

- [2] 刘付建, 沈宏林, 李衍春, 等. 气相色谱法测定溶剂型木器涂料中 13 种有机溶剂含量[J]. 中南林业科技大学学报, 2014, 8(8): 94-96, 119.
- [3] 祁彩霞, 杨发胜. 气相色谱法测定盐酸左氧氟沙星原料药中有机溶剂三氯甲烷残留[J]. 中国药业, 2014, 31(12): 73-74.
- [4] 王英瑛, 李俊. 毛细管气相色谱法测定舒必利中有机溶剂残留量[J]. 中国药师, 2014, 14(6): 934-936.
- [5] 张焯, 杜祯, 孙少平, 等. 喷雾冷冻干燥法制备丹参酮 A 固体分散体及其理化性质评价[J]. 中国药学杂志, 2012, 13(3): 204-208.
- [6] 杨玉琴, 李俊. 顶空毛细管气相色谱法测定醋酸可的松中 6 种有机溶剂残留量[J]. 中国药师, 2014, 12(6): 937-939.
- [7] 孙晋瑞, 伊星璐, 张昊然, 等. 气相色谱法测定左西孟旦原料药中 6 种有机溶剂残留量[J]. 中国药房, 2014, 41(21): 1995-1997.
- [8] 谢颖, 戴丹, 谢春燕. 气相色谱法测定丹参酮 A 原料药中有机溶剂残留量[J]. 华西药学杂志, 2014, 3(1): 84-86.
- [9] 刘蝉. 气相色谱法测定维生素 E 软胶囊中 8 种有机溶剂残留量[J]. 安徽医药, 2014, 8(4): 624-626.
- [10] 刘薇芝, 胡汉昆, 郑保根, 等. 气相色谱法测定磷酸二甲啡烷中有机溶剂残留[J]. 中国药师, 2014, 8(4): 563-565.

(责任编辑: 骆欢欢)

## 加味升降散对瘦素诱导肝星状细胞信号通路的影响

邵敏明, 江漪, 刘妮, 张奉学

广州中医药大学热带医学研究所, 广东 广州 510405

**[摘要]** 目的: 研究加味升降散对瘦素诱导肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSC) 信号通路相关因子表达的影响。方法: 以重组大鼠瘦素作用于 HSC-T6 细胞, 各干预组在瘦素作用前分别加入加味升降散、N-乙酰-L 半胱氨酸 (NAC)、氯化二亚苯基碘喹 (DPI) 及 JAK 抑制剂 AG490 干预, 再加入瘦素。瘦素组直接加入瘦素, 正常组不加任何药物。另设只加入加味升降散含药血清的加味升降散自身对照组。各组处理不同时间后, 检测细胞内基质金属蛋白酶抑制因子-1 (TIMP-1) mRNA、磷酸化 Janus 激酶 2 (JAK2) 及磷酸化信号转导和转录激活 3 (STAT3) 蛋白表达水平。结果: 加味升降散干预 12 h、24 h 后与瘦素组比较, TIMP-1 mRNA 表达明显下调 ( $P < 0.05$ )。免疫细胞化学检测显示, 瘦素刺激 HSC-T6 细胞 2 h 后细胞质 p-JAK2 及细胞核内 p-STAT 蛋白表达与正常组明显增加 ( $P < 0.01$ ), 加味升降散干预后 p-JAK2 及 p-STAT3 蛋白表达明显低于瘦素组 ( $P < 0.01$ )。结论: 加味升降散能阻断瘦素在肝星状细胞信号内信号转导, 抑制 TIMP-1 的基因表达。

**[关键词]** 加味升降散; 瘦素; 肝星状细胞; 信号转导

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2015) 03-0241-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.03.116

肝纤维化是一切慢性肝病共同的病理学基础, 近年来, 瘦素作为一种新的致纤维化细胞因子逐渐受到重视<sup>[1]</sup>, 其主要机制是通过结合瘦素激活磷酸化 Janus 激酶 2- 磷酸化信号转导和转录激活 3 (JAK2- STAT3) 引起肝星状细胞增殖、抑制其凋亡, 上调基质金属蛋白酶抑制因子-1 (TIMP-1), 抑制基质金属蛋白酶 1 (MMP-1) 的表达, 能直接抑制活化的 HSC 凋亡从而引起肝纤维化<sup>[2-3]</sup>。加味升降散具有升清降浊、活血护肝之

