

8-*O*-乙酰山栀子苷甲酸对慢性炎性痛模型大鼠脊髓背角内HDAC1~5表达的影响及与JAK₂-STAT₃信号通路的关系研究[△]

王健^{1,2*}, 肖小莉³, 崔佳¹, 王磊¹, 樊婷婷¹, 张维^{1#}(1.空军军医大学第一附属医院药剂科, 西安 710032; 2.解放军94750部队医院门诊所, 福建连城 366200; 3.上海中医药大学附属市中医院风湿科, 上海 200071)

中图分类号 R285;R441.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)05-0608-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.05.07

摘要 目的:研究8-*O*-乙酰山栀子苷甲酸(8-OaS)对慢性炎性痛模型大鼠脊髓背角内组蛋白去乙酰化酶1~5(HDAC1~5)表达的影响及与Janus激酶2-信号转导与转录活化因子3(JAK₂-STAT₃)信号通路的关系。方法:取SD大鼠随机分为正常对照组、假手术组(生理盐水)、完全弗氏佐剂(CFA)组(生理盐水)和8-OaS低、中、高剂量组(2、20、200 μg/kg),每组6只,除正常对照组和假手术组外,其余各组大鼠左侧后足趾侧皮下注射CFA复制慢性炎性痛模型,建模后腹腔注射相应药物,每日1次,连续7 d。采用热辐射法检测首次给药第1、2、3、4、5、6、7、8、11、15天大鼠的缩足潜伏期。另取大鼠按上述后5组方法进行分组给药,采用Western blot法检测大鼠末次给药后腰膨大节段脊髓背角中HDAC1~5、磷酸化JAK₂(pJAK₂)、磷酸化STAT₃(pSTAT₃)蛋白表达情况。再另取大鼠随机分为假手术组(生理盐水)、CFA组(生理盐水)、8-OaS组(20 μg/kg)和JAK₂-STAT₃的拮抗药α-氰基-(3,4-羟基)-*N*-苄苯乙酰胺(AG490)组(8 mg/kg),每组6只,同上法复制IP模型后腹腔注射相应药物,每日1次,连续7 d,采用免疫荧光组织化学染色观察各组大鼠HDAC5和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)在脊髓背角的表达情况。结果:与正常对照组和假手术组比较,其余各组大鼠的缩足潜伏期均明显缩短($P < 0.05$);与CFA组比较,8-OaS低、中、高剂量组大鼠的缩足潜伏期均明显延长($P < 0.05$),且呈剂量依赖性。与假手术组比较,CFA组大鼠脊髓背角中HDAC1~5、pJAK₂、pSTAT₃蛋白表达均明显增强($P < 0.05$);与CFA组比较,8-OaS低、中、高剂量组大鼠脊髓背角中HDAC5、pJAK₂、pSTAT₃蛋白表达均明显降低($P < 0.05$),但HDAC1~4蛋白表达差异均无统计学意义($P > 0.05$)。HDAC5大量表达于星形胶质质细胞上,与假手术组比较,CFA组大鼠脊髓背角中GFAP和HDAC5表达均明显增强($P < 0.05$);与CFA组比较,8-OaS组和AG490组大鼠脊髓背角中GFAP和HDAC5表达均明显降低($P < 0.05$)。结论:8-OaS可有效缓解由CFA诱导的慢性炎性痛,其机制可能与下调脊髓背角中HDAC5表达和JAK₂、STAT₃的磷酸化水平有关。

关键词 8-*O*-乙酰山栀子苷甲酸;慢性炎性痛;组蛋白去乙酰化酶;星形胶质细胞;Janus激酶2-信号转导与转录活化因子3;大鼠

Study on the Effects of 8-*O*-acetyl-shanzhiside Methylester on the Expression of HDAC 1-5 in the Spinal Dorsal Horn of Rats with Chronic Inflammatory Pain and Its Relationship with JAK₂-STAT₃ Signaling Pathway

