

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.23.013

荔枝核总黄酮通过 JAK2/STAT3 信号通路抗大鼠肝纤维化的实验研究^{*}

欧士钰, 杜 凌[△], 韦 捷, 陈 刚

柳州市工人医院消化内科, 广西柳州 545007

摘 要:目的 探讨荔枝核总黄酮(TFL)通过酪氨酸蛋白激酶 2(JAK2)/信号转导及转录激活因子 3(STAT3)信号通路对二甲基亚硝胺(DMN)诱导的大鼠肝纤维化的作用机制。**方法** 将 30 只大鼠近照随机数字表法分为空白对照组、模型组、TFL 组,各 10 只。除空白对照组外,其余各组大鼠采用 DMN 腹腔注射 4 周建立大鼠肝纤维化模型。造模后,TFL 组给予 TFL 灌胃,空白对照组和模型组给予等体积生理盐水灌胃,6 周后处死大鼠。检测大鼠血清天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平及肝组织羟脯氨酸(HYP)水平。取固定部位肝组织进行病理组织学检查,并采用 Western blot 检测 JAK2、磷酸化 JAK2(p-JAK2)、STAT3、磷酸化 STAT3(p-STAT3)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、胶原-I(Collagen-I)蛋白表达情况。**结果** 与模型组比较,TFL 组大鼠 DMN 诱导的肝损伤病理表现改善,血清 AST、ALT 及肝组织 HYP 水平降低($P < 0.05$)。Western blot 检测结果显示,TFL 组 α -SMA、Collagen-I、p-JAK2、JAK2、p-STAT3、STAT3 蛋白表达较模型组降低($P < 0.05$)。**结论** TFL 对 DMN 诱导的肝纤维化大鼠具有保护作用,其机制可能与 JAK2/STAT3 信号通路有关。

关键词:荔枝核总黄酮; 肝纤维化; JAK2/STAT3

中图法分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)23-3216-04

Effects of total flavone from Litchi chinensis sonn on rats with hepatic fibrosis through JAK2/STAT3 signaling pathway^{*}

OU Shiyu, DU Ling[△], WEI Jie, CHEN Gang*Department of Gastroenterology, Liuzhou Worker's Hospital, Liuzhou, Guangxi 545007, China*

Abstract: Objective To observe the effects of total flavone from Litchi chinensis sonn (TFL) on dimethylnitrosamine (DMN)-induced hepatic fibrosis in rats through janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway. **Methods** Thirty rats were divided into blank control group, model group and TFL group according to the random number table method, with 10 rats in each group. Except for the blank control group, the rats in other groups were intraperitoneally injected with DMN for 4 weeks to establish the hepatic fibrosis model. After establishment of the model, TFL group was given TFL by gavage, while blank control group and model group were given the same volume of normal saline by gavage for 6 weeks. The serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and hydroxyproline (HYP) of liver tissues were detected. Meanwhile, the liver tissue were collected for histopathological examination. The protein expressions levels of JAK2, phosphorylated JAK2 (p-JAK2), STAT3, phosphorylated STAT3 (p-STAT3), α -smooth muscle actin (α -SMA) and Collagen-I were detected by Western blot. **Results** Compared with the model group, the pathological manifestations of DMN-induced liver injury of rats in TFL group were improved, and the levels of serum AST, ALT and HYP of liver tissue were decreased ($P < 0.05$). The results of Western blot showed that p-JAK2, JAK2, p-STAT3 and STAT3, α -SMA, Collagen-I expression levels in TFL group were decreased compared with those in model group ($P < 0.05$). **Conclusion** TFL has a protective effect on DMN-induced hepatic fibrosis in rats, and its mechanism may be related to JAK2/STAT3 signaling pathway.

