网络出版时间: 2020-9-8 11:02 网络出版地址: https://kns. cnki. net/kcms/detail/34. 1065. R. 20200903. 1447. 003. html

三叉神经痛模型大鼠的三叉神经节中 JAK/STAT3 通路的活化

摘要 目的 检测用眶下神经缩窄术建立的大鼠三叉神经 痛(TN)模型中三叉神经节(TG)内 pSTAT3 蛋白表达的变化 及其定位的细胞类型。方法 随机将成年雄性 SD 大鼠分 成两组: 眶下神经缩窄术组(CCI-ION 组)和假手术组(Sham 组),用 Von Frey 毛刷检测两组大鼠的机械敏感阈值。通过 Western blot 检测术后 TG内 pSTAT3 蛋白表达量变化,并用 免疫荧光实验观察 pSTAT3 的荧光染色情况及其定位细胞 类型。结果 CCI-ION 组大鼠在术后第1~14 天出现机械 敏感阈值的显著降低(P < 0.05)。CCI-ION 组内大鼠 TG 的 pSTAT3 蛋白表达量相较于 Sham 组大鼠明显升高(P < 0.05)。CCI-ION 组大鼠 pSTAT3 的荧光染色亦明显强于 Sham 组 行免疫荧光双染实验发现 pSTAT3 定位于大鼠 TG 的小胶质细胞内而非卫星胶质细胞或神经元细胞内。结论

在 TN 模型大鼠的 TG 小胶质细胞内有 JAK/STAT3 通路的活化。

关键词 三叉神经痛; 眶下神经缩窄术; JAK/STAT3; pSTAT3; 三叉神经节

中图分类号 R 745.11

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2020) 10 - 1487 - 04 doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2020.10.002

JAK 激酶/信号转导和转录激活因子信号 STAT3 转导通路是一条从膜到核的信号转导通路, 能在多种病理生理过程发挥重要作用^[1]。其主要 由 JAK 蛋白酪氨酸激酶和 STAT3 蛋白连接蛋白两 部分组成,能在细胞因子诱导下被活化从而调节目 的基因的表达^[2]。JAK/STAT3 通路能在许多细胞 类型中被与损伤反应有关的细胞因子激活,因此在 疼痛信息的传递和调节中发挥着重要作用^[3]。神 经性疼痛的发展也伴随着炎症成分的释放,可引发

2020-05-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81271162); 安徽省科技攻关计 划项目(编号: 1401045013); 安徽省重点研究和开发计划 项目(编号: 201904a07020062); 安徽省重点研究与开发计 划项目(编号: 1704f0804025)

作者单位: 安徽医科大学口腔医学院, 合肥 230032

作者简介:张 瑶,女,硕士研究生;

王元银,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,Email: wyy1970548@ sohu.com;

侯爱兵,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,Email: houaibing@ sina. com 神经损伤并由各种信号通路传递信息从而引发更加 广泛和持久的效应,这些均可能使疼痛过敏增 强^[4]。脊神经损伤(建立脊神经缩窄动物模型)后 脊髓中有 pSTAT3、白介素(IL)-6、IL-1β蛋白的表达 上调,而在给予 JAK/STAT 通路抑制剂后 IL-6、IL-1β的表达则明显减低并伴随机械痛敏的减弱^[5],提 示 JAK/STAT 通路在神经性疼痛的免疫炎症反应中 有着重要作用。而有关三叉神经痛(trigeminal neuralgia, TN)模型大鼠的三叉神经节(trigeminal ganglion, TG)中有无 JAK/STAT3 通路的活化尚无研究 涉及 因此该研究旨在通过成功建立大鼠 TN 模型, 使用 Western blot、免疫荧光方法检测 pSTAT3 在 TN 大鼠 TG 中的变化情况,为探讨有效的 TN 治疗方法 提供新的方向。

