR 半定量检测肝组织 Leptin 及 OB-Rb mRNA 的表达 Trizol 法抽提肝组织总 RNA,进行 RT-PCR 扩增。引物序列由北京塞百盛基因技术有限公司合成。Leptin 上游引物:5'-GTCGG-TATCCGCCAGGCAGAGGG-3',下游引物:5'-GGAGTAGAGCGAGGCTTCCAGGAC-3',扩增条件:94℃ 变性 3min,然后 94℃ 40s,58℃ 50s,72℃ 90s(30 个循环),72℃ 延伸 10min,扩增片段为 277bp;OB-Rb 上游引物:5'-AGGGGTTCTATTT-GTATCAGTGACC-3',下游引物:5'-GAAAATTTCCCTCCAGTTCCAAAAG-3',扩增条件:94℃ 变性 3min,然后 94℃ 40s,58℃ 50s,72℃ 90s(30 个循环),72℃ 延伸 10min,扩增片段为 352bp;内参 GAPDH 上游引物:5'-CCTTCATT-GACCTCAACTAC-3',下游引物 5'-GGAAGGC-CATGCCAGTGAGC-3',扩增条件:94℃ 变性 3min,然后 94℃ 40s,59℃ 50s,72℃ 90s(30 个循环),72℃ 延伸 10min,扩增片段为 594bp。取每个标本的扩增产物 6μl 于 1% 的含 GV 核酸染料的琼脂糖凝胶电泳,以 DNA Marker(DL2000)作为标准片段标记,电泳后于紫外透射仪观察,输入微机应用 Quantity One 凝胶图像分析软件对目的电泳条带进行分析,以相应的内参电泳条带作为参照,结果以两者之积分吸光度的比值表示。

2.3.2 Western blot 法检测肝组织中 JAK2、STAT3 的蛋白水平 取 500~600mg 肝组织加 1ml 提取液匀浆,4℃,12000r/min 离心 5min,取上清,加入等体积 2XSDS 上样缓冲液,100℃ 中煮沸 5min。进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,每孔上样等量总蛋白。利用水浴式电印迹法将蛋白转移至膜上。室温下干燥 30min。室温振荡封闭膜 2h 后,加入 1:250(封闭液稀释)的第一抗体稀释液,室温缓慢摇动 2h,用 Tween-PBS 洗膜 3 次后,再加入 1:6500(封闭液稀释)的 HRP 标记的第二抗体稀释液,室温振摇 1h,Tween-PBS 充分洗膜后,将膜浸入 DAB 显色液中,5~10min 内在膜上显示清晰条带后,立即用蒸馏水洗膜,终止反应。使用 Gel-pro 凝胶分析软件,测定各条带的平均光密度值

表 1 各组大鼠肝组织 Leptin mRNA、OB-Rb mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Leptin/GAPDH	OB-Rb/GAPDH
正常组	10	0.2293 $\pm$ 0.0132	0.2253 $\pm$ 0.0048
模型组	10	0.6523 $\pm$ 0.0204*	0.7403 $\pm$ 0.0118*
秋水仙碱组	10	0.4386 $\pm$ 0.0292* Δ	0.4735 $\pm$ 0.0249* Δ
肝复健方低剂量组	10	0.5540 $\pm$ 0.0163* Δ #	0.6304 $\pm$ 0.0108* Δ #
肝复健方中剂量组	10	0.4536 $\pm$ 0.0216* Δ ☆	0.4891 $\pm$ 0.0228* Δ ☆
肝复健方高剂量组	10	0.3349 $\pm$ 0.0156* Δ ☆▲	0.3996 $\pm$ 0.0174* Δ ☆▲

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$;与秋水仙碱组比较,# $P<0.05$;与肝复健方低剂量组比较,☆ $P<0.05$;与肝复健方中剂量组比较,▲ $P<0.05$

表 2 各组大鼠肝组织 JAK2、STAT3 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	JAK2/GAPDH	STAT3/GAPDH
正常组	10	0.3274 $\pm$ 0.0121	0.2253 $\pm$ 0.0048
模型组	10	1.2268 $\pm$ 0.0132*	0.7403 $\pm$ 0.0118*
秋水仙碱组	10	0.5303 $\pm$ 0.0183* Δ	0.4735 $\pm$ 0.0249* Δ
肝复健方低剂量组	10	0.9131 $\pm$ 0.0137* Δ #	0.6304 $\pm$ 0.0108* Δ #
肝复健方中剂量组	10	0.5200 $\pm$ 0.0129* Δ ☆	0.4891 $\pm$ 0.0228* Δ ☆
肝复健方高剂量组	10	0.4544 $\pm$ 0.0082* Δ ☆▲	0.3996 $\pm$ 0.0174* Δ ☆▲

