

Th1/Th2 免疫失衡介导的 JAK2/STAT3 信号通路在慢性偏头痛模型大鼠神经递质释放中的作用机制

黄娜 李静 祁天培 柴琳洁 李琳

【摘要】 目的 探究 Th1/Th2 免疫失衡介导的非受体型蛋白酪氨酸激酶 2(Janus kinase 2, JAK2)/转录激活因子 3(Signal transduction and activator of transcription 3, STAT3)信号通路在慢性偏头痛模型大鼠神经递质释放中的作用及可能机制。**方法** 根据实验设计将大鼠随机分为对照组、偏头痛组、JAK2 抑制(WP1066)组,每组各 10 只;试剂盒检测血清 Th1/Th2 免疫相关因子:干扰素- γ (Interferon-Gamma, IFN- γ)、白细胞介素-4(Interleukin-4, IL-4)、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor-Alpha, TNF- α)、IL-6、TNF- β 、IL-2、IL-5、IL-9、IL-10、5-羟色胺(5-Hydroxytryptamine, 5-HT)、 β -内啡肽(Beta-endorphin, β -EP)、 γ -氨基丁酸(Gamma-aminobutyric acid, GABA)、一氧化氮(Nitric oxide, NO)水平;记录各组大鼠挠头次数;激光多普勒灌注监测仪测量脑血流;Western blotting 检测大脑皮质中 JAK2, STAT3, 磷酸化 JAK2(Phospho-JAK2, p-JAK2)及 p-STAT3 蛋白水平。**结果** 与对照组比较,偏头痛组血清 TNF- α , TNF- β , IFN- γ , IL-2 水平明显增高($P < 0.05$), IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 水平明显降低($P < 0.05$),烦躁易动、双耳明显变红、挠头次数增加($P < 0.05$),脑血流量减少,大脑皮层 JAK2, STAT3 水平无明显变化($P > 0.05$), p-JAK2, p-STAT3 表达水平增高($P < 0.05$),血清 5-HT、 β -EP 水平降低, GABA, NO 水平增高($P < 0.05$);与偏头痛组比较, WP1066 组烦躁程度降低,双耳变红程度减弱且挠头次数减少($P < 0.05$),脑血流量增加,大脑皮层总 JAK2、总 STAT3 表达水平降低, p-JAK2, p-STAT3 表达水平降低($P < 0.05$),血清 5-HT、 β -EP 水平增高, GABA, NO 水平降低($P < 0.05$)。**结论** 抑制 JAK2 表达可改善偏头痛模型大鼠行为学表现、改善脑血流量及神经递质水平,这可能与 Th1/Th2 免疫失衡介导的 JAK2/STAT3 信号通路有关。

【关键词】 慢性偏头痛 非受体型蛋白酪氨酸激酶 2/转录激活因子 3 信号通路 神经递质

【中图分类号】 R747.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2024)05-0465-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2024.05.008

Mechanism of JAK2/STAT3 signaling pathway mediated by Th1/Th2 immune imbalance in neurotransmitter release in chronic migraine model rats Huang Na*, Li Jing*, Qi Tianpei, et al. * Department of Traditional Chinese Medicine, Dingzhou People's Hospital, Dingzhou Hebei 073000

【Abstract】 Objective To explore the role of non-receptor protein tyrosine kinase 2 (JAK2)/ signal transduction and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway mediated by Th1/Th2 immune imbalance in neurotransmitter release in chronic migraine rats and its possible mechanism. **Methods** According to the experimental design, the rats were randomly divided into control group, migraine group and JAK2 inhibition (WP1066) group, with 10 rats in each group. Serum Th1/Th2 immune-related factors were detected by the kit, including interferon- γ (IFN- γ), interleukin-4 (IL-4), tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-6, TNF- β , IL-2, IL-5, IL-9, IL-10, serotonin (5-HT), beta-endorphin (beta-EP), gamma-aminobutyric acid (GABA), and nitric oxide (NO) levels. Head scratching times of rats in each group were recorded, cerebral blood flow was measured by laser Doppler perfusion monitor, and protein levels of JAK2, STAT3, phospho-JAK2 (p-JAK2) and p-STAT3 in cerebral cortex were detected by Western blotting. **Results** Compared with the control group, the serum contents of TNF- α , TNF- β , IFN- γ and IL-2 in migraine group were significantly increased ($P < 0.05$), the contents of IL-4, IL-5, IL-9 and IL-10 were significantly decreased ($P < 0.05$), irritability and easy movement, both ears significantly red, head scratching times increased ($P < 0.05$), cerebral

