

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.10.003

文章编号: 1005-8982(2016)10-0011-05

论著

桂枝提取物对动脉粥样硬化大鼠白细胞介素 6/ 信号转导子和转录活化子 3 信号通路的影响

朱芹英¹, 张卉², 杨铁骊²

(1. 青海省西宁市第一人民医院 药剂科, 青海 西宁 810000; 2. 河南省黄淮学院, 河南 驻马店 463000)

摘要:目的 分析桂枝提取物对动脉粥样硬化(AS)大鼠白细胞介素 6/ 信号转导子和转录活化子 3(IL-6/STAT3)信号通路的影响。**方法** 选取健康纯种 SD 雄性大白鼠共 366 只,随机分为正常对照组、空白 AS 模型组和桂枝提取物组。免疫组织化学法检测 Toll 样受体 4(TLR4)、肝脏 X 受体(LXR)、C-Jun 的 N 末端激酶(JNK/P-JNK)、细胞外调节蛋白激酶(ERK1/2/P-ERK1/2)、P38 丝裂原活化蛋白激酶(P38MAPK/p-P38MAPK)、白细胞介素 6(IL-6)、蛋白质酪氨酸激酶 JAK-1 抗原(JAK1/p-JAK1)、转录活化子 3(STAT3/p-STAT3)及核转录因子 kappa B(NF-κB)P65 的表达在 AS 大鼠腹主动脉中的表达;用实时荧光定量 PCR 技术检测 AS 大鼠腹主动脉血管 AGTRI mRNA 和 IL-6 mRNA 的表达。**结果** 与正常对照组比较,空白模型组腹主动脉血管 IL-6 阳性表达率明显升高 ($P < 0.05$);与空白模型组比较,桂枝提取物组 IL-6 的阳性表达率显著降低 ($P < 0.05$)。与正常对照组比较,空白模型大鼠腹主动脉血管 IL-6 mRNA 的表达显著升高 ($P < 0.05$);与空白模型组比较,桂枝提取物组 IL-6 mRNA 的表达显著降低 ($P < 0.05$)。与正常对照组比较,空白模型组腹主动脉 p-JAK1 阳性表达率显著提高, p-STAT3 阳性表达率显著降低 ($P < 0.05$);与空白模型组比较,桂枝提取物组 p-JAK1 阳性表达率显著降低, p-STAT3 阳性表达率显著升高 ($P < 0.05$)。**结论** 桂枝提取物可以通过降低 TLR4 水平,升高 LXR 水平,同时抑制 JNK、p38MAPK 和 ERK1/2 的磷酸化,作用于 NF-κB 转录因子,抑制 IL-6 分泌,进而影响 JAK2/STAT3 信号转导通路。

关键词: 动脉粥样硬化;桂枝提取物;信号通路转导

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Impact Guizhi extract on IL-6/STAT3 signaling pathway in atherosclerotic rats

Qin-ying Zhu¹, Hui Zhang², Tie-li Yang²

(1. Department of Pharmacy, the First People's Hospital of Xining City, Xining, Qinghai 810000, China; 2. Henan Huanghuai College, Zhumadian, Henan 463000, China)

Abstract: Objective To analyze effect of Guizhi extraction on the interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 (IL-6/STAT3) signaling pathway in atherosclerosis (AS) rats. **Methods** Totally 366 healthy pure-bred male SD rats were randomly divided into normal control group, blank AS model group and Guizhi extract group. Immunohistochemistry was used to detect TLR4, LXR, JNK/p-JNK, ERK1/2/P-ERK1/2, P38MAPK/p-P38MAPK, IL-6, JAK1/p-JAK1, STAT3/p-STAT3 and NFκB P65/ p-NFκB P65 expressions in rats with aortic AS. Real-time PCR was used to detect AGTRI mRNA and IL-6 mRNA expressions in abdominal aorta of AS rats. **Results** Compared with the normal control group, vascular IL-6 expression was significantly increased in the abdominal aorta of the blank model group ($P < 0.05$); compared with the blank model group, the level of IL-6 in the Guizhi extract group was significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with the normal control group, the positive IL-6 mRNA expression rate in the abdominal aorta was significantly increased in the blank model group ($P < 0.05$). Compared with the blank model group, IL-6 mRNA expression was significantly lowered in the Guizhi extract group ($P < 0.05$). Compared with the normal control group, abdominal aortic p-JAK1 level significantly increased, p-STAT3 level sig-