功, 本实验观察中药复方加味升降散对瘦素刺激肝星状细胞信号通路的影响, 探讨该方抗肝纤维化机制。

### 1 材料与方法

1.1 材料 重组大鼠瘦素 (Leptin) 购自 Peprtech 公司; 氯化二亚苯基碘喹 (DPI) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; N-乙酰-L 半胱氨酸 (NAC) 购自北京索莱宝科技有限公司;  $\alpha$ -氰基-(3, 4-羟基)N-苄基乙烯胺 (AG490) 购自 Invitrogen 公司;

**[收稿日期]** 2014-10-11

**[作者简介]** 邵敏明 (1986-), 女, 在读博士研究生, 研究方向: 中西医结合基础。

**[通讯作者]** 张奉学, E-mail: zhangfengxue@gzucm.edu.cn。

RNA 提取试剂盒等均为 TIANGEN 公司产品。DNA Marker、PCR 试剂盒、优化 PCR 试剂盒为天为时代生物技术公司产品。p- JAK2 抗体、p- STAT3 抗体购自广州吉坤生物技术有限公司。

1.2 细胞培养 肝星状细胞(HSC)- T6 细胞株, 由广州中医药大学热带医学研究所病毒室冻存复苏。

1.3 含药血清的制备 SD 大鼠 4 只, SPF 级, 体重(200±30)g, 由广东省实验动物中心提供(合格证: 粤检验证字第 2008A04 号)。给予加味升降散溶液灌胃, 早晚各 1 次, 给药量为 11 g/kg。连续 3 天, 最后一次给药后 1 h, 下腔静脉取血, 离心, 取上层血清, 过滤除菌, -40℃ 保存备用。

1.4 实验分组及药物处理 HSC- T6 随机分为 7 组进行处理: 按加入药物不同分为瘦素组(100 ng/mL), 加味升降散(50 μmol/L)组、NAC(10 mmol/L)组、DPI(20 μmol/L)组、AG490(50 μmol/L)组、加味升降散(50 μmol/L)自身对照组和正常组。加味升降散组、NAC 组、DPI 组、AG490 组先加入相应溶液预处理 30 min 后, 再加入瘦素。瘦素组直接加入瘦素, 正常组仅加入培养液、加味升降散自身对照组仅加入含药血清(50 μmol/L)的培养液, 不加瘦素。

1.5 RT-PCR 检测细胞内 TIMP-1 mRNA 的表达 细胞传代至 6 孔板, 按上述分组分别加入药物作用 6、12、24 h 后, 按 Trizol 试剂说明书提取总 RNA, 并反转录成 cDNA。PCR 扩增: TIMP- 1 和 β - actin 引物序列见表 1 所示, TIMP- 1 和 β - actin 的退火温度分别是 54℃、55℃。扩增体系: 95℃, 5 min, 预变性 94℃, 30 s, 54/55℃, 30 s, 72℃, 1 min, 35 个循环, 72℃, 7 min, 终末延伸, 最后进行凝胶电泳。

表 1 TIMP-1 和 β-actin 引物及序列

Gene	Sequence	Amplicon Length(bp)
TIMP- 1	Sense : 5' CCACAGATATCCGGTTCGCCTACA 3'	214
	Anti- sense 5' GCACACCCACAGCCAGCACTAT 3'	
β - actin	Sense : 5' GGCTACAGCTTCACCACCAC 3'	500
	Anti- sense 5' TACTCTGCTTCTGATCCAC 3'	

1.6 免疫细胞化学方法测定细胞中磷酸化 Janus 激酶 2 (p-JAK2)、磷酸化信号转导和转录激活 3 (p-STAT3) 的活性 按照实验分组, 对 7 组细胞进行常规细胞爬片。随后采用 PV6002 二步法免疫细胞化学法检测 p- JAK2, p- STAT3 蛋白的活性。结果判断: 每张细胞爬片于显微镜放大倍数× 200 下观察, 先观察整张细胞爬片, 后每片随机选取 5 个视野, 测阳性细胞所占比率。p- JAK2 蛋白表达以胞浆染呈黄色至棕褐色为阳性细胞, 无着色为阴性, 计算阳性细胞百分数进行统计分析。p- STAT3 蛋白表达以细胞核染呈黄色至棕褐色为阳性细胞, 无着色为阴性。核移位阳性率(%)= 核移位阳性细胞 / 视野下细胞总数× 100%, 以此为计量指标, 然后进行统计分

析。

1.7 统计学方法 本实验计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 总体服从正态性分布和方差齐性行单因素方差分析(One way ANOVA)和 SNK- q 检验; SPSS18.0 软件。