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$;与秋水仙碱组比较,# $P<0.05$;与肝复健方低剂量组比较,☆ $P<0.05$;与肝复健方中剂量组比较,▲ $P<0.05$

(OD 值),以光密度值代表蛋白质的表达量。待测蛋白质表达量与内参照 GAPDH 表达量进行对比,表示蛋白质的相对表达水平。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,两个样本均数比较采用 t 检验,多个样本均数比较行完全随机设计单因素方差分析。

3 结果

3.1 各组大鼠肝组织 Leptin mRNA、OB-Rb mRNA 表达的比较

表 1 示,与正常组比较,其余各组大鼠肝组织 Leptin mRNA、OB-Rb mRNA 的表达均明显增强,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,秋水仙碱组和肝复健方低、中、高剂量组 Leptin mRNA、OB-Rb mRNA 表达明显减弱,差异有统计学意义($P<0.05$)。肝复健方高剂量组 Leptin mRNA、OB-Rb mRNA 的表达下降优于秋水仙碱组、肝复健方中、低剂量组($P<0.05$);秋水仙碱组与肝复健方中剂量组比较 Leptin mRNA、OB-Rb mRNA 的表达差异无统计学意义($P>0.05$)。

3.2 各组大鼠肝组织 JAK2、STAT3 蛋白表达的比较

表 2 示,与正常组比较,其余各组大鼠肝组织中 JAK2、STAT3 的表达量均明显增强($P<0.05$);与模型组比较,肝复健方低、中、高剂量组及秋水仙碱

组 JAK2、STAT3 的蛋白表达量显著性降低($P<0.05$)。肝复健方中剂量组与秋水仙碱组比较 JAK2、STAT3 蛋白表达量差异无统计学意义($P>0.05$);秋水仙碱组与肝复健方低剂量组相比 JAK2、STAT3 蛋白的表达量显著降低($P<0.05$);肝复健方高剂量组在降低 JAK2、STAT3 蛋白表达量方面优于秋水仙碱组、肝复健方中、低剂量组($P<0.05$)。

4 讨论

Leptin 是由肥胖基因编码的一种由 167 个氨基酸组成的分泌型蛋白质^[9]。1998 年, Potter 等在活化的肝星状细胞(HSC)中发现 Leptin mRNA 和蛋白质后,人们开始关注 Leptin 与肝病的作用, Leptin 可能是一个关键促纤维化因子^[10-11]。其作用是通过靶细胞膜上的受体和相应的信号转导系统来实现的^[12]。目前已证实有 6 种受体亚型^[13],而其中只有长受体 OB-Rb 具有完整的信号转导能力, Leptin 信号传导通路的研究目前大多集中于 JAK2/STAT3 通路。

中医学将 HF 归属于“黄疸”、“胁痛”、“臌胀”等范畴。浊毒内蕴、肝络瘀滞是 HF 的主要病机之一。浊毒病邪作用于人体,循人体络脉体系由表入里,由局部至全身^[14]。本病可因感染邪毒、或忧思郁怒、或饮酒过多、或饮食不节及其他疾病转变所致使脏腑失和,肝脾受损,肝失疏泄,脾失健运,水湿不化,

聚湿生浊,湿浊蕴久,酿生毒邪,浊毒并见,兼夹为害,损伤肝络,络脉瘀滞,坚积而成。肝复健方以田基黄、茵陈、绞股蓝化浊解毒,以治根本,田基黄有清热利湿,散瘀止痛,解毒之功效;虎杖活血兼解热毒利湿浊;黄连苦寒清热毒、燥湿浊;山甲珠活血散瘀、通行经络;丹参养血活血;鳖甲滋养肝肾,软坚散结;三棱破血行气消积;红景天益气活血,清热解毒。诸药合用,湿浊化、热毒清、气血调畅,肝得滋养,肝复如常。

本研究结果显示,各组大鼠肝组织均有 Leptin、OB-Rb、JAK2、STAT3 不同程度的表达,模型组显著高于正常组($P < 0.05$),而秋水仙碱组和肝复健方低、中、高剂量组表达较模型组均有不同程度下降($P < 0.05$)。肝复健方中剂量组与秋水仙碱组差异无统计学意义($P > 0.05$),肝复健方高剂量组表达量降低优于肝复健方中、低剂量组及秋水仙碱组。本研究结果提示,JAK2、STAT3 的表达程度与同期 Leptin mRNA、OB-Rb mRNA 的表达程度有一定相关性。模型大鼠的 HF 过程中,活化的 HSC 大量分泌 Leptin,Leptin 进一步激活了其功能受体 OB-Rb,两者结合后直接激活 JAK2/STAT3 信号通路。肝复健方能够下调 OB-Rb 的表达,减少 Leptin 配体和 OB-Rb 受体结合后的复合物的产生,进而抑制 JAK2/STAT3 信号通路,从而达到直接抑制 Leptin 促 HSC 活化,形成 HF 的作用。本研究证实了肝复健方抗 HF 作用的又一重要机制,对与多种信号通路的交互作用有待进一步研究。

