

王敏,李作孝. 基于 JAK2/STAT3/SOCS3 信号通路探讨复方甘草酸苷对实验性自身免疫性脑脊髓炎的防治作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(6): 62-68.

Wang M, Li ZX. Intraperitoneal injection of compound glycyrrhizin exerts preventive and therapeutic effects on experimental autoimmune encephalomyelitis via the JAK2/STAT3/SOCS3 signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(6): 62-68.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.06.009

基于 JAK2/STAT3/SOCS3 信号通路探讨复方甘草酸苷对实验性自身免疫性脑脊髓炎的防治作用

王 敏,李作孝*

(西南医科大学附属医院神经内科,四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨复方甘草酸苷(CG)对实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)小鼠的防治作用及其对 JAK2/STAT3/SOCS3 信号通路的影响。**方法** 将 50 只雌性 C57BL/6 小鼠随机分为 5 组:空白组、模型组和 CG 低、中、高剂量干预组,每组 10 只。模型组和 CG 各干预组建立 EAE 模型,干预组分别予以 CG 低、中、高剂量(15、30、60 mg/(kg·d))腹腔注射,空白组及模型组腹腔注射等体积生理盐水,连续 14 d。观察小鼠神经功能缺损评分、病理学改变及程度。采用 Western blot 法检测脑组织蛋白的表达、实时荧光定量 RT-PCR 法检测脑组织 mRNA 的含量。**结果** 与模型组比较,CG 各干预组最高神经功能缺损评分($P<0.05$)及累计神经功能缺损评分($P<0.05$)降低,脊髓组织炎性细胞浸润及脱髓鞘程度减轻,JAK2、STAT3 蛋白及其 mRNA 表达下降($P<0.05$),SOCS3 蛋白及其 mRNA 表达升高($P<0.05$),ROR γ t mRNA 表达下降($P<0.05$),Foxp3 mRNA 升高($P<0.05$)。**结论** CG 对 EAE 小鼠发挥防治作用,其机制可能与负性调控因子 SOCS3 的表达上调,JAK/STAT 信号通路的抑制以及影响 Th17/Treg 细胞平衡有关。

【关键词】 复方甘草酸苷;实验性自身免疫性脑脊髓炎;JAK/STAT 信号通路;ROR γ t;Foxp3

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)06-0062-07

Intraperitoneal injection of compound glycyrrhizin exerts preventive and therapeutic effects on experimental autoimmune encephalomyelitis via the JAK2/STAT3/SOCS3 signaling pathway

WANG Min, LI Zuoxiao*

(Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of glycyrrhizin compound (CG) on mouse models of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) via the JAK2/STAT3/SOCS3 signaling pathway. **Methods** Fifty female C57BL/6 mice were randomly divided into the control group, model group, and high-dose, medium-dose and low-dose CG intervention groups ($n = 10$ mice per group). The model and CG intervention groups established the EAE model. The intervention groups were injected with CG (15 mg/(kg·d), 30 mg/(kg·d), or 60 mg/(kg·d)) for 14 consecutive days. The control and model groups were simultaneously intraperitoneally injected with equal volumes of saline. The neurological deficit scores and pathological changes in each group were recorded. Western blot was used to detect protein expression in

[基金项目] 泸州市政府-西南医科大学科技战略合作基金项目(2018LZXNYD-DK17)。

[作者简介] 王敏(1993—)女,硕士研究生,研究方向:神经免疫。E-mail: 1213772596@qq.com

[通信作者] 李作孝(1964—)男,教授,硕士生导师,研究方向:神经免疫。E-mail: lzx3235@sina.com

the brain tissue, and real-time fluorescence quantitative RT-PCR was used to detect mRNA expression in the brain tissue.

Results Compared with the model group, the highest neurological deficit and cumulative neurological deficit scores were reduced, spinal cord inflammation and demyelination were reduced, JAK2 and STAT3 protein and mRNA expressions were decreased, SOCS3 protein and mRNA expressions were increased, ROR γ t mRNA expression was decreased, and FOXP3 mRNA expression was increased in all CG groups (all $P < 0.05$). **Conclusions** CG exerted preventive and therapeutic effects on EAE model mice. The mechanism may be related to upregulation of SOCS3, inhibition of the JAK/STAT signaling pathway, and rectification of the Th17/Treg immune imbalance.

