• 420 •

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2021.06.005

论 著•

# 糖尿病周围神经病变机械性痛觉超敏的比较性研究\*

廖陈龙¹周 晗¹ 陈鸿锦¹ 钟文翔² 张文川1△

(<sup>1</sup>上海交通大学医学院附属第九人民医院神经外科,上海 200011;<sup>2</sup>上海交通大学医学院附属新华医院 神经外科,上海 200092)

摘 要 目的:比较机械性痛觉超敏阳性与阴性的糖尿病周围神经病变大鼠,探索糖尿病周围神经 病变机械性痛觉超敏的发生机制。方法:在 SD 大鼠中分别通过链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 腹腔 注射及在此基础上行坐骨神经乳胶管置入建立糖尿病模型,建立相应对照组(溶媒腹腔注射及溶媒腹 腔注射结合坐骨神经乳胶管置入)。建模后每周进行疼痛行为学检查,于第4周末分别分为机械性 痛觉超敏阴性与阳性组(每组各8例)。比较各组大鼠坐骨神经形态学、髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)表达、背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)及脊髓背角神经元的活化情况。结果: STZ注射结合乳胶管置入组的大鼠发生机械性痛觉超敏的比例(51/60)较仅行 STZ注射组大鼠(10/20) 显著升高(P < 0.05)。机械性痛觉超敏阳性组较阴性组发生较显著的脱髓鞘病变(MBP 蛋白表达升 高及坐骨神经形态学显示),在DRG 中具有较多的NF-200 阳性神经元激活(P < 0.05),在脊髓背 角浅表及较深板层中具有较多的神经元激活(P < 0.05)。结论:糖尿病大鼠机械性痛觉超敏的发生与 有髓神经纤维的损害及其相应 DRG 神经元与脊髓背角神经元的激活密切相关。

关键词 机械性痛觉超敏; 糖尿病周围神经病变; 背根神经节; 脊髓背角; 神经病理性疼痛

## Comparative research on the mechanical allodynia in diabetic peripheral neuropathy \*

LIAO Chenlong<sup>1</sup>, ZHOU Han<sup>1</sup>, CHEN Hongjin<sup>1</sup>, ZHONG Wenxiang<sup>2</sup>, ZHANG Wenchuan<sup>1 △</sup> (<sup>1</sup>Department of Neurosurgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; <sup>2</sup> Department of Neurosurgery, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

**Abstract Objective:** To identify the difference between diabetic peripheral neuropathy (DPN) with and without mechanical allodynia (MA) in rat model. **Methods:** Two rat models of DPN were established, one was made by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ), the other was STZ injection plus insertion of sciatic nerve latex tube (STZ + latex tube). Two corresponding control groups were respectively set up. Nociceptive behaviors were tested weekly. At the 4 th week, each experimental group was further divided into MA positive (MA+) group and MA negative (MA-) group. The morphometric analysis of sciatic nerves and quantification of myelin basic protein (MBP) were conducted. The number of c-Fos-immunoreactive neurons in both dorsal root ganglion (DRG) and spinal dorsal horn (DH) were measured. **Results:** More rats developed DPN in STZ + latex tube group (51/60) than STZ only group (10/20) (P < 0.05). The demyelination in MA+ subgroups were more serious than those in MA- subgroups (manifested by morphological changes and increased MBP expression). More NF-200 positive neurons in DRG were c-Fos-immunoreactive neurons in both superficial (I-II) and deeper (III-V) laminae of spinal DH in the MA+ subgroups were larger than those in the MA- subgroups (P < 0.05). **Conclusion:** The impairment of primary myelinated fibers and the activation pattern of neurons in both DRG and spinal DH

<sup>\*</sup>基金项目:国家自然科学基金(81771320,81801219);上海市青年科技英才扬帆计划(18YF1415400)

<sup>△</sup>通信作者 张文川 zhangwench88@hotmail.com

are the characteristics to distinguish the presence of MA in DPN rats.

