

• 论著 •

毒素清对肺炎痰热证大鼠肺组织 Janus 激酶/信号转导和转录激活因子信号通路的影响

梅 雪, 李建生, 张艳霞

(河南中医学院老年医学研究所, 河南 郑州 450008)

【摘要】 目的 观察肺炎痰热证大鼠肺组织 Janus 激酶/信号转导和转录激活因子(JAK/STAT)转导通路,探讨毒素清治疗肺炎痰热证的作用机制。方法 将 Wistar 大鼠按随机数字表法分为正常组、肺炎组、肺炎痰热证组、阳性对照组、毒素清组,每组 12 只。制备细菌性肺炎痰热证大鼠模型,采用免疫组化法测定肺组织 p-JAK2、p-STAT1、p-STAT3、细胞信号转导抑制蛋白 3(SOCS3)表达,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定肺组织 SOCS3 mRNA 表达。结果 与正常组比较,肺炎组、肺炎痰热证组肺组织 p-JAK2、p-STAT1、p-STAT3、SOCS3 蛋白及 SOCS3 mRNA 表达均显著升高(均 $P < 0.01$),且肺炎痰热证组较肺炎组升高明显(均 $P < 0.05$)。与肺炎痰热证组相比,毒素清组、阳性对照组肺组织 p-JAK2、p-STAT1、p-STAT3 蛋白表达明显减弱(均 $P < 0.01$),SOCS3 蛋白及 mRNA 表达明显增强(均 $P < 0.01$),其中,毒素清组肺组织 p-JAK2、p-STAT1、p-STAT3 蛋白表达较阳性对照组减弱尤为明显(均 $P < 0.05$)。结论 JAK/STAT 信号转导通路参与了肺炎痰热证肺组织的病理损伤过程;毒素清治疗肺炎痰热证的作用机制可能与上调 SOCS3,阻断 JAK/STAT 信号通路,继而减少炎症因子的释放有关。

【关键词】 细菌性肺炎; 痰热证; Janus 激酶/信号转导和转录激活因子通路; 毒素清

中图分类号: R256.1; R285.5 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.02.005

Influence of Dusuqing (毒素清) of traditional Chinese medicine prescriptions on Janus activated kinase/signal transducers and activators of transcription signal transduction pathway in lung tissue of rat models with bacterial pneumonia and phlegm-heat syndrome (痰热证) MEI Xue, LI Jian-sheng, ZHANG Yan-xia. Department of Geriatrics, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, Henan, China
Corresponding author: LI Jian-sheng, Email: li_js8@163.com

【Abstract】 Objective To observe the Janus activated kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) signal transduction pathway in the lung tissues of rat models with bacterial pneumonia accompanied by phlegm-heat syndrome (痰热证) and to approach the mechanism of traditional Chinese medicine prescriptions, Dusuqing (DSQ, 毒素清), in treatment of the disease. Methods Wistar rats were randomly divided into five groups: normal, pneumonia, pneumonia with phlegm-heat syndrome, positive control and DSQ treated groups (each, $n = 12$). Rat models with bacterial pneumonia accompanied by phlegm-heat syndrome were made. The expressions of p-JAK2, p-STAT1, p-STAT3 and suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) proteins in lung tissue were analyzed by immunohistochemistry staining. The expression of SOCS3 mRNA was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Results The lung tissue expressions of p-JAK2, p-STAT1, p-STAT3, SOCS3 proteins and SOCS3 mRNA in pneumonia group and pneumonia with phlegm-heat syndrome group were markedly higher than those in normal control group (all $P < 0.01$), and in pneumonia with phlegm-heat syndrome group the expressions were significantly higher than those in the pneumonia group (all $P < 0.05$). Compared with pneumonia with phlegm-heat syndrome group, the lung tissue expressions of p-JAK2, p-STAT1, p-STAT3 proteins were markedly weakened and the expressions of SOCS3 protein and SOCS3 mRNA were obviously enhanced in positive control group and DSQ treated group (all $P < 0.01$). Compared with the positive control group, the lung tissue expressions of p-JAK2, p-STAT1, p-STAT3 proteins in DSQ treated group were reduced more significantly (all $P < 0.05$). Conclusion JAK/STAT signal transduction pathway was involved in the pathological changes of lung tissues in pneumonia with phlegm-heat syndrome. The mechanism of DSQ in treating bacterial pneumonia with phlegm-heat syndrome may be related to its ability of up-regulating SOCS3 to interrupt JAK/STAT signal transduction pathway and in turn the reduction of release of inflammatory factors.