WANG Jian^{1,2}, XIAO Xiaoli³, CUI Jia¹, WANG Lei¹, FAN Tingting¹, ZHANG Wei¹(1.Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2.Dept. of Ambulatorium, No. 94750 Military Hospital of PLA, Fujian Liancheng 366200, China; 3.Dept. of Rheumatology, the Affiliated TCM Hospital of Shanghai University of TCM, Shanghai 200071, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of 8-*O*-acetyl-shanzhiside methylester (8-OaS) on the expression of histone deacetylase 1-5 (HDAC1-5) in the spinal dorsal horn of chronic inflammatory pain model rats, and its relationship with Janus-activated kinase 2-signal transductions and activators of transcription 3 (JAK₂-STAT₃) signaling pathway. METHODS: SD rats were randomly divided into normal control group, sham operation group (normal saline), complete Freund's adjuvant (CFA) group (normal saline), 8-OaS low-dose, medium-dose and high-dose groups (2, 20, 200 μg/kg), with 6 rats in each group. Except for normal control group and sham operation group, chronic inflammatory pain model was induced by subcutaneous injection of CFA into the left hind toe of rats in other groups; after modeling, those groups were given relevant medicine intraperitoneally, once a day, for consecutive 7 d. Thermal radiation method was used to detect the latency of paw withdraw in rats on the 1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th, 6th, 7th, 8th, 11th and 15th day of administration. Rats were grouped and given medicine according to the above method of the latter 5 groups. The protein expression of HDAC 1-5, phosphorylated JAK₂ (pJAK₂) and phosphorylated STAT₃ (pSTAT₃) in the spinal dorsal horn of lumbar enlargement segment in rats were detected by Western blot method after last medication. Rats were randomly divided into sham operation group (normal saline), CFA group (normal saline), 8-OaS group (20 μg/kg) and JAK₂-STAT₃ inhibitor AG490 group (8 mg/kg), with 6 rats in each group;

[△] 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(No.81603320);西京医院学科助推计划项目(No.XJZT14M15)

* 医师。研究方向:中药镇痛机制。E-mail:15249273207@163.com

通信作者:主管药师,博士。研究方向:镇痛性中药药效物质基础与机制。E-mail:1358359@qq.com

phosphorylated STAT₃ (pSTAT₃) in the spinal dorsal horn of lumbar enlargement segment in rats were detected by Western blot method after last medication. Rats were randomly divided into sham operation group (normal saline), CFA group (normal saline), 8-OaS group (20 μg/kg) and JAK₂-STAT₃ inhibitor AG490 group (8 mg/kg), with 6 rats in each group;

IP model was established by same method as above and then were given relevant medicine intraperitoneally, once a day, for consecutive 7 d. The expression of HDAC5 and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in spinal dorsal horn of rats were detected by immunofluorescence histochemical staining. RESULTS: Compared with normal control group and sham operation group, the latency of paw withdraw was shortened significantly in other groups ($P < 0.05$). Compared with CFA group, the latency of paw withdraw was prolonged significantly in 8-OaS low-dose, medium-dose and high-dose groups ($P < 0.05$), in dose-dependent manner. Compared with sham operation group, the protein expression of HDAC 1-5, pJAK₂ and pSTAT₃ in spinal dorsal horn of rats were increased significantly in CFA group ($P < 0.05$). Compared with CFA group, the protein expression of HDAC5, pJAK₂ and pSTAT₃ in spinal dorsal horn of rats were decreased significantly in 8-OaS low-dose, medium-dose and high-dose groups ($P < 0.05$), but there was no statistical significance in the protein expression of HDAC 1-4 ($P > 0.05$). HDAC5 was expressed on astrocytes in the spinal dorsal horn; compared with sham operation group, the expression of GFAP and HDAC 5 were increased significantly in spinal dorsal horn of rats in CFA group ($P < 0.05$). Compared with CFA group, the expression of GFAP and HDAC5 in spinal dorsal horn of rats were decreased significantly in 8-OaS group and AG490 group ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: 8-OaS can effectively relieve CFA-induced chronic inflammatory pain, the mechanism of which may be associated with the down-regulation of HDAC5 expression and the phosphorylation levels of JAK2 and STAT3.

KEYWORDS 8-*O*-acetyl-safalinoside; Chronic inflammatory pain; Histone deacetylase; Astrocytes; JAK₂-STAT₃; Rats

慢性疼痛(Chronic pain)是一种不愉快的躯体感觉和情感经历,与潜在的组织损伤或神经功能紊乱相关^[1-2]。慢性疼痛病情迁延不愈,其发生严重影响了患者的生活质量和精神状态,加之缺乏有效的治疗方法、镇痛药物副作用大等缺点,使该症成为当前困扰人类健康较严重的问题之一[如外伤、神经压迫、感染及癌症等导致的慢性炎性痛(Chronic inflammatory pain)]^[3-4]。既往研究表明,在IP状态下,大鼠脊髓背角内的胶质细胞和神经元被序贯激活,两者共同参与了慢性疼痛的发生与发展过程;此外,慢性疼痛的维持可能与星形胶质细胞的关系更为密切,其机制可能与脊髓背角星形胶质细胞内信号转导与转录活化因子3(Signal transducers and activators of transcription 3, STAT₃)的激活有关^[5]。亦有研究报道称,骨癌痛模型大鼠脊髓背角胶质细胞活化明显,组蛋白去乙酰化酶(Histone deacetylases, HDACs)表达显著上调,给予雷公藤内脂醇能够显著缓解模型大鼠的痛阈,其机制可能与抑制脊髓背角胶质细胞中HDACs的上调、阻断胶质细胞激活诱导的神经炎症有关^[6]。由此可见,Janus激酶2-信号转导与转录活化因子3(Janus-activated kinase 2-signal transducers and activators of transcription 3, JAK₂-STAT₃)信号转导通路和HDACs在疼痛的发生与发展过程中具有重要意义。