基金项目:2024 年度中医药类科学研究课题计划项目(2024198)

作者单位:073000 河北省定州市人民医院中医科[黄娜 李静(通信作者)];廊坊市卫生急救中心直属急救站(祁天培);石家庄市藁城人民医院(柴琳洁 李琳)

blood flow decreased, cerebral cortex JAK2, STAT3 changes were not statistically significant ($P>0.05$), p-JAK2 and p-STAT3 expression increased ($P<0.05$), the serum levels of 5-HT and β -EP were decreased, and the levels of GABA and NO were increased ($P<0.05$). Compared with the migraine group, WP1066 group had less irritability, less redness in both ears and less head scratching ($P<0.05$), cerebral blood flow increased, total JAK2 and total STAT3 expression decreased, p-JAK2 and p-STAT3 expression decreased ($P<0.05$), the serum levels of 5-HT and β -EP were increased, and the levels of GABA and NO were decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Inhibition of JAK2 can improve the behavior, cerebral blood flow and neurotransmitter levels in migraine rats, which may be related to the JAK2/STAT3 signaling pathway mediated by Th1/Th2 immune imbalance.

【Key words】 Chronic migraine JAK2/STAT3 signaling pathway Neurotransmitter

偏头痛是一种致残性神经疾病,影响着全球2%的人口,且可用的治疗方案有限^[1]。根据发作的天数可分为慢性偏头痛和发作性偏头痛。慢性偏头痛在患病率、合并症、治疗反应和生物标志物方面与发作性偏头痛不同^[2]。三分之一的慢性偏头痛患者可能每天都会头痛,在普通神经病学咨询中这一比例高达1.7%~3.3%^[3]。尽管临床有相当多的慢性偏头痛病例,但这些患者经常被排除在大多数研究之外,因此可获得的信息很少。部分学者表明,慢性偏头痛患者可能具有复杂的病理生理机制。近年来有研究表明偏头痛可能是免疫系统受损或自身免疫性疾病的结果^[4-5]。Th1/Th2免疫失衡在机体多种免疫性疾病中发挥重要作用^[6-8],且Th1与Th2可通过分泌炎症因子和抗炎因子激活非受体型蛋白酪氨酸激酶2(Janus kinase 2, JAK2)/转录激活因子3(Signal transduction and activator of transcription 3, STAT3)信号通路^[9]。既往研究显示,慢性偏头痛与神经递质的释放密切相关^[10-11]。然而, Th1/Th2免疫失衡介导的JAK2/STAT3信号通路是否与神经递质的释放相关,目前尚未阐明。本研究通过建立慢性偏头痛大鼠模型,以期初步阐明Th1/Th2免疫失衡介导的JAK2/STAT3信号通路在慢性偏头痛模型大鼠神经递质释放中的作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

JAK2抗体、STAT3抗体、p-JAK2抗体、p-STAT3抗体、p53抗体(美国abcam公司),干扰素- γ (Interferon-Gamma, IFN- γ)试剂盒、大鼠白细胞介素-4(Interleukin-4, IL-4)试剂盒、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor-Alpha, TNF- α)检测试剂盒、IL-6试剂盒、TNF- β 试剂盒、IL-2试剂盒、IL-5

