

·方药研究·

本文引用:秦 汉,喻京生,贺 莉,王颖筱,高 健,姚琬华.祛风活血丸对实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠 JAK2 mRNA 和 STAT3 mRNA 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(3):245-249.

## 祛风活血丸对实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠 JAK2 mRNA 和 STAT3 mRNA 表达的影响

秦 汉<sup>1</sup>,喻京生<sup>2\*</sup>,贺 莉<sup>1</sup>,王颖筱<sup>1</sup>,高 健<sup>1</sup>,姚琬华<sup>1</sup>

(1.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007)

**[摘要]** 目的 观察祛风活血丸对实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠视网膜 JAK2 及 STAT3 mRNA 表达的影响。方法 将 80 只(160 眼)雄性 Lewis 大鼠根据随机数字表法随机抽取 16 只作为空白组(A),对其余 64 只大鼠进行实验性自身免疫性葡萄膜炎模型制作。造模成功后,根据随机数字表法将其随机分为模型组(B)、祛风活血丸常规剂量组(C)、祛风活血丸两倍剂量组(D)、熊胆开明片组(E)。干预 14 d 后用 qPCR 法检测大鼠视网膜组织中 JAK2 mRNA 和 STAT3 mRNA 的相对表达量。结果 JAK2 mRNA:与 B 组比较,C 组、E 组表达降低,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),D 组表达显著降低,差异具有统计学意义( $P<0.01$ );STAT3 mRNA:与 B 组比较,C、D、E 组表达均降低,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 祛风活血丸能降低实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠 JAK2、STAT3 mRNA 的表达,抑制 JAK2/STAT3 信号通路,达到抗炎作用。

**[关键词]** 实验性自身免疫性葡萄膜炎;祛风活血丸;JAK2/STAT3 信号通路;JAK2 mRNA;STAT3 mRNA

**[中图分类号]**R285.5;R393 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.03.004

### Effects of Qufeng Huoxue Pill on JAK2 mRNA and STAT3 mRNA Expression in Experimental Autoimmune Uveitis Rats

QIN Han<sup>1</sup>, YU Jingsheng<sup>2\*</sup>, HE Li<sup>1</sup>, WANG Haoxiao<sup>1</sup>, GAO Jian<sup>1</sup>, YAO Wanhua<sup>1</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the effect of Qufeng Huoxue pill on expression of JAK2 mRNA and STAT3 mRNA of retinal ganglion cells in experimental autoimmune uveitis rats. **Methods** According to the random number table method, 16 rats from 80 male Lewis rats (160 eyes) were randomly selected as the blank group (group A), and the other 64 rats were built for experimental autoimmune uveitis models. After the success of modeling, the rats were randomly divided into model group (group B), conventional dose of Qufeng Huoxue pill group (group C), double doses of Qufeng Huoxue pill group (group D), Xiongdan Kaiming tablet group (group E). After 14 days of administration, the relative expression of JAK2 mRNA and STAT3 mRNA in retinal tissue of rat was detected by Real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** JAK2 mRNA: compared with group B, the expression of group C and group E decreased obviously, the difference was with statistical significance ( $P<0.05$ ), the expression of group D decreased significantly ( $P<0.01$ ). STAT3 mRNA: compared with group B, the expression of group C, D and E decreased significantly, there was statistical significance ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Qufeng Huoxue pill could reduce the expression of JAK2 mRNA and STAT3 mRNA in experimental autoimmune uveitis rats and inhibit the JAK2 / STAT3 signaling pathway to achieve anti-inflammatory effect.