**Keywords** mechanical allodynia; diabetic peripheral neuropathy; dorsal root ganglion; spinal dorsal horn; neuropathic pain

糖尿病周围神经病变 (diabetic peripheral neuropathy, DPN) 并发的疼痛是指由糖尿病或糖尿病前 期导致的周围神经病理性疼痛,其发病机制复杂, 对标准化镇痛治疗效果差,严重影响病人生活质量, 是疼痛临床控制的难题<sup>[1]</sup>。另有一部分 DPN 病人并 不出现疼痛,而主要表现为感觉缺失。因此,DPN 可根据临床表现分为痛性与非痛性 DPN 两类。两 者的鉴别有助于推进痛性 DPN 发病机制的研究, 在进一步探索其高危因素的基础上判别对相关治疗 敏感的潜在人群<sup>[2,3]</sup>。既往大量研究致力于比较痛性 与非痛性 DPN 之间的区别,但无论在临床特征(年 龄、糖尿病病程、血糖水平、肥胖指标等)、基础 神经病变(感觉运动神经功能障碍、各类纤维功能 和形态学改变、自主神经病变等),还是在神经微 循环障碍或相关病理机制(免疫反应、炎性机制、 基因易感性等)等方面,均未能明确两者之间的差 异<sup>[4,5]</sup>。因此我们推测,这可能与 DPN 疼痛性质的 多样性相关。作为神经病理性疼痛, DPN 疼痛可表 现为自发性及诱发性疼痛,后者包括痛觉过敏及痛 觉超敏<sup>[6]</sup>,且根据刺激因素(如压力、针刺、温度) 的不同,可有多种分类<sup>[7]</sup>,因此痛性 DPN 并非单 一的病变,而应视为一类异质性的病变,其与非痛 性 DPN 的区别应建立在进一步疼痛模式分类的基 础上。

鉴于机械性痛觉超敏是神经病理性疼痛的特征性表现,本研究创新性地将机械性痛觉超敏从神经病理性疼痛的诸多表现中抽提出来,通过比较机械性痛觉超敏阳性与阴性糖尿病大鼠的周围神经纤维损害情况及相关神经元的激活模式差异,以期探索 DPN 机械性痛觉超敏的发生发展机制,为比较不同表型的痛性 DPN 提供实验基础及理论依据。

### 方 法

#### 1. 实验动物

本实验动物进行的研究行为均严格遵守相关动物保护及使用规定,并已通过上海交通大学医学院附属新华医院伦理委员会批准(伦理号: XHEC-F-NSFC-2018-017)。成年雄性 SD 大鼠 (200~250 g)购自上海生命科学研究院实验动物中心,饲养于本

单位实验动物中心。

# 2. 分组与建模方案

根据本课题组前期建模数据及相关文献<sup>[8,9]</sup>, 采用链脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ, 美国 Sigma) 腹腔注射组 (60 mg/kg) 建立糖尿病模型,后者高血 糖可维持4周以上,单次注射建模成功率在95%以 上,单次未成功模型可在1周后追加同剂量STZ。 采用随机数字表法将大鼠随机非平均分为4组,一 组通过链脲佐菌素腹腔注射组 (60 mg/kg) 建立糖尿 病模型 (n = 60), 一组在此基础上结合坐骨神经乳 胶管置入建立糖尿病模型 (n = 20), 其余 2 组分别 作为对照组(溶媒腹腔注射及溶媒腹腔注射结合 坐骨神经乳胶管置入,n = 8),见图1。右侧坐 骨神经乳胶管置入法依据本课题组前期实验方案 进行<sup>[10]</sup>,即于坐骨结节近端1 cm 至远端3 cm 置入 一段(长约1 cm)内径与该段坐骨神经直径相仿的 长筒状乳胶管,达到仅接触但不压迫坐骨神经的程 度; 单纯注射 STZ 实验组大鼠行假手术切口。分别 于建模后3天、1周对各组大鼠通过尾静脉采血检 测空腹血糖,视血糖浓度 > 16.7 mmol/L 为糖尿病 成功建模。分别于建模后3天及后续每周检测各组 大鼠后爪机械缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 及热缩足反射潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL)。前者采用 von Frey 纤维丝、

"up and down"法检测<sup>[10,11]</sup>;后者采用热板仪检测:将透明有机玻璃箱将大鼠罩于热板仪上,适应20~30分钟后通过热辐射光源聚焦到顶部玻璃(初始温度维持在30℃),启动热板仪(升温速度为每秒1℃)后,记录开始照射至大鼠出现缩足、舔足的时间,重复测定3次,间隔10分钟,取平均值记为TWL,设置每次最长辐射时间为30s,避免灼伤大鼠足底皮肤。建模4周后,去除热痛觉过敏阴性的大鼠,根据MWT,将2组实验组大鼠进一步分为机械性痛觉超敏阳性(MA+)与阴性(MA-)组,各实验亚组随机选择8只大鼠,处死后取材。