试剂盒、IL-9试剂盒、IL-10试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司), 5-羟色胺(5-Hydroxytryptamine, 5-HT)、 β -内啡肽(Beta-endorphin, β -EP)、 γ -氨基丁酸(Gamma-aminobutyric acid, GABA)、一氧化氮(Nitric oxide, NO)试剂盒(索莱宝生物科技有限公司), WP1066(美国MCE), 全自动酶标仪(赛默飞世尔科技公司), 激光多普勒灌注监测仪(瑞典帕瑞医学公司)。

1.2 实验分组与偏头痛模型的建立

根据实验设计将大鼠随机分为对照组、偏头痛组、JAK2抑制(WP1066)组, 每组各10只; 偏头痛组、WP1066组大鼠在颈部的皮下注射硝酸甘油(10 mg/kg); WP1066组大鼠在注射硝酸甘油前半小时注射WP1066(30 mg/kg); 对照组大鼠注射等体积0.9%的生理盐水。

1.3 酶联免疫吸附法(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清IFN- γ , IL-4, TNF- α , IL-6, TNF- β , IL-2, IL-5, IL-9, IL-10, 5-HT, β -EP, GABA, NO水平

收集各组大鼠血清, 分别按照大鼠IFN- γ 试剂盒、大鼠IL-4试剂盒、TNF- α 检测试剂盒、IL-6试剂盒、TNF- β 试剂盒、IL-2试剂盒、IL-5试剂盒、IL-9试剂盒、IL-10试剂盒、5-HT、 β -EP试剂盒、GABA试剂盒、NO试剂盒说明书中的实验步骤进行操作, 最后根据提供的公式计算各相关因子的相对水平。

1.4 拍摄记录大鼠挠头次数

各组大鼠干预结束后使用摄像机拍摄观察大鼠的一般状态, 记录大鼠的挠头次数, 持续3 h。

1.5 激光多普勒灌注监测仪测量大鼠脑血流

使用激光多普勒灌注监测仪测量大鼠脑血流量; 在麻醉状态下在大鼠头部做1个交叉皮肤切口, 露出整个头骨, 对完整的颅骨进行激光扫描成像测量, 将激光束指向隐窝, 扫描距离设定为15.0 cm,

扫描范围为2.0 cm×2.0 cm,在隐窝的正下方(隐窝后方2 mm,隐窝外侧5 mm)有1个约0.8 mm大小的圆窗,测量血流并生成图像所需的频率为每秒5个图像;通过 Peri-Cam PSI 系统计算平均脑血流量。

1.6 Western blotting 检测大脑皮质中 JAK2, STAT3,p-JAK2 及 p-STAT3 蛋白相对表达水平

收集各组大鼠大脑皮质并切碎,根据其重量加入合适的裂解液,高速研磨离心后提取出其总蛋白,将总蛋白分装到1.5 mL离心管中置于金属浴中高温变性,检测各组蛋白水平后配置相同水平的样品;根据所需检测蛋白的分子量配置合适水平的凝胶,向各个凝胶孔道中加入相同体积的样品,先将电泳仪设置为80 V电泳30 min,再设置为120 V电泳至结束;预先配置一定体积的转膜液预冷,将电泳结束的凝胶与聚偏二氟乙烯膜(Polyvinylidene fluoride,PVDF)膜按照一定顺序置于转膜夹中进行转膜;将转膜结束的PVDF膜浸入快速封闭液中封闭15 min,Tris-HCl 缓冲盐溶液+Tween20(Tris-buffered saline with Tween-20,TBST)清洗后将需要的分子量的蛋白剪成适量大小在对应的抗体孵育盒中4℃孵育过夜,次日将条带清洗后室温孵育1 h对应的二抗,使用TBST清洗干净后滴加适量的发光液进行曝光、拍照。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 23.0 软件,所有计量数据均以均数

±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 偏头痛模型大鼠血清 Th1/Th2 免疫相关因子相对表达水平

与对照组比较,偏头痛组血清 TNF- α ,TNF- β ,IFN- γ ,IL-2 水平明显增高($P<0.05$),IL-4,IL-5,IL-9IL-10 水平明显降低($P<0.05$)(图1)。