独一味系藏族习用药材,为唇形科植物独一味 [*Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo] 的干燥地上部分。已有研究表明,该药除传统的活血止血、祛风止痛作用外,其有效成分8-*O*-乙酰山栀子苷甲酸(8-*O*-acetyl-shanzhisi-methylester, 8-OaS)具有明显缓解慢性痛的功效^[7]。因此,笔者结合疼痛发生的机制及8-OaS的镇痛特性,探究HDAC1~5与JAK₂-STAT₃信号转导通路之间的关系,为临床慢性炎性痛的治疗提供可靠的实验依据。

1 材料

1.1 仪器

Hargreaves型热痛仪(美国Stoeling公司);CM1950型冷冻切片机(德国Leica公司);TS-1型摇床(江苏其林

贝尔仪器制造有限公司);3K30型低温离心机(美国Sigma公司);BX-60型共聚焦激光显微镜(日本Olympus株式会社);PT 1200E型超声组织匀浆机(路易企业有限公司);ChemiDoc™ MP System全能型成像系统(美国Bio-Rad公司)。

1.2 药品与试剂

8-OaS(批号:766720,纯度:≥97%)、完全弗氏佐剂(CFA,批号:F5881)、JAK₂-STAT₃的拮抗药 α -氰基-(3,4-羟基)-*N*-苄苯乙酰胺(AG490,批号:T3434,纯度:99.99%)购自美国Sigma公司;小鼠抗胶质纤维酸性蛋白(GFAP)免疫球蛋白G(IgG)(美国Santa Cruz Biotechnology公司,批号:sc-58766);兔抗酪氨酸蛋白激酶JAK₂ IgG、兔抗STAT₃ IgG和兔抗HDAC1~5 IgG(美国Cell Signaling Technology公司,批号:3230T、9139S、2062、57156、60538、2072、20458);Biotin结合的驴抗兔IgG和Cy3标记的亲合素(Avidin)(美国Jackson Immuno-Research公司,批号:211-065-109、211-165-109);Alexa488结合的驴抗小鼠IgG(美国Jackson Immuno-Research公司,批号:211-545-109);辣根过氧化物酶(HRP)结合的驴抗小鼠IgG、HRP结合的驴抗兔IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:SC-2064、ZDR-5308);小鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin)IgG(美国Sigma公司,批号:A1978);10%十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)(美国Bio-Rad公司);聚偏氟乙烯(PVDF)膜(美国Millipore公司);组织裂解液(北京百奥莱博科技有限公司,货号:BL1357);增强化学发光(ECL)液(北京拜尔迪诊断技术有限公司,货号:K-12045-D50)。

1.3 动物

二级清洁级健康SD大鼠,♂,体质量约220~250g,由空军军医大学动物实验中心提供[实验动物生产许可证号:SCXK(军)2012-0007]。所有大鼠于恒温22~25℃下饲养,并保证12h的光照,可自由摄取水和食物。所有的实验均在空军军医大学动物研究伦理委员会批准下进行。

2 方法与结果

2.1 造模

大鼠分别于左侧后足趾侧皮下注射CFA 50 μL 构建慢性炎性痛模型^[9],假手术大鼠同法注射50 μL 生理盐水,正常对照大鼠不做处理。

2.2 8-OaS的镇痛效果

2.2.1 分组与给药 取大鼠随机分为正常对照组、假手术组(生理盐水)、CFA组(生理盐水)和8-OaS低、中、高剂量组(2、20、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$),每组6只。CFA和8-OaS的给药剂量设定依据本研究组既往研究^[8-9]。除正常对照大鼠全程不做任何处理外,其余各组大鼠均从造模后第1天开始腹腔注射相应药物进行干预,每日1次,连续7 d。每次给药时间严格控制在同一时间范围(一般安排在行为学测试之后),实验过程安排同一人进行操作。