3. 神经形态学检查

大鼠麻醉(2%戊巴比妥钠,50 mg/kg,腹腔 注射)后,原切口暴露并截取长约1 cm的坐骨神经, 分为三部分,两部分备用形态学检查:电镜检查及 甲苯胺蓝(美国 Sigma)染色后光镜检查<sup>[10]</sup>,另一 部分备用 Western blot 检测。使用 Image Pro Plus 软

2021/6/21 10:11:49

中国疼痛医学杂志 Chinese Journal of Pain Medicine 2021, 27 (6)



图1 实验动物分组及数量

Fig. 1 Grouping and quantity of the rats

Group 1: 药物对照组 (control group), control group with vehicle-injection and sham operation;

Group 2: 乳胶管对照组 (control group with latex tube), control group with vehicle-injection and nerve encircled;

Group 3: 药物注射机械性痛觉超敏阴性组 (STZ-MA-), experimental group with STZ-injection and sham operation, absence of MA;

Group 4: 药物注射机械性痛觉超敏阳性组 (STZ-MA+), experimental group with STZ-injection and sham operation, presence of MA;

Group 5: 药物注射结合乳胶管置入机械性痛觉超敏阴性组 (STZ + latex tube-MA-), experimental group with STZ-injection and nerve encircled, absence of MA;

Group 6: 药物注射结合乳胶管置入机械性痛觉超敏阳性组 (STZ + latex tube-MA+), experimental group with STZ-injection and nerve encircled, presence of MA.

件进行测量、分析:测量有髓和无髓神经纤维、轴 突的数量和直径,计算g比例(轴突面积/总神经纤 维面积)及神经纤维密度<sup>[12]</sup>。

4. Western blot 实验

坐骨神经组织经裂解、离心、转移上清等步骤 后以 BCA 试剂盒(武汉谷歌生物科技有限公司) 行总蛋白定量,电泳转膜后封闭,分别添加一抗: 兔抗 MBP 抗体(1:500,武汉博士德生物工程有限 公司),小鼠抗 GAPDH(1:1,0000,武汉谷歌生 物科技有限公司),后添加相应二抗,化学发光试 剂进行显影,软件分析条带光密度值,以其相对于 GADPH 密度的比值进行统计分析。

5. 免疫荧光及组化实验

大鼠心脏灌注后取右侧 L<sub>4-6</sub> 背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 及 L<sub>4-5</sub> 节段的腰髓,包埋后对前者行矢状面切片 (20 μm),对后者行横截面切片 (4 μm)。DRG 切片:取各组不同切片分别加入以下一抗:小鼠抗神经丝 200 (NF-200) 抗体 (1:200,英国 Abcam)和兔抗 c-Fos 抗体 (1:2000,英国 Abcam);小鼠抗降钙素基因相关肽 (CGRP) 抗体

(1:100, 英国 Abcam) 和兔抗 c-Fos 抗体 (1:2000),

相应二抗: Alexa Fluor 647 标记的山羊抗兔 IgG (1:50, 美国 Jackson) 和 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:50, 美国 Jackson),随后滴加 DAPI 染液 复染细胞核。腰髓切片:取各组切片添加一抗:兔 抗 c-Fos 抗体 (1:2000),相应二抗:生物素化羊抗兔 抗体(1:200,美国 Vector),洗片、孵育(ABC,1:200, 美国 Vector)、显色(DAB,丹麦 DAKO)。

DRG 切片: 倒置荧光显微镜观察, Image Pro Plus 软件计数 NF-200 与 c-Fos、CGRP 与 c-Fos 双 标细胞及占比。

腰髓切片:光学显微镜下观察,Image Pro Plus 软件计数脊髓背角中浅层 (I-II) 与深层 (III-V) 的 c-Fos 染色细胞。

6. 统计学分析

统计学分析使用 SPSS 18.0 软件,分类变量采用 百分比表示,组间比较采用 Pearson's  $\chi^2$  检验;连续 变量(符合正态分布)采用均数 ±标准差( $\bar{x} \pm SD$ ) 表示,组间比较采用方差分析,两两比较采用t检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