**[Keywords]** experimental autoimmune uveitis; Qufeng Huoxue pill; JAK2 / STAT3 signal pathway; JAK2 mRNA; STAT3 mRNA

**[收稿日期]**2017-12-17

**[基金项目]**国家自然科学基金项目(81273808);湖南省中医药科研计划项目(201718);湖南省教育厅科学研究项目(17A164);湖南省研究生科研创新项目(CX2017B435);湖南中医药大学研究生创新课题项目(2017CX11)。

**[作者简介]**秦 汉,男,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治眼底病。

**[通讯作者]**\* 喻京生,男,教授,主任医师,硕士研究生导师,E-mail:yujingsheng-mike@163.com。

葡萄膜炎是一组种类繁多、治疗棘手的眼病,多发生于青壮年,是全球范围内引起致盲和视觉缺陷的主要原因之一,其发病机制主要为自身免疫反应<sup>[1]</sup>。近年研究认为 Th17 细胞在自身免疫性葡萄膜炎的发生发展过程中发挥更为重要的作用,它主要由 IL-23 诱导产生<sup>[2-3]</sup>。Janus 激酶(janus kinase,JAK)/信号转导子和转录激活子(signal transducer and activator of transcription,STAT)通路,即 JAK/STAT 通路是介导细胞因子信号转导的重要途径,在调节机体炎症反应中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。IL-23 信号需通过 JAK/STAT 信号通路的转导发挥生物学效应,JAK2、STAT3 是此信号通路的主要调节因子<sup>[5-6]</sup>。实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveoretinitis,EAU)是一种 T 细胞介导、靶器官特异的自身免疫相关的疾病,由大鼠所诱导的 EAU 模型是研究人类葡萄膜炎的经典动物模型<sup>[7-8]</sup>。

祛风活血丸具有祛风清热、养血活血的功效,临床应用多年,在治疗葡萄膜炎方面取得良好疗效<sup>[9-10]</sup>。因此,本实验通过建立实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠模型,从 JAK2、STAT3 两个靶点入手,观察祛风活血丸对实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠 JAK2/STAT3 信号通路的干预作用,探究其防治葡萄膜炎的作用机制,为该药的临床应用提供实验佐证。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 受试药物 祛风活血丸由熟地黄、当归、川芎、柴胡、黄芩、菊花、防风、鱼腥草等药物组成,由湖南中医药大学第一附属医院药剂科配制而成。批号:20170308,规格:每丸重约 0.2 g,用时以蒸馏水溶散为质量分数 100 mg/mL 的悬浊液,置于 4 ℃冰箱中保存;熊胆开明片由熊胆粉、石决明、菊花、枸杞子、泽泻、茺蔚子等药物组成,吉林长白山药业集团股份有限公司产品,批号:170201,规格:0.35 g/片,用时以蒸馏水溶散为质量分数 8 mg/mL 的悬浊液,置于 4 ℃冰箱中保存。

1.1.2 动物 Lewis 大鼠 80 只,雄性,6~8 周龄,体质量 150~180 g,SPF 级,经检查均健康无眼疾,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2016-0011。

1.1.3 主要试剂、仪器 光感受器间维生素 A 类结合蛋白(interphotoreceptor retinoid-binding protein,IRBP)多肽片断 ADGSSWEGVGVGVVPDV,上海生工生物工程股份有限公司合成,批号:P14198; Freund 完全佐剂(FCA),购自 Sigma 公司,批号:BJ0120392;

PBS 溶液,购自北京索莱宝科技有限公司,批号:P1032;TRIzol Reagent 试剂,批号:R1022,荧光定量 PCR 预混液 SYBR Green qPCR Mix,批号:P2092,购自广州东盛生物科技有限公司;DEPC(焦炭酸二乙酯),购自 Sigma 公司,批号:V900882;mRNA 逆转录试剂盒,购自 Thermo 公司,批号:K1622;荧光定量 PCR 仪,ABI 公司产品;核酸定量仪,Thermo 公司产品;DYY-6C 型电泳仪,北京六一仪器厂产品;OMS-23 手术显微镜,TOPCON 公司产品。