【Keywords】 compound glycyrrhizin; experimental autoimmune encephalomyelitis; JAK/STAT pathway; ROR γ t; Foxp3

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是一种以弥漫性炎性脱髓鞘为特征的中枢神经系统自身免疫性疾病,目前没有任何药物能够完全预防或逆转其渐进性神经系统病变^[1]。实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)是研究 MS 的经典动物模型。MS 和 EAE 发病主要由 T 细胞,尤其是 CD4⁺T 亚群介导。尽管如此,MS 发病机制仍不清楚。研究显示 Janus 激酶/信号转换转录激活子(JAK/STAT)信号通路通过传导多种炎性细胞因子信号参与 EAE 的发病过程^[2]。并且有研究显示 STAT3 可诱导维甲酸相关的孤儿受体 γ t (ROR γ t) 的表达,驱动原始 CD4⁺T 细胞向 Th17 细胞分化,从而导致 Th17/Treg 免疫失衡发挥致病作用^[3]。Th17 细胞产生促炎性细胞因子,主要是 IL-17,有助于炎症和脱髓鞘的发生。而细胞因子信号转导抑制子(SOCS)蛋白家族能抑制 JAK/STAT 信号通路发挥负调控作用^[4]。复方甘草酸苷(compound glycyrrhizin, CG)是中药甘草的提取物,具有抗炎、免疫调节、保护神经以及促进髓鞘再生的作用^[5]。受此启发,本研究建立了小鼠 EAE 模型,通过观察各组小鼠临床症状、脊髓组织炎症及脱髓鞘情况,同时检测脑组织 JAK2、STAT3 及 SOCS3 蛋白含量及其 mRNA 的表达以及 ROR γ t、Foxp3 mRNA 的表达,探讨 CG 对 EAE 小鼠的防治作用及其可能机制,为 MS 的治疗提供新的策略。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雌性 SPF 级 C57BL/6 小鼠 50 只,8 周龄,体重 18~22 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2016-0002],于西南医科大学忠山动物房[SYXK(川)2018-065]饲养,环境清洁,室内通风良好,保持室温 25℃ 左右,12 h 明暗交替,食料和饮

水充足。实验方案通过西南医科大学实验动物伦理委员会动物福利伦理审查(201912-8),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂

CG 注射液(商品名“美能”,每支 20 mL)购自卫材(中国)药业有限公司;小鼠髓鞘少突胶质细胞糖蛋白多肽段(MOG₃₅₋₅₅)购自上海吉尔生化有限公司;福氏完全佐剂和百日咳毒素均购自美国 Sigma 公司;兔抗 JAK2 购自美国 CST 公司;兔抗 STAT3、SOCS3 及 GAPDH 抗体均购自英国 Abcam 公司;山羊抗兔 HRP 购自美国 Aspen 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 分组及 EAE 模型制作

50 只 C57BL/6 小鼠适应性饲养一周后,随机分为 5 组:空白组、模型组和 CG 低、中、高剂量干预组,每组 10 只。将 MOG₃₅₋₅₅ 溶于 PBS 中,稀释为 3 mg/L,结核分支杆菌溶入福氏完全佐剂中稀释为 5 mg/L,两种液体按 1:1 于冰上充分乳化制成油包水状抗原乳剂。模型组和 CG 各干预组每只小鼠于脊柱两侧分四点皮下注射 0.2 mL 抗原乳剂,空白组小鼠注射等体积生理盐水。造模当日记作第 0 天,模型组和 CG 各干预组分别于造模第 0 天和第 2 天尾静脉注射百日咳菌毒素提高模型成功率,每只 500 ng。

1.3.2 药物配置及干预

将 CG 用生理盐水稀释为 1/2 原液、1/4 原液备用,本实验药物剂量浓度按照人和动物间体表面积等效剂量比值计算 CG 低、中、高剂量分别为 15、30、60 mg/(kg·d),CG 1/4 原液、1/2 原液、原液分别给予 CG 低、中、高剂量干预组小鼠,则 CG 各干预组每只小鼠给药体积均为 30 mL/kg。自造模第 1 天起,CG 低、中、高剂量干预组每只小鼠分别腹腔注射 1/4 CG 原液、1/2 CG 原液、CG 原液 30 mL/kg,连续注射 14 d,每日 1 次。空白组及 EAE 模型组每只小

鼠腹腔注射生理盐水 30 mL/kg, 连续注射 14 d, 每日 1 次。

1.3.3 小鼠一般情况观察及神经功能缺损评分

造模第 0 天起每天同一时间观察小鼠精神情况、饮食活动, 行神经功能缺损评分。使用改良 Kono's 5 分法^[6], 神经功能缺损评分如下: 0 分: 正常; 0.5 分: 小鼠仅尾部尖端下垂; 1 分: 尾部拖地; 1.5 分: 单后肢不完全瘫痪; 2 分: 单后肢完全瘫痪; 2.5 分: 单后肢瘫痪伴另一后肢不完全瘫痪; 3 分: 双后肢完全瘫痪; 3.5 分: 双后肢瘫痪伴一前肢瘫痪; 4 分: 四肢瘫痪; 5 分: 死亡。