2.2 抑制 JAK2 表达对偏头痛模型大鼠一般症状及脑血流量的影响

与对照组比较,偏头痛组烦躁易动,双耳明显变红、挠头次数增加($P<0.05$),脑血流量减少(图2);与偏头痛组比较,WP1066 组烦躁程度降低,双耳变红程度减弱且挠头次数减少($P<0.05$),脑血流量增加(图2)。

2.3 抑制 JAK2 表达对偏头痛模型大鼠大脑皮层 JAK2,STAT3 及其磷酸化水平的影响

与对照组比较,偏头痛组大脑皮层 JAK2,STAT3 水平无明显变化($P>0.05$),p-JAK2,p-STAT3 表达水平增高($P<0.05$);与偏头痛组比较,WP1066 组大脑皮层总 JAK2、总 STAT3 表达水平降低,p-JAK2,p-STAT3 表达水平降低($P<0.05$)(图3)。

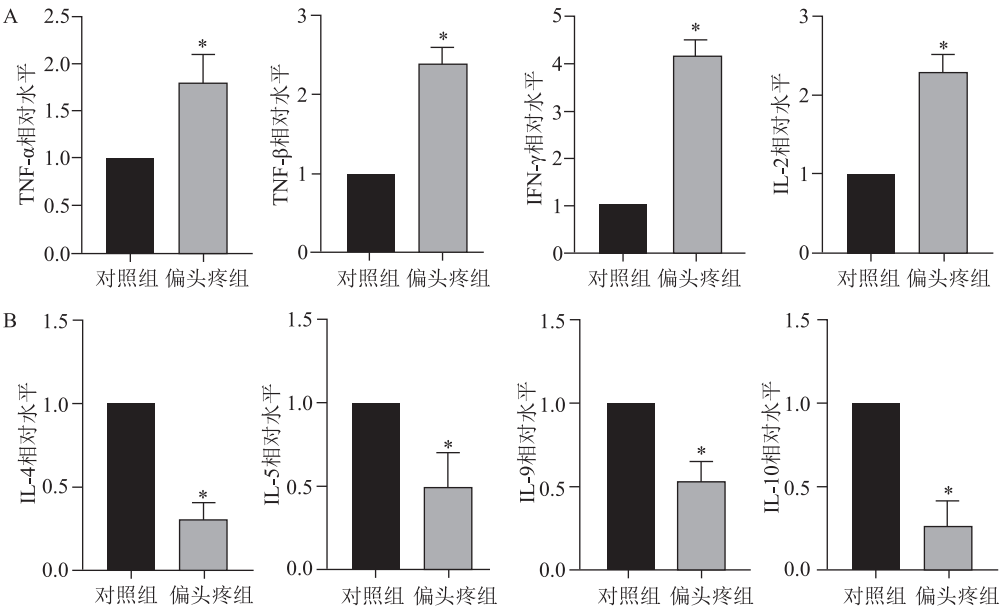


图1 各组大鼠血清 TNF- α ,TNF- β ,IFN- γ ,IL-2,IL-4,IL-5,IL-9,IL-10 相对表达水平 A 为试剂盒检测大鼠血清 TNF- α ,TNF- β ,IFN- γ ,IL-2 水平;B 为试剂盒检测各组大鼠血清 IL-4,IL-5,IL-9,IL-10 水平;与对照组比较,* $P<0.05$