Key words: total flavone from Litchi chinensis sonn; hepatic fibrosis; JAK2/STAT3

* 基金项目:广西卫生与计划生育委员会课题(Z20170893, Z2016165);广西中医药管理局科研课题(GXZYB20220434)。

作者简介:欧士钰,男,副主任医师,主要从事消化系统疾病的基础与临床研究。 [△] 通信作者, E-mail:154622874@qq.com。

肝纤维化是各种慢性肝病进一步向肝硬化发展的必经阶段,是肝脏细胞外基质(ECM)合成与降解平衡紊乱,导致 ECM 过度沉积的病理过程^[1]。目前研究认为,肝纤维化乃至早期肝硬化是可以逆转的^[2-3]。荔枝核总黄酮(TFL)是从荔枝核中提取的有效药理成分,研究表明 TFL 具有抗肝纤维化作用,其机制与 TFL 可抑制核因子 κ B p65(NF- κ B p65)蛋白表达有关^[4]。酪氨酸蛋白激酶 2(JAK2)/信号转导及转录激活因子 3(STAT3)信号通路的激活与促肝纤维化作用密切相关^[5-6]。目前,TFL 对 JAK2/STAT3 信号通路是否有干预作用尚鲜见报道,TFL 是否通过该信号通路发挥抗肝纤维作用尚未明确。本研究旨在观察 TFL 对 JAK2/STAT3 信号通路的影响,进一步探讨 TFL 抗肝纤维化的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SD 大鼠 30 只,雄性,SPF 级,体重(200±20)g,由中山大学实验动物中心提供(合格证号:SCXK 粤 2021-0029)。

1.2 仪器与试剂 仪器:酶标仪及凝胶成像系统(美国赛默飞世尔科技公司);电泳仪、电泳槽(美国 Bio-Rad 公司);光学显微镜(日本奥林巴斯公司)。试剂:TFL(南京泽朗医药科技有限公司,纯度 80%);二甲基亚硝胺(DMN,美国 Sigma-Aldrich 公司);天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、羟脯氨酸(HYP)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司);BCA 蛋白定量试剂盒、RIPA 裂解液、蛋白酶抑制、磷酸酶抑制剂(碧云天生物科技有限公司);磷酸化 JAK2(p-JAK2)抗体、JAK2 抗体、磷酸化 STAT3(p-STAT3)抗体、STAT3 抗体(CST 公司); α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体、胶原- I (Collagen- I)抗体(Proteintech 公司),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体、过氧化物酶标记的山羊抗鼠二抗(北京中杉金桥生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 模型制备及给药 采用随机数字表法将 30 只大鼠分为空白对照组、模型组、TFL 组,各 10 只。模型组、TFL 组大鼠按 Ala-Kokko 方法^[7]腹腔注射 DMN(0.5%,2 mL/kg)建立肝纤维化模型,共 4 周,空白对照组不造模。造模同时,TFL 组大鼠分别灌胃相应受试药物(TFL,200 mg/kg),空白对照组及模型组灌服等体积生理盐水,共 6 周,每天 1 次。6 周后处死大鼠,取血标本和肝组织标本备用。

1.3.2 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 ALT、AST、HYP 水平 将收集到的血标本静置后,3 000 r/min 离心 5 min,取血清;取 50 mg 肝组织标本,匀浆后 3 000 r/min 离心 15 min,取上清。按照试剂盒说明书检测血清 AST、ALT 水平和肝组织 HYP 水平。

1.3.3 肝组织病理学检查 常规 10%甲醛固定,乙

醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋后制备切片,经 HE 染色、Masson 染色后,于光镜下观察病理改变。

1.3.4 Western blot 检测 p-JAK2、JAK2、p-STAT 3、STAT 3、 α -SMA、Collagen- I 蛋白的表达 取适量肝组织剪碎后冰上裂解,低温离心后取上清获得组织总蛋白,BCA 法检测蛋白浓度,上样、电泳、转膜、封闭、洗膜,加入相应的稀释的抗体,4 ℃ 孵育过夜,加入二抗,室温孵育 1 h。增强型化学发光(ECL)显影,凝胶成像系统曝光,Image-J 软件分析目的蛋白的相对表达量。以 GAPDH 为内参,至少进行 3 次独立重复实验。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析及 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TFL 对肝纤维化大鼠 AST、ALT、HYP 水平的影响 与空白对照组比较,模型组 AST、ALT、HYP 水平明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,TFL 组 ALT、AST、HYP 水平明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组 AST、ALT 及 HYP 水平比较($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	ALT(U/L)	AST(U/L)	HYP(μ g/g)
空白对照组	10	47.75±8.89	50.40±13.73	61.28±9.28
模型组	10	146.51±16.55 ^a	161.55±15.32 ^a	151.45±36.88 ^a
TFL 组	10	83.39±20.64 ^{ab}	98.33±22.93 ^{ab}	94.94±21.55 ^{ab}
<i>F</i>		94.042	98.268	32.595
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