1.3.4 脊髓组织 HE 染色

各组小鼠在第 30 天处死, 取脊髓组织, 4% 多聚甲醛固定 36 h 后制作石蜡切片。石蜡切片脱蜡后用蒸馏水洗涤。切片置入 Harris 苏木素和伊红染液染色, 脱水, 封片。

1.3.5 蛋白提取和 Western blot 分析

各组小鼠在第 30 天处死, 取少量脑组织, 剪碎加入 RIPA 裂解缓冲液, 30 min 后将所得裂解液 4℃ 离心 5 min, 取上清液, 即为总蛋白溶液。BCA 法检测蛋白浓度。样品用 SDS-PAGE 电泳分离, 将蛋白转至 PVDF 膜上。转膜完成后, 加入密封溶液, 室温封闭 1 h。去尽封闭液, 加入一抗稀释剂, 4℃ 孵育过夜。一抗稀释剂为兔抗 JAK2、STAT3 及 SOCS3 抗体 (1:1000 稀释)。第 2 天取出条带, 用 TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。加入二抗稀释剂 (山羊抗兔 HRP 抗体), 室温孵育 30 min。加入 ECL 混合发光溶液 (A 液:B 液=1:1), 暗室中曝光, 显影、定影。使用 AlphaEaseFC 软件处理结果, 以 GAPDH 为内部参数, 计算蛋白的相对表达。

1.3.6 RNA 提取及实时荧光定量 RT-PCR

各组小鼠在第 30 天处死, 取大脑组织约 100 mg, 用 TRIpure 试剂分离得到总 RNA, 用 EntiLink™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒 (ELK Biotechnology, EQ003) 按照制造商的说明逆转录成 cDNA。设计针对 JAK2、STAT3、SOCS3、RORγt 及 Foxp3 的引物 (所有引物均由武汉金开瑞生物工程有限公司合成, 见表 1, 在 StepOne™ Real-Time PCR 仪 (Life technologies 公司) 上扩增基因片段, 每个样品均作 3 个复孔。反应在 95℃ 热启动 3 min, 然后在 95℃ 进行 10 s (变性)、58℃ 进行 30 s (复性) 和

72℃ 进行 30 s (延伸), 变性、复性、延伸三个过程循环 40 次。以 GAPDH 为内部参数, 通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算基因含量的相对表达。

1.4 统计学方法

用 SPSS 22.0 软件行统计学分析和处理数据, 实验中获得的所有数据均为计量数据, 表示方法为平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$)。单因素方差分析用于多组间比较, LSD-*t* 检验用于各组之间的两两比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠临床表现及神经功能缺损评分

空白组小鼠未发病。模型组及 CG 各干预组在第 8~9 天开始先后出现临床症状, 主要表现为饮食减少、体重下降、活动减慢, 行走时可见拖尾; 第 14~17 天后迅速达发病高峰, 表现为不同程度的肢体瘫痪甚至死亡, 经历短暂的高峰期后, 症状逐渐缓解, 肢体瘫痪逐渐恢复, 见图 1。经药物干预后发现: 与模型组比较, CG 各干预组小鼠临床症状减轻, 多表现为尾部尖端下垂、单后肢瘫痪或不完全瘫痪, 剂量越大症状越轻。且与模型组比较, CG 各干预组最高神经功能缺损评分及累计神经功能缺损评分降低 ($P < 0.05$), 干预剂量越大, 最高神经功能缺损评分及累计神经功能缺损评分越低 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.2 各组小鼠脊髓病理学改变

空白组脊髓组织几乎未见炎性细胞浸润, 髓鞘结构相对正常; EAE 模型组及 CG 各干预组脊髓组织有不同程度的炎性细胞浸润, 以单核细胞为主, 脊髓前索及侧索白质处髓鞘结构松散, 崩解脱失, 但与 EAE 模型组比较, CG 各干预组脊髓组织的炎性细胞浸润及脱髓鞘程度均明显减轻, 见图 2。

2.3 各组小鼠脑组织 JAK2、STAT3 及 SOCS3 蛋白的表达

与空白组比较, 模型组 JAK2、STAT3 的蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$), 负性调控因子 SOCS3 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$); 经药物干预后发现: 与模型组比较, CG 各剂量干预组 JAK2、STAT3 蛋白表达均明显降低 ($P < 0.05$), 负性调控因子 SOCS3 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), 且干预剂量越大, 蛋白表达变化越明显 ($P < 0.05$), 见图 3、表 3。