收稿日期: 2015-10-08

[通信作者] 杨铁骊, E-mail: 1294881139@qq.com

nificantly lowered in the blank model group ($P < 0.05$). Compared with the blank model group, p-JAK1 level significantly reduced and p-STAT3 level significantly increased in the Guizhi extract group ($P < 0.05$). **Conclusions** Guizhi extract can inhibit IL-6 secretion, thereby affect JAK2/STAT3 signal transduction pathway by reducing TLR4 level, increasing LXR level while suppressing phosphorylation of JNK, p38MAPK and ERK1/2 and acting on the NF κ B transcription factor.

Keywords: atherosclerosis; Guizhi extract; signal transduction pathway

动脉粥样硬化(athrosclerosis, AS)是以动脉硬化为主要病变的血管疾病,受累动脉多从内膜开始病变。发病患者一般均优先出现脂质、血栓、复合糖类集聚物、纤维组织增生及钙沉淀等症状,这些物质将在病变动脉逐步退变、钙化,累及血管弹性^[1]。当疾病发展至阻塞动脉血管时,该动脉及其负责供血区域将极易出现组织器官缺血、缺氧及坏死情况,患者将出现脑中风或心肌梗塞等症状,严重影响患者生命健康^[2]。桂枝提取物是中医常用药物之一,主要用于治疗风寒感冒、血塞经闭、心悸或关节痹痛等症状。为分析桂枝提取物在 AS 治疗中的疗效,并探究其对 AS 大鼠白细胞介素 6/ 信号转导子和转录活化子 3(IL-6/STAT3)信号通路的影响,笔者进行如下研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选取健康纯种 SD 雄性大白鼠共 366 只(购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司),每只均为 200~250 克,随机分为正常对照组、空白 AS 模型组和桂枝提取物组。其中,正常对照组予以普通饲料和自来水喂养;空白 AS 模型组和桂枝提取物组采用高脂饲料喂养,同时在喂养第 7 天行大鼠主动脉内膜球囊损伤术。桂枝提取物组在建模后第 3 天予以桂枝提取物给药(西安天瑞生物技术有限公司,规格:10:1),给药体积为 2 ml/kg,按照 19 mg/kg 给药,1 次/d,持续给药 16 周;其余两组予以生理盐水给药。16 周后,麻醉动物,取 0.5 cm 长度腹主动脉标本。其中,桂枝提取物为:取桂枝粉末 0.5 g,加乙醇 10 ml,密塞,浸泡 20 min,时时振摇,滤过,滤液作为供试品溶液。

1.2 主要实验仪器

兔抗人多克隆 TLR4 抗体及兔抗人多克隆 LXR 抗体购自艾博抗(上海)贸易有限公司,磷酸化 p-JNK 兔多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,鼠抗人 ERK1/2 单克隆抗体及兔抗人 p-ERK1/2 单克隆抗体购自美国 Cell Signaling

Technology 公司, Anti-phospho-p38 MAPK 磷酸化 p38MAPK 抗体及鼠抗人 p38MAPK 单克隆抗体购自上海瑞齐生物科技有限公司,酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒由上海哈灵生物科技有限公司提供,兔抗人多克隆抗体 JAK1 及 p-STAT3 和 SP 免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,兔抗人多克隆 NF κ B P65/p-NF- κ B P65 抗体及大鼠白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6)免疫组织化学试剂盒购自上海安妍生物有限公司,PCR 仪(abi7900HT)购自 APPLIED BIOSYSTEMS 公司、凝胶图像分析仪和分光光度计(UV-photometer 型)购自上海精宏实验仪器厂,电泳仪和恒温水浴箱(DK-S22 型)购自北京六一仪器厂,低温高速离心机购自上海梅特勒托力多仪器有限公司,光学显微镜购自日本 Olympus 公司,切片机购自德国 DELICA 公司。