### 1.2 分组及干预

1.2.1 EAU 大鼠模型制作<sup>[11]</sup> 造模组大鼠分别于两侧大腿内侧皮下缓慢注射 0.1 mL 含有 30 μg IRBP1177-1191 的 FCA 乳糜液 1 次。空白组大鼠在相同部位注射等剂量蒸馏水 1 次。

1.2.2 验证模型 造模后在裂隙灯显微镜下观察大鼠眼前节改变,以出现虹膜血管扩张、虹膜后粘连、前房渗出、角膜缘血管充血(睫状充血)、晶状体前囊有灰白色絮状沉着物、瞳孔膜闭以及玻璃体混浊等炎性改变作为 EAU 大鼠模型制作成功的标志。

1.2.3 动物分组 80 只 Lewis 大鼠根据随机数字表法随机抽取 16 只作为空白组(A),对其余 64 只大鼠进行 EAU 模型制作。造模成功后,根据随机数字表法将其随机分为模型组(B)、祛风活血丸常规剂量组(C)、祛风活血丸两倍剂量组(D)、熊胆开明片组(E)。

1.2.4 干预方法 造模后第 7 天开始干预,给药剂量按人鼠体表面积折算法计算,祛风活血丸常规剂量组按 4 g/(kg·d)剂量灌胃,祛风活血丸两倍剂量组按 8 g/(kg·d)剂量灌胃,熊胆开明片组按 0.5 g/(kg·d)剂量灌胃,空白组、模型组以蒸馏水 4 mL 灌胃,每日 1 次,连续干预 14 d。

### 1.3 视网膜组织取材

干预 14 d 后,10%水合氯醛腹腔注射麻醉各组大鼠,充分暴露眼球于眼眶缘,用眼科剪分离球结膜及球后结缔组织,镊住眼球后极部的视神经,用弯剪小心剪断视神经,取出大鼠眼球。参考 Mcmenamin<sup>[12]</sup>方法在手术显微镜下进行取材,将取出的视网膜组织放入 1.5 mL 微量离心管中,滴入 100 μL 总 RNA 提取试剂(Trizol),-80 ℃冰箱保存。

### 1.4 qPCR 法检测大鼠视网膜组织中 JAK2 mRNA 和 STAT3 mRNA 的表达

采用 Trizol 法抽提大鼠视网膜组织中总 RNA,进行逆转录反应,总反应体系 20 μL,42 ℃水浴 1 h,然后在 70 ℃反应 10 min 使 Reverse Tran-

scriptase 失活,合成 cDNA。取上述反应液 1  $\mu\text{L}$  作为荧光定量的模板,反应体系总体积为 10  $\mu\text{L}$ 。JAK2 上游引物为 5'-AGATGTGC-CGCTATGACC-3',下游引物为 5'-CTCTTCCGTG-CTGTGCTG-3'; STAT3 上游引物为 5'-GCTTCT-CGTTCTGGGTCTG-3',下游引物为 5'-GTCTTGCCACTGAT-GTCCTT-3';  $\beta$ -actin 上游引物为 5'-AGCCCCCTCTGAACC-CTAAG-3',下游引物为 5'-CCAGAGGCATACAGGGA-CAAC-3'。 $\beta$ -actin 作为内参,  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算相对表达量。

### 1.5 统计学分析

数据采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,运用 SPSS 22.0 软件包进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐者采用 LSD 法,方差不齐者用 Dunnett's T3 法。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 EAU 大鼠模型验证

造模后在裂隙灯显微镜下观察大鼠眼部反应,模型组出现一系列不同程度的炎症反应,与葡萄膜炎一致,空白组未观察到炎症反应。造模后第 5 天,观察到炎症反应,表现为虹膜血管轻度扩张、角膜缘血管充血;造模后第 7 天,出现葡萄膜炎反应,表现为不同程度的前房混浊、角膜后壁沉着物(KP)、房水闪辉、瞳孔缩小,部分出现晶状体前灰白色絮状物;造模后第 10 天,出现明显葡萄膜炎反应,表现为虹膜血管明显扩张、房水混浊、前房变浅、前房积脓、KP、瞳孔缘灰白色絮状物、瞳孔膜闭等体征(见图 1)。模型组大鼠一共 64 只,其中有 56 只出现不同程度的葡萄膜炎反应,造模成功率为 87.5%。