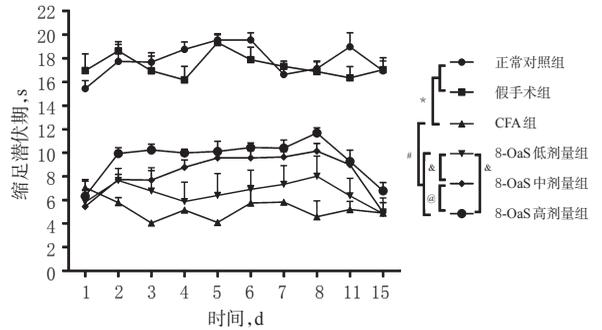
2.2.2 行为学测试 采用热辐射法检测各组大鼠给药第1、2、3、4、5、6、7、8、11、15天的缩足潜伏期。测试前将Hargreaves热痛仪基础温度调至37 $^{\circ}\text{C}$,将所有实验大鼠放入罩有透明罩的有机材料检测实验台上,待适应20 min时,将热光源发射器对准大鼠左侧足底注射部位,启动开关并开始计时,仔细观察在照射的过程中若大鼠出现缩左足行为则被视为阳性,同时关闭发射器开关并读取时间,记为缩足潜伏期,否则视为阴性。出现阳性行为的时间误差值控制在0.1 s范围内,检测时间不能超过30 s,避免损伤大鼠后足。

2.2.3 数据处理与测定结果 采用SPSS 17.0软件进行统计分析,组间比较采用配对 t 检验。结果显示,与正常对照组和假手术组比较,其余各组大鼠的缩足潜伏期均明显缩短($P<0.05$)。与CFA组比较,8-OaS低、中、高剂量组大鼠的缩足潜伏期均明显延长($P<0.05$),且呈剂量依赖性。各组大鼠的缩足潜伏期测定结果见图1。

2.3 8-OaS干预状态下HDAC1~5及JAK₂-STAT₃信号通路的表达

2.3.1 分组与给药 取大鼠随机分为假手术组、CFA组和8-OaS低、中、高剂量组,每组6只,给药方法同“2.2.1”项。

2.3.2 Western blot法检测HDAC1~5、pJAK₂、pSTAT₃蛋白表达 各组大鼠末次给药后,腹腔注射水合氯醛(280 mg/kg),待深麻醉后迅速开胸并搭建体外循环灌注通道,用事先预冷的0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS, pH为7.2~7.4)快速冲去体内流动的循环血,并于冰块上均匀分离腰膨大节段脊髓背角,加至提前溶解了磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的组织裂解液中。使用超声组织匀浆机低温匀浆裂解,吸取匀浆裂解液至1.5 mL离心管中,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下、以12 000 r/min离心5 min,使用BCA法对离心管中的上清液进行蛋白定量,并进行10%的SDS-PAGE电泳分离,并将分离后的蛋白转至PVDF膜上,以5%脱脂奶粉封闭2 h, TBST溶液洗膜3次,每次



注:与正常对照组或假手术组比较,* $P<0.05$;与CFA组比较,* $P<0.05$;与8-OaS低剂量组比较,& $P<0.05$;与8-OaS中剂量组比较,@ $P<0.05$

Note: vs. normal control group or sham operation group, * $P<0.05$; vs. CFA group, # $P<0.05$; vs. 8-OaS low-dose group, & $P<0.05$; vs. 8-OaS medium-dose group, @ $P<0.05$

图1 各组大鼠的缩足潜伏期测定结果

Fig 1 The latency of paw withdraw in rats of each group

10 min,加入一抗[兔抗HDAC1~5 IgG(稀释比例:1:200)、兔抗pJAK₂(稀释比例:1:300)、pSTAT₃(稀释比例:1:300)及小鼠抗GFAP IgG(稀释比例:1:800)、小鼠抗 β -actin IgG(稀释比例:1:500)],于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育12 h后,用TBST溶液清洗3次,每次10 min,分别加入HRP结合的驴抗兔IgG和HRP结合的驴抗小鼠IgG(稀释比例均为1:1 000),于室温下孵育1~2 h后,用TBST溶液洗膜3次,每次10 min,添加ECL液后置于成像系统下扫描荧光条带,采用Image Lab 5.1软件分析光密度值,以 β -actin为内参,以相应蛋白与内参的光密度比值表示相应蛋白的相对表达量。

2.3.3 数据处理与测定结果 采用SPSS 17.0软件进行统计分析,单因素方差分析比较各组大鼠蛋白定量数据的差异,邦弗朗尼(Bonferroni)事后检定/检验法检验组间差异。结果显示,与假手术组比较,CFA组大鼠脊髓背角中HDAC1~5、pJAK₂、pSTAT₃蛋白表达均明显增强($P<0.05$)。与CFA组比较,8-OaS低、中、高剂量组大鼠脊髓背角中HDAC5、pJAK₂、pSTAT₃蛋白表达均明显降低($P<0.05$),HDAC1~4蛋白表达差异均无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠脊髓背角中HDAC1~5、pJAK₂、pSTAT₃蛋白表达的电泳图见图2,测定结果见表1。

