

# 基于 JAK-STAT+SOCS 负反馈调节信号通路探讨 眩晕方对神经根型颈椎病大鼠镇痛作用的机制研究

蒋 锦, 陆培春, 刘 琴, 徐 静

(江苏大学附属医院 麻醉科, 江苏 镇江 212000)

**摘要:**目的:基于 JAK-STAT/SOCS 负反馈调节信号通路探讨眩晕方对神经根型颈椎病(cervical spondylotic radiculopathy, CSR)大鼠镇痛作用的机制研究。方法:采用随机、双盲、药物有效治疗对照的方法,构建大鼠急性 CSR 模型,观察实验动物的行为和体征。采用酶联免疫吸附实验法检测 IL-6 和 PGE2 含量;采用免疫共沉淀法(co-Immunoprecipitation)检测脊髓组织中 SOCS1-JAK1、SOCS3-STAT3 蛋白相互作用。结果:假手术组大鼠精神良好、活动灵、足爪未见肿胀、体重增长平稳。造模后大鼠进食明显减少,活动量减低,反应迟钝,毛发暗淡无光,双后足肿胀、溃烂。而治疗组大鼠行为和体征较前改善。相比假手术组,模型组大鼠机械痛阈下降、步态评分升高、IL-6 和 PGE2 水平均显著升高,差异有统计学意义;而相比模型组,治疗组大鼠机械痛阈升高、步态评分降低、IL-6 和 PGE2 水平均显著下降,差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。免疫共沉淀结果发现 SOCS1 和 STAT3 与 JAK1 相互作用。结论:眩晕方能够对 CSR 大鼠具有明显镇痛作用,其机制可能是通过 JAK-STAT 信号通路与 SOCS 交互作用,进而减少炎症因子,从而达到镇痛作用。本研究从 JAK-STAT/SOCS 负反馈调节信号通路的新思路出发,为阐明眩晕方对大鼠镇痛作用的机制提供临床循证依据。

**关键词:**眩晕方;神经根型颈椎病;SOCS;JAK-STAT 信号通路;负反馈调节;镇痛作用;CSR 模型;炎症因子

中图分类号: R72

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2020)06-0648-04

颈椎病(cervical spondylosis)是一种常见病、多发病,导致脊柱内外组织结构平衡失调并刺激或压迫周围组织结构(血管、神经根、交感神经和脊髓),进而诱发一系列症状,如头痛、肩背疼痛、麻木、无力感等。其多归因于颈椎间盘退变、颈椎骨质增生以及颈部外伤劳损或先天骨发育异常。颈椎病近年来发病率逐年升高,预防和治疗颈椎病已成为全球共同关注和解决的问题之一。神经根型颈椎病(cervical spondylotic radiculopathy, CSR)是颈椎病的常见表型<sup>[1,2]</sup>;神经根性疼痛是 CSR 患者的典型症状<sup>[3]</sup>。CSR 的发病可归因于颈椎间盘突出、椎后小关节增生退变压迫背根神经节及神经根<sup>[4,5]</sup>。

JAK 是一类胞质内非受体型可溶性酪氨酸蛋白激酶。该家族四大成员中的 JAK1、JAK2 和 TYK2 广泛存在于各种组织和细胞中,而另一成员 JAK3 仅存在于骨髓和淋巴系统<sup>[6]</sup>。此外,STAT 是一种能够结合于 DNA 的独特蛋白家族,发挥转录调控作用<sup>[7]</sup>。JAK/STAT 负调节主要涉及以下三个负调节因子:细胞因子信号转导抑制蛋白(suppressors of cy-

tokine signaling, SOCS)、活化 STATs 蛋白抑制因子、蛋白酪氨酸磷酸酶<sup>[8]</sup>。其中 SOCS 家族是 1997 年以来发现的 JAK/STAT 信号转导通路负调控因子,其成员包括 CIS 和 SOCS1-7。SOCS1 和 SOCS3 是 SOCS 家族中的重要成员,是先天性和适应性免疫应答关键性生理调节因子,参与广泛的生物学过程。此外,二者也是 JAK 激酶和 STAT 信号转导通路中重要抑制因子<sup>[9]</sup>,通过负性调节阻止细胞的恶性转化及凋亡抑制。研究<sup>[10]</sup>发现,SOCS3 与 STAT3 在胃癌组织中的表达呈负相关性。