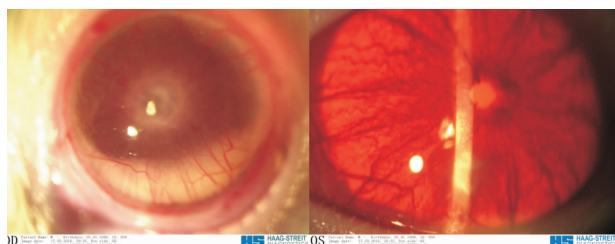


图 1 造模第 10 天模型组大鼠眼部炎症情况  
(裂隙灯显微镜下眼前节照相)

### 2.2 大鼠视网膜组织中 JAK2 mRNA、STAT3 mRNA 相对表达量

JAK2 mRNA 相对表达量:与模型组比较,祛风活血丸常规剂量组、熊胆开明片组表达均降低,差异

具有统计学意义( $P<0.05$ ),祛风活血丸两倍剂量组表达明显降低,差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。见表 1。STAT3 mRNA 相对表达量:与模型组比较,祛风活血丸常规剂量组、祛风活血丸两倍剂量组、熊胆开明片组表达均降低,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 1,图 2-图 4。

表 1 各组大鼠视网膜组织 JAK2 mRNA

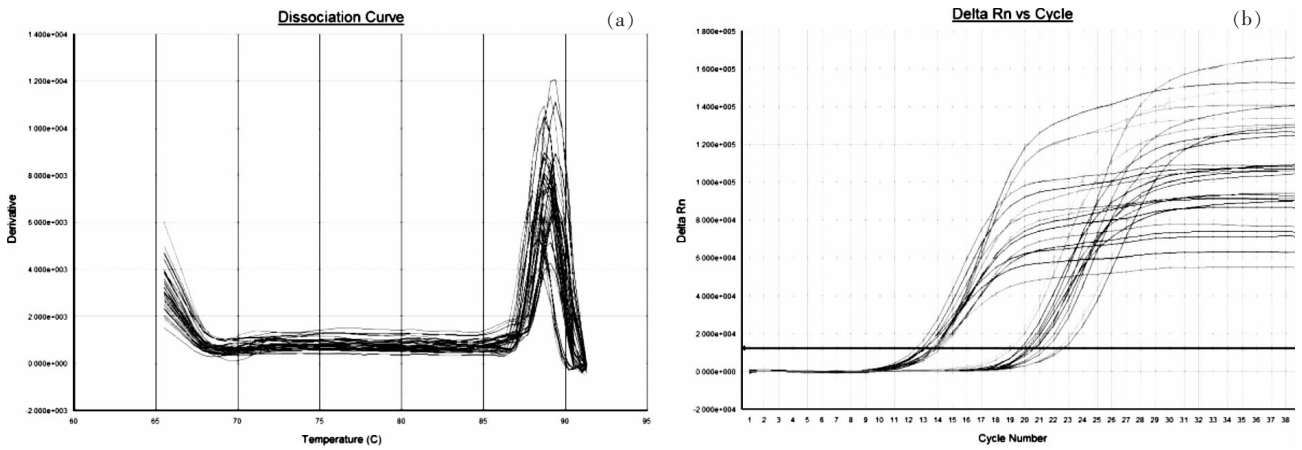
组别	n	及 STAT3 mRNA 相对表达量 ( $\bar{x}\pm s$ )	
		JAK2 mRNA	STAT3 mRNA
空白组	13	1.83 $\pm$ 0.34	0.94 $\pm$ 0.07
模型组	14	9.23 $\pm$ 0.32 <sup>##</sup>	4.75 $\pm$ 0.18 <sup>#</sup>
祛风活血丸常规剂量组	11	4.47 $\pm$ 0.95 <sup>△</sup>	2.65 $\pm$ 0.20 <sup>△</sup>
祛风活血丸两倍剂量组	12	2.80 $\pm$ 0.36 <sup>△△</sup>	2.07 $\pm$ 0.18 <sup>△</sup>
熊胆开明片组	12	4.09 $\pm$ 0.67 <sup>△</sup>	1.82 $\pm$ 0.19 <sup>△</sup>
F 值		18.45	24.72