1.3 实验方法

造模 16 周后给予大鼠禁食 12 h,麻醉,腹腔采血,劲椎脱位处死大鼠,分离颈总动脉,取主动脉弓起始端 1.0 cm 动脉,多聚甲醛固定 12 h,打开大鼠腹腔,分离皮肤、脂肪组织,沿主动脉背部剪开,取 2.0 cm 腹动脉,冲洗,-80℃冰箱保存待检。将主动脉标本选用乙醇脱水,包膜,制片,HE 染色操作,显微镜下观察动脉管壁形态学变化。将腹动脉标本冲洗后,选用油红 O 染色,检测标本内中性三酰甘油、脂蛋白情况。

免疫组织化学法检测 Toll 样受体 4 (Toll like receptors 4, TLR4)、肝脏 X 受体(liver X receptor, LXR)、C-Jun 的 N 末端激酶(JNK/P-JNK)、细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK1/2/P-ERK1/2)、P38 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, P38MAPK/p-P38 MAPK)、白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6)、蛋白质酪氨酸激酶 JAK-1 抗原(tyrosine protein kinase JAK1, JAK1/p-JAK1)、转录活化子 3(activator of transcription 3, STAT3/p-STAT3)及核转录因子 kappa B(NF- κ B/p-NF- κ B)P65 的表达在 AS 大鼠腹

主动脉中的表达;用实时荧光定量 PCR 技术检测 AS 大鼠腹主动脉血管 AGTR1 mRNA 和 IL-6 mRNA 的表达。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,计数资料采用 χ^2 检验;计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 *t* 检验; $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TLR4、LXR 在不同大鼠腹主动脉中的表达

TLR4、LXR 在不同大鼠腹主动脉中的表达,见表 1。和正常对照组比较,空白模型组腹主动脉 TLR4 阳性表达率显著升高 ($P < 0.05$);与空白模型组比较,桂枝提取物组 TLR4 阳性表达率显著降低 ($P < 0.05$)。与正常对照组比较,空白模型组腹主动脉 LXR 阳性表达率显著降低 ($P < 0.05$);与空白模型组比较,桂枝提取物组 LXR 蛋白阳性表达率升高 ($P < 0.05$)。

表 2 JNK/P-JNK、ERK1/2/P-ERK1/2 和 P38MAPK/p-P38MAPK 在不同大鼠腹主动脉中的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	JNK/P-JNK	ERK1/2/P-ERK1/2	P38MAPK/p-P38MAPK	χ^2 值	P 值
正常对照组 ($n=180$)	(11.53 \pm 1.98)/(22.12 \pm 2.89) [†]	(1.11 \pm 0.25)/(0.08 \pm 0.02) [†]	(0.40 \pm 0.07)/(1.03 \pm 0.11) [†]	2.791	0.023
空白模型组 ($n=92$)	(46.96 \pm 9.11)/(58.78 \pm 11.51)	(1.99 \pm 0.18)/(0.49 \pm 0.11)	(1.44 \pm 0.14)/(1.37 \pm 0.16)	3.411	0.002
桂枝提取物组 ($n=94$)	(17.88 \pm 3.41)/(23.31 \pm 5.01) [†]	(1.69 \pm 0.11)/(0.23 \pm 0.02) [†]	(0.64 \pm 0.05)/(0.63 \pm 0.07) [†]	4.562	0.017

注:与[†]空白模型组比较, $P < 0.05$

2.3 AGTR1 mRNA 在不同大鼠腹主动脉中的表达

AGTR1 mRNA 在不同大鼠腹主动脉中的表达,见表 3。与正常对照组比较,空白模型组腹主动脉 AGTR1 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.05$);与空白模型组比较,桂枝提取物组 AGTR1 mRNA 水平显著降低, ($P < 0.05$),扩增倍数为 0.81。