【Key words】 Bacterial pneumonia; Phlegm-heat syndrome; Janus activated kinase/signal transducers and activators of transcription signal transduction pathway; Dusuqing

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2006CB504605); 河南省高校新世纪优秀人才支持计划项目(2006HANCET-05)

通信作者: 李建生, Email: li_js8@163.com

作者简介: 梅 雪(1978-), 女(汉族), 河南省人, 硕士, 讲师。

中药复方毒素清治疗细菌性肺炎疗效显著, 在改善患者症状、缩短疗程、调节免疫功能、改善生活质量等方面均显示出较好效果^[1], 但对其作用机制仍有待深入研究。Janus 激酶/信号转导和转录激活因子(JAK/STAT)信号通路是多种炎症细胞因子

信号转导的主要途径之一,广泛参与炎症的发生发展。本研究基于细菌性肺炎痰热证大鼠模型,从 JAK/STAT 信号通路入手,探讨毒素清治疗肺炎痰热证的作用机制,为其临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物及主要试剂:Wistar 大鼠 60 只,雌雄各半,体重(200±20) g,由河南省实验动物中心提供〔合格证号:SCXK(豫)2005-0001〕。肺炎克雷伯杆菌由北京生物制品检验鉴定所提供(菌号:46114),营养琼脂培养,生理盐水稀释至 1.5×10^8 cfu/ml。p-JAK2、p-STAT1、p-STAT3、细胞信号转导抑制蛋白 3(SOCS3)单克隆抗体试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供,逆转录试剂盒由立陶宛 Fermentas 公司提供。SOCS3、 β -肌动蛋白(β -actin)引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。阳性对照药由清金化痰汤和桑白皮汤组成(清金化痰汤:黄芩、栀子、桔梗、麦冬、桑白皮、贝母、知母、瓜蒌子、橘红、茯苓、甘草;桑白皮汤:桑白皮、半夏、苏子、杏仁、贝母、栀子、黄芩、黄连)。毒素清颗粒由人参、瓜蒌、麦冬、生地、鱼腥草、白头翁等组成,每克含生药量 1.66 g,均由河南中医学院第一附属医院制剂室提供并鉴定。

1.2 动物模型制备:参照张均田主编的《现代药理实验方法学》,以气管插管法制作肺炎模型,在此基础上给予风热干预,制备痰热证肺炎模型^[2]。将肺炎痰热证组、阳性对照组、毒素清组动物置于温度(38±1)℃、相对湿度 50%、风速 0.7 m/s 的鼓风干燥箱中进行风热刺激,每日 2 次,每次 30 min,连续 9 d;第 9 日经气管插管注入 0.3 ml 肺炎克雷伯杆菌。肺炎组不进行风热刺激,其余处理同肺炎痰热证组;正常组不做任何处理。

1.3 分组及给药:将大鼠按随机数字表法分为正常组、肺炎组、肺炎痰热证组、阳性对照组、毒素清组 5 组,每组 12 只。毒素清组第 7 日开始给予毒素清水溶剂($2.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)灌胃,每日 1 次,连续 5 d;阳性对照组同期给予清金化痰汤合桑白皮汤中药水煎剂($5.607 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)灌胃;正常组、肺炎组、肺炎痰热证组同期给予相同体积的生理盐水灌胃,所有动物于风热刺激 11 d 后取材。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 肺组织病理观察:开胸,迅速摘取右肺,10%甲醛水溶液固定,采用苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察各组肺组织病理变化。

1.4.2 肺组织 p-JAK2、p-STAT1、p-STAT3 和

SOCS3 的蛋白表达:采用免疫组化过氧化物酶标记的链霉卵白素(SP)法,光镜下细胞膜、细胞质呈棕色为免疫组化结果阳性。用 Image pro plus 5.1 软件拍照并进行半定量分析。每张切片随机选取不重叠的 5 个视野,测其积分吸光度(A)值,取均值。

1.4.3 肺组织 SOCS3 mRNA 表达:采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)抽提肺组织总 RNA,逆转录后使用上述引物进行 PCR 扩增;PCR 产物经质量分数为 2% 的琼脂糖电泳,法国 Bio2VT 凝胶成像系统成像。Quantity one 分析软件进行半定量分析,用 SOCS3 与 β -actin 条带的灰度值比值反映 SOCS3 mRNA 的相对表达水平。