注:与空白组比较, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ ;与模型组比较,  $\Delta P<0.05$ ,  $\Delta\Delta P<0.01$ 。

## 3 讨论

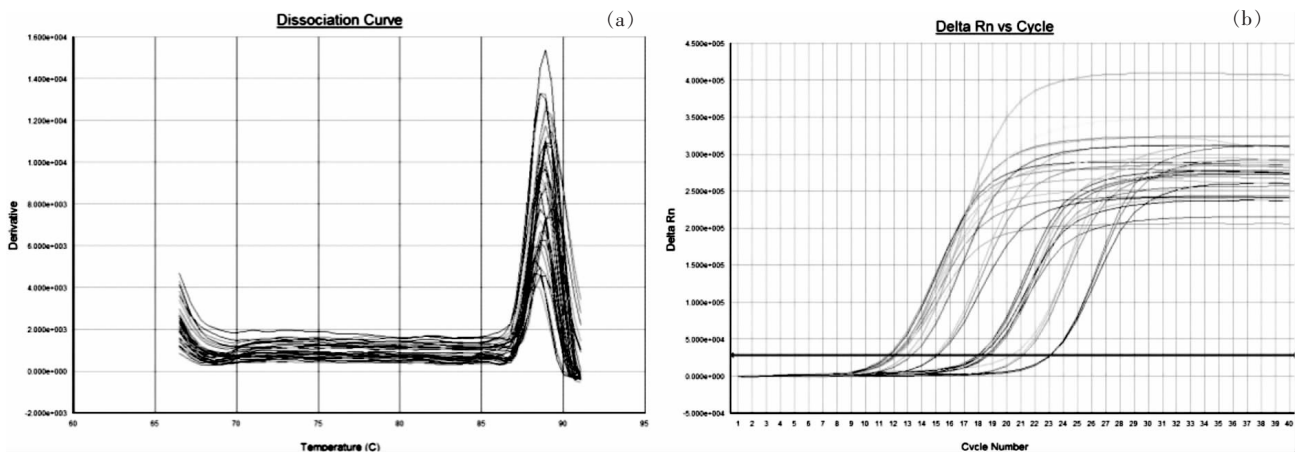
自身免疫性葡萄膜炎是一种与视网膜蛋白免疫反应相关的致盲性眼病<sup>[3]</sup>。目前,免疫抑制剂仍是自身免疫性葡萄膜炎的主要治疗药物,长期使用副作用明显<sup>[4]</sup>。近年来,中药因其独特优势在葡萄膜炎的治疗中逐渐受到关注。葡萄膜炎分别属于中医学“瞳神紧小”(《证治准绳》)、“瞳神干缺”(《秘传眼科龙木论》)、“云雾移睛”(《证治准绳》)、“视瞻昏渺”(《证治准绳》)等范畴。眼位居高,易受风邪,风为阳邪,肝为风木之脏,开窍于目,同气相求,故眼病的发生多与风邪有关;热亦为阳邪,其性升腾上炎,最易上冲头目,引起眼疾;风热二邪常常合而侵袭眼目,葡萄膜具有多气多血的特点,外邪侵犯时易造成局部气机郁滞,血行不畅,久之则形成气滞血瘀之象,因此,本病的基本病机可归纳为外感风热、气滞血瘀。祛风活血丸是湖南中医药大学第一附属医院眼科院内制剂,主要由熟地黄、当归、川芎、柴胡、黄芩、菊花、防风、鱼腥草等药物组成,方中防风祛风止痛;黄芩、鱼腥草清热解毒;熟地黄、当归、川芎补血敛阴,活血行气,补而不滞,能使营血调和;菊花清肝明目;柴胡疏肝解郁;诸药合用,祛风清热、行气活血。前期研究证实,祛风活血丸治疗葡萄膜炎临床疗效确切<sup>[9-10]</sup>。

