

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.15.003

当归黄芪汤对糖尿病大鼠肾组织 JAK2STAT3 信号通路的影响

吕娟,曹兰秀[△]

(陕西中医药大学中药教研室,陕西 西安 712046)

摘要:目的 探讨当归黄芪汤对糖尿病大鼠肾组织酪氨酸激酶-信号传导与转录激活因子(JAK2STAT3)信号通路的影响。方法 选择清洁级 Wistar 大鼠 90 只,根据随机数字表法分为观察组、模型组和对照组,各 30 只。模型组及观察组大鼠建立糖尿病模型,对照组大鼠腹腔内注射相同剂量的柠檬酸液。建模成功后第 2 天,观察组给予当归黄芪汤,模型组及对照组给予等量的蒸馏水,均灌胃给药,干预 12 周。结果 观察组及模型组大鼠的 24 h 尿蛋白定量(24 hPRO)、尿素氮(BUN)及血肌酐(SCr)均明显高于对照组,但观察组明显低于模型组($P < 0.05$);观察组及模型组大鼠肾组织的超氧化物歧化酶(SOD)水平均分别明显低于对照组,且观察组明显高于模型组($P < 0.05$);丙二醛(MDA)水平均明显高于对照组,且观察组明显低于模型组($P < 0.05$);观察组及模型组大鼠肾组织的磷酸化酪氨酸激酶(p-JAK2)及磷酸化信号传导与转录激活因子(p-STAT3)表达均明显高于对照组,且观察组明显低于模型组($P < 0.05$);经 Spearman 法分析相关性后显示,p-JAK2 及 p-STAT3 均分别与 24 hPRO、BUN、SCr 及 MDA 呈正相关($P < 0.05$),与 SOD 呈负相关($P < 0.05$)。结论 当归黄芪汤可抑制糖尿病大鼠 JAK2STAT3 信号通路的表达,该作用与氧化应激损伤有关,可通过检测 JAK2STAT3 信号通路的激活情况评价糖尿病的治疗效果。

关键词:当归黄芪汤;糖尿病;大鼠;肾组织;JAK2STAT3;信号通路

中图分类号:R285.5;R255.4

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)15-0009-03

Effect of Danggui Huangqi Decoction on JAK2STAT3 Signaling Pathway in Renal Tissue of Diabetic Rats

Lü Juan, Cao Lanxiu

(Chinese Medicine Teaching and Research Room, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi, China 712046)

Abstract: Objective To investigate the effect of Danggui Huangqi Decoction on tyrosine kinase-signal transducer and activator of transcription(JAK2STAT3) signaling pathway in renal tissue of diabetic rats. **Methods** Totally 90 clean Wistar rats were selected and divided into the observation group, the model group and the control group according to the random number table method, 30 rats in each group. The diabetic model was established for the model group and the observation group. The same dose of citric acid was injected into the abdominal cavity of the control group. 2 d after the success of the modeling, the observation group was given Danggui Huangqi Decoction, the model group and the control group were given the same amount of distilled water, intragastric administration. All the rats were intervened for 12 weeks. **Results** The levels of 24 h urine protein quantity, urea nitrogen(BUN) and serum creatinine(SCr) in the observation group and the model group were significantly higher than those in the control group, and those in the observation group were significantly lower than those in the model group($P < 0.05$). The superoxide dismutase(SOD) levels of the renal tissue in the observation group and the model group were significantly lower than that in the control group, but that in the observation group was significantly higher than that in the model group($P < 0.05$). The malondialdehyde(MDA) levels of the renal tissue in the observation group and the model group were significantly higher than that in the control group, but that in the observation group was significantly lower than that in the model group($P < 0.05$). The expression of phosphorylated tyrosine kinase(p-JAK2) and phosphorylated signal transducer and activator of transcription(p-STAT3) in the renal tissue of the rats in the observation group and the model group were significantly higher than that in the control group, but that in the observation group was significantly lower than that in the model group($P < 0.05$). After analysis of correlation by Spearman, p-JAK2 and p-STAT3 were respectively positively correlated with 24 h urine protein quantity, BUN, SCr and MDA($P < 0.05$), but they were negatively correlated with SOD($P < 0.05$). **Conclusion** Danggui Huangqi Decoction can inhibit the expression of JAK2STAT3 signaling pathway in diabetic rats, and this effect is related to oxidative stress injury. The effect of the treatment of diabetes can be evaluated by detecting the activation of the JAK2STAT3 signaling pathway.