2 结果

2.1 A~G 组 TIMP-1mRNA 表达比较 见图 1、图 2、图 3。6 h 瘦素组 TIMP- 1mRNA 的表达与正常组比较, 差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 12 h、24 h 的 TIMP- 1mRNA 表达较正常组升高( $P<0.05$ ); 6 h 加味升降散组、NAC 组及 DPI 组 TIMP- 1mRNA 的表达与同时间段瘦素组比较, 差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 12 h、24 h 加味升降散组的 TIMP- 1mRNA 表达明显低于同时间段瘦素组( $P<0.05$ ), 与同时间段正常组比较, 差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

2.2 各组 p-JAK2、p-STAT3 的活性比较 见表 2。各组

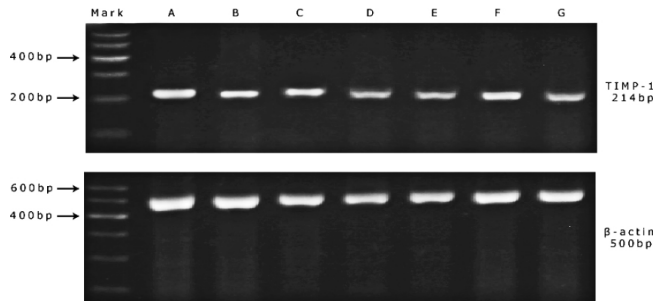


图 1 A~G 组 6 h TIMP-1mRNA 和 β-actin mRNA 的表达

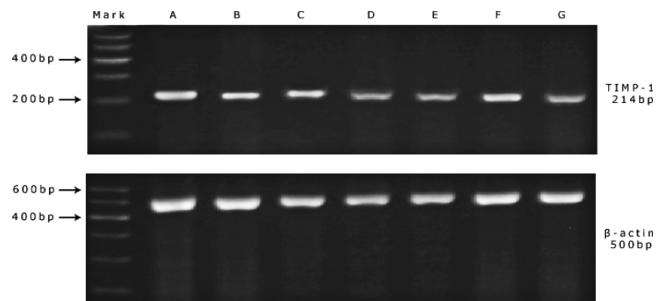


图 2 A~G 组 12 h TIMP-1mRNA 和 β-actin mRNA 的表达

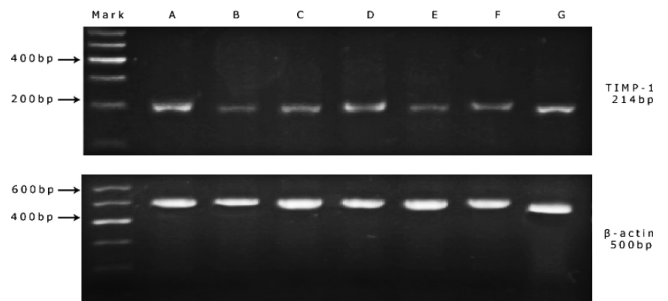


图 3 A~G 组 24 h TIMP-1mRNA 和 β-actin mRNA 的表达 A (瘦素组), B (加味升降散组), C (NAC 组), D (DPI 组), E (AG490 组), F (加味升降散自身对照组), G (正常组)。

HSC- T6 细胞浆内 p- JAK2 蛋白的表达差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。经瘦素处理后胞浆表达 p- JAK2 蛋白的阳性细胞数明显增多,与正常组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );加味升降散组、NAC 组和 DPI 组蛋白表达低于瘦素组( $P < 0.05$ ),但高于正常组( $P < 0.05$ );加味升降散自身对照组表达低于正常组( $P < 0.05$ )。各组 HSC- T6 细胞核内 p- STAT3 蛋白的表达差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。经瘦素处理后细胞核内表达 p- STAT3 蛋白的阳性细胞数明显增多,与正常组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );AG490 干预组的 p- STAT3 蛋白表达显著低于瘦素组( $P < 0.05$ ),与正常组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );加味升降散组蛋白表达低于 NAC 组和 DPI 组( $P < 0.05$ ),与 AG490 组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );加味升降散自身对照组与正常组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 2 各组 p-JAK2、p-STAT3 的活性比较( $\bar{x} \pm s$ )

组 别	阳性率	
	p- JAK2	p- STAT3
瘦素组	95.97± 3.21 <sup>①</sup>	86.65± 10.76 <sup>①</sup>
加味升降散组	84.50± 2.18 <sup>①②</sup>	25.52± 2.77 <sup>②</sup>
NAC 组	89.22± 3.26 <sup>①②</sup>	38.25± 6.68 <sup>②③</sup>
DPI 组	83.41± 3.53 <sup>①②</sup>	41.33± 5.17 <sup>②③</sup>
AG490 组	47.33± 4.21 <sup>①②</sup>	21.49± 3.28 <sup>②</sup>
加味升降散自身对照组	41.52± 4.19 <sup>①</sup>	20.16± 5.04 <sup>②</sup>
正常组	57.17± 4.82	26.67± 3.63