1.5 统计学方法:采用 SPSS 13.0 统计分析软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理改变:正常组大鼠肺各级支气管、肺泡及肺间质组织结构均正常。肺炎组肺泡结构大部分被破坏,肺泡壁血管明显充血、水肿,肺泡壁较正常组明显增厚,大量炎性细胞浸润,严重浸润区域连成片,有纤维性增生。肺炎痰热证组肺泡结构破坏严重,大量炎性细胞浸润,肺泡壁血管充血、水肿,肺泡壁明显增厚,病变严重区域连成片,有纤维性增生。阳性对照组各级支气管有炎症,肺泡壁血管轻度充血、水肿,有少量炎性细胞浸润,肺泡壁轻度增厚,较两个模型组肺组织损伤明显轻。毒素清组各级支气管、肺泡壁血管损伤较阳性对照组轻。

2.2 肺组织 p-JAK2、p-STAT1、p-STAT3 的蛋白表达(表 1):与正常组比较,肺炎组和肺炎痰热证组肺组织 p-JAK2、p-STAT1、p-STAT3 的蛋白表达均显著增强(均 $P < 0.01$),且肺炎痰热证组较肺炎组增强明显(均 $P < 0.05$);与肺炎痰热证组比较,毒素清组和阳性对照组 p-JAK2、p-STAT1、p-STAT3 的蛋白表达均显著降低(均 $P < 0.01$),且毒素清组较阳性对照组降低更明显(均 $P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠肺组织 p-JAK2、p-STAT1、p-STAT3、SOCS3 蛋白及 SOCS3 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	蛋白表达(积分 A 值)				SOCS3 mRNA
		p-JAK2	p-STAT1	p-STAT3	SOCS3	
正常组	12	1.65±0.74	1.80±1.11	1.39±0.95	0.75±0.30	0.50±0.03
肺炎组	12	9.33±1.88 ^a	18.73±2.48 ^a	16.55±2.00 ^a	1.63±0.34 ^a	0.67±0.08 ^a
肺炎痰热证组	12	10.87±1.72 ^{ab}	20.51±2.68 ^{ab}	17.75±1.76 ^{ab}	2.17±0.62 ^{ab}	0.76±0.05 ^{ab}
阳性对照组	12	4.94±1.45 ^c	5.86±1.90 ^c	3.74±1.20 ^c	3.73±0.86 ^c	0.87±0.04 ^c
毒素清组	12	3.45±1.66 ^{cd}	4.13±1.96 ^{cd}	2.39±1.25 ^{cd}	3.95±0.56 ^c	0.88±0.03 ^c

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与肺炎组比较,^b $P < 0.05$;与肺炎痰热证组比较,^c $P < 0.01$;与阳性对照组比较,^d $P < 0.05$

2.3 肺组织 SOCS3 蛋白及 mRNA 表达(表 1);与正常组比较,肺炎组和肺炎痰热证组肺组织 SOCS3 蛋白及 mRNA 表达显著增强,且肺炎痰热证组表达较肺炎组增强明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与肺炎痰热证组比较,毒素清组和阳性对照组肺组织 SOCS3 蛋白及 mRNA 表达均明显提高(均 $P < 0.01$),其中,毒素清组表达水平较阳性对照组有所升高,但差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

3 讨论

毒素清具有清热解毒化痰、益气养阴之功效。以往的临床研究表明,毒素清治疗老年细菌性肺炎有明显效果,能明显降低患者主症、次症积分及其他症状如发热、咳嗽、咯痰、气喘、烦渴口干、五心烦热、汗出、消化道症状及精神、神经症状等评分^[3]。研究发现毒素清颗粒能减少肺炎老龄大鼠外周血及支气管肺泡灌洗液中白细胞计数(WBC)和中性粒细胞比例(PMN),降低血中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1(IL-1)水平,提高肺泡灌洗液中巨噬细胞分泌的调理素样蛋白含量,以增强对细菌的调理和吞噬作用^[4-5]。另外,毒素清颗粒也能降低肺炎痰热证大鼠外周血中 WBC 和 PMN,抑制炎症因子的表达,减轻肺组织损伤^[6]。本研究结果显示,肺炎痰热证组肺组织炎症因子表达增强,肺组织损伤严重;毒素清能显著降低肺组织炎症因子的表达水平,减轻肺组织炎症损伤。