Th17 细胞通过分泌炎症因子来介导葡萄膜炎的发生和发展<sup>[5]</sup>。Th17 细胞主要通过特异性分泌炎症因子 IL-17 来介导促炎症反应。JAK2/STAT3 信号通路是一条与 Th17 分化、IL-17 的合成分泌密切相关的重要炎症信号通路,信号通路的异常活化导致



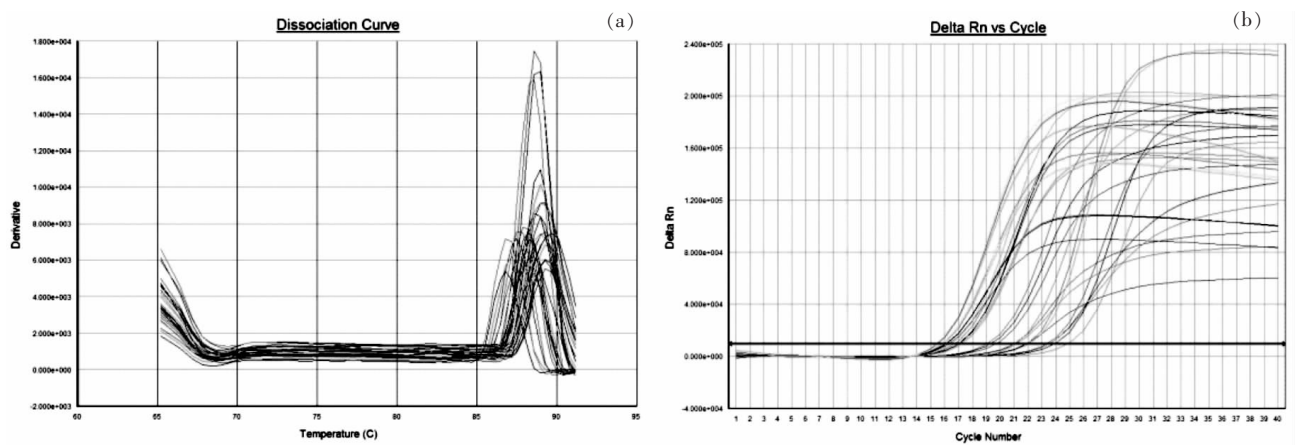
(a:融解曲线 b:扩增曲线)

图2 JAK2 mRNA PCR 曲线图



(a:融解曲线 b:扩增曲线)

图3 STAT3 mRNA PCR 曲线图



(a:融解曲线;b:扩增曲线)

图4  $\beta$ -actin PCR 曲线图

Th17 分化、IL-17 合成分泌异常。IL-23 对于 Th17 的存活和功能具有维持作用,IL-17 的分泌和 Th17 的分化、扩增均需要 IL-23 的诱导刺激。IL-23 信号需经由 JAK/STAT 信号通路的转导,JAK2、STAT3 是这一信号通路的主要调节因子,IL-23 与 IL-23 受体结合后,经由 JAK/STAT 通路磷酸化 STAT3<sup>[5-6,16]</sup>。STAT3 在 Th17 的分化、IL-17 的合成和分泌过程中

具有重要作用,而 STAT3 的功能只有通过 JAK2 使其磷酸化才能被启动,所以 JAK2 与 STAT3 密不可分。因此,目前葡萄膜炎的治疗思路更趋向于通过抑制调节因子 JAK2 和 STAT3 的表达,拮抗 JAK2/STAT3 信号通路的异常活化,良性调控 Th17 细胞的分化过程,抑制炎症因子的分泌,达到减轻炎症反应的目的。