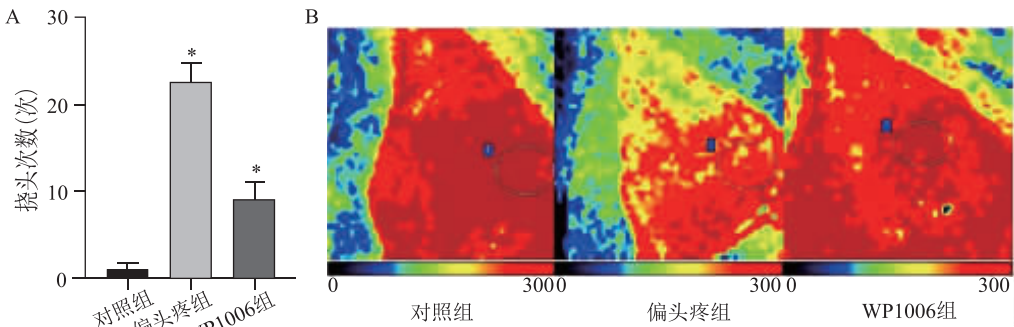


图2 各组大鼠挠头次数及脑血流量 A为各组大鼠挠头次数;B为各组大鼠脑血流量;与对照组比较,* $P<0.05$;与偏头痛组比较,# $P<0.05$

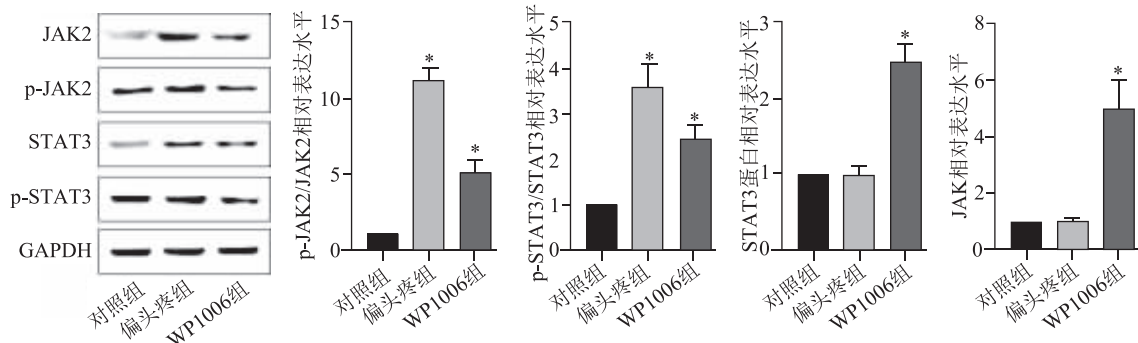


图3 各组大鼠大脑皮层 JAK2,STAT3,p-JAK2,p-STAT3 蛋白相对表达水平 与对照组比较,* $P<0.05$;与偏头痛组比较,# $P<0.05$

2.4 抑制 JAK2 对偏头痛模型大鼠血清疼痛相关神经递质水平的影响

与对照组大比较,偏头痛组血清 5-HT, β -EP 水平降低,GABA,NO 水平增高;与偏头痛组比较,WP1066 组血清 5-HT, β -EP 水平增高,GABA,NO 水平降低($P<0.05$)(表 1)。

表 1 各组大鼠血清中 5-HT, β -EP,GABA,NO 水平($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	5-HT (pg/mL)	β -EP (pg/mL)	GABA (ng/mL)	NO (μ mol/mL)
对照组	398.56 \pm 52.79	352.90 \pm 50.27	43.56 \pm 2.67	10.69 \pm 1.15
偏头痛组	306.52 \pm 41.22 *	253.71 \pm 38.17 *	69.21 \pm 4.22 *	22.05 \pm 2.37 *
WP1066 组	378.46 \pm 50.81 #	318.27 \pm 37.01 #	57.80 \pm 4.73 #	17.83 \pm 2.21 #

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与偏头痛组比较,# $P<0.05$

3 讨论

偏头痛是一种反复发作的神经系统疾病,严重影响患者的健康、社会和经济状况。根据流行病学报道,全球每 10 人中就有 1 人患有偏头痛,其发病率仍在显著增高^[12]。慢性偏头痛特点是头痛发作频繁,每月至少有 15 d 头痛。慢性偏头痛患者通常

