

鲜生地黄对慢加急性肝衰竭大鼠 JAK2/STAT3 通路的影响

郭丽颖^{1,2} 李秋伟^{1,2} 李 力¹ 苗 静² 贾建伟²

(1 天津中医药大学,天津,300193; 2 天津市第二人民医院,天津,300192)

摘要 目的:观察鲜生地黄对慢加急性肝衰竭大鼠 JAK2/STAT3 通路的影响。方法:30 只雄性 Wistar 大鼠按照 1:4 比例随机分为对照组和实验组。实验组大鼠先用四氯化碳诱导成肝纤维化模型,再按照 1:1 比例随机分为模型组和观察组,应用 D 氨基半乳糖进行急性攻击,建立慢加急性肝衰竭大鼠模型。观察组在急性攻击前 7 d 予以鲜生地黄连续灌胃。各组大鼠分别在急性攻击后 24 h 取材,检测血清内毒素、白细胞介素-6 含量及肝脏组织中 JAK2mRNA、STAT3mRNA 的表达。结果:模型组大鼠肝组织中 JAK2mRNA、STAT3mRNA 表达低于对照组和观察组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。观察组与对照组大鼠肝组织中 JAK2mRNA、STAT3mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。模型组大鼠血清内毒素显著高于对照组和观察组,差异有统计学意义($P < 0.01$);观察组与对照组比较,大鼠血清内毒素表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。模型组大鼠血清白细胞介素-6 高于对照组和观察组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:鲜生地黄能够降低肠道内毒素的吸收,促进 JAK2/STAT3 通路活化,但是介导物质可能并不是 IL6,相关机制需要进一步完善。

关键词 鲜生地黄;慢加急性肝衰竭;JAK2;STAT3

Effects of Fresh Radix Rehmanniae Recens on JAK2/STAT3 Pathway in Acute-on-chronic Liver Failure Rats

Guo Liying^{1,2}, Li Qiuwei^{1,2}, Li Li¹, Miao Jing², Jia Jianwei²

(1 Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2 Tianjin Second People's Hospital, Tianjin 300192, China)

Abstract Objective: To observe the effect of fresh Radix Rehmanniae Recens on JAK2/STAT3 pathway in acute-on-chronic liver failure rats. **Methods:** Thirty male Wistar rats were randomly divided into control group and experimental group according to 1:4 ratio. Rats in experimental group were firstly induced to hepatic fibrosis model with carbon tetrachloride, and then randomly divided into model group and treatment group according to the ratio of 1:1. Acute attacks were performed with D-galactosamine and a rat model of chronic acute liver failure was established. The treatment group was given intragastrically with the fresh Radix Rehmanniae Recens 7 days before the acute attack. Rats in each group were harvested 24 hours after acute challenge. Serum endotoxin, interleukin-6 levels, and expression of JAK2 mRNA and STAT3 mRNA in liver tissue were measured. **Results:** The expression of JAK2 mRNA and STAT3 mRNA in the liver tissue of the model group was lower than that in the control group and the model group. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). There was no significant difference in the expression of JAK2 mRNA and STAT3 mRNA between the treatment group and the control group ($P > 0.05$). The serum endotoxin level in the model group was obviously higher than that in the control group and the treatment group, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). There was no significant difference in serum endotoxin expression between the treatment group and the control group ($P > 0.05$). Serum interleukin-6 levels in the model group were higher than those in the control group and the treatment group, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion:** Fresh Radix Rehmanniae Recens can reduce the absorption of toxins in the intestine and promote the activation of JAK2/STAT3 pathway, but the mediator may not be IL6, and the relevant mechanisms need to be further improved.

Key Words Fresh Radix Rehmanniae Recens; Chronic plus acute liver failure; JAK2; STAT3

中图分类号:R743.3 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.08.039

肝衰竭属于中医学“急黄”“瘟黄”范畴,“湿、热、瘀”是肝衰竭的主要病理基础,“毒、虚”是肝衰竭的特有病理因素,“热、毒”是疾病进展的关键^[1]。

鲜生地黄既可以清热凉血,又可以养阴生津,因此它可以作用于肝衰竭的多个病理过程,在临证中获得一定的疗效^[2-4],但是其作用机制尚不明确。酪氨酸

基金项目:国家十二·五科技重大专项(2012ZX10005-005);天津市中医药管理局中医、中西医结合科研专项(2015059)