2.4 NF- κ B P65 和 p-NF- κ B P65 在不同大鼠腹主动脉中的表达

NF- κ B P65 和 p-NF- κ B P65 在不同大鼠腹主动脉中的表达,见表 4。磷酸化前,与正常对照组比较,空白模型组腹主动脉 NF- κ B P65 阳性表达率显著增高 ($P < 0.05$);和空白模型组比较,桂枝提取物组腹主动脉 NF- κ B P65 阳性表达率显著降低 ($P < 0.05$),磷酸化后,与正常对照组比较,空白模型组腹主动脉 p-NF- κ B P65 阳性表达率显著增高 ($P < 0.05$);和空白模型组比较,桂枝提取物组腹主动脉 p-NF- κ B P65 阳性表达率显著降低 ($P < 0.05$)。

2.2 JNK/P-JNK、ERK1/2/P-ERK1/2 和 P38MAPK/p-P38MAPK 在不同大鼠腹主动脉中的表达

JNK/P-JNK、ERK1/2/P-ERK1/2 和 P38MAPK/p-P38MAPK 在不同大鼠腹主动脉中的表达,见表 2。磷酸化前,与正常对照组比较,空白模型组腹主动脉 JNK、ERK1/2 和 P38MAPK 阳性表达率显著增高 ($P < 0.05$);与空白模型组比较,桂枝提取物组 JNK、ERK1/2 和 P38MAPK 阳性表达率显著下降 ($P < 0.05$)。磷酸化后,与正常对照组比较,空白模型组腹主动脉 P-JNK、P-ERK1/2 和 p-P38MAPK 阳性表达率显著增高 ($P < 0.05$);与空白模型组比较,桂枝提取物组 P-JNK、P-ERK1/2 和 p-P38MAPK 阳性表达率显著降低 ($P < 0.05$)。

表 1 TLR4、LXR 在不同大鼠腹主动脉中的表达 例(%)

组别	TLR4	LXR	χ^2 值	P 值
正常对照组 ($n=180$)	27(15.00) [†]	157(87.22) [†]	3.074	0.002
空白模型组 ($n=92$)	79(85.87)	18(19.57)	4.312	0.039
桂枝提取物组 ($n=94$)	56(59.57) [†]	48(51.06) [†]	3.175	0.001

注:与[†]空白模型组比较, $P < 0.05$

2.5 IL-6 和 IL-6 mRNA 在不同大鼠腹主动脉中的表达

IL-6 和 IL-6 mRNA 在不同大鼠腹主动脉中的表达,见表 5。与正常对照组比较,空白模型组腹主动脉血管 IL-6 阳性表达率显著升高 ($P < 0.05$);与空白模型组比较,桂枝提取物组 IL-6 的阳性表达率显著降低 ($P < 0.05$)。与正常对照组比较,空白模型大鼠腹主动脉血管 IL-6 mRNA 的表达显著升高 ($P < 0.05$);与空白模型组比较,桂枝提取物组 IL-6 mRNA 的表达显著降低 ($P < 0.05$)。

2.6 JAK1/p-JAK1 和 STAT3/p-STAT3 在不同大鼠腹主动脉中的表达

JAK1/p-JAK1 和 STAT3/p-STAT3 在不同大鼠腹主动脉中的表达,见表 6。与正常对照组比较,空白模型组腹主动脉 JAK1/p-JAK1 阳性表达率显著提高,STAT3/p-STAT3 阳性表达率显著降低 ($P < 0.05$);与空白模型组比较,桂枝提取物组 JAK1/p-JAK1 阳

胞表达率显著降低,STAT3/p-STAT3 阳性表达率显著升高。

表 3 AGTRI mRNA 在不同大鼠腹主动脉中的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	AGTRI mRNA	抑制率 (%)	χ^2 值	P 值
正常对照组 (n=180)	1.27 ± 0.34 [†]			
空白模型组 (n=92)	28.52 ± 4.33			
桂枝提取物组 (n=94)	24.95 ± 3.09 [†]	12.52	3.451	0.011