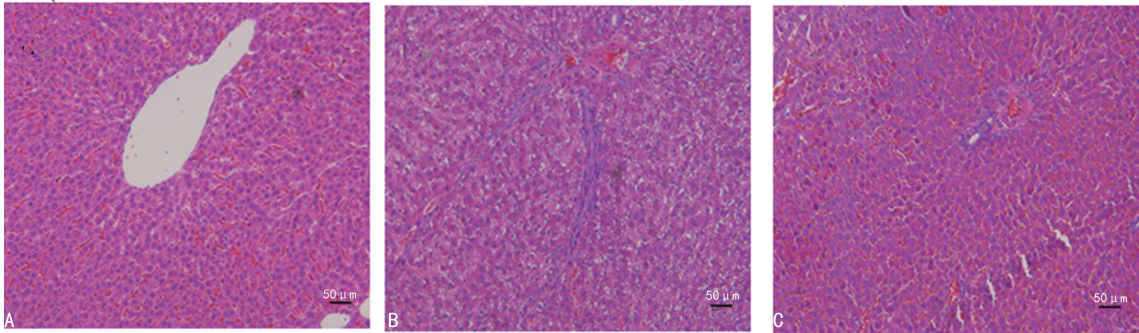
注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.2 TFL 对肝纤维化大鼠肝组织病理学改变的影响 空白对照组大鼠肝脏组织肝细胞索排列整齐,肝细胞形态正常,无水肿,无脂肪变性,小叶结构正常,未见纤维间隔,汇管区未见胶原沉积。与空白对照组比较,模型组肝细胞索排列紊乱,肝细胞水肿,脂肪变性,多数正常小叶结构破坏或消失,形成假小叶。与模型组相比,TFL 组肝细胞坏死明显减少,假小叶消失。见图 1、2。

2.3 各组肝纤维化大鼠肝组织 JAK2/STAT3 信号通路的变化 Western blot 检测结果显示,模型组肝组织 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 的表达较空白对照组明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,TFL 组 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 的表达不同程度降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

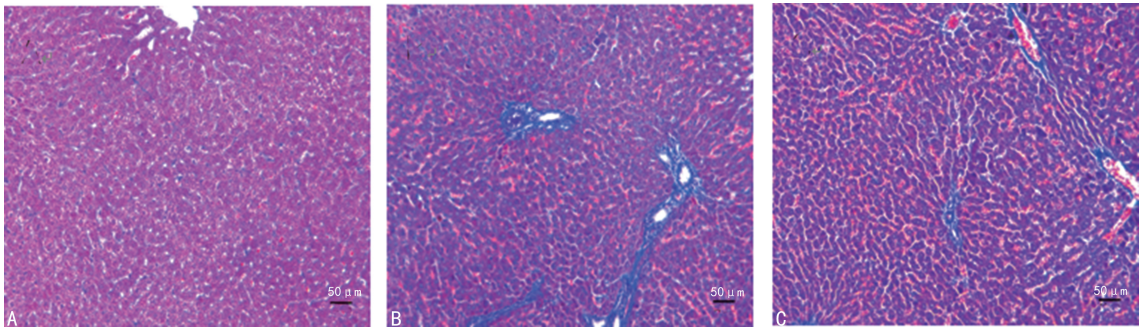
2.4 各组肝纤维化大鼠肝组织 α -SMA、Collagen- I 蛋白表达 Western blot 检测结果显示,肝纤维化模型组肝组织 α -SMA、Collagen- I 蛋白的表达较空白对照组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模

型组比较,TFL 组 α -SMA、Collagen- I 的表达不同程度降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。



注:A 为空白对照组;B 为模型组;C 为 TFL 组。

图 1 大鼠肝组织 HE 染色病理切片(×200)



注:A 为空白对照组;B 为模型组;C 为 TFL 组。

图 2 大鼠肝组织 Masson 染色病理切片(×200)