表 1 RT-PCR 引物序列
Table 1 RT-PCR primer sequence

基因名称		引物序列(5'-3')
Gene name		Primer sequence
GAPDH	上游 F	TGAAGGGTGGAGCCAAAAG
	下游 R	AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT
JAK2	上游 F	GGAATTCAGTGCTCAAGAGGG
	下游 R	CGCATCCGCAGTTAGTCTGT
STAT3	上游 F	AAAGACTCACATGCCACGTTG
	下游 R	CAATTTCCATTGGCTTCTCAAG
SOCS3	上游 F	TCAAGACCTTCAGCTCCAAAAG
	下游 R	GTCTTGACGCTCAACGTGAAG
Foxp3	上游 F	ACCACCTTCTGCTGCCACTG
	下游 R	AAGGTTGCTGTCTTTCCTGGG
RORγt	上游 F	TGTTTTTCTGAGGATGAGATTGC
	下游 R	GCTAGGAGGCCTTGTGCGATG

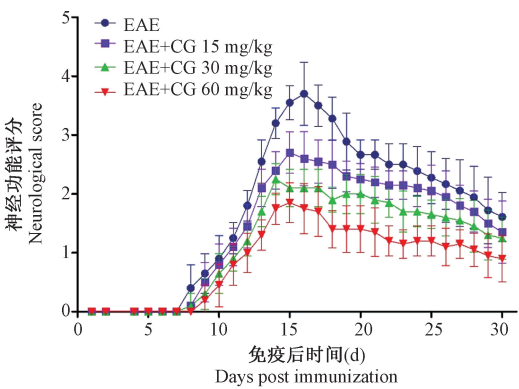
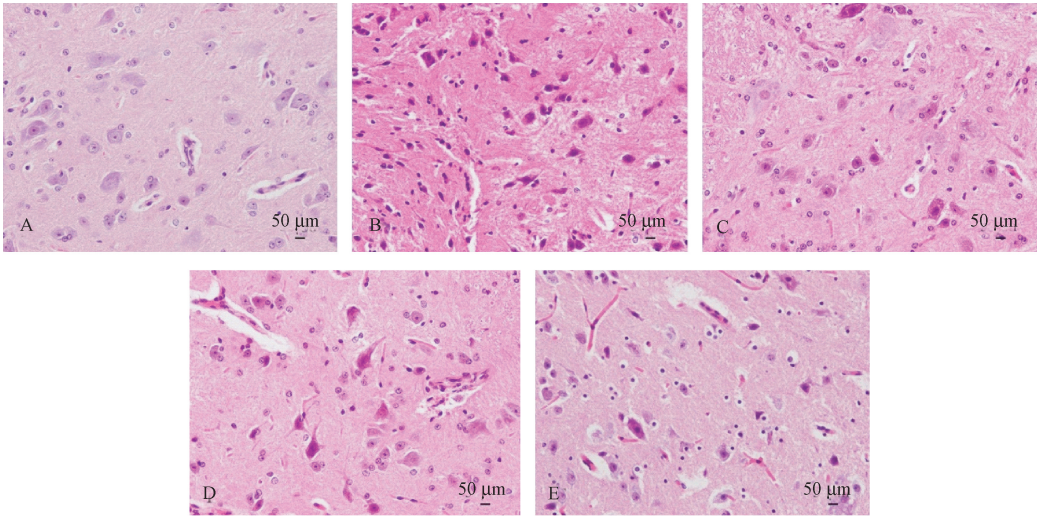


图 1 各组神经功能缺损评分
Figure 1 Neurological deficit score of each group

表 2 模型组及 CG 各干预组最高神经功能缺损评分及累计神经功能缺损评分比较 (n=10)
Table 2 The highest neurological deficit score and the cumulative neurological deficit score were compared between model group and three CG intervention groups

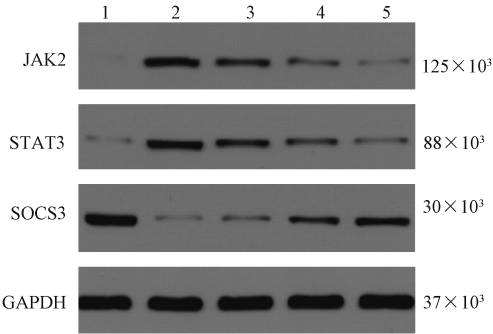
组别 Groups	最高评分 [#] Highest score	累计评分 [#] Cumulative score
模型组 Model group	3.70±0.54	48.75±11.65
低剂量组 Low-dose CG group	2.75±0.26 ^a	42.30±4.35 ^a
中剂量组 Medium-dose CG group	2.40±0.32 ^{ab}	35.25±3.53 ^{ab}
高剂量组 High-dose CG group	1.85±0.34 ^{abc}	26.25±5.71 ^{abc}
F	42.23	18.66
P	<0.01	<0.01