此外,眩晕方是基于半夏白术天麻汤加减的经验方<sup>[11]</sup>,包括药物当归、川芎、丹参、葛根、白芍、熟地、白术、茯苓、泽泻、菖蒲、磁石、桂枝。该自拟方在活血通络、改善微循环缺血、除烦安神、中枢镇惊镇疼、抑制急性炎症水肿等方面作用显著。鉴于此,本研究基于 JAK-STAT/SOCS 负反馈调节信号通路探讨眩晕方对 CSR 大鼠镇痛作用的机制研究。

## 1 材料与方法

收稿日期: 2020-06-10; 修回日期: 2020-10-11

作者简介: 蒋锦(1949-),女,江苏大学附属医院麻醉科住院医师。

### 1.1 实验动物和分组

本实验动物为购自上海斯莱克实验动物有限责任公司的Sprague-Dawley健康雄性大鼠(66只,6周龄,体重160~200g),饲养于SPF级动物室。所有实验大鼠均饲养于恒温、恒湿环境,使用人工照明,每天白天12h,夜间12h(08:00~20:00),允许自由饮水及进食。适应性喂养1周后,采用随机数字表法,将66只大鼠随机分为假手术组(正常对照)、模型组(CSR大鼠模型构建)、治疗组(我院自拟眩晕方药物治疗),每组22只。

### 1.2 实验造模

腹腔注射10%水合氯醛3mL/kg麻醉大鼠。俯卧位固定,常规消毒后,手触下颈部附近最高棘突(T2),以第2胸椎棘突为标记,以颈7为中心,沿棘突纵行切开皮肤及皮下组织、颈后部肌群,直至C6~T2椎弓充分暴露,暴露棘突及两侧椎板,用眼科剪刀剪断颈6~7两侧横突以上椎板,暴露出椎管内脊髓,显露出左侧颈6、7神经根,使用尼龙渔线(约1.5cm长,直径0.5mm)诱导颈神经根炎症,建立CSR模型。术后常规庆大霉素注射,连续3天。假手术组动物仅钳开C7椎板,暴露脊髓,无插线处理。手术完成后,待动物于SPF恒温房内苏醒。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 大鼠干预方法** 假手术组:正常饮食和饮水,无任何干预处置。造模后第3天开始干预,模型组每日抓取1次,无药物干预处置;治疗组予以我院自拟眩晕方,药物如下:当归15g、川芎12g、丹参15g、葛根12g、白芍15g、熟地15g、白术15g、茯苓12g、泽泻18g、菖蒲9g、磁石15g、桂枝6g。水煎至200mL,分为两袋,早晚餐后半小时各1袋。

**1.3.2 实验动物行为和体征观察** CSR大鼠模型建立后,观察行为学变化,如大鼠的精神状态、体重变化、活动度、关节肿胀度、毛色毛质、死亡情况等。

**1.3.3 机械痛阈测定和步态评估** 干预7天后,采用YLS-3E型痛分析仪对各组大鼠进行机械痛阈测定。同时,观察大鼠行走及休息时的步态,参照Kawakami等法对大鼠疼痛所致步态障碍进行评估,采用计分制(1分=正常步态、足无畸形;2分=正常步态,伴足内收蜷缩畸形;3分=轻度步态障碍;4分=严重步态障碍)。

**1.3.4 酶联免疫吸附实验(ELISA)法检测** 各组大鼠IL-6、PGE2含量 干预7天后,采用10%水合氯醛麻醉大鼠致死,取压线处脊髓及神经根组织,制成组织匀浆。按ELISA试剂盒操作方法,采用ELISA法

分别检测IL-6、PGE2含量。反应结束后30min内,采用酶标仪在450nm处读取OD值。

**1.3.4 免疫共沉淀法检测** SOCS1与JAK1、SOCS3与STAT3蛋白相互作用如上述操作,取组织制成组织匀浆。离心后加入RIPA裂解液裂解细胞,冰上赋予后低温离心10min;取上清液,加入SOCS与JAK1、SOCS3与STAT3抗体,4℃孵育过夜。免疫共沉淀法检测SOCS1与JAK1、SOCS3与STAT3蛋白相互作用。