#### 结 果

#### 1. 一般情况和行为学

建模后 3 天至 1 周,实验组大鼠均出现血糖升高 (16.7 mmol/L),明显高于对照组。在第 4 周时, STZ + 乳胶管实验组中机械性痛觉超敏阳性大鼠 51 只,机械性痛觉超敏阴性大鼠 9 只;STZ 注射组中 机械性痛觉超敏阳性大鼠 10 只,机械性痛觉超敏 阴性大鼠 10 只。STZ + 乳胶管实验组机械性痛觉超 敏的发生率 (51/60)显著大于单纯 STZ 注射组 (10/20, Pearson's  $\chi^2$  = 10.147, *P* < 0.05)。两实验组中机械性 痛觉超敏阳性组的平均 MWT 值均显著低于机械性 痛觉超敏阴性组及相应对照组 (*P* < 0.05),后两者的 平均 MWT 值均未见明显差异 (见图 2A);各实验 亚组的平均 TWL 值均低于相应对照组 (*P* < 0.05), 且各实验亚组间未见明显差异 (见图 2B)。



2. 坐骨神经 MBP 定量

如图 2C, D 所示,各实验亚组均较对照组出现 显著的 MBP 表达水平升高 (*P* < 0.05);各实验组中, 机械性痛觉超敏阳性组的 MBP 表达量较阴性组显 著升高 (*P* < 0.05)。

3. 神经形态学

如图 3 所示,各实验组均出现不同程度的神经 脱髓鞘病变及变性变化。神经纤维形态测定结果如 表 1 所示,各实验亚组的有髓纤维 g 比例较相应对 照组显著升高 (P < 0.05),而有髓神经纤维区域及密 度均较相应对照组减少 (P < 0.05)。在各实验组中, 机械性痛觉超敏阳性组的有髓纤维 g 比例较相应阴 性组显著升高 (P < 0.05),而有髓神经纤维区域及 密度均较相应阴性组减少 (P < 0.05)。神经形态学观 察和神经形态测定结果均显示各实验组中存在无髓 纤维的变性,与相应对照组对比,各实验组出现显 著的无髓神经纤维区域及密度的减少 (P < 0.05),但 机械性痛觉超敏阳性组与阴性组未见显著性差异。



图 2 第 4 周各组大鼠疼痛行为学结果及各组大鼠坐骨神经 MBP 的表达
(A) 后爪机械缩足反射阈值结果; (B) 后爪热缩足反射潜伏期结果; (C, D) 采用蛋白质免疫印迹实验检测各组大鼠 坐骨神经 MBP 的表达情况; (C) 电泳结果; (D) 相对表达量统计结果。
\*P<0.05, 与1组相比; <sup>\*</sup>P<0.05, 与2组相比; <sup>△</sup>P<0.05, 与3组相比; <sup>†</sup>P<0.05, 与5组相比。</li>

Fig. 2 Nociceptive behavioral results and the expression of myelin basic protein (MBP) in sciatic nerve of each group at the 4<sup>th</sup> week (A) The mechanical withdrawal threshold; (B) The thermal withdrawal latency; (C, D) Western blot analysis of the expression of myelin basic protein (MBP) in sciatic nerve; (C) Electrophoresis bands; (D) Standardized MBP expression. \*P < 0.05, compared with group 1;  ${}^{#}P < 0.05$ , compared with group 2;  ${}^{\triangle}P < 0.05$ , compared with group 3;  ${}^{\uparrow}P < 0.05$ , compared with group 5. • 424 •

	- <b>I</b>	I I I				
组别 Groups	有髓纤维密度 MF density (number/mm <sup>2</sup> )	有髓纤维轴突面积 MF axonal area (µm <sup>2</sup> )	有髓纤维面积 MF fiber area (µm <sup>2</sup> )	有髓纤维 g 比例 MF g-ratio	无髓纤维轴突面积 UA area (µm <sup>2</sup> )	无髓纤维密度 UA density (number/mm <sup>2</sup> )
1	$7627 \pm 140$	$25.8 \pm 2.25$	$61.3 \pm 3.3$	$0.51 \pm 0.08$	$0.76 \pm 0.04$	8,2637±5372
2	$7455 \pm 152$	$26.4 \pm 2.32$	57.8±3.1	$0.54 \pm 0.13$	$0.68 \pm 0.05$	7,7382±4726
3	$5028 \pm 168*$	22.4±2.22	46.5±2.7*	$0.57 \pm 0.14$	$0.43 \pm 0.02*$	5,3426±4871*
4	$4406 \pm 117^{*}$	$23.5 \pm 2.36$	$33.3 \pm 2.1$ * $^{\triangle}$	$0.74 \pm 0.24$ * $^{\triangle}$	$0.47 \pm 0.03*$	5,8594±4572*
5	$4770 \pm 148^{\#}$	$23.7 \pm 3.25$	$40.8 \pm 2.3^{\#}$	$0.62 \pm 0.22^{\#}$	$0.47 \pm 0.04^{\text{\#}}$	5,4373±4106 <sup>#</sup>
6	$3872 \pm 116^{\#\dagger}$	$23.6 \pm 2.84$	$29.5 \pm 1.6^{\text{H}^{\dagger}}$	$0.76 \pm 0.23^{\# \dagger}$	$0.42\pm0.02^{\#}$	$4,8960\pm 3684^{\#}$