注:与[†]空白模型组比较,P<0.05

表 4 NF- κ B P65 和 p-NF- κ B P65 在不同大鼠腹主动脉中的表达 例 (%)

组别	NF- κ B P65	p-NF- κ B P65	χ^2 值	P 值
正常对照组 (n=180)	14(7.78) [†]	13(7.22) [†]	4.175	0.040
空白模型组 (n=92)	57(61.96)	74(80.43)	4.063	0.013
桂枝提取物组 (n=94)	29(30.85) [†]	58(61.70) [†]	3.111	0.002

注:与[†]空白模型组比较,P<0.05

表 5 IL-6 和 IL-6 mRNA 在不同大鼠腹主动脉中的表达

组别	IL-6/例 (%)	IL-6 mRNA/ $(\bar{x} \pm s)$	χ^2 值	P 值
正常对照组 (n=180)	21(11.67) [†]	1.22 ± 0.19 [†]	2.957	0.011
空白模型组 (n=92)	62(67.39)	68.97 ± 21.33	4.003	0.034
桂枝提取物组 (n=94)	41(43.62) [†]	49.42 ± 18.05 [†]	3.176	0.003

注:与[†]空白模型组比较,P<0.05

表 6 JAK1/p-JAK1 和 STAT3/p-STAT3 在不同大鼠腹主动脉中的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	JAK1/p-JAK1	STAT3/p-STAT3	χ^2 值	P 值
正常对照组 (n=180)	(0.48 ± 0.07)/ (0.13 ± 0.02) [†]	(0.57 ± 0.12)/ (0.19 ± 0.05) [†]	2.183	0.021
空白模型组 (n=92)	(0.58 ± 0.13)/ (0.87 ± 0.16)	(0.21 ± 0.08)/ (0.13 ± 0.07)	3.976	0.001
桂枝提取物组 (n=94)	(0.42 ± 0.06)/ (0.17 ± 0.08) [†]	(0.27 ± 0.05)/ (0.19 ± 0.06) [†]	4.459	0.003

注:与[†]空白模型组比较,P<0.05

3 讨论

AS 与高血压、高血脂、吸烟、糖尿病及肥胖等有关,发病患者症状与病变动脉位置以及附近器官受累缺血程度有关^[9]。主动脉动脉粥样硬化患者常无明显症状,而 AS 患者,如狭窄直径超过 75%,患者将合并心肌梗塞、心率失常及心绞痛,甚至猝死;脑动脉粥样硬化则可能引发脑中风、脑萎缩症状;肾脏动脉粥样硬化可能引发顽固性高血压、肾功能不全等症;下肢动脉粥样硬化可能引发跛行、坏疽症状^[9]。围绕 AS 的发生先后提出了很多学术意见,目前普遍认为 AS 是一种慢性炎症性疾病,由内皮细

胞开启,过量低密度脂蛋白胆固醇聚集在血管皮下,导致白细胞渗出,血管平滑肌细胞增殖形成的病理性炎症反应过程。白细胞介素 6/ 信号转导子和转录活化子 3(IL-6/STAT3)信号通路,参与体内 AS 形成的病理生理反应,是具有治疗靶点潜力的细胞蛋白调节因子,主要分为促炎和抗炎性两类^[5-6]。

IL-6 是白细胞介素的一种,该物质广泛存在于机体内,包括多种淋巴及非淋巴细胞均可分泌 IL-6,如上皮细胞、血管内皮细胞、B 细胞、T 细胞等^[7]。这些细胞在分泌 IL-6 时可受多种因素调节,如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factors,TNF- α)、IL-1 可增强呈纤维细胞合成 IL-6;IL-4、糖皮质激素可促进单核巨噬细胞合成 IL-6 等。具有增强免疫反应细胞增殖、分化能力,并提高其功能的效用^[8-9]。STAT3 及 Janus 激酶信号通路是多种炎症因子的激活途径,该信号途径与丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路共同参与、介导了多种细胞的反应,对炎症发生、发展具有重要调节作用^[10]。