### 1.4 统计学分析

本研究基于SPSS 21.0统计软件(SPSS Inc, Chicago, USA)进行统计学分析。计量数据采用平均值±标准差的数据表示形式,两组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠动物行为和体征观察

假手术组大鼠精神良好,进食良,喜动,活动灵活,反应敏捷,皮毛光亮,舌质淡红,尾色正常,足爪未见肿胀,体重增长平稳。造模后观察发现,模型组大鼠进食明显减少,活动量减低,反应迟钝,毛发暗淡无光,双后足肿胀、溃烂,走路微跛,触碰时躲避并嘶叫伴弓背蜷缩,体重增加不显著。而治疗组大鼠毛色光泽及进食量均较前改善,活动量增加,双后足肿胀溃烂及跛行症状减轻,体重增长恢复平稳。

### 2.2 各组大鼠机械痛阈测定

组间检验结果提示:相比假手术组,模型组大鼠机械痛阈下降,差异有统计学意义;而相比模型组,治疗组大鼠机械痛阈升高,差异有统计学意义(均 $P<0.05$ )(见表1)。

表1 各组大鼠机械痛阈测定对比

组别	假手术组	模型组	治疗组
机械痛阈	762.05 ± 122.56	512.80 ± 101.54*	691.47 ± 125.28#

注:与假手术组相比,\* $P<0.05$ ;与模型组相比,# $P<0.05$

### 2.3 各组大鼠步态评分比较

组间检验结果提示:相比假手术组,模型组大鼠步态评分升高,差异有统计学意义;而相比模型组,治疗组大鼠步态评分降低,差异有统计学意义(均 $P<0.05$ )(见表2)。

表2 各组大鼠步态评分对比

组别	假手术组	模型组	治疗组
步态评分	1.00 ± 0.00	3.25 ± 0.45*	1.25 ± 0.26#

注:与假手术组相比,\*P<0.05;与模型组相比,#P<0.05

### 2.4 ELISA法检测各组大鼠IL-6、PGE2含量

与假手术组相比:模型组IL-6和PGE2水平均显著提升,差异有统计学意义(均P<0.05);而相比模型组,治疗组IL-6和PGE2水平均显著下降,差异有统计学意义(均P<0.05)(见表3)。

表3 各组大鼠IL-6、PGE2含量对比

组别	假手术组	模型组	治疗组
IL-6	41.65 ± 5.23	114.75 ± 24.00*	54.82 ± 6.08#
PGE2	22.67 ± 3.88	48.09 ± 5.10*	27.14 ± 3.12#

注:与假手术组相比,\*P<0.05;与模型组相比,#P<0.05

### 2.5 免疫共沉淀法检测SOCS1与JAK1、SOCS3与STAT3蛋白相互作用

SOCS1和STAT3抗体的免疫沉淀细胞裂解液中条带与input阳性对照细胞液中的条带一致,存在JAK1;而阴性对照液细胞裂解液中未出现特异性条带,不存在JAK1和SOCS3;提示JAK1和SOCS3的成功表达。以上结果说明通过SOCS1抗体沉淀的细胞裂解液中含有JAK1,STAT3抗体沉淀的细胞裂解液中含有SOCS3,因此SOCS1与JAK1、SOCS3与STAT3存在结合。

## 3 讨论

本研究之初已发现炎症因子的介导在CSR急性期根性疼的发生、发展和缓解中有重要意义<sup>[12]</sup>。采用颈椎插线法构建CSR大鼠模型,可准确反映颈神经根炎症反应的变化过程,且方法简单,结果可靠,实验周期短,可重复性好。此外,眩晕方是基于半夏白术天麻汤加减的经验方,具有行气活血通络功效。该项研究从JAK-STAT/SOCS负反馈调节信号通路的新思路出发,构建大鼠CSR模型,重点脊髓组织中SOCS1-JAK1、SOCS3-STAT3蛋白相互作用的检测,探讨眩晕方对CSR的治疗意义,以期提出新型治疗理论以指导眩晕方的临床应用,为阐明眩晕方对大鼠镇痛作用的机制提供临床循证依据。