Table	1	Morphome	tric da	ta of	periph	eral nerv	e fibers	in all	groups
Lanc		monphome	un uu	u or j	peripin	ci ai nei v	c moers		Stoups

表1 各组周围神经纤维的形态计数学数据

\*P < 0.05,与1组相比; <sup>#</sup>P < 0.05,与2组相比; <sup> $\triangle$ </sup>P < 0.05,与3组相比; <sup>†</sup>P < 0.05,与5组相比。

\*P < 0.05, compared with group 1; "P < 0.05, compared with group 2;  $^{\triangle}P < 0.05$ , compared with group 3; "P < 0.05, compared with group 5.





#### 图 3 电镜下观察各组大鼠坐骨神经

(A-F)依次表示第 1~6组。与两组对照组 (A, B)相比,各组实验组 (C-F)可见不同程度的脱髓鞘和神经变性病变。 机械性痛觉超敏阳性组 (D, F)比阴性组 (C, E)出现更为显著的脱髓鞘病变,髓鞘板层出现明显紊乱、断裂、肿胀。 粗箭头表示有髓纤维,细箭头表示无髓纤维。比例尺=2 微米

#### Fig. 3 Electron micrographs of sciatic nerve in each group

(A-F) Showed groups 1-6 in turn. The morphologies of sciatic nerves in two control groups (A, B) were almost intact and normal. Abnormal morphological structures of both myelinated (arrow head) and unmyelinated fibers (thin arrow), presenting as dense and collapse configuration and different degree of myelin impairments, could be noted in the experimental subgroups (C-F). More serious demyelination were found in MA + groups (D, F) than in MA-groups (C, E), accompanied by disorder, edema and disarray of myelin sheath. Scale bar =  $2 \mu m$ 

#### 4. DRG 神经元激活

如图 4 所示,与相应对照组相比,实验组中 DRG 内激活(c-Fos 标记)的 NF-200 及 CGRP 阳 性神经元数量均显著增多(*P* < 0.05)。在两对实验组 中,机械性痛觉超敏阳性组 DRG 内激活(c-Fos 标记)的 NF-200 阳性神经元数量较阴性组显著 增多(*P* < 0.05,见图 4A, C),而 DRG 内激活(c-Fos 标记)的 CGRP 阳性神经元数量在机械性痛觉超敏

# 阳性组与阴性组之间未见明显差异(见图 4B, C)。 5. 脊髓背角神经元激活

如图 5A-F 所示,与相应对照组相比,实验组中脊髓背角浅表 (I-II)、较深 (III-V) 板层内激活 (c-Fos标记)的神经元数量较相应对照组显著增多 (*P* < 0.05)。在两对实验组中,机械性痛觉超敏阳性组脊髓背角内激活 (c-Fos标记)的神经元数量较阴性组显著增多 (*P* < 0.05,见图 5G)。



图 4 采用免疫荧光实验分别检测各组大鼠 DRG 内 c-Fos 与 NF-200 或 CGRP 共表达情况
(A) 各组 DRG 内 NF-200 与 c-Fos 共染情况,可见各实验组中存在不同数量的 NF-200 与 c-Fos 共染神经元(白色箭头),以第 4、6 组居多;(B) 各组 DRG 内 CGRP 与 c-Fos 共染情况,可见各实验组中存在不同数量的 NF-200 与 CGRP 共染神经元(白色箭头);(C) 双染神经元统计结果。比例尺 = 100 微米

\*P < 0.05, 与 1 组相比; <sup>#</sup>P < 0.05, 与 2 组相比; <sup>△</sup>P < 0.05, 与 3 组相比; <sup>↑</sup>P < 0.05, 与 5 组相比。