注: [#]指神经功能缺损评分;与 Model 组相对比, ^a*P*<0.05;与各剂量 CG 干预组相对比, ^b*P*<0.05, ^c*P*<0.05。
Note. [#]refers to the neurological deficit score. Compared with the Model group, ^a*P*<0.05. Compared with the CG intervention group at different doses, ^b*P*<0.05, ^c*P*<0.05.



注:A:空白组;B:模型组;C:CG 低剂量组;D:CG 中剂量组;E:CG 高剂量组。
图 2 各组小鼠脊髓组织 HE 染色

Note. A, Control group. B, Model group. C, Low-dose CG group. D, Medium-dose CG group. E, High-dose CG group.
Figure 2 HE staining of spinal cord tissue in each group of mice



注:1:空白组;2:模型组;3:CG 低剂量组;4:CG 中剂量组;5:CG 高剂量组。

图 3 各组 Western blot 检测 JAK2、STAT3、SOCS3 表达情况

Note. 1, Control group. 2, Model group. 3, Low-dose CG group. 4, Medium-dose CG group. 5, High-dose CG group.

Figure 3 Western blot analysis showing the expressions of JAK2、STAT3、SOCS3 in the mice

2.4 各组小鼠脑组织的 JAK2 mRNA、STAT3 mRNA 及 SOCS3 mRNA 的表达

与空白组比较,模型组 JAK2 mRNA、STAT3 mRNA 升高 ($P<0.05$),SOCS3 mRNA 降低 ($P<0.05$);经药物干预后发现:与 EAE 模型组比较,CG 各剂量干预组 JAK2 mRNA、STAT3 mRNA 均显著降低 ($P<0.05$),SOCS3 mRNA 显著升高 ($P<0.05$),与剂量呈依赖性 ($P<0.05$),见表 4。

2.5 各组小鼠脑组织 Th17/Treg 细胞关键转录因子的表达

与空白组比较,模型组 ROR γ t mRNA 升高 ($P<0.05$),Foxp3 mRNA 降低 ($P<0.05$);经药物干预后发现:与模型组比较,CG 各剂量干预组 ROR γ t mRNA 显著降低 ($P<0.05$),Foxp3 mRNA 显著升高 ($P<0.05$),干预剂量越大,作用效果越明显 ($P<0.05$),见表 5。

表 3 各组小鼠脑组织 JAK2、STAT3 及 SOCS3 蛋白的表达

Table 3 Expression of JAK2, STAT3 and SOCS3 proteins in brain tissues of mice in each group

组别 Groups	JAK2/GAPDH	STAT3/GAPDH	SOCS3/GAPDH
空白组 Control group	0.03±0.01	0.05±0.01	0.61±0.04
模型组 Model group	0.63±0.04 ^a	0.60±0.02 ^a	0.08±0.02 ^a
低剂量组 Low-dose CG group	0.34±0.05 ^{ab}	0.34±0.04 ^{ab}	0.15±0.02 ^{ab}
中剂量组 Medium-dose CG group	0.17±0.04 ^{abc}	0.22±0.02 ^{abc}	0.28±0.03 ^{abc}
高剂量组 High-dose CG group	0.09±0.01 ^{abcd}	0.12±0.02 ^{abcd}	0.41±0.04 ^{abcd}
F	546.17	754.31	414.61
P	<0.01	<0.01	<0.01

注:与 Contol 组相对比,^a $P<0.05$;与 Model 组相对比,^b $P<0.05$;与各剂量 CG 干预组相对比,^c $P<0.05$,^d $P<0.05$ 。
Note. Compared with Control group, ^a $P<0.05$. Compared with the Model group, ^b $P<0.05$. Compared with the CG intervention group at different doses, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.05$.