有发作性偏头痛史,其头痛频率随时间延长而增加^[13]。据估计,每年约有 3% 的发作性偏头痛患者发展为慢性偏头痛,这种转变是双向的,约 26% 的慢性偏头痛患者在 2 年的随访中缓解为发作性偏头痛,这使得很难确认发作性偏头痛的累积患病率^[14]。神经生理学和影像学研究表明,慢性偏头痛可能与某些脑区的结构和功能改变有关,特别是皮层过度兴奋和脑干功能障碍^[15]。三叉神经系统的增敏也起着至关重要的作用。此外,一些分子机制如降钙素基因相关肽(Calcitonin gene-related peptide,CGRP)、垂体腺苷酸环化酶激活多肽(Pituitary adenylate cyclase activating peptide,PACAP)等已被证明参与慢性偏头痛的发病机制^[16]。然而,慢性偏头痛的完全病理生理学尚不完全清楚。

Th1/Th2 免疫失衡参与溃疡性结肠炎、新型冠状病毒肺炎(Corona virus disease 2019,COVID-19)、哮喘、特发性肺纤维化等多种疾病的发生发展过程^[17-19,6-8],且 Th1 与 Th2 分别通过分泌炎症因子 TNF- α ,TNF- β ,IFN- γ ,IL-2 与抗炎因子 IL-4,IL-5,IL-9,IL-10 激活 JAK2/STAT3 信号通路^[9,20]。JAK2/STAT3 信号通路参与癫痫、阿尔茨海默病等

多种中枢神经系统性疾病^[21-22]。杨建梅等^[23]研究表明复方藜苳片通过阻断 JAK2/STAT3 通路抑制皮层神经炎症来改善硝酸甘油致大鼠慢性偏头痛。既往研究显示,慢性偏头痛与神经递质 5-HT, β -EP, GABA, NO 的释放密切相关^[10-11]。然而,在慢性偏头痛大鼠模型 Th1/Th2 免疫失衡介导的 JAK2/STAT3 信号通路是否与神经递质的释放相关,未见报道。本研究结果显示,在慢性偏头痛模型大鼠中炎症因子 TNF- α , TNF- β , IFN- γ , IL-2 水平增高与抗炎因子 IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 水平降低,即 Th1/Th2 免疫失衡,此时大鼠大脑皮质中 p-JAK2, p-STAT3 表达水平增高,表明 JAK2/STAT3 信号通路被激活;进一步检测血清中神经递质水平显示 5-HT, β -EP, GABA, NO 水平明显异常,这与既往研究结果保持一致。为了进一步探究 JAK2/STAT3 信号通路与神经递质是否存在直接联系,本研究通过抑制该通路显示改善神经递质水平的异常。