作者简介:郭丽颖(1986.04—),女,博士研究生在读,住院医师,研究方向:中医、中西医结合肝病、传染病,E-mail:tingliziguo@126.com

通信作者:贾建伟(1962.03—),男,本科,主任医师,研究方向:中医、中西医结合肝病、传染病,E-mail:jiajiawei@126.com

激酶 2 (JAK2)/转录因子 3 (STAT3) 信号通路是肝损伤发展过程中的重要调控机制。因此本研究基于 JAK2/STAT3 通路,初步探讨鲜生地黄治疗肝衰竭的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级雄性 Wistar 大鼠 30 只,质量(220 ± 20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司(动物许可证号:SCXK2016006)。实验前在恒温($25\text{ }^{\circ}\text{C}$)、光照周期 12 h/12 h 环境中适应性饲养 1 周。

1.1.2 药物 鲜生地黄生地黄采自河南省武陟县,清洗后真空冰冻保鲜技术处理,用前榨汁。

1.1.3 试剂与仪器

1.1.3.1 主要试剂 TRNzol 总 RNA 提取试剂由天根生化科技(北京)有限公司,生产批号:DP405-02。PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 由 TaKaRa 生物有限公司,生产批号:RR047B。Premix Ex Taq™(探针法 mix)由 TaKaRa 生物有限公司,生产批号:RR390L。所用的 JAK2、STAT3 目的基因引物、探针均由北京 Invitrogen 公司合成。D-氨基半乳糖(D-Gal)购自上海市阿达玛斯试剂有限公司,批号:P1243553。四氯化碳(CCl_4)购自天津市化学试剂供销公司,批号:160918。橄榄油购自天津市化学试剂供销公司,批号:161205。

1.1.3.2 主要仪器 QL-902 涡旋振荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Ce-ntrifuge 5415D 离心机(Eppendorf 公司);分光光度 NANODROP 2000 (Thermo scientific 公司);凝胶成像系统 Tanon 1600 (上海天能科技有限公司);荧光定量 PCR 仪 ABI7500(Applied Biosystems 公司);ELX-800 型酶标仪(美国 Biotek 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备

1.2.1.1 动物模型制备 参考朴正福、张海燕等^[5-6]方法建立慢加急性肝衰竭大鼠模型。

1.2.1.2 肝纤维化大鼠模型制备 将 CCl_4 与橄榄油按照 1:1 配制成 50% CCl_4 橄榄油溶液,按照 2 mL/kg 剂量,给予大鼠腹腔注射,1 次/3 d,连续 8 周,建立肝纤维化大鼠模型。

1.2.1.3 慢加急性肝衰竭大鼠模型制备 D-Gal 与 0.9% 氯化钠溶液按照 1:10 配制成 D-Gal 溶液。肝纤维化模型大鼠禁食 24 h,不禁水,按照 2 g/kg 剂量,腹腔注射 D-Gal 溶液,建立慢加急性肝衰竭大鼠

模型。

1.2.1.4 分组 采用 SPSS 22.0 统计软件进行随机化处理。30 只 Wistar 大鼠按照 1:4 比例随机分为 2 组,空白对照组(简称对照组)6 只,自由饮水进食;实验组 24 只,自由饮水进食,并按照 1.2.1.2 方法应用 50% CCl_4 橄榄油溶液建立肝纤维化模型。8 周后从实验组中随机抽取 6 只大鼠验证肝纤维化模型成立后,余下的大鼠按照 1:1 比例随机分为模型组和观察组,按照 1.2.1.3 方法应用 D-Gal 进行急性攻击,建立慢加急性肝衰竭大鼠模型。

1.2.2 给药 成模前 1 周开始进行药物干预。对照组、模型组按照 0.25 mL/100 g 剂量给予生理盐水灌胃,1 次/d;观察组按照 0.25 mL/100 g 剂量给予鲜生地黄汁灌胃,1 次/d。取材:慢加急性肝衰竭大鼠模型成立 24 h 后,麻醉解剖大鼠,采集门静脉血液,于 3 000 r/min 离心 10 min 后留取上清,液氮保存后转移到 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存,待测;取肝左叶组织液氮保存后转移到 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存,待测。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 一般情况观察 每天记录各组大鼠饮水量及体重,观察皮毛及大便情况。