Key words: Danggui Huangqi Decoction; diabetes; rats; kidney tissue; JAK2STAT3; signal pathway

糖尿病肾病(DN)作为糖尿病最严重的一类并发症,当前仍未完全阐明其发病机制,氧化应激可能是导致此种并发症的关键因素^[1]。酪氨酸激酶-信号传导与转录激活因子(tyrosine kinase-signal transducer and

activator of transcription,JAK2STAT3)信号通路发生的活化可能对 DN 的发展有促进作用^[2]。祖国医学认为,糖尿病患者大都气阴两虚,且血瘀于脉。当归黄芪汤是由当归和黄芪进行配伍的中医古方,可发挥较好的益气活

第一作者:吕娟(1977-),女,硕士研究生,讲师,研究方向为中西医结合治疗糖尿病及并发症,(电子信箱)lwb1988214@yeah.net。

[△]通信作者:曹兰秀(1972-),女,博士研究生,副教授,研究方向为配伍对中药功效的靶向控制作用,(电子信箱)656417090@qq.com。

血功效,治疗糖尿病有一定疗效,但相关报道并未涉及当归黄芪汤对 JAK2STAT3 信号通路的影响^[3]。本研究中分析了当归黄芪汤对糖尿病大鼠的肾组织 JAK2STAT3 信号通路产生的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

仪器:AU400 型全自动生化分析仪(日本 Olympus 公司);UV 2000 型紫外-可见分光光度计(尤尼科上海公司);9602A 型酶标仪(北京艾普华美生物科技有限公司);蛋白印迹及电泳系统(美国 Bio-Rad 公司)。

试剂:超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA)试剂盒,均购自深圳晶美公司;兔抗大鼠磷酸化酪氨酸激酶(p-JAK2)及磷酸化信号传导与转录激活因子(p-STAT3)型多克隆抗体,均购自武汉博士德公司;链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司)。

动物与分组:选择我校 2017 年 6 月实验室饲养的清洁级 Wistar 大鼠 90 只,均为雄性,8 周龄,均购自北京维通利华公司,许可证号为 SCXK<京>2014-0001。根据随机数字表法分成观察组、模型组和对照组,各 30 只。其中,观察组大鼠的体质量为 200~225 g,平均(212.34±2.16)g;模型组大鼠为 202~223 g,平均(211.98±2.30)g;对照组大鼠为 205~220 g,平均(212.18±2.24)g。各组大鼠的周龄、性别及体质量相比,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经我校动物实验伦理委员会审核批准。

1.2 方法

模型建立及药物干预:所有大鼠在相同条件下饲养 1 周,禁食 12 h,模型组及观察组大鼠建立糖尿病模型,腹腔内注射 60 mg/kg STZ 溶液,对照组大鼠腹腔内注射相同剂量的柠檬酸液。72 h 后,测定模型组及观察组大鼠的空腹血糖,超过 16.7 mmol/L 为建模成功。建模成功后第 2 天,灌胃给药,观察组大鼠给予 3.6 g/(kg·d)的当归黄芪汤(称取当归 6 g 和黄芪 30 g,加入蒸馏水 200 mL,煮沸约 0.5 h,过滤,收集药液,药渣内加入蒸馏水 200 mL,煮沸 0.5 h,过滤,收集药液,合并 2 次收集的药液,蒸发并浓缩至 100 mL,最终质量浓度为 0.36 g/mL),每日 1 次;模型组及对照组大鼠均给予等量蒸馏水,1 次/日。均连续给药 12 周。

1.3 观察指标

12 周后,对比 3 组大鼠肾功能指标,包括 24 h 尿蛋白定量(24 hPRO)、尿素氮(BUN)及血肌酐(SCr)水平;肾组织氧化应激指标,包括超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA);大鼠肾组织的 JAK2STAT3 信号通路情况,包括磷酸化酪氨酸激酶(p-JAK2)及磷酸化信号传导与转录激活因子(p-STAT3),分析 JAK2STAT3 信号通

路与肾功能及氧化应激指标的相关性。

肾功能指标:以代谢笼采集大鼠在 24 h 内的尿液,考马斯亮蓝 G250 法测定 24 hPRO 水平,再经腹主动脉采集血液标本 2 mL,3 000 r/min 离心 10 min 后提取血清,通过全自动生化分析仪测定 BUN 及 SCr 水平。

肾组织氧化应激指标:提取大鼠的肾脏组织 1 g,以生理盐水配置 10% 质量体积比的肾组织匀浆,行 3 000 r/min 离心 5 min 后,提取上清液,根据试剂盒说明书测定肾组织 SOD 及 MDA 水平。