表 4 各组小鼠脑组织 JAK2 mRNA、STAT3mRNA 及 SOCS3 mRNA 的表达

Table 4 Contents of JAK2 mRNA, STAT3mRNA and SOCS3 mRNA in brain tissues of mice in each group

组别 Groups	JAK2	STAT3	SOCS3
空白组 Control group	0.68±0.35	1.32±0.78	1.26±0.13
模型组 Model group	10.09±0.55 ^a	18.07±1.70 ^a	0.14±0.08 ^a
低剂量组 Low-dose CG group	6.36±0.79 ^{ab}	12.30±1.71 ^{ab}	0.34±0.09 ^{ab}
中剂量组 Medium-dose CG group	4.97±0.60 ^{abc}	9.34±1.84 ^{abc}	0.60±0.06 ^{abc}
高剂量组 High-dose CG group	2.49±0.41 ^{abcd}	5.39±1.30 ^{abcd}	0.83±0.06 ^{abcd}
F	418.51	178.91	244.60
P	<0.01	<0.01	<0.01

注:与 Contol 组相对比,^a $P<0.05$;与 Model 组相对比,^b $P<0.05$;与各剂量 CG 干预组相对比,^c $P<0.05$,^d $P<0.05$ 。
Note. Compared with Control group, ^a $P<0.05$. Compared with the Model group, ^b $P<0.05$. Compared with the CG intervention group at different doses, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.05$.

表 5 各组小鼠脑组织 Th17/Treg 细胞关键转录因子的表达

Table 5 Expression of key transcription factors of Th17/Treg cells in brain tissue of mice in each group

组别 Groups	ROR γ t	Foxp3
空白组 Control group	1.22±0.43	1.06±0.12
模型组 Model group	12.18±1.40 ^a	0.38±0.07 ^a
低剂量组 Low-dose CG group	8.53±1.30 ^{ab}	0.54±0.06 ^{ab}
中剂量组 Medium-dose CG group	6.52±1.12 ^{abc}	0.73±0.10 ^{abc}
高剂量组 High-dose CG group	3.73±0.99 ^{abcd}	0.81±0.08 ^{abcd}
F	148.07	85.48
P	<0.01	<0.01

注:与 Contol 组相对比,^a $P<0.05$;与 Model 组相对比,^b $P<0.05$;与各剂量 CG 干预组相对比,^c $P<0.05$,^d $P<0.05$ 。
Note. Compared with Control group, ^a $P<0.05$. Compared with the Model group, ^b $P<0.05$. Compared with the CG intervention group at different doses, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.05$.

3 讨论

MS 是一种中枢神经系统自身免疫性疾病,其主要特征为多中心炎症和脱髓鞘^[7]。EAE 是国际公认的研究 MS 病理过程的理想动物模型^[8]。目前治疗 MS 的疾病修饰药物是否可以延缓临床进展以及是否安全仍存在争议。CG 是以甘草酸(Glycyrrhizic acid, GL)(亦称甘草甜素)为主要活性物质,并辅以甘氨酸、半胱氨酸以及蛋氨酸等组成的复方制剂。而甘草次酸(Glycyrrhetic acid, GA)是 GL 的主要活性代谢产物,是 GL 的非糖部分,被认为是 GL 大部分药理特性的原因。CG 为甘草酸类第二代制剂,以 β 体甘草酸单铵盐为主要成分。甘草具有抗炎、抗氧化、免疫调节、保护神经以及促进髓鞘再生的作用,且被广泛用于湿疹、荨麻疹、过敏性紫癜、银屑病、溃疡性结肠炎等免疫相关疾病的治疗。Tabuchi 等^[9]研究显示 GA 可以渗透血脑屏障到达大脑。Jia 等^[10]用甘草甜素治疗 BALB/c 小鼠模型的坐骨神经损伤,结果表明,与甘草甜素低剂量组或对照组相比,甘草甜素高剂量和中剂量能促进坐骨神经髓鞘形成。Li 等^[11]研究发现,GL 可以通过降低 HMGB1 水平,灭活星形胶质细胞和小胶质细胞以及抑制神经元损伤来降低 EAE 的严重程度。受此启发,本实验建立 MS 的动物模型 EAE,并使用 CG 干预模型,以期寻找 MS 的潜在治疗药物。结果显示:与 EAE 模型组比较,CG 各干预组小鼠肢体瘫痪程度减轻,脊髓组织炎性细胞浸润及脱髓鞘程度明显减轻。另外,CG 各干预组最高神经功能缺损评分及累计神经功能缺损评分明显降低,且呈剂量依赖性。表明 CG 能减轻 EAE 小鼠的病情进展,可能对 EAE 小鼠发挥防治作用。