1.2.3.2 血清内毒素、IL6 检测 采用酶联免疫吸附法进行检测。往预先包被的内毒素(ET)、白细胞介素-6(IL-6)捕获抗体的包被微孔中,依次加入标本、标准品、HRP 标记的检测抗体,经过温浴并彻底洗涤,用底物 TMB 显色,TMB 在过氧化物酶的催化下转化为蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和 ET、IL-6 呈正相关。用酶标仪在 450 nm 波长测定吸光度,计算样品浓度。

1.2.3.3 肝组织中 JAK2、STAT3 的 mRNA 检测 采用 Real Time PCR taqman 探针方法检测目的基因 mRNA,以 GAPDH 为内参照,双标准曲线法进行相对定量。肝脏组织放入已预冷的研钵中进行研磨成粉末状,按 TRNzol 总 RNA 提取试剂说明书提取 RNA,并应用紫外吸收测定法检测浓度和纯度。然后采用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 进行 cDNA 反转录。取 cDNA 样品配置 Realtime PCR 反应体系进行 PCR 反应。PCR 反应体系为 20 μL ,Master Mix($2 \times$)10 μL ,上下游特异引物各 0.5 μL ,探针 0.5 μL 。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 s,然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 s 重复循环 39 次,末次循环 60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸至 40 s,收集荧光。JAK2 引物序列(5'to3'):上游 TATGCGAATGATCGGCAATG,下游 AAATCTCGTCTGGGCACCCT,探针 FAM-AAGGGCAGATGATCGTAT-

TCCATTT-BHQ1; STAT3 引物序列 (5' to 3'): 上游 TGATAAGGACTCTGGGGATG, 下游 GGGTCAGGT-GCTTGAAGTCT, 探针 FAM-CCTCAGAGGGTCTCG-GAAATTTAAC-BHQ1。其中 Reporter 为 FAM, Quencher 为 BHQ1。目的基因和内参分别进行 Real-time PCR 反应, 每个样本检测 3 个复孔。数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行分析。每一份标本均行复管检测, 取其均值做为目的基因的表达水平。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析, 行正态性检验和方差齐性检验, 所有数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 符合正态分布且方差齐的数据应用单因素方差分析 LSD 检验; 呈偏态分布或方差不齐则作多组样本秩和 k-w 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况比较 对照组大鼠毛发光泽, 活动多, 精神状态好, 大便正常。实验组大鼠在给予 CCl_4 过程中, 毛发凌乱无光泽, 易急惹, 皮肤逐渐黄染, 体重增长缓慢。8 周时实验组大鼠死亡 2 只, 随机抽取 6 只大鼠中解剖发现有 2 只出现腹水。D-Gal 急性攻击后, 模型组和观察组大鼠逐渐出现精神萎靡, 黄疸加重, 部分可见口鼻出血症状, 至 24 h 模型组死亡 1 只。

2.2 肝组织 JAK2mRNA、STAT3mRNA 表达 3 组大鼠肝组织中 JAK2mRNA、STAT3mRNA 表达差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。对照组及观察组大鼠肝组织中 JAK2mRNA、STAT3mRNA 表达均高于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。对照组与观察组比较, 大鼠肝组织中 JAK2mRNA、STAT3mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 3 组肝组织 JAK2mRNA、STAT3mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数 (只)	JAK2mRNA	STAT3mRNA
对照组	6	1.48 $\pm$ 0.28 ^{▲▲}	0.99 $\pm$ 0.24 [▲]
模型组	8	0.66 $\pm$ 0.27 ^{**}	0.54 $\pm$ 0.23 [*]
观察组	8	1.15 $\pm$ 0.37 ^{▲▲}	1.08 $\pm$ 0.51 ^{▲▲}
F		12.24	5.86
P		0.00	0.01

注: 与对照组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$

2.3 血清 ET、IL6 比较 3 组大鼠血清 ET 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。对照组及观察组大鼠血清 ET 均高于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。对照与观察组比较, 大鼠血清 ET 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 3 组血清 ET、IL6 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数 (只)	ET (Eu/L)	IL6 (pg/mL)
对照组	6	0.57 $\pm$ 0.12	51.29 $\pm$ 5.16
模型组	8	1.17 $\pm$ 0.26 ^{**}	54.33 $\pm$ 3.22
观察组	8	0.74 $\pm$ 0.29 ^{▲▲}	52.86 $\pm$ 4.17
F		11.99	0.925
P		0.00	0.41