与正常组比较,① $P < 0.05$ ;与瘦素组比较,② $P < 0.05$ ;与加味升降散组比较,③ $P < 0.05$

### 3 讨论

加味升降散的组方是在清·杨璇《伤寒温疫条辨》中升降散(僵蚕、蝉蜕、姜黄、大黄)的基础上加用三七、丹参、桃仁、白花蛇舌草等药物组成,具有升清降浊、调补气血、活血化瘀、清热解毒、驱秽祛邪、疏肝解郁及补气健脾功效。此方体现了“升清降浊”的治法。姜黄、大黄二药主沉降,降阴中之浊阴,僵蚕、蝉蜕二药轻浮,升阳中之清阳,升清降浊法通过两味君药的“降浊”之功,直接排除体内病理产物,而其“升清”则能够促进精微物质的进一步转化和利用。并且,升降运动两者互根互用,升降相因,升清和降浊可以相互促进,相互制约。升清降浊中的“降浊”,可将化痰利湿、活血化瘀、泻热祛湿、解毒辟疫、清络祛热、疏肝利胆、消滞通腑等治法融于一体,多途径、多环节地清除体内堆积的浊毒产物,其“升清”法开通内外、平调升降,能增强人体转化的能力,减少代谢产物“浊阴”的堆积。这种双向调节体内物质代谢的方法,较传统的化痰除湿,活血化瘀等单纯降浊法具有更多的治疗优势。

近来的研究表明,TIMP 既可抑制金属蛋白酶活性,也可

保持金属蛋白酶原的稳定性,及防止其酶原活化<sup>[4]</sup>。TIMP- 1 和 TIMP- 2 可与金属蛋白酶原的非催化位点结合,抑制酶原的活化。此现象首见 TIMP- 2 与明胶酶 A 酶原的结合上:TIMP- 2 可与明胶酶 A 酶原的羧基端结合,常以一种酶原-抑制物复合物的形式分泌。当以此种方式结合时,TIMP- 2 可抑制明胶酶 A 的活化。金属蛋白酶细胞外活性的调节非常复杂,包括各种不同形式和相互作用的机制。TIMPs 作用的最新概念包括对酶原活化的选择性和催化位点的抑制。不同的 TIMPs 可以不同的方式结合并影响不同的金属蛋白酶<sup>[5]</sup>。实验发现,瘦素刺激 HSC 后,TIMP- 1mRNA 较正常组表达水平明显增高。在给予 JAK 抑制剂 AG490 能抑制 TIMP- 1mRNA 表达,上调 MMP- 1mRNA 表达,说明瘦素通过 JAK- STAT 信号转导通路对 TIMP- 1mRNA 进行调控的。而抗氧化剂 NAC 和 NOX 抑制剂 DPI 也能抑制 TIMP- 1mRNA 表达,本实验首次发现加味升降散干预后能抑制瘦素诱导的 TIMP- 1mRNA 表达,上调 MMP- 1mRNA 表达。

HSC- T6 细胞经加味升降散处理后,凋亡率升高,表明加味升降散可诱导 HSC 凋亡。在瘦素作用 HSC- T6 细胞前给予加味升降散处理后,p- JAK2、p- STAT3 的表达下降,表明加味升降散能够抑制 JAK2、STAT3 信号转导通路的激活。加味升降散抑制 STAT3 磷酸化蛋白的表达后,有效的阻止了磷酸化 STAT3 形成二聚体移位到细胞核内,从而影响了基因的转录,如抑制 TIMP- 1mRNA 表达,上调 MMP- 1mRNA 表达。结果表明通过抑制 JAK2、STAT3 信号转导通路也是加味升降散抑制 HSC- T6 细胞的增殖并诱导其凋亡的机制之一。

### [参考文献]

- [1] Pouer 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.
- [2] Bertolani C, Marra F. Role of adipocytokines in hepatic fibrosis [J]. *Curr Pharm Des*, 2010, 16 (17): 1929- 1940.
- [3] Cao Q, Mak KM, Ren C, et al. Leptin stimulates tissue inhibitor of metalloproteinase- 1 in human hepatic stellate cells: respective roles of the JAK/STAT and JAK- mediated H2O2- dependant MAPK pathways [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(6): 4292- 4304.
- [4] Buday L, Downward J. Many faces of Ras activation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1786(2): 178- 187.
- [5] Shaul YD, Seger R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773(8): 1213- 1226.

(责任编辑: 骆欢欢)