表 2 各组大鼠肝组织 JAK2/STAT3 信号通路的表达情况($\bar{x}\pm s$)			
组别	<i>n</i>	p-JAK2/JAK2	p-STAT3/STAT3
空白对照组	10	0.11±0.01	0.17±0.02
模型组	10	1.13±0.10 ^a	0.90±0.15 ^a
TFL 组	10	0.55±0.11 ^{ab}	0.41±0.06 ^{ab}
<i>F</i>		105.76	45.27
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

表 3 各组大鼠肝组织 α -SMA、Collagen- I 表达的变化($\bar{x}\pm s$, $n=10$)		
组别	α -SMA	Collagen- I
空白对照组	0.17±0.02	0.06±0.01
模型组	1.52±0.21 ^a	1.14±0.06 ^a
TFL 组	0.98±0.10 ^{ab}	0.68±0.10 ^{ab}
<i>F</i>	79.68	194.08
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

3 讨 论

肝纤维化是各种原因的慢性肝病向肝硬化发生、发展过程中的一个重要阶段,多种病因如炎症、乙醇、化学毒物、寄生虫、乙型肝炎病毒、胆汁淤积及胆道梗阻等,均可以使肝脏发生纤维化,如果这些因素持续

存在,可使肝纤维化发展至肝硬化,甚至肝癌^[1]。但是,如果在肝纤维化早期阶段去除或抑制这些病因,肝纤维是可以缓解甚至逆转的^[2]。中医药在抗肝纤维化领域具有很大优势,TFL 具有抗肝纤维化及保肝作用,但其具体机制尚不完全清楚。

本研究建立大鼠肝纤维化动物模型,进一步研究 TFL 抗肝纤维化作用及其机制。DMN 是一种化学毒物,具有肝毒性,可以在肝细胞线粒体中代谢为乙醛,进而与蛋白质交联;也可代谢产生活性甲基化基因,引起核酸、蛋白质的甲基化,使肝细胞坏死凋亡,DMN 还可通过氧化应激使肝脏脂质过氧化,刺激肝星状细胞(HSC)活化,使细胞外基质胶原蛋白产物增多或降解减少,胶原过度沉积,导致肝纤维化发生、发展。DMN 诱导的肝纤维化动物模型胶原沉积与人类肝硬化早期改变的病理特点非常相似,是目前进行肝纤维研究的常用动物模型^[7-8]。

本研究中肝模型组肝组织病理切片提示肝索排列紊乱,有较多的成纤维细胞出现,纤维结缔组织增生,纤维间隔形成,提示大鼠肝纤维化模型复制是成功的。本研究结果显示,与模型组比较,TFL 治疗干预 6 周后,TFL 组大鼠血清 ALT、AST、HYP 及 α -SMA、Collagen- I 蛋白表达均降低($P<0.05$),且病理结果提示,TFL 能改善肝组织损伤及纤维化程度,提示 TFL 有较好的治疗肝纤维化及保肝作用,与相关报道一致^[9]。

有研究认为,JAK2/STAT3 信号通路与肝纤维化密切相关,HSC 的活化是肝纤维化进程关键的关键因素^[2,5-6],HSC 膜上特异性受体亚单位与血小板源生长因子、瘦素、转化生长因子 β 等促肝纤维化细胞因子发生同源或异源寡聚化后,从而使与受体偶联的 JAKs 被激活,继而使受体细胞质段的酪氨酸磷酸化为含 SH2 的蛋白停泊位点,下游信号蛋白分子被激活使靶基因发挥作用,STAT 蛋白末端的酪氨酸残基(Tyr705)、丝氨酸残基(Ser727)同时可被 JAKs 诱导而发生磷酸化,进而激活 STATs 蛋白,形成同源或异源 STATs 蛋白二聚体进入细胞核结合相应靶基因的启动子,从而使靶基因转录活化 HSC,参与肝纤维化发生、发展^[5,10-11]。本研究结果显示,肝纤维化模型组肝组织 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 蛋白较空白对照组明显升高,提示 DMN 所诱导大鼠肝纤维化过程中大鼠肝组织 JAK2/STAT3 信号通路活化,参与了肝纤维化的发生、发展过程;TFL 组 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 较空白对照组降低,提示 TFL 可抑制 JAK2/STAT3 信号通路。因此,笔者认为 JAK2/STAT3 至少部分参与了肝纤维化的形成,TFL 可能通过抑制转录因子 JAK2/STAT3 而发挥抗肝纤维化作用。