注: 与对照组比较, ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{▲▲} $P < 0.01$

3 讨论

肝衰竭是多种病因所致的严重肝脏损害, 导致其合成、解毒、排泄和生物转化等功能发生严重障碍或失代偿, 出现以凝血功能障碍、黄疸、肝性脑病、腹水等为主要表现的一组临床征候群, 预后差, 病死率高, 是肝脏病中常见的危重病。肝衰竭发病机制可以概括为免疫损伤、缺血缺氧损伤、内毒素血症“三重打击学说”^[7], 核心表现在肝细胞死亡、炎性反应细胞浸润和微循环障碍三方面, 其中肝细胞大量坏死及有效再生的缺乏是肝衰竭死亡的主要原因^[8]。因此肝细胞的有效再生, 是改善肝衰竭预后的重要因素。酪氨酸激酶 JAK/转录因子 STAT 参与了许多细胞因子及生长因子介导的细胞增殖及分化等生物过程, 特别是 STAT 蛋白已被证实在细胞因子诱导细胞增殖过程中占有重要地位, 其中 JAK2/STAT3 通路在成人肝脏中表达, 并参与肝再生、免疫等过程^[9-10]。研究^[11]表明在肝脏局部切除术后多种早期即刻基因被立即激活。IL-6 负责激活这些基因的 40%。IL-6 可活化 STAT, 许多研究表明这就是肝再生的开始^[12]。

鲜生地黄甘寒质润, 养阴生津同时又可清热凉血, 将其应用于肝衰竭治疗中可凉血解毒、清营护络; 可增水濡络而行血; 调和阴阳, 生津养液, 滋补肝肾, 整体作用于肝衰竭“三重打击学说”中的各个阶段。现代研究^[13-14]表明中药养阴生津作用主要体现在调控细胞增殖方面。为进一步明确鲜生地黄作用机制, 我们探讨了鲜生地黄对 JAK2/STAT3 通路影响。

本研究证实了鲜生地黄能够提高慢加急性肝衰竭大鼠模型中肝组织中 JAK2mRNA、STAT3mRNA 的表达 ($P < 0.05$), 达到正常大鼠水平 ($P > 0.05$); 能够降低慢加急性肝衰竭大鼠模型门静脉 ET 水平 ($P < 0.05$), 但是不能改善早期免疫损伤所致的 IL6 升高的结局 ($P > 0.05$)。因此我们推测鲜生地黄能够降低肠道内毒素的吸收, 能够促进 JAK2/STAT3 (下接第 1983 页)

参考文献

- [1] 马兆哲,于永铎.生物反馈联合针灸及化癥通便汤对盆底失弛缓型便秘的治疗效果[J]. 贵州医科大学学报,2017,42(3):341-343.
- [2] 程丹. 眼针治疗结肠慢传输型便秘的临床应用及研究[J]. 世界中医药,2016,11(1):86-90.
- [3] 汪南湖,林秋贤,刁娜,等. 便秘的治则治法探讨[J]. 中医药信息,2012,29(3):3-4.
- [4] 张美林,肖彦燕. 益气润肠通腑汤治疗结肠慢传输型便秘气虚证的临床观察[J]. 中医临床研究,2017,9(29):55-56.
- [5] 毛丽华,陆琳,刘艳. 益火补土法治疗脾肾阳虚型结肠慢传输型便秘患者的临床疗效[J]. 临床合理用药杂志,2016,9(12):136-137.
- [6] 吕艳锋,张成博,喻苗,等. 玉烛散对血虚型慢传输型便秘小鼠结肠平滑肌细胞内 Ca^{2+} 浓度及收缩的影响[J]. 中国现代普通外科进展,2016,19(5):337-342.
- [7] 赵兴兵,吴维佳,李丹丹,等. 小鼠脾虚便秘造模对肠道微生物及酶活性的影响[J]. 中国微生态学杂志,2013,25(9):993-996.
- [8] 牛明了,甄欢欢,周晓丽. 秦芩提取物对便秘大鼠血清及结肠组织 NO、SOD、MDA、GSH 水平的影响[J]. 山东医药,2016,56(05):27-29.
- [9] 王成伟,何洪波,李宁,等. 电针深刺天枢穴治疗功能性便秘随机对照研究[J]. 中国针灸,2010,30(9):705-708.
- [10] 彭唯娜,王琳,刘志顺,等. 个体化深刺天枢穴治疗结肠慢传输

型便秘随访疗效及安全性分析:多中心随机对照研究[J]. 中国针灸,2013,33(10):865-869.