JAK/STAT 信号通路能调控大量炎性细胞因子(如 IL-6、IL-12、IL-22、IL-23 等)的生物学活动,广泛参与炎症、细胞增殖及免疫调节等病理生理过程^[12]。已证实 JAK/STAT 信号通路的异常活跃与 EAE 发病密切相关^[13]。至今发现 JAKs 有四种亚型,分别为 JAK1-3 和 TYK2。STAT 位于 JAK 下游,是信号传导及转录激活因子,STAT 家族包括 STAT1-4、STAT5a、STAT5b 以及 STAT6。当细胞外信号(IL-6 等)与目标细胞对应受体结合,JAKs 被激活,胞浆中 STATs 单体磷酸化形成二聚体,二聚体进入细胞核内与特定的 DNA 序列结合,诱导目标基因表达,以调控特定细胞因子的表达^[14]。不同的 T 细胞

亚群被这些特定细胞因子激活后,又产生大量炎性细胞因子来驱动炎症,开启持续炎症级联反应,引起脑、脊髓、视神经的慢性炎症和神经元变性,促进少突胶质细胞凋亡和脱髓鞘^[2,15]。而 SOCS 是该通路的主要负调控机制之一。SOCS 家族成员有 SOCS1-7 及 CIS^[16]。研究发现在动物模型^[17-18]和体外实验^[19]中,GL 均显示出抑制 JAK/STAT 信号途径的作用,从而减轻了炎症反应。本实验结果显示,与空白组比较,EAE 模型组 JAK2、STAT3 的蛋白表达量及其 mRNA 含量均上调,同时 SOCS3 在 EAE 小鼠体内的表达明显下调,且以高剂量组为甚,表明负性调控因子 SOCS3 的缺失及 JAK2、STAT3 的异常活化均参与 EAE 小鼠的发病过程,这与既往研究一致。进一步研究发现,与 EAE 模型组比较,CG 干预后能降低 JAK2、STAT3 蛋白及其 mRNA 的表达,同时 SOCS3 的蛋白及其 mRNA 的表达增高,且以高剂量组为甚。由此证明,CG 可能通过上调负性调控因子 SOCS3 以及抑制 JAK2/STAT3 信号通路的异常活化,以抑制炎症级联反应,减轻 EAE 小鼠临床症状,发挥对 EAE 小鼠的防治作用。

另外 JAK/STAT 信号通路还能调控细胞影响幼稚 CD4⁺T 细胞的分化方向参与 MS/EAE 发病。众所周知,IL-6 通过激活 T 细胞 gp130-STAT3 途径直接促进 Th17 细胞的发育^[20]。Th17 细胞能高分泌 IL-17 A、IL-17F、IL-22 和 IL-23,介导自身免疫反应,在 MS/EAE 中发挥致病作用,ROR γ t 是诱导幼稚 CD4⁺T 细胞向 Th17 细胞分化的关键转录因子^[21-22]。而 STAT3 是诱导 ROR γ t 所必需的。Yang 等^[23]研究揭示了在 STAT3 缺陷的 Th 细胞中 ROR γ t 的表达大大降低,同时观察到转录因子叉头框蛋白 P3(Foxp3)表达升高。因此,STAT3 和 ROR γ t 在幼稚 CD4⁺T 细胞分化为 Th17 细胞中起关键作用。Treg 细胞产生细胞因子 IL-10 和 TGF- β 抑制自身免疫性疾病,与 Th17 细胞相互拮抗以维持免疫稳态,Foxp3 是 Treg 细胞发育和发挥功能的主调节因子^[24-25]。据报道,GL 可以有效抑制 Th17 的分化和信号传导^[26]。本研究发现,CG 明显下调了 EAE 小鼠的 STAT3 和 ROR γ t 的表达,同时 Foxp3 的表达上调。提示 CG 可以上调保护性因子 Foxp3 的表达并抑制炎症性因子 ROR γ t 的表达以纠正 Th17/Treg 免疫失衡,从而使 Th17/Treg 细胞平衡向有利于 Treg 细胞的方向分化,减轻 EAE 小鼠炎症反应。