1 材料与方法

 1.1 实验动物 选取体质量为 120 g 左右的成年 雄性 SD 大鼠,常规饲料饲养,自由饮水进食,室内 环境温度控制在 20~25 ℃,12 h 交替照明。造模前 对所有大鼠进行 Von Frey 毛刷的刺激训练练习,在 每日基本固定的时间段内(避免在下午5点以后进 行,否则大鼠比较活跃测量不准确)交替刺激大鼠 双侧触须垫区域约6次,刺激间隔 30~60 s,持续3 ~5 d 后记录每只大鼠在此期间的平均机械阈值, 剔除对刺激异常敏感(<0.6 g)及过于迟钝(>1.8 g)的大鼠,使得最后选出用于造模的大鼠健康且对 一定机械强度下的刺激反应平静,依照动物伦理学 的原则进行所有的动物实验和处理。实验所用大鼠 均来自安徽医科大学实验动物中心。

1.2 实验模型建立 将 32 只雄性 SD 大鼠按照随 机分组的原则将其分成 2 组,即假手术组(Sham 组) 16 只,眶下神经缩窄组(CCI-ION 组) 16 只。称 重后 按照每 100 g 体质量给予 0.38 ml 10% 水合 氯醛的比例对大鼠行腹腔注射麻醉。待麻醉显效 后 将大鼠放置于消毒铺巾后的操作台上,对拟操作 的术区用 0.5% 碘伏消毒,沿大鼠左侧颧骨下缘胡 须垫区稍偏内侧做约 5 mm 长的手术切口,纹氏钳 略扩大手术切口后向下钝性分离组织,用玻璃分针 • 1488 •

轻柔的显露出约3 mm 长度的眶下神经,注意操作 轻柔,最后用5-0号线在相距2~3 mm 处分别结 扎眶下神经使其轻微压迫,缝合皮肤创口并涂抹金 霉素软膏预防感染;对于 Sham 组行手术切口的部 位及前期方法相同,而在玻璃分针显露出眶下神经 后不予以结扎,仅缝合皮肤切口并涂抹金霉素软膏 完成造模。最后分别将 Sham 组与 CCI-ION 组模型 大鼠置入不同的鼠笼中并备注相应标签后继续常规 饲养。

1.3 实验模型验证 使大鼠在安静环境下稳定 15 min 后,用 Von Frey 毛刷从最小的刺激力度开始依次增大刺激大鼠的术侧胡须垫区进行检测,每个刺激力度的检测需重复6次,每次间隔 30 s,直至大鼠出现以下阳性反应:逃避或攻击以及不对称的面部 搔抓行为中的至少1项,此时记录下出现阳性反应的最小刺激力度即为机械敏感阈值。实验大鼠分别 在术前和术后 1、2、3、4、6、8、10、12、14 d 时记录阈 值并统计分析。

1.4 Western blot 法检测 pSTAT3 蛋白含量 将 未行任何手术操作的 Naive 大鼠和建模后第 3、7 天 的大鼠采用 10% 水合氯醛腹腔注射过量麻醉致死, 遂立即于冰上分离取出术侧 TG 并编号称重,于冰 浴的玻璃匀浆器内按照 1 mg 组织加入 10 μl RIPA 裂解液的比例在剪碎神经节后进行研磨,待无肉眼 可见大块组织后,于4℃、12 000 r/min 的条件下离 心 30 min; 取上清液按照比例加入蛋白上样缓冲液, 于100 ℃条件下加热10 min 使蛋白充分变性 最后 置于 - 20 ℃冰箱内储存备用。上样行 SDS 凝胶电 泳后将目的蛋白转移到 PVDF 膜上, TBST 溶液漂洗 3次每次约5 min 后 将 PVDF 膜置于 5% 脱脂牛奶 中室温下封闭1h。用一抗稀液稀释一抗(pSTAT3-Tyr705:1:10 000 美国 Abcam 公司 货号 ab76315; GAPDH: 1 : 10 000,美国 Bioworld 公司,货号 AP0063) 随后将 PVDF 膜置入并于 4 ℃ 摇床孵育 过夜。将充分漂洗后的 PVDF 膜置于已稀释好的二 抗中室温孵育1h。最后将漂洗后的膜置于显影机 内设置条件曝光成像 采用 Image J 图像处理系统分 析目的蛋白的相对表达水平。