肾组织 JAK2STAT3 信号通路:提取大鼠的肾脏组织 1 g,添加组织裂解液,3 000 r/min 离心 5 min,提取上清液,通过 Western Blot 法及有关试剂盒测定 p-JAK2 及 p-STAT3 的表达情况,严格遵守说明书步骤逐步操作。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计软件分析。计数资料以百分率(%)表示,行 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

结果见表 1 至表 4。经 Spearman 法分析相关性,可知 p-JAK2 及 p-STAT3 均分别与 24 hPRO, BUN, SCr 及 MDA 呈正相关($P<0.05$),与 SOD 呈负相关($P<0.05$)。

表 1 大鼠肾组织 JAK2STAT3 信号通路与肾功能及氧化应激指标的相关性分析(r, P)

项目	24 hPRO	BUN	SCr	SOD	MDA
p-JAK2	(0.598,0.001)	(0.754,0.000)	(0.698,0.000)	(-0.723,0.000)	(0.568,0.000)
p-STAT3	(0.601,0.001)	(0.729,0.000)	(0.987,0.000)	(-0.712,0.000)	(0.613,0.000)

表 2 3 组大鼠肾功能指标比较($\bar{X} \pm s, n=30$)

组别	24 hPRO(mg)	BUN(mmol/L)	SCr(μ mol/L)
观察组	78.94±11.03**	8.84±1.35**	72.58±9.57**
模型组	94.28±13.67*	12.77±2.49*	88.11±13.52*
对照组	7.56±1.27	6.41±0.88	55.14±5.25
F 值	11.267	6.219	10.364
P 值	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,* $P=0.000$;与模型组比较,** $P=0.000$ 。表 3、表 4 同。

表 3 3 组大鼠肾组织氧化应激指标比较($\bar{X} \pm s, n=30$)

组别	SOD(U/mg)	MDA(nmol/mg)
观察组	203.94±23.68**	26.14±6.55**
模型组	146.31±22.72*	34.49±7.31*
对照组	263.82±30.69	23.08±4.26
F 值	23.585	10.694
P 值	0.000	0.000

3 讨论

糖尿病患者的病程超过 15 年后通常会发生肾脏损伤,随着病情进展,可能会出现持续性蛋白尿,且较难逆

表4 3组大鼠肾组织 JAK2/STAT3 表达水平比较($\bar{X} \pm s, n=30$)

组别	p-JAK2/GAPDH	p-STAT3/GAPDH
观察组	0.23 ± 0.05* [#]	0.24 ± 0.03* [#]
模型组	0.35 ± 0.04*	0.28 ± 0.05*
对照组	0.13 ± 0.03	0.09 ± 0.02
F值	5.891	4.357
P值	0.001	0.003

转,最后可进行性地引发终末期肾功能衰竭等症状^[4],早期干预十分必要。当归黄芪汤由5:1比例的黄芪和当归组方,也是我国传统补气养血的重要方剂,对劳倦内伤和气弱血虚,以及阳浮外越等症状疗效较好。糖尿病患者应用当归黄芪汤有助于发挥其补气养血的功效^[5],但是否对肾组织有保护作用值得深入研究。

本研究结果显示,观察组及模型组大鼠的24 hPRO, BUN, SCr水平均明显高于对照组大鼠,但观察组大鼠明显低于模型组大鼠($P < 0.05$),提示当归黄芪汤对大鼠的肾功能具有较好的保护作用。分析原因,可能是因为当归黄芪汤降低了肾小球及肾小管内的转化生长因子- β_1 的表达,并有效降低了细胞外基质的积聚,抑制了肾脏肥大的进展,最终起到一定的肾保护作用^[6-8]。糖尿病初期通常会出现燥热伤阴等症状,伴随病情的进展,逐渐导致阴伤及气,并引起气阴两虚。祖国医学认为,气是血之帅,若气虚则机体将无力运血,血行不畅,且瘀于脉中,故糖尿病的治疗以益气养阴活血为重。方中黄芪可发挥补气固表和利尿托毒等功效,当归可发挥补血活血等功效,二者联用共奏益气活血之功效,有助于延缓肾脏的纤维化进程,最终发挥肾保护作用。观察组及模型组大鼠肾组织的SOD水平均明显低于对照组,观察组明显高于模型组;MDA水平均明显高于对照组,观察组明显低于模型组($P < 0.05$),提示当归黄芪汤能较好地缓解糖尿病导致的氧化应激损伤。原因可能与当归黄芪汤可帮助机体控制血糖水平的明显上升,并最终减少了糖基化终产物的受体表达等因素有关^[9-10]。糖基化终产物所介导的此种受体参与了糖尿病大鼠肾组织氧化应激损伤的作用机制,而持续性高血糖状态对此种受体的表达具有促进作用。当归黄芪汤能较好地阻断或延缓此种受体的表达进程,最终缓解了机体的氧化应激损伤。此外,观察组及模型组大鼠肾组织的p-JAK2及p-STAT3表达均明显高于对照组,但观察组又明显低于模型组($P < 0.05$),提示当归黄芪汤能抑制JAK2/STAT3信号通路的异常激活状态。可能是因为当归黄芪汤通过延缓了在高血糖条件下的氧化应激,进而防止了JAK2/STAT3信号通路的异常激活。当归黄芪汤通过降糖和缓解氧化应激损伤等作用调节机体的氧化应激反应,能间接地诱导JAK2及STAT3产生磷酸化反应,进而激活JAK2/STAT3信号通路的异常活化,最