2.4 8-OaS是否通过抑制JAK₂-STAT₃信号通路的激活影响HDAC5的表达

2.4.1 分组与给药 取大鼠随机分为假手术组(生理盐水)、CFA组(生理盐水)、8-OaS组(20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)和AG490组(8 mg/kg),每组6只。给药方法同“2.2.1”项。AG490的给药剂量设定依据本研究组既往研究^[10]。

2.4.2 免疫荧光组织化学染色检测GFAP、HDAC5表达 大鼠末次给药后,腹腔注射水合氯醛(280 mg/kg),

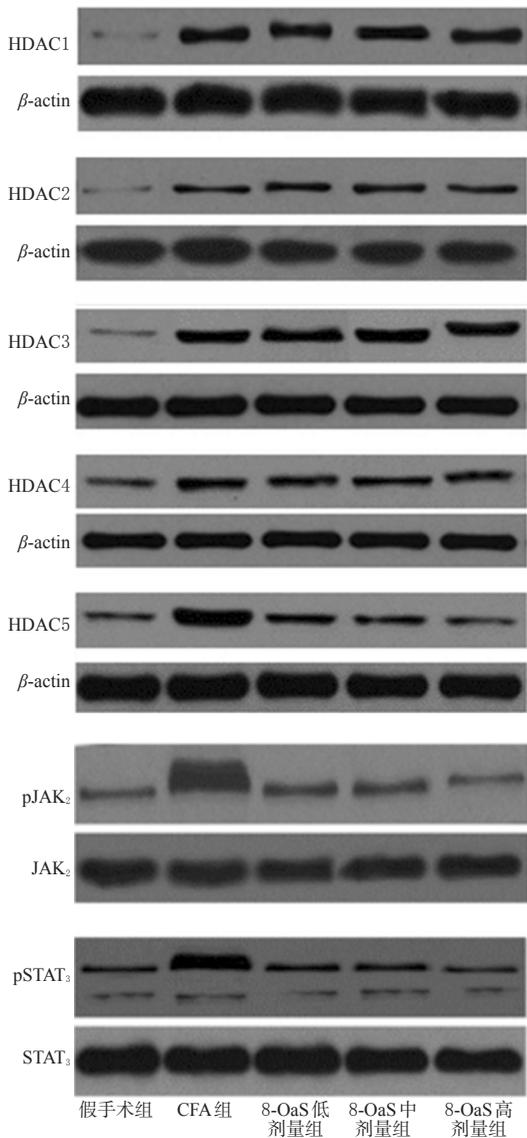


图2 各组大鼠脊髓背角中HDAC1~5、pJAK₂、pSTAT₃蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophoregram of protein expression of HDAC 1-5, pJAK₂, pSTAT₃ in spinal dorsal horn of rats in each group

表1 各组大鼠脊髓背角中HDAC1~5、pJAK₂、pSTAT₃蛋白相对表达量的测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Protein relative expression of HDAC 1-5, pJAK₂, pSTAT₃ in spinal dorsal horn of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC4	HDAC5	pJAK ₂	pSTAT ₃
假手术组	0.85±0.08	0.66±0.09	0.71±0.10	1.04±0.12	1.01±0.09	1.02±0.11	1.01±0.12
CFA组	2.32±0.15*	1.91±0.14*	2.21±0.17*	1.72±0.11*	2.45±0.24*	2.41±0.18*	2.22±0.19*
8-OaS低剂量组	2.28±0.11	1.89±0.15	2.31±0.11	1.71±0.14	1.81±0.13*	1.97±0.13*	1.86±0.13*
8-OaS中剂量组	2.26±0.15	1.88±0.16	2.26±0.15	1.69±0.13	1.54±0.14*	1.68±0.15*	1.52±0.12*
8-OaS高剂量组	2.28±0.16	1.90±0.15	2.29±0.16	1.70±0.12	1.08±0.13*	1.26±0.14*	1.22±0.15*