1.5 免疫荧光实验 将 Sham 组大鼠与建模后第 2 天的 CCI-ION 大鼠用前述方法取出术侧 TG 后于 4 ℃冰箱内梯度脱水固定 TG(分别置于 4% 多聚甲醛 溶液中 20 min , 10% 蔗糖溶液、20% 蔗糖溶液中各 2 h , 30% 蔗糖液中过夜),取出后用组织包埋剂于 -20 ℃环境下包埋 TG ,在冰冻切片机上切片后于

-20 ℃冰箱内保存待用,取出的冰冻切片复温15 min 后于 PBS 中洗胶后用配置好的含有山羊血清的 PBST 封闭液于室温条件下封闭 2 h,充分漂洗后将 按照比例稀释后的一抗加于组织玻片上 [pSTAT3-Tyr705: ab76315,1:100; 免抗 GFAP: ab7260,1: 1 000; 兔抗 NeuN: ab177487 ,1 : 300; 鼠抗 CD11b (ITGAM): ab8878,1:200) (美国 Abcam 公司); 鼠 抗 pSTAT3-Tyr705: #4113 ,1: 100(美国 Cell Signaling Technology 公司)],置于4℃冰箱内孵育过夜 后取出 漂洗残余的一抗孵育液后用封闭液稀释二 抗(山羊抗小鼠 IgG/TRITC(ZF0313)、山羊抗兔 IgG/FITC(ZF0311):1:100,北京中杉金桥科技有 限公司) 室温下暗箱内避光孵育2h 后于 PBS 液中 漂洗 避光黑暗环境下滴加防荧光淬灭液后置盖玻 片固定,并放置于-20℃冰箱内避光保存待用。 1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 行为学实验结果和 Western blot 结果采用重复测量 设计的方差分析,以 P < 0.05 为差异有统计学意 义。

2 结果

2.1 行为学实验结果 Von Frey 毛刷测定结果显示 CCI-ION 组大鼠的机械敏感阈值明显低于 Sham 组大鼠。术后第1天 CCI-ION 组大鼠机械敏感阈值 即开始降低 [Sham 组: (1.55±0.22) g, CCI-ION 组: (0.35±0.21) g],在第14天时疼痛阈值达到最低 [Sham 组: (1.53±0.04) g, CCI-ION 组: (0.10± 0.04) g, F = 25.13 P < 0.05](图1)。



图 1 各组大鼠触须垫在造模后不同时间点机械敏感阈值的变化 与 Sham 组比较: *** P < 0.001

2.2 pSTAT3 蛋白在 TG 中的表达变化 Western blot 结果显示 ,CCI-ION 组大鼠 TG 中 pSTAT3 蛋白 相对表达量在术后第 3、7 天时较 Sham 组大鼠均明 显增高 ,差异有统计学意义(*F* = 64. 37 ,*P* < 0. 05)。

见图2。



图 2 pSTAT3 蛋白在 CCIHON 组大鼠术侧 TG 中的表达变化 与 Sham 组(0 d) 比较: *** P < 0. 001

2.3 pSTAT3 蛋白的免疫荧光表达及其定位 在 术后第 2 天的术侧 TG 内 ,CCI-ION 组大鼠可见大量 的 pSTAT3 绿色荧光(图 3A2)而在 Sham 组大鼠 pSTAT3 标记的绿色荧光则很少(图 3A1)。在分别 行 pSTAT3 与 GFAP(卫星胶质细胞标志物)、ITGAM (小胶质细胞标志物)、Neun(神经元细胞标志物)的 免疫荧光双染实验后发现,在术后第 2 天,pSTAT3 仅与 ITGAM 有大量的共染(图 3B3 中表现为黄色 的共染区),而与 GFAP 无共染(图 3C),与 Neun 亦 无共染(图 3D),提示活化的 pSTAT3 定位于小胶质 细胞内。比例尺均为 50 μm。