中医理论中动脉粥样硬化与痹症有关,患者多因阳气不足,水气痰饮及阴邪居于阳位,血痰互瘀,梗阻经脉,不通则痛,故治疗需以化痰活血、化痰通络及清热解毒为主^[9]。桂枝提取物是中医常用血寒经闭、痰饮、心悸、关节痹痛及风寒感冒治疗药物,本品性温,味辛、甘,归心、肺和膀胱经,具有发汗解肌、助阳化气及温通经脉值疗效,故临床常用于治疗 AS。

为分析桂枝提取物对动脉粥样硬化 AS 大鼠白细胞介素 6/ 信号转导子和转录活化子 3(IL-6/STAT3)信号通路的影响,笔者进行了本次研究。本研究发现空白模型组腹主动脉血管 IL-6 表达显著升高,桂枝提取物组 IL-6 的水平显著降低。且空白模型大鼠腹主动脉血管 IL-6 mRNA 的表达显著升高,桂枝提取物组 IL-6 mRNA 的表达显著降低,这表明 IL-6 是动脉粥样硬化病变的重要参与因子,而桂枝提取物质量可显著降低大鼠 IL-6 含量,改善大鼠症状。同时本研究还发现与空白模型组腹主动脉 p-JAK1 阳性表达率显著提高,p-STAT3 阳性表达率显著降低,且与空白模型组比较,桂枝提取物组 p-JAK1 阳性表达率显著降低,p-STAT3 阳性表达率显著升高,这表明桂枝提取物可通过 JAK1/ STAT3 信号途径抵抗动脉粥样硬化。

综上所述,桂枝提取物是一种有效的抗动脉粥样硬化药物,其可调节 TLR4、LXR、JNK、p38MAPK、

ERK1/2、NF- κ B 及 IL-6 等细胞因子的表达, 并影响 JAK2/STAT3 通路。

参 考 文 献:

- [1] 刘荣乐, 李剑, 倪唤春, 等. 组织因子途径抑制物 2(TFPI-2)基因多态性与急性冠脉综合征的关联性[J]. 复旦学报(医学版), 2013, 40(06): 685-693.
- [2] QUAN J X, LIU J, GAO X B. Palmitate induces interleukin-8 expression in human aortic vascular smooth muscle cells via Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B pathway (TLR4/NF- κ B-8) [J]. Journal of Diabetes, 2014, 6(1): 33-41.
- [3] 严优苻, 钟伟健, 郭丽冰. GC-MS 分析桂枝汤不同配伍对桂枝挥发油成分的影响[J]. 中药材, 2012, 35(3): 410-415.
- [4] 何本鸿, 张介眉, 朱旭, 等. 葱白提取物纳米乳口腔喷雾剂对急性心肌缺血兔心电图及心肌梗死面积的影响 [J]. 内科急危重症杂志, 2011, 17(4): 232-235.
- [5] 张介眉, 张耕, 都建军, 等. 葱白提取物纳米乳对急性心肌缺血兔血清 NO 和 TnT 水平的影响[J]. 中西医结合研究, 2011, 3(2): 72-75.
- [6] LEE H S, HATTORI T, PARK E Y, et al. Expression of toll-like receptor 4 contributes to corneal inflammation in experimental dry eye disease[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2012, 53(9): 5632-5640.
- [7] 闫承慧, 栾波, 黄明方, 等. CREG 调控 IGF2R/IGFII 内吞抑制人血管平滑肌细胞增殖[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(9): 1676-1681.
- [8] 陆冬晓, 韩敦正, 陆东风. 白藜芦醇对糖尿病下肢缺血大鼠微血管新生的影响[J]. 广东医学, 2013, 34(13): 1986-1989.
- [9] 李冀, 于海, 李胜志, 等. 桂枝甘草汤及其提取物组分对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用的研究[J]. 中医药信息, 2011, 28(1): 27-29.
- [10] 毛敬洁, 李钻芳, 黄佳, 等. 栝楼桂枝汤醇提物对氧化应激 PC12 细胞内 Nrf2 和 HO-1mRNA 表达的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2013, 8(6): 563-566.

(王荣兵 编辑)