终发挥了较好的治疗效果。Spearman法分析相关性后显示,p-JAK2及p-STAT3均分别与24 hPRO, BUN, SCr, MDA呈正相关($P < 0.05$),与SOD呈负相关($P < 0.05$),再次证实了JAK2/STAT3信号通路与糖尿病大鼠的肾功能及氧化应激指标之间联系紧密,与文献[11-12]的报道结果相同。

综上所述,当归黄芪汤能抑制JAK2/STAT3信号通路的异常激活状态,通过其降糖和缓解机体的氧化应激损伤而实现。临床对JAK2/STAT3信号通路的常规监测有助于综合评价治疗效果,值得推广。

参考文献:

- [1] Xue R, Lei S, Xia ZY, et al. Selective inhibition of PTEN preserves ischaemic post-conditioning cardioprotection in STZ-induced Type 1 diabetic rats: role of the PI3K/Akt and JAK2/STAT3 pathways[J]. Clin Sci (Lond), 2016, 130(5): 377-392.
- [2] 赵博, 冷燕, 吴晓静, 等. JAK2/STAT3信号通路在糖尿病大鼠心肌缺血再灌注诱发脑损伤中的作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2016, 36(2): 211-213.
- [3] 宋纯东, 任瑞英, 薛黎明, 等. 益肾活血方对早期糖尿病肾病大鼠肾组织JAK2/STAT3的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(8): 847-849.
- [4] 袁超, 管金川, 曹红, 等. 脊髓背角MCP-1-JAK2/STAT3信号转导参与大鼠2型糖尿病神经病理疼痛的机制研究[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(8): 1467-1471.
- [5] Zhang Y, Zhou B, Deng B, et al. Amyloid- β induces hepatic insulin resistance in vivo via JAK2[J]. Diabetes, 2013, 62(4): 1159-1166.
- [6] 张凯, 储全根, 毕华剑, 等. 抵当汤对糖尿病大鼠心肌组织JAK2/STAT3信号通路的影响[J]. 安徽中医药大学学报, 2016, 35(2): 65-69.
- [7] 丁武杰, 方敬爱, 孙艳艳, 等. 益肾胶囊对糖尿病肾病大鼠肾组织JAK/STAT信号通路及 α -SMA、FN的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2013, 14(6): 484-487.
- [8] 李凤萍, 杨孟雪, 李显文, 等. 2型糖尿病大血管病患者血清诱导的人脐静脉内皮细胞中JAK2/STAT3信号通路的表达[J]. 第二军医大学学报, 2016, 37(4): 452-457.
- [9] 张佩琛, 周开, 吴瑗, 等. 当归补血汤对糖尿病大鼠肾组织损伤的保护作用[J]. 中成药, 2016, 38(12): 2541-2545.
- [10] Wang K, Wu YG, Su J, et al. Total glucosides of paeony regulates JAK2/STAT3 activation and macrophage proliferation in diabetic rat kidneys[J]. Am J Chin Med, 2012, 40(3): 521-536.
- [11] 刘焱伟, 薛锐, 夏中元, 等. 第10号染色体丢失性磷酸酶及张力蛋白同源基因调控的酪氨酸蛋白激酶2/信号传导与转录因子3信号通路对糖尿病心肌缺血后处理敏感性的作用[J]. 中华糖尿病杂志, 2017, 9(8): 515-519.
- [12] Tang J, Liu CY, Lu MM, et al. Fluorofenidone protects against renal fibrosis by inhibiting STAT3 tyrosine phosphorylation[J]. Mol Cell Biochem, 2015, 407(1): 77-87.

(收稿日期:2017-11-27;修回日期:2017-12-22)