本次研究通过建立实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠模型,观察了祛风活血丸对其视网膜 JAK2/STAT3 信号通路基因表达的调节作用。结果显示:与模型组比较,祛风活血丸常规剂量组、祛风活血丸两倍剂量组、熊胆开明片组 JAK2 mRNA、STAT3 mRNA 表达均降低,其中祛风活血丸两倍剂量组 JAK2 mRNA 表达显著降低。本实验中祛风活血丸能抑制 EAU 大鼠视网膜组织中 JAK2、STAT3 mRNA 表达,说明了 JAK2、STAT3 是祛风活血丸干预 EAU 的靶点,即可通过抑制 JAK2、STAT3 靶点达到改善 EAU 病理过程的目的。综上所述,祛风活血丸可能通过抑制 JAK2、STAT3 mRNA 表达水平,良性调控 JAK2/STAT3 信号通路,达到抗炎作用。

#### 参考文献:

- [1] 杨培增.葡萄膜炎的研究进展[J].中华眼科杂志,2005,41(12):1149-1151.
- [2] PENG Y, HAN G, SHAO H, et al. Characterization of IL-17+ interphotoreceptor retinoid-binding protein-specific T cells in experimental autoimmune uveitis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007,48(9):4153-4161.
- [3] EVANS H G, SUDDASON T, JACKSON I, et al. Optimal induction of T helper 17 cells in humans requires T cell receptor ligation in the context of Toll-like receptor-activated monocytes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(43):17034-17039.
- [4] ALQHASHAM A, RASHEED Z. Therapeutic targets for rheumatoid arthritis: Progress and promises [J]. Autoimmunity, 2014,47(2): 77-94.
- [5] CHEN C, ZHANG X, WANG Y. Analysis of JAK2 and STAT3 polymorphisms in patients with ankylosing spondylitis in Chinese Han population[J]. Clip Immunol, 2012,136(3):442-446.
- [6] HU K, HOU S, JIANG Z, et al. JAK2 and STAT3 polymorphisms in a Han Chinese population with Behcet's disease[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012,53(1):538-541.
- [7] AGARWAL R K, SILVER P B, CASPI R R. Rodent models of experimental autoimmune uveitis[J]. Methods Mol Biol, 2012 (900):443-469.
- [8] YANG H, ZHENG S, QIU Y, et al. Activation of liver X receptor alleviates ocular inflammation in experimental autoimmune uveitis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2014,55(4):2795-2804.
- [9] 曾静,喻京生,颜家朝,等.祛风活血丸治疗前葡萄膜炎疗效观察[J].中国中医眼科杂志,2012,12(6):409-411.
- [10] 肖霞,喻京生,李维,等.中西医结合治疗葡萄膜炎 123 例疗效观察[J].湖南中医杂志,2016,32(3):74-76.
- [11] CASPI R R. Experimental autoimmune uveoretinitis in the rat and mouse[J]. Curr Protoc Immunol, 2003, Chapter 15:Unit 15.6. DOI:10.1002/0471142735.im1506s53.
- [12] MCMENAMIN P G. Optimal methods for preparation and immunostaining of iris, ciliary body, and choroidal whole mounts. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000,41(10):3043-3048.
- [13] Caspi R R. A look at autoimmunity and inflammation in the eye[J]. J Clin Invest,2010,120(9):3073-3083.
- [14] 于晋懿,卢弘.非感染性葡萄膜炎的免疫抑制治疗[J].眼科新进展,2014,34(7):695-700.
- [15] 崔彦,毕宏生, Deming Sun. Th1, Th17 细胞对小鼠视网膜星形细胞的杀伤作用[J].中华实验眼科杂志,2012,30(1):25-28.
- [16] TOUSSIROT E. The IL23/Th17 pathway as a therapeutic target in chronic inflammation in chronic inflammatory diseases [J]. Inflamm Allergy Drug Targets, 2012,11(2):159-168.

(本文编辑 杨瑛)