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与CFA组比较,* $P<0.05$

Note: vs. sham operation group, * $P<0.05$; vs. CFA group, * $P<0.05$

待深麻醉后迅速开胸灌注冲去机体内流动的循环血液,加入固定液(含pH为7.2~7.4的PBS和4%多聚甲醛)固定。取出腰膨大节段置于上述固定液中继续固定2 h后,以4℃、30%蔗糖溶液脱水48 h,用冷冻切片横切(厚度为20~30 μm),用PBS清洗3次,每次5 min,随后用5%山羊血清室温封闭2 h,滴加小鼠抗GFAP IgG(稀释比例:1:800)和兔抗HDAC5 IgG(稀释比例:1:200),于室温下孵育1 h后,再于4℃下孵育48 h,用PBS清洗3次,每次5 min,加入Biotin结合的驴抗兔IgG(稀释比例:1:500),于室温下孵育6 h;PBS再次漂洗5 min×3次后,于室温滴加Alexa488标记的驴抗小鼠IgG和Cy3标记的Avidin(稀释比例均为1:500),室温放置4 h,PBS再次漂洗5 min×3次后于暗光下将薄片置于载玻片上,待水分自然蒸发后以荧光封片剂封片,使用共聚焦激光显微镜观察GFAP与HDAC5的双重标记情况,定量分析GFAP与HDAC5表达情况。

2.4.3 数据处理与测定结果 统计方法同“2.3.3”项。结果显示,HDAC5大量表达于星形胶质细胞上。与假手术组比较,CFA组大鼠脊髓背角中GFAP和HDAC5表达均明显增强($P<0.05$);与CFA组比较,8-OaS组和AG490组大鼠脊髓背角中GFAP和HDAC5表达均明显降低($P<0.05$)。大鼠脊髓背角中GFAP与HDAC5表达的荧光图见图3,电泳图见图4,测定结果见表2。

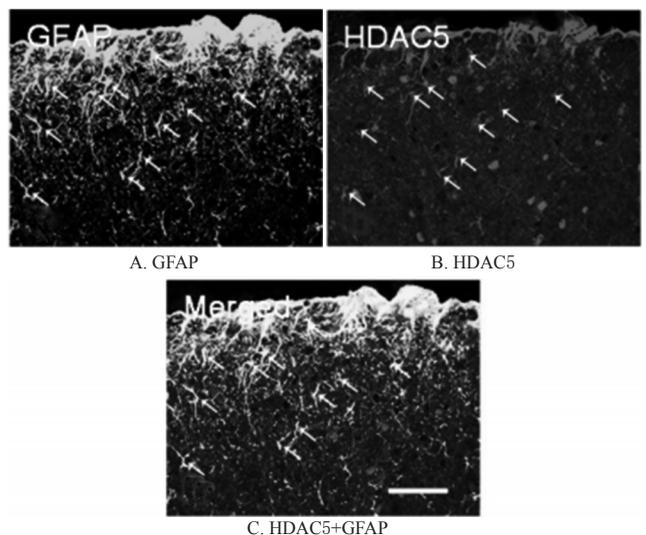


图3 大鼠脊髓背角中GFAP与HDAC5表达的荧光图(×60)

Fig 3 Fluorescence map of the expression of GFAP and HDAC5 in spinal dorsal horn of rats(×60)

3 讨论

本实验基于前期研究探索8-OaS对慢性炎性痛的改善情况及机制探讨^[9]。通过CFA足趾侧皮下注射构建慢性炎性痛模型,采用Western blot法检测8-OaS干预后大鼠脊髓背角内HDAC1~5的表达改变。之后通过免疫荧光双标染色方法观察到脊髓背角内HDAC5与星形胶

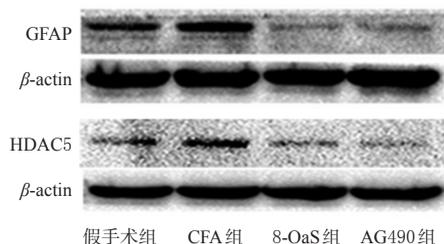


图4 各组大鼠脊髓背角中GFAP与HDAC5表达的电泳图

Fig 4 Electrophoregram of the expression of GFAP and HDAC5 in spinal dorsal horn of rats in each group

表2 各组大鼠脊髓背角中GFAP与HDAC5相对表达量的测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 The relative expression of GFAP and HDAC5 in spinal dorsal horn of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	GFAP	HDAC5
假手术组	1.08 ± 0.21	0.82 ± 0.24
CFA组	2.12 ± 0.13*	1.92 ± 0.38*
8-OaS组	0.83 ± 0.19 [#]	0.66 ± 0.21 [#]
AG490组	0.85 ± 0.16 [#]	0.64 ± 0.14 [#]

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与CFA组比较,[#] $P < 0.05$

Note: vs. sham operation group, * $P < 0.05$; vs. CFA group, [#] $P < 0.05$

质细胞的标记物GFAP大量共存;Western blot结果进一步提示腹腔给予8-OaS能够显著抑制JAK₂-STAT₃胞内信号转导通路。加用JAK₂-STAT₃的拮抗药AG490后结果显示,8-OaS通过降低JAK₂-STAT₃胞内信号转导通路的磷酸化进一步实现对HDAC5的抑制从而达到对星形胶质细胞活化的抑制作用。