3 讨论

TN 是一种严重的慢性疼痛综合征 在三叉神经 的一个或多个分支的口面部区域内出现严重的、短 暂的、阵发性的电击样疼痛,常由接触"扳机点"引 发,发病率为4%~13%^[6]。目前其具体发病机制 尚不完全清楚,周围致病因素认为是 TG 及脑桥区 的异常压迫引起的,而中枢发病机制理论则认为 TN 是一种感觉性癫痫样发作^[7]。针对其完全有效的 理想治疗方法尚未被发现,现阶段对 TN 的经典治 疗手段主要是卡马西平、奥卡西平等抗癫痫药,但是 治疗后复发率仍较高^[8]。因此阐明 TN 的有关分子 生物学发病机制对进一步探究其有效的治疗方法是 必需的。

用 CCI-ION 术建立TN模型是由 Vos et al^[9]于



图 3 术后第 2 天的术侧 TG 内 pSTAT3 的免疫荧光表达及其定位 A: 大鼠术侧 TG 中 pSTAT3 蛋白(绿色) 的免疫荧光表达情况 × 40; 1: Sham 组; 2: CCI-ION 组; B: CCI-ION 组大鼠术侧 TG 内免疫荧 光图 ×100; 1: pSTAT3; 2: ITGAM; 3: 两者叠加后; C: TG 中 pSTAT3 与 GFAP 的荧光双染图 ×100; D: TG 中 pSTAT3 与 Neun 的荧光双染 图 ×100

1994 年首次提出的一种经典的造模方法,其能有效 模拟出 TN 的自发性疼痛及痛觉过敏两大方面,其 中大鼠胡须垫区的机械阈值测定是判断造模有无成 功的标准。近年来 研究^[5]显示 STAT3 通路的活化 参与了外周神经损伤后脊髓内痛觉信息的传递和调 节。此外 在糖尿病神经性痛及奥利沙铂引发神经 性疼痛的大鼠模型中亦观察到 JAK/STAT3 通路的 活化^[1,10]。神经系统中胶质细胞是除神经元外的第 二大主要成分,外周神经系统(PNS)中的胶质细胞 主要由卫星胶质细胞、施万细胞和小胶质细胞组 成^[11]。本研究中 CCIHON 术后第 2 天的免疫荧光 实验发现 pSTAT3 定位于 TG 中的小胶质细胞上 这 与 Dominguez et al^[5]在脊神经损伤模型中的观察结 果相似。然而,有报道^[12-13]表明,除了小胶质细胞 外 上调的 pSTAT3 还存在于其他类型的细胞中 这 种差异可能是由于行实验检测的时间点不同或取材 标本不同引起。

本研究由 CCI-ION 术建立大鼠模型 结果表明, 在术后第 14 天的机械阈值检测中,CCI-ION 组较 Sham 组均明显降低,提示 TN 模型建立成功。同 时,Western blot 实验结果表明,CCI-ION 后术侧 TG 的 pSTAT3 蛋白相对表达量明显增加。在 Dominguez et al^[14]的研究中,脊髓内 pSTAT3 的免疫荧光表 达在术后 24~48 h 时最高,因此本实验选用术后第 2 天(术后 48 h)作为免疫荧光的检测时间点。结果 表明 CCI-ION 组的术侧 TG 中有大量的 pSTAT3 荧 光染色,而 Sham 组仅可见很少的 pSTAT3 荧光染 色。这些发现可能为 TN 的治疗及相关分子机制研 究提供了新的方向。