综上所述,抑制 JAK2 可改善偏头痛模型大鼠行为学表现、改善脑血流量及神经递质水平,这可能与 Th1/Th2 免疫失衡介导的 JAK2/STAT3 信号通路相关,然而关于二者直接更为深入的机制有待进一步探究,本研究将为临床中治疗慢性偏头痛提供新的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Hovaguimian A, Roth J. Management of chronic migraine[Z], 2022; e067670.
- [2] Cho S, Chu MK. Serological biomarkers of chronic migraine [J]. Curr Pain Headache Rep, 2023, 27(10): 531-542.
- [3] Martínez-Pías E, García-Azorín D, Trigo-López J, et al. Migraña crónica con cefalea diaria [J]. Rev Neurol, 2021, 72 (4): 133-140.
- [4] Faraji F, Shojapour M, Farahani I, et al. Reduced regulatory T lymphocytes in migraine patients [J]. Neurol Res, 2021, 43(8): 677-682.
- [5] Arumugam M, Sugan Lal jabaris S [J]. Recent preclinical study offers a promising clue: role of regulatory T cells as biomarkers in migraine. Immunol Lett, 2021(240): 9-11.
- [6] Abdi H, Aganj Z, Hosseinzadeh H, et al. Crocin restores the balance of Th1/Th2 immune cell response in ConA-treated human lymphocytes [J]. Pharmacol Rep, 2022, 74(3): 513-522.
- [7] Lv L, Chen Z, Bai W, et al. Taurohyodeoxycholic acid alleviates trinitrobenzene sulfonic acid induced ulcerative colitis via regulating Th1/Th2 and Th17/Treg cells balance [J]. Life Sci, 2023; 121501.
- [8] Supriya R, Gao Y, Gu Y, et al. Role of exercise intensity on Th1/Th2 immune modulations during the COVID-19 pandemic [Z], 2021; 761382.
- [9] Lu Y, Ma Q, Yu L, et al. JAK2 inhibitor ameliorates the progression of experimental autoimmune myasthenia gravis and balances Th17/Treg cells via regulating the JAK2/STAT3-AKT/mTOR signaling pathway [Z], 2023; 109693.
- [10] Nan N, Gong MX, Wang Q, et al. Wuzhuyu decoction relieves hyperalgesia by regulating central and peripheral 5-HT in chronic migraine model rats [Z], 2022; 153905.
- [11] Wang W, Zhang XY, Bai XY, et al. Gamma-aminobutyric acid and glutamate/glutamine levels in the dentate nucleus and periaqueductal gray with episodic and chronic migraine: a proton magnetic resonance spectroscopy study [J]. J Headache Pain, 2022, 23(1): 83.
- [12] Parreira E, Luzeiro I, Pereira Monteiro JM. Enxaqueca crónica e refratária: como diagnosticar e tratar (chronic and refractory migraine: how to diagnose and treat) [J]. Acta Med Port, 2020, 33(11): 753-760.
- [13] Scher AI, Buse DC, Fanning KM, et al. Comorbid pain and migraine chronicity: the chronic migraine epidemiology and outcomes study [J]. Neurology, 2017, 89(5): 461-468.
- [14] Quintana S, Russo M, Manzoni GC, et al. Comparison study between erenumab, fremanezumab, and galcanezumab in the preventive treatment of high frequency episodic migraine and chronic migraine [J]. Neurol Sci, 2022, 43(9): 5757-5758.
- [15] Yuan ZY, Wang W, Zhang XY, et al. Altered functional connectivity of the right caudate nucleus in chronic migraine: a resting-state fMRI study [J]. J Headache Pain, 2022, 23(1): 154.
- [16] Sevivas H, Fresco P. Treatment of resistant chronic migraine with anti-CGRP monoclonal antibodies: a systematic review [J]. Eur J Med Res, 2022, 27(1): 86.
- [17] Anapindi KDB, Yang N, Romanova EV, et al. PACAP and other neuropeptide targets link chronic migraine and opioid-induced hyperalgesia in mouse models [J]. Mol Cell Proteomics, 2019, 18(12): 2447-2458.
- [18] Zhang BB, Zeng MN, Zhang QQ, et al. Ephedrae herba polysaccharides inhibit the inflammation of ovalbumin induced asthma by regulating Th1/Th2 and Th17/Treg cell immune imbalance [J]. Mol Immunol, 2022, 152: 14-26.
- [19] Spagnolo P, Tonelli R, Samarelli AV, et al. The role of immune response in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis: far beyond the Th1/Th2 imbalance [J]. Expert Opin Ther Targets, 2022, 26(7): 617-631.
- [20] Wang W, Sung N, Gilman-Sachs A, et al. Cell profiles in pregnancy and recurrent pregnancy losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh cells [Z], 2020; 2025.
- [21] 陈菲, 陈霞, 黄财城. 星形胶质细胞外泌体对癫痫大鼠小胶质细胞活化及 JAK2/STAT3 通路的影响 [J]. 卒中与神经疾病, 2022, 29(3): 267-273, 280.
- [22] 吴倩. 从 JAK2/STAT3 信号通路研究参芪益智颗粒调控星形胶质细胞抗 AD 作用机制 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2018.
- [23] 杨建梅, 邓海燕, 李坤, 等. 复方藜苳片通过阻断 JAK2/STAT3 通路抑制皮层神经炎症改善硝酸甘油致大鼠慢性偏头痛 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2018, 20(12): 2224-2230.