当外周组织或神经受损时,脊髓背角内小胶质细胞和星形胶质细胞会相继被活化,活化的胶质细胞会释放大量的趋化因子,募集胶质细胞释放更多的炎症因子,加剧脊髓背角的炎症反应,这些炎症因子结合神经元上的相应受体可活化神经元,促进慢性疼痛的发生与发展^[11-14]。既往研究证实,小胶质细胞主要在慢性疼痛形成阶段达到活化高峰,星形胶质细胞于慢性疼痛稳定时激活明显^[5]。因此,抑制星形胶质细胞的活化对慢性疼痛的缓解显得尤为重要。作为神经系统数量较多的细胞之一,星形胶质细胞主要对神经元起到营养、支持以及维持脊髓背角微环境稳定的作用。

HDACs是一类核内蛋白酶,主要对染色体的结构和基因表达具有修饰和调控的作用^[15]。组蛋白乙酰化程度的改变能够影响相关基因的表达。而组蛋白去乙酰化水平则发挥相反的作用。既往研究表明,HDACs在肿瘤的发生、发展过程中发挥重要作用,参与肿瘤细胞的增殖、分化以及转移,并且给予HDACs的抑制剂能

够发挥明显的抗肿瘤特性^[16-17]。亦有研究报道称,HDACs的上调有助于改善脊髓背角胶质细胞的病理变化和骨癌引起的慢性疼痛,其机制可能是通过抑制脊髓背角胶质细胞中HDACs的上调,然后阻断胶质细胞激活诱导的神经炎症^[18]。结合上述资料,本实验研究结果提示,HDAC1~5参与了CFA诱发慢性炎性痛的过程,且慢性炎性痛时其表达明显增强。腹腔给予8-OaS后,可显著缓解CFA诱发的热痛阈,HDAC5作为HDAC1~5中唯一改变的蛋白分子,其表达和星形胶质细胞的激活均得到显著抑制,从而阻碍了慢性炎性痛的发生与发展,这符合笔者设想的HDAC5与星形胶质细胞与慢性炎性痛的形成密切相关。

有研究发现,慢性疼痛时,脊髓背角星形胶质细胞内的STAT₃磷酸化水平会显著提高,并且给予STAT₃的抑制剂可观察到大鼠术侧痛阈明显增加^[5]。当JAK₂信号分子在白细胞介素6(IL-6)等促炎症因子作用下发生磷酸化时,紧接着其下游分子STAT₃也会发生磷酸化。而磷酸化的STAT₃分子会影响细胞因子信号转导抑制蛋白3(SOCS3)、细胞因子以及干扰素(IFN- α 、IFN- β)等分子表达^[19]。在本实验中,笔者给予慢性炎性痛模型大鼠JAK₂-STAT₃信号转导通路的拮抗药AG490进行人为干预,观察到AG490在分子水平上不仅可以降低JAK₂和STAT₃的表达,还可以间接抑制HDAC5的表达,说明JAK₂-STAT₃信号通路参与了慢性炎性痛的形成,并与HDAC5的抑制相关。

8-OaS作为传统中药独一味的有效成分之一,其药理活性强,抗炎性质稳定。目前在临床上,独一味作为一种口服抗炎药被广泛应用。本研究组前期结果显示,鞘内给予8-OaS可以有效缓解大鼠IP症状,其机制可能与8-OaS抑制了脊髓背角内的炎症反应有关^[6]。本研究结果表明,8-OaS能够显著缓解IP,镇痛时间持续久,且呈剂量依赖性。其次,HDAC1~5参与了IP的形成,而8-OaS可以特异性下调HDAC5的表达进而影响星形胶质细胞的活化,并且给予JAK₂-STAT₃信号转导通路的拮抗药AG490后效果与单独给予8-OaS相当,故推测8-OaS可能通过抑制JAK₂-STAT₃信号转导通路的激活下调了HDAC5的表达,但具体机制有待研究的进一步深入。并且8-OaS是否还可能通过其他途径影响星形胶质细胞的活化有待进一步探究。本研究存在一定的局限性,虽然在CFA诱导的IP模型大鼠中未见HDAC1~4的改变,但该研究尚未在JAK₂-STAT₃信号转导通路抑制后,研究HDAC1~4的表达情况,设计上缺乏严谨性,无法全面排除实验的偶然性,在之后的实验研究过程中需要注意。