参考文献

- [1] Li C D , Zhao J Y , Chen J L , et al. Mechanism of the JAK2/ STAT3-CAV-I-NR2B signaling pathway in painful diabetic neuropathy [J]. Endocrine , 2019 , 64(1): 55 - 66.
- [2] Imada K , Leonard W J. The Jak-STAT[J]. Mol Immunol ,2000 , 37: 1 – 11.
- [3] Herrmann J E , Imura T , Song B , et al. STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury [J].
 J Neurosci , 2008 , 28(28): 7231 43.
- [4] Goto T , Iwai H , Kuramoto E , et al. Neuropeptides and ATP signaling in the trigeminal ganglion [J]. Jpn Dent Sci Rev ,2017 ,53 (4): 117 24.
- [5] Dominguez E, Rivat C, Pommier B, et al. JAK/STAT3 pathway is activated in spinal cord microglia after peripheral nerve injury and contributes to neuropathic pain development in rat [J]. J Neurochem, 2008, 107(1): 50 – 60.
- [6] Punyani S R , Jasuja V R. Trigeminal neuralgia: An insight into the current treatment modalities [J]. J Oral Biol Craniofac Res , 2012 , 2(3): 188 – 97.

- [7] Li Y Jiao H , Ren W , et al. TRESK alleviates trigeminal neuralgia induced by infraorbital nerve chronic constriction injury in rats
 [J]. Mol Pain 2019 ,15: 1744806919882511.
- [8] Henry M A, Fairchild D D, Patil M J, et al. Effect of a novel, orally active matrix metalloproteinase-2 and -9 inhibitor in spinal and trigeminal rat models of neuropathic pain [J]. J Oral Facial Pain H, 2015, 29(3): 286 – 96.
- [9] Vos B P , Strassman A M , Maciewicz R J. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve [J]. J Neurosci , 1994 , 14(5 Pt 1): 2708 – 23.
- [10] Li S F , Ouyang B S , Zhao X , et al. Analgesic effect of AG490 , a Janus kinase inhibitor , on oxaliplatin-induced acute neuropathic pain[J]. Neural Regen Res , 2018 , 13(8): 1471-6.
- [11] Ji R R, Berta T, Nedergaard M. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? [J]. Pain, 2013, 154(Suppl 1): S10 – 28.
- [12] Tsuda M, Kohro Y, Yano T, et al. JAK-STAT3 pathway regulates spinal astrocyte proliferation and neuropathic pain maintenance in rats [J]. Brain 2011 ,134: 1127 – 39.
- [13] Sanz E , Hofer M J ,Unzeta M , et al. Minimal role for STAT1 in interleukin-6 signaling and actions in the murine brain [J]. Glia , 2008 , 56(2): 190 - 9.
- [14] Dominguez E , Mauborgne A , Mallet J , et al. SOCS3-mediated blockade of JAK/STAT3 signaling pathway reveals its major contribution to spinal cord neuroinflammation and mechanical allodynia after peripheral nerve injury [J]. J Neurosci , 2010 , 30 (16) : 5754 - 66.

Activation of the JAK/STAT3 pathway in the trigeminal ganglion of CCI-ION model rats

Zhang Yao, Liu Yajun, Li Fang et al (Stomatological College of Anhui Medical University Hefei 230032)

Abstract *Objective* To detect the expression changes of pSTAT3 protein in trigeminal ganglions (TGs) of trigeminal neuralgia (TN) model rats and its located cell type. *Methods* The rat model of TN was established by chronic constriction of infraorbital nerve. Von Frey hair was used to determine the mechanical sensitivity threshold of the two groups , and Western blot was used to detect the changes of pSTAT3 protein expression in TG. Immuno– fluorescence assay was performed to observe the fluorescence staining of pSTAT3 and its located cell type. *Results*

The CCI-ION group showed a significant reduction of the mechanical pain threshold (P < 0.05) from the first day to the fourteenth day after surgery. The expression level of pSTAT3 protein in TG of CCI-ION group was significantly higher than that of Sham group (P < 0.05). The immunofluorescence experiment showed that the staining of pSTAT3 in the CCI-ION group was stronger than that in the Sham group , and pSTAT3 was located in microglia cells rather than satellite glia cells or neurons. *Conclusion* The activation of JAK/STAT3 pathway was found in the TG microglias of TN model rats.

Key words trigeminal neuralgia; chronic constriction of infraorbital nerve; JAK/STAT3; pSTAT3; trigeminal ganglion