参考文献

- [1]张永生,徐珊,赵育芳,等.三七总苷对肝纤维化模型大鼠的干预作用[J].中医杂志,2011,52(19):1671-1675.
- [2]Saxena NK, Ikeda K, Rockey DC, et al. Leptin in hepatic fibrosis: evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermates of ob/ob mice[J]. Hepatology,2002,35(4):762-771.
- [3]李佃贵,裴林,白文忠,等.肝复健胶囊抗免疫性肝纤维化大鼠的实验研究[J].中成药,2007,29(3):346-348.
- [4]任慧雅,裴林,张立众,等.肝复健胶囊对免疫性肝纤维化大鼠转化生长因子 β_1 的影响[J].中成药,2007,29(5):768-770.
- [5]常红,李佃贵,张纳,等.肝复健胶囊治疗慢性乙型肝炎肝纤维化患者 92 例临床观察[J].中成药,2009,31(12):1811-1813.
- [6]李佃贵,张纳,郭敏,等.肝复健方对肝纤维化大鼠 TGF- β /Smad 信号通路的影响[J].北京中医药大学学报,2009,32(11):755-758.
- [7]徐叔云.药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,2002:1351.
- [8]王丽,李佃贵,孟宪鑫,等.化浊解毒益气方对肝纤维化大鼠细胞因子的影响[J].中国老年学杂志,2009,29(7):838-840.
- [9]Anania FA. Leptin, liver, and obese mice-fibrosis in the fat lane[J]. Hepatology, 2002,36(1):246-248.
- [10]Potter JJ, Womack L, Mezey E, et al. Transdifferentiation of rat hepatic stellate cells results in leptin expression[J]. Biochem Biophys Res Commun,1998,244(1):178-182.
- [11]Potter JJ, Rennie-Tankesley L, Mezey E. Influence of leptin in the development of hepatic fibrosis produced in mice by Schistosoma mansoni infection and by chronic carbon tetrachloride administration[J]. J Hepatol, 2003,38(3):281-288.
- [12]贺松其,文彬,吕志平,等.保肝宁对肝纤维化模型大鼠肝组织形态学及 JAK2、STAT3 蛋白磷酸化水平的影响[J].上海中医药杂志,2008,42(5):75-79.
- [13]Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver diseases[J]. Hepatology,2009,50(3):957-969.
- [14]王正品,李佃贵,杜艳茹,等.浊毒致病论与现代中医病因学[J].中医杂志,2010,51(1):11-13.

(收稿日期:2012-11-26;修回日期:2012-12-27)

[编辑:邓媛]

欢迎订阅《中医杂志》

《中医杂志》是由中华中医药学会和中国中医科学院主办的全国性中医药综合性学术期刊。1955 年创刊以来始终坚持“以提高为主,兼顾普及”的办刊方针,是我国中医药界创刊早、发行量大、具有较高权威性和学术影响力的国家级医药期刊,是中国中文核心期刊和科技核心期刊、中国精品科技期刊、首届国家期刊奖获得者和中国期刊方阵双奖期刊。2009 年被中国期刊协会评为“新中国 60 年有影响力的期刊”。2011 年获国家新闻出版政府奖期刊奖提名奖,并且是唯一获此荣誉的中医类期刊。被国内外多种检索系统收录。本刊主要栏目中“当代名医”和“临证心得”分别介绍名老中医和临床医生辨证用药治疗疑难病的经验;“临床研究”、“临床报道”介绍中医药治疗的新方法、新成果。学术探讨、思路与方法、方法学与临床评价、专家论坛、病例讨论、综述、百家园等栏目,提供最新信息与治疗方法,成为学习中医药、研究中医药,不断提高临床及研究水平的良师益友。

《中医杂志》为半月刊,大 16 开本,每月 2 日和 17 日出版,每期 9.80 元。读者可以到全国各地邮局办理订阅手续(邮发代号:2-698),也可以与本刊读者服务部联系邮购,邮购免邮费。电话:010-64014411 转 3036。国外发行:中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱,邮编:100044,代号:M140)。

本社地址:北京市东直门内南小街 16 号,邮编:100700,电话:010-64035632。网址:http://www.jtcm.net.cn。