- [11] 尚志杰,尚迎辉. 中药四磨汤治疗肺癌患者应用羟考酮针剂致便秘临床观察[J]. 中医学报,2016,44(2):85-86.
- [12] 吴小玲,何义波,吴瑜梅. 乳糖联合枯草杆菌二联活菌治疗慢性便秘的疗效[J]. 胃肠病学,2016,21(2):90-92.
- [13] 沈旭艳. 结肠慢传输型便秘证素规律初探[D]. 福州:福建中医药大学,2017.
- [14] 谭蕊,何永恒,林仁敬,等. 白术七物颗粒结合针灸治疗慢性功能性便秘 30 例临床观察[J]. 湖南中医杂志,2015,31(5):48-49.
- [15] 周英,孙必强,刘卫东,等. 七味白术散及提取物对小鼠肠道菌群失调腹泻 IL-8 表达的影响[J]. 中国微生态学杂志,2015,27(9):1009-1013.
- [16] 邓天好,赵先平,郭抗萧,等. 四磨汤对便秘肠道微生态调节作用的研究[J]. 中国微生态学杂志,2015,27(5):614-617.
- [17] 沈小雪,俞汀,林琳. 胃肠道微生态如何影响慢性便秘以及指导临床治疗[J]. 胃肠病学,2017,22(5):308-311.
- [18] 韩澄,蔡宋宋. L-阿拉伯糖对便秘小鼠神经递质水平的影响[J]. 食品与发酵科技,2015,51(1):51-52.
- [19] 胡文辉,陈玲玲,金丽虹. 布拉氏酵母菌联合乳糖对儿童功能性便秘患者血清肠神经递质指标的影响及疗效[J]. 中国中西医结合消化杂志,2016,24(9):706-708.

(2018-04-12 收稿 责任编辑:张文婷)

(上接第 1978 页)

通路活化,但是介导物质并不是 IL6,相关机制需要进一步完善。

参考文献

- [1] 周小舟,黄俏光,孙新锋,等. 慢加急性、慢性肝衰竭中医证候规律的研究[J]. 中国中医药科技,2012,19(6):483-484.
- [2] 沈南兰,雷金艳,郭丽颖. 鲜生地改善慢性乙型肝炎患者胃肠功能临床研究[J]. 河北医药,2012,34(13):2054-2055.
- [3] 贾建伟,赵洁,李谦,等. 慢性重型肝炎营血证的鲜生地汁治疗[J]. 中西医结合肝病杂志,2007,17(1):7-9.
- [4] 贾建伟,袁桂玉,曹武奎,等. 鲜生地治疗慢性重肝营血症临床观察[C]. 深圳:全国中西医结合传染病学术会议,2006.
- [5] 朴正福,赵丹,张海燕,等. 大鼠慢加急性肝衰竭模型肝脏组织病理学特征研究[J]. 胃肠病学和肝病杂志,2010,19(5):432-436.
- [6] 张海燕,侯维,卢静,等. 大鼠慢加急性肝衰竭模型建立的方法探讨[J]. 胃肠病学和肝病杂志,2009,18(4):348-351.
- [7] 叶一农,高志良. 乙型肝炎肝衰竭发生机制中的三重打击[J]. 传

染病信息,2009,22(5):276-279.

- [8] 徐少卿,郭建彪,李红艳,等. 血清甲胎蛋白与慢加急性肝衰竭预后的关系[J]. 临床消化病杂志,2014,26(1):46-47.
- [9] 吴志豪. 人类肝脏 JAK-STAT 相互作用网络的构建[D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院,2008.
- [10] 闫春玲. EPO、IGF-1、ILK 和 JAK/Stat 信号通路在大鼠肝再生中对肝细胞增殖的调节作用研究[D]. 河南师范大学,2013.
- [11] Li W, Liang X, Leu JI, et al. Global changes in interleukin-6-dependent gene expression patterns in mouse livers after partial hepatectomy[J]. Hepatology,2001,33(6):1377-1386.
- [12] Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2004,5(10):836-847.
- [13] 李民,张旭,朱平,刘学风. 麦冬、生地药血清对血管内皮细胞增殖的影响[J]. 国医论坛,2001,16(5):43-44.
- [14] 陈志国,叶松山,范迎,等. 金钗石斛多糖提取工艺的优化及对小鼠脾细胞增殖的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):27-32.

(2018-04-17 收稿 责任编辑:王明)