参考文献

[1] ACOSTA-OLIVO C, SILLER-ADAME A, TAMEZ-MA-

- TA Y, et al. Laser treatment on acupuncture points improves pain and wrist functionality in patients undergoing rehabilitation therapy after wrist bone fracture: a randomized, controlled, blinded study[J]. *Acupunct Electrother Res*, 2017, 42(1):11-25.
- [2] YAN BP, CHAN LLY, LEE VWY, et al. Sustained 3-year benefits in quality of life after percutaneous coronary interventions in the elderly: a prospective cohort study[J]. *Value Health*, 2018, 21(4):423-431.
- [3] 朱文君, 韩秀敏, 郭亚民. 苯并咪唑类药物治疗包虫病研究进展[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2017, 29(4):530-533.
- [4] ESER F, NEBIOGLU S, ALIYEVA A, et al. Neuropathic pain in pregnant turkish women with lumbopelvic pain and its impact on health-related quality of life[J]. *Eur J Rheumatol*, 2018, 5(1):37-39.
- [5] WANG J, QIAO Y, YANG RS, et al. The synergistic effect of treatment with triptolide and MK-801 in the rat neuropathic pain model[J]. *Molecular Pain*, 2017. DOI: 10.1177/1744806917746564.
- [6] HU XF, HE XT, ZHOU KX, et al. The analgesic effects of triptolide in the bone cancer pain rats via inhibiting the up-regulation of hdacs in spinal glial cells[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2017. DOI: 10.1186/s12974-017-0988-1.
- [7] ZHU B, GONG N, FAN H, et al. Lamiophlomis rotata, an orally available tibetan herbal painkiller, specifically reduces pain hypersensitivity states through the activation of spinal glucagon-like peptide-1 receptors[J]. *Anesthesiology*, 2014, 121(4):835-851.
- [8] 王健, 张春奎, 张青, 等. 雷公藤内酯醇(T10)通过抑制脊髓背角内 p38-MAPK 的磷酸化发挥镇痛作用的机制研究[J]. *神经解剖学杂志*, 2016, 32(1):18-24.
- [9] ZHANG W, BAI Y, QIAO Y, et al. 8-O-acetyl shanzhiside methylester from lamiophlomis rotata reduces neuropathic pain by inhibiting the ERK/TNF-alpha pathway in spinal astrocytes[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2018. DOI:10.3389/fncel.2018.00054.
- [10] LI SF, OUYANG BS, ZHAO X, et al. Analgesic effect of AG490, a Janus kinase inhibitor, on oxaliplatin-induced acute neuropathic pain[J]. *Neural Regeneration Research*, 2018. DOI:10.4103/1673-5374.235305.
- [11] LI J, DENG G, WANG H, et al. Interleukin-1beta pre-treated bone marrow stromal cells alleviate neuropathic pain through CCL7-mediated inhibition of microglial activation in the spinal cord[J]. *Sci Rep*, 2017. DOI: 10.1038/srep42260.
- [12] MICHOT B, DEUMENS R, HERMANS E. Immunohistochemical comparison of astrocytic mGluR5 upregulation in infraorbital nerve-versus sciatic nerve-ligated rat[J]. *Neurosci Lett*, 2017. DOI:10.1016/j.neulet.2017.05.035.
- [13] HU C, LU Y, CHENG X, et al. Gene therapy for neuropathic pain induced by spared nerve injury with naked plasmid encoding hepatocyte growth factor[J]. *J Gene Med*, 2017. DOI: 10.1002/jgm.2994.
- [14] SUBEDI L, VENKATESAN R, KIM SY. Neuroprotective and anti-inflammatory activities of allyl isothiocyanate through attenuation of JNK/NF-κB/TNF-α signaling[J]. *Int J Mol Sci*, 2017. DOI:10.3390/ijms18071423.
- [15] GRABARSKA A, ŁUSZCZKI JJ, Nowosadzka E, et al. Histone deacetylase inhibitor SAHA as potential targeted therapy agent for larynx cancer cells[J]. *J Cancer*, 2017, 8(1):19-28.
- [16] KONIGSTEIN M, ROSSO R, TOPAZ G, et al. Drug-induced Brugada syndrome: clinical characteristics and risk factors[J]. *Heart Rhythm*, 2016, 13(5):1083-1087.
- [17] VERMA M, KUMAR V. Epigenetic biomarkers in colorectal cancer[J]. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 2017, 21(2):1-13.
- [18] 仇子钰, 张凉, 王晗, 等. 独一味单体抑制脊髓背角内 AKT-mTOR 信号通路缓解大鼠神经病理性痛[J]. *中国药师*, 2017, 20(11):1932-1937.
- [19] 刘建民, 黄良文, 朱旭红, 等. 3种活血化瘀中药复方含药血清对神经胶质瘤 U251 细胞 JAK/STAT 信号通路的影响[J]. *中国药房*, 2017, 28(16):2176-2179.

(收稿日期:2018-09-04 修回日期:2018-12-14)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊, 欢迎投稿、订阅