综上所述,CG 对 EAE 小鼠防治作用的机制可

能与上调负性调控因子 SOCS3 的表达,抑制 JAK/STAT 信号通路以及影响 Th17/Treg 细胞平衡有关。本实验提示 CG 可能是 MS 的一种潜在治疗剂,然而,目前 CG 对 EAE 研究甚少,且 EAE 发病机制十分复杂,CG 调控 JAK/STAT 信号通路的细胞外信号尚不明确以及是否涉及其他信号通路有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Multiple Sclerosis [J]. N Engl J Med, 2018, 378(2): 169-180.
- [2] Yin L, Chen Y, Qu Z, et al. Involvement of JAK/STAT signaling in the effect of cornel iridoid glycoside on experimental autoimmune encephalomyelitis amelioration in rats [J]. J Neuroimmunol, 2014, 274(1-2): 28-37.
- [3] Lee GR. The balance of Th17 versus treg cells in autoimmunity [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(3): 730.
- [4] Durham GA, Williams JLL, Nasim MT, et al. Targeting SOCS proteins to control JAK-STAT signalling in disease [J]. Trends Pharmacol Sci, 2019, 40(5): 298-308.
- [5] Hosseinzadeh H, Nassiri-Asl M. Pharmacological effects of Glycyrrhiza spp. and its bioactive constituents: update and review [J]. Phytother Res, 2015, 29(12): 1868-1886.
- [6] Dijkstra S, Kooij G, Verbeek R, et al. Targeting the tetraspanin CD81 blocks monocyte transmigration and ameliorates EAE [J]. Neurobiol Dis, 2008, 31(3): 413-421.
- [7] Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, et al. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis [J]. N Engl J Med, 2000, 343(20): 1430-1438.
- [8] 李康宁, 樊永平, 王蕾. 不同剂量 MOC₃₅₋₅₅ 抗原诱导 EAE 小鼠模型的免疫组织化学比较 [J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(6): 451-456, 432-434.
- [9] Tabuchi M, Imamura S, Kawakami Z, et al. The blood-brain barrier permeability of 18beta-glycyrrhetic acid, a major metabolite of glycyrrhizin in Glycyrrhiza root, a constituent of the traditional Japanese medicine yokukansan [J]. Cell Mol Neurobiol, 2012, 32(7): 1139-1146.
- [10] Jia YX, Li JR, Mao CY, et al. Glycyrrhizin improves p75NTR-associated sciatic nerve regeneration in a BALB/c mouse model [J]. Exp Ther Med, 2014, 7(5): 1141-1146.
- [11] Li J, Shi J, Sun Y, et al. Glycyrrhizin, a potential drug for autoimmune encephalomyelitis by inhibiting high-mobility group box 1 [J]. DNA Cell Biol, 2018, 37(12): 941-946.
- [12] 郑娜, 王奇, 尹琳琳. 多发性硬化症信号传导通路异常研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(7): 77-80.
- [13] Zhang J, Zeng YQ, Zhang J, et al. Tripchlorolide ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by down-regulating

- ERK1/2-NF-kappaB and JAK/STAT signaling pathways [J]. J Neurochem, 2015, 133(1): 104-112.
- [14] Gadina M, Gazaniga N, Vian L, et al. Small molecules to the rescue: Inhibition of cytokine signaling in immune-mediated diseases [J]. J Autoimmun, 2017, 85: 20-31.
- [15] T Virtanen A, Haikarainen T, Raivola J, et al. Selective JAKinibs: prospects in inflammatory and autoimmune diseases [J]. BioDrugs, 2019, 33(1): 15-32.
- [16] Mahony R, Ahmed S, Diskin C, et al. SOCS3 revisited: a broad regulator of disease, now ready for therapeutic use? [J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(17): 3323-3336.
- [17] 姚惠香, 陈维雄, 陈玮, 等. 复方甘草酸苷对小鼠实验性结肠炎 NF-κB, STAT3 信号转导通路的影响 [J]. 胃肠病学, 2011, 16(2): 86-89.
- [18] Tian X, Liu Y, Liu X, et al. Glycyrrhizic acid ammonium salt alleviates Concanavalin A-induced immunological liver injury in mice through the regulation of the balance of immune cells and the inhibition of hepatocyte apoptosis [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 120: 109481.
- [19] He SQ, Gao M, Fu YF, et al. Glycyrrhizic acid inhibits leukemia cell growth and migration via blocking AKT/mTOR/STAT3 signaling [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(5): 5175-5181.
- [20] Nishihara M, Ogura H, Ueda N, et al. IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17+ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state [J]. Int Immunol, 2007, 19(6): 695-702.
- [21] Kostic M, Stojanovic I, Marjanovic G, et al. Deleterious versus protective autoimmunity in multiple sclerosis [J]. Cell Immunol, 2015, 296(2): 122-132.
- [22] Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells [J]. Cell, 2006, 126(6): 1121-1133.
- [23] Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, et al. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells [J]. J Biol Chem, 2007, 282(13): 9358-9363.
- [24] Dominguez-Villar M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune disease [J]. Nat Immunol, 2018, 19(7): 665-673.
- [25] Noack M, Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases [J]. Autoimmun Rev, 2014, 13(6): 668-677.
- [26] Wu WZ, Zhang FR. Glycyrrhizin combined with acitretin improve clinical symptom of psoriasis via reducing Th17 cell differentiation and related serum cytokine concentrations [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(9): 16266-16272.