本研究将66只大鼠适应性喂养7天,用随机数字表法抽取22只分为假手术组、造模组、治疗组。

各组大鼠动物行为和体征观察结果显示,相比假手术组大鼠行为和体征表现正常,造模后大鼠进食明显减少,活动量减低,反应迟钝,毛发暗淡无光,双后足肿胀、溃烂;而治疗组大鼠毛色、进食量、活动量、双后足肿胀、和体重均明显恢复,初步提示眩晕方在改善CSR大鼠症状的作用。随后本研究进一步评估并对比各组大鼠机械痛阈和步态评分结果,提示相较假手术组,模型组大鼠机械痛阈下降、步态评分升高,而治疗组大鼠机械痛阈升高、步态评分降低。为明晰其作用机制,本研究采用ELISA法检测各组大鼠IL-6、PGE2含量。ELISA具有快速、灵敏、简便、载体易于标准化等优点。其测定的对象可以是抗体也可以是抗原,故在本实验中检测IL-6、PGE2具有可行性。结果提示与假手术组相比,模型组呈上升趋势,而与模型组相比,治疗组前述指标呈下降趋势。同时,免疫共沉淀是确定两蛋白质在完整细胞内生理性相互作用的有效方法。本实验中检测SOCS1-JAK1和SOCS3-STAT3蛋白相互作用可采用此方法。结果发现SOCS1抗体沉淀的细胞裂解液中含有JAK1,STAT3抗体沉淀的细胞裂解液中含有SOCS3,提示SOCS1与JAK1、SOCS3与STAT3存在结合。

就其机制而言,JAK-STAT信号通路在发挥信号转导作用的同时,可发挥负反馈调节功能,调控通路平衡<sup>[13]</sup>。SOCS是JAK/STAT的负调节的主要负调节因子。本院自拟眩晕方中川芎行气活血通络<sup>[14]</sup>;葛根有退热、升阳、生津作用;当归补血活血通络<sup>[15]</sup>;丹参养血活血通络,除烦安神,并镇惊镇疼;白芍养血敛阴,平抑肝阳。白术、云苓、泽泻相配,健脾利水、消肿降浊功能增强;菖蒲开窍醒神,化湿和胃,宁神益智;磁石镇惊安神,平肝潜阳,两药相配安神作用增强。桂枝温阳通脉,其与白芍相合,可强心利尿镇静。因此,该方机制可能与降低炎症因子IL-6、PGE2含量,依赖SOCS负反馈调节因子调控JAK-STAT信号通路相关。

本研究创新性地基于JAK-STAT/SOCS负反馈调节信号通路,来讨论眩晕方对CSR大鼠镇痛作用的机制研究,JAK/STAT信号通路是一条重要信号转导途径,而SOCS家族主要作用在于负反馈调节该通路。本研究通过探论眩晕方对以上通路的作用,为缓解CSR患者的疼痛提供新思路。