JAK/STAT 通路是细胞因子信号转导的重要途径,对细胞的生理和病理反应发挥着重要的调控作用^[7],在脂多糖(LPS)、TNF- α 等介导的炎症反应中发挥着重要作用。JAK 是一种重要的蛋白酪氨酸激酶,其家族成员有 JAK1、JAK2、JAK3、TYK2;STAT 的家族成员主要有 STAT1~4、STAT5a、STAT5b、STAT6,其中 STAT1 和 STAT3 与炎症疾病密切相关,广泛参与介导炎症细胞因子的表达与调控^[8]。Samavati 等^[9]研究发现,LPS 刺激后,STAT1、STAT3 酪氨酸磷酸化,JAK/STAT 通路被激活,促进 IL-1 β 、IL-6 的生成;抑制 STAT3 生成能导致 LPS 诱导 IL-1 β 、IL-6 基因及蛋白表达显著减少。还有实验表明,经腹腔和鼻腔给予小鼠 LPS 后,肺组织中 STAT 迅速被激活,在启动肺部炎症反应中可能起一定作用^[10];另外,STAT1、STAT3 在脓毒症时高度活化,并参与了严重腹腔感染所致脓毒症的病理过程,抑制该通路有助于多器官功能损害的防治^[11]。本实验结果显示,与正常组相比,肺炎组、肺炎痰热证组大鼠肺组织 p-JAK2、p-STAT1、

p-STAT3 表达均显著上调,其中,肺炎痰热证组改变尤为明显,提示 JAK/STAT 通路参与了肺炎痰热证的发生发展。毒素清组较肺炎痰热证组肺组织中 p-JAK2、p-STAT1、p-STAT3 表达明显减弱,提示毒素清可能抑制了 JAK/STAT 信号通路,从而减少炎症因子的释放,改善炎症损伤。

SOCS 由细胞因子诱导产生,是 JAK/STAT 信号通路中重要的负调控蛋白,至少有 SOCS1~7 和细胞因子诱导的含 SH2 区域的蛋白(CIS)8 种成分组成;其中 SOCS1 和 SOCS3 与炎症反应关系密切。本实验结果显示,肺炎痰热证组中肺组织 SOCS3 蛋白及 mRNA 表达上调,表明当 JAK/STAT 通路被激活后,促进了 SOCS 表达并负反馈性抑制该通路。研究表明,SOCS 的这种负调节作用主要通过竞争性抑制 STAT 的活化、抑制 JAK 与底物结合以及泛素化途径降解 JAK 和 STAT 蛋白等,从而阻断 JAK/STAT 通路^[12]。毒素清组肺组织中 SOCS3 蛋白和 mRNA 表达较肺炎痰热证组明显增强,推测毒素清减轻肺损伤的机制可能与上调 SOCS3 的表达而阻断 JAK/STAT 信号通路有关。

参考文献

- [1] 李建生,程龙,马利军,等.毒素清治疗老年细菌性肺炎的临床观察.中国中西医结合杂志,2002,22(7):505-507.
- [2] 李建生,张艳霞,周红艳,等.细菌性肺炎痰热证模型的建立与评价.中医杂志,2009,50(9):822-825.
- [3] 李建生.老年人肺炎的特点与治疗.河南中医,2000,20(6):1-3.
- [4] 李建生,张杰,董丽,等.毒素清对肺炎双球菌肺炎老龄大鼠肺脏免疫功能的影响.中国中西医结合急救杂志,2002,9(6):338-341.
- [5] 李建生,余嗣荣,李素云,等.毒素清对肺炎克雷伯杆菌肺炎老龄大鼠心肌梗伤中炎症细胞因子表达的影响.中国中西医结合急救杂志,2008,15(2):74-77.
- [6] 张艳霞,李建生,周红艳,等.毒素清对细菌性肺炎痰热证肺组织炎症因子的影响.辽宁中医杂志,2009,36(9):1616-1618.
- [7] 张勉之,赵松,段建召,等.JAK/STAT 信号转导途径在糖尿病肾病肾小管上皮细胞中的表达.中国中西医结合急救杂志,2007,14(5):309-312.
- [8] Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, et al. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. Gene, 2002, 285(1-2):1-24.
- [9] Samavati L, Rastogi R, Du W, et al. STAT3 tyrosine phosphorylation is critical for interleukin 1 beta and interleukin-6 production in response to lipopolysaccharide and live bacteria. Mol Immunol, 2009, 46(8-9):1867-1877.
- [10] Severgnini M, Takahashi S, Rozo LM, et al. Activation of the STAT pathway in acute lung injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 286(6):L1282-1292.
- [11] 王松柏,姚咏明,陈劲松,等.严重腹腔感染大鼠 JAK/STAT 通路活化与多器官功能损害的关系.解放军医学杂志,2004,29(1):42-44.
- [12] 魏秀青,余平,黎明.细胞因子信号转导抑制分子的研究进展.国外医学生理病理科学与临床分册,2005,25(1):14-17.

(收稿日期:2010-01-27)

(本文编辑:李银平)