TFL 对 DMN 诱导的肝纤维化具有较好的治疗作用,有可能逆转肝纤维化,其机制可能与抑制 JAK2/STAT3 蛋白的表达,阻断 JAK2/STAT3 信号通路的信号传导有关,但肝纤维化的形成机制极其复杂,TFL 抗肝纤维化的作用机制仍需进一步深入研究。

参考文献

- [1] EZHILARASAN D. Oxidative stress is bane in chronic liver diseases: clinical and experimental perspective[J]. Arab J Gastroenterol, 2018, 19(2): 56-64.
- [2] OKAZAKI I, WATANABE T, HOZAWA S, et al. Reversibility of hepatic fibrosis: from the first report of col-

- lagenase in the liver to the possibility of gene therapy for recovery[J]. Keio J Med, 2001, 50(2): 58-65.
- [3] LEE Y A, WALLACE M C, FRIEDMAN S L. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story[J]. Gut, 2015, 64(5): 830-841.
- [4] 罗伟生, 欧士钰, 靳雅玲, 等. 荔枝核总黄酮抗大鼠肝纤维化的作用及其对核转录因子- κ B p65 表达的影响[J]. 广东医学, 2012, 33(21): 3201-3204.
- [5] HUANG W, JI R, GE S, et al. MicroRNA-92b-3p promotes the progression of liver fibrosis by targeting CREB3L2 through the JAK/STAT signaling pathway[J]. Pathol Res Pract, 2021, 219: 153367.
- [6] YANG L, HAN B, ZHANG M, et al. Activation of BK channels prevents hepatic stellate cell activation and liver fibrosis through the suppression of TGF β 1/SMAD3 and JAK/STAT3 profibrotic signaling pathways[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 165.
- [7] ALA-KOKKO L, PIHLAJANIEMI T, MYERS J C, et al. Gene expression of type I, III and IV collagens in hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine in the rat[J]. Biochem J, 1987, 244(1): 75-79.
- [8] 吕艳红, 吴姗姗, 王振常, 等. 肝纤维化动物模型造模方法的研究进展[J]. 广西医学, 2020, 42(7): 875-878.
- [9] 肖绪华, 赵永忠, 曹杰. 荔枝核总黄酮对肝纤维化大鼠转化生长因子及核因子 κ B 表达的影响[J]. 华夏医学, 2019, 32(3): 11-15.
- [10] TANG L Y, HELLER M, MENG Z, et al. Transforming growth factor- β (TGF- β) directly activates the JAK1-STAT3 axis to induce hepatic fibrosis in coordination with the SMAD pathway[J]. J Biol Chem, 2017, 292(10): 4302-4312.
- [11] HUI J, GAO J, WANG Y, et al. Panax notoginseng saponins ameliorates experimental hepatic fibrosis and hepatic stellate cell proliferation by inhibiting the Jak2/Stat3 pathways[J]. J Tradit Chin Med, 2016, 36(2): 217-224.

(收稿日期: 2022-04-06 修回日期: 2022-09-15)

(上接第 3215 页)

- [10] 汪廉, 孙明月, 彭万胜. 毛细支气管炎患儿血清 IL-35、Th2 类细胞因子水平变化及其意义[J]. 山东医药, 2022, 62(3): 20-24.
- [11] SINGH J, SOHAL S S, LIM A, et al. Cytokines expression levels from tissue, plasma or serum as promising clinical biomarkers in adenocarcinoma of the prostate: a systematic review of recent[J]. Ann Trans Med, 2019, 7(11): 245.
- [12] GUNAWARDENE A, DENNETT E, LARSEN P. Prognostic value of multiple cytokine analysis in colorectal cancer: a systematic review[J]. J Gastrointest Oncol, 2019, 10(1): 134-143.

- [13] 黄晓东, 蔺际, 杜鹏辉, 等. 高脂血症性急性胰腺炎 T 淋巴细胞亚群和细胞因子的变化及意义[J]. 中华急诊医学杂志, 2022, 31(1): 92-97.
- [14] TURNER M D, NEDJAI B, HURST T, et al. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(11): 2563-2582.

(收稿日期: 2022-03-28 修回日期: 2022-09-15)