综上所述,眩晕方能够对CSR大鼠具有明显镇痛作用,其机制与JAK-STAT信号通路与SOCS的交互作用,进而降低炎症因子水平相关。本研究为深

入探讨 CSR 分子治疗途径提供一定理论基础。我们期望未来在动物实验基础上开展临床实验,促进下一步眩晕方生产的开展,造福 CSR 患者。

## 参考文献

- [1] STOCKS S J, MCNAMEE R, MOLEN H F V D, et al. Trends in incidence of occupational asthma, contact dermatitis, noise-induced hearing loss, carpal tunnel syndrome and upper limb musculoskeletal disorders in European countries from 2000 to 2012 [J]. *Occupational & Environmental Medicine*, 2015;72(4): 294-303
- [2] KULIN J, REASTON M R. Musculoskeletal disorders early diagnosis: A retrospective study in the occupational medicine setting [J]. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 6, 1(2011-01-05), 2011;6(1): 1-6
- [3] 魏戎,高云,张兴平,等.基于临床科研信息共享系统的神经根型颈椎病发病特征分析[J]. *中医杂志*, 2015;56(19): 1663-1666
- [4] Corey DL, Comeau D. Cervical radiculopathy. *Med Clin North Am*. 2014;98(4):791-799
- [5] Bono CM, Ghiselli G, Gilbert TJ, et al. An evidence-based clinical guideline for the diagnosis and treatment of cervical radiculopathy from degenerative disorders. *Spine J*. 2011; 11(1):64-72
- [6] Schoenfeld AJ, George AA, Bader JO, et al. Incidence and epidemiology of cervical radiculopathy in the United States military: 2000 to 2009. *J Spinal Disord Tech*. 2012;25(1):17
- [7] 李红光,赵利红,张振华,等.黏蛋白1基因调控酪氨酸蛋白激酶/信号转导与转录激活因子3信号通路抑制甲状腺癌细胞增殖及促进细胞凋亡机制[J]. *中华实验外科杂志*, 2017;34(11):1889-1891
- [8] 张旭,陈俊国,章爱莲,等.慢病毒介导细胞因子信号转导抑制因子3基因沉默对糖尿病大鼠胰岛素信号通路的影响[J]. *中国糖尿病杂志*, 2017;9(12):779-781
- [9] Inagaki-Ohara K, Kondo T, Ito M, et al. SOCS, inflammation, and cancer [J]. *JAKSTAT*, 2013;2(3): e24053
- [10] 程勇,张谢夫,赵春临,等.胃癌组织中SOCS3与STAT3 mRNA的表达[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2011;46(3): 468-470
- [11] 曾浪泉.葛根汤联合半夏白术天麻汤加减治疗耳源性、颈源性眩晕的疗效观察[J]. *中医临床研究*, 2019;11(1):105-106
- [12] 王勤俭,王燕,董良杰,等.防风汤加减结合项三针治疗神经根型颈椎病的临床研究[J]. *南京中医药大学学报*, 2019;35(3):270-274
- [13] Man-Qing Liu, Min Zhao, Wen-Hua Kong, et al. Combination antiretroviral therapy (cART) restores HIV-1 infection-mediated impairment of JAK-STAT signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2017;8(14):22524-22533
- [14] 王艳.眩晕汤治疗眩晕症临床疗效观察[J]. *亚太传统医药*, 2015;(5):102-103
- [15] 朱立,赵进喜,贾海忠,等.当归川芎活血通经,桃仁牡丹皮凉血散瘀[J]. *环球中医药*, 2019;12(8):1197-1200

(上接第644页)

恢复到正常肤质,给病人提供一个良好的治疗效果,大部分病人可直接从红斑期过渡为正常肤质,最大限度减轻甚至避免了色素沉着期病人在工作、生活、社交、心理上的不便;使面部烧伤病人能更早回归社会、投入工作。

## 参考文献

- [1] 朱哲,孙瑜,周浩,等.烧伤后色素沉着和色素脱失的临床治疗研究进展 [J]. *中华烧伤杂志*, 2020;36(07): 615-619
- [2] 张红艳,吕志红,黄开俊,等.强脉冲光在预防深Ⅱ度烧伤患者皮肤色素沉着的应用 [J]. *中华医学美容美容杂志*, 2007;13(03):152-154
- [3] 张媛媛,卢军玲海.皮肤康复综合治疗在面部浅Ⅱ度烧伤愈后色素沉着治疗中的临床应用 [J/CD]. *中华损伤与修复杂志: 电子版*, 2011;6(1): 130-133
- [4] 杨维琦,夏美华,张雁聘,等.强脉冲光对预防面部烧伤创面色素沉着的临床疗效观察 [J]. *中国激光医学杂志*, 2013; 22(01): 35-37
- [5] 张志,李孝建,梁达荣,等.壬二酸和维A酸治疗面部烧伤后色素沉着的疗效观察 [J]. *医学研究生学报*, 2006(09): 39-41
- [6] MATTOS K P H, CINTRA M L, GOUV A I R, et al. Skin hyperpigmentation following intravenous polymyxin B treatment associated with melanocyte activation and inflammatory process [J]. *Journal of Clinical Pharmacy & Therapeutics*, 2017;42(5):573-578
- [7] 李敬,于霖,韩凤娟,等.准长脉宽 1064 nm Nd:YAG 激光联合超分子水杨酸治疗面部轻度痤疮的临床疗效观察 [J]. *中国中西医结合皮肤性病学杂志*, 2020;19(01):68-71