**Fig. 4** Co-expression of c-Fos and NF-200 or CGRP in DRG by immunofluorescence double staining (A) In two control groups, almost no immunofluorescent labeling of c-Fos protein was noted in NF-200<sup>+</sup> DRG neurons. In contrast, the immunofluorescent labeling of c-Fos protein could be seen in NF-200<sup>+</sup> DRG neurons of the other four experimental groups, and more double labeled neurons were observed in MA + groups (group 4 and 6) than in MA- groups (group 3 and 5); (B) In the two control groups, there was almost no immunofluorescence labeling of c-Fos protein in CGRP<sup>+</sup> DRG neurons, while in the other four experimental subgroups, there was a large number of immunofluorescence labeling of c-Fos protein in CGRP<sup>+</sup> DRG neurons; (C) Statistical results of immunofluorescence double stained neurons. Scale bar = 100 µm \*P < 0.05, compared with group 1;  ${}^{#}P < 0.05$ , compared with group 2;  ${}^{\triangle} P < 0.05$ , compared with group 3;  ${}^{\dagger}P < 0.05$ , compared with group 5.

• 425 •



5 采用免疫组化实验检测各组大鼠脊髓背角浅表板层 (I-II)及较深板层 (III-V)内 c-Fos 阳性神经元 (A-F)依次表示第1~6组。与对照组(A,B)相比,各实验组(C-F)的浅表、较深板层内均存在不同数量的 c-Fos 阳性神经元,以第4、6组(D,E)居多;(G)各组大鼠脊髓背角浅表、较深板层内 c-Fos 阳性神经元数量统计结果。 比例尺=100 微米

\*P<0.05, 与1组相比; <sup>#</sup>P<0.05, 与2组相比; <sup>△</sup>P<0.05, 与3组相比; <sup>↑</sup>P<0.05, 与5组相比。

Fig. 5 c-Fos positive neurons in the superficial lamina (I-II) and deeper lamina (III-V) of spinal DH were detected by immunohistochemistry (A-F) showed groups 1-6 in turn. When compared with the control groups (A, B), various c-Fos positive neurons could be noted in both superficial and deeper laminae in all experimental groups (C-F), with larger number of c-Fos positive neurons in group 4 and group 6 (D, E); (G) Statistical results of the number of c-Fos positive neurons in the superficial and deeper layers of spinal DH in each group. Scale bar = 100 μm

\*P < 0.05, compared with group 1;  ${}^{\#}P < 0.05$ , compared with group 2;  ${}^{\triangle}P < 0.05$ , compared with group 3;  ${}^{\dagger}P < 0.05$ , compared with group 5.

#### 讨 论

糖尿病可导致周围神经因肿胀而易受解剖狭窄 的卡压性损害,后者很大程度取决于神经肿胀程度 及其与解剖狭窄的匹配情况<sup>[13,14]</sup>,因此本研究采用 既往报道的糖尿病大鼠神经卡压模型,通过在糖尿 病大鼠周围神经行等管径的乳胶管置入来提高神经 卡压的发生率<sup>[8]</sup>,因乳胶管内径与坐骨神经相仿, 初始置入时并不压迫神经,仅神经在高糖状态下发 生肿胀后才出现受压,本研究发现与传统 STZ 诱导 的 DPN 模型相比,神经压迫因素与 DPN 大鼠机械 性痛觉超敏的发生率呈正相关。

MBP 是中枢和周围神经系统髓鞘的重要组成 部分,是检测脱髓鞘病变的重要指标之一<sup>[15]</sup>,因此 通过 MBP 的定量研究(见图 2C, D),我们明确了 机械性痛觉超敏阳性组比阴性组大鼠出现更为严重 的周围神经脱髓鞘病变。且神经形态计数学结果也 显示,机械性痛觉超敏阳性组比阴性组出现更为显 著的有髓纤维损害(见表 1),既往研究已证实有 髓神经纤维比无髓神经纤维更容易受到机械压迫性 损伤<sup>[16,17]</sup>,因此,综合本研究发现,DPN 机械性痛 觉超敏与有髓神经纤维的压迫性损害密切相关。这 也为临床上采用神经减压术可有效缓解疼痛,尤其 是机械性痛觉超敏提供理论和实验依据<sup>[18]</sup>。

本研究进一步利用可显示神经元激活状态的 c-Fos 蛋白对机械性痛觉超敏阳性与阴性组大鼠进行 DRG 及脊髓背角神经元激活状态的对比研究,结 合本研究所采用的疼痛行为学检查,分别采用 NF-200 和 CGRP 标记有髓纤维和肽能无髓纤维及其相 关神经元,前者传导粗触觉传入,大部分投射至脊 髓背角较深部板层 (III-V);后者传导痛温觉传入, 投射至脊髓背角浅表板层 (I-II)。通过 DRG 的免 疫荧光双标实验,发现机械性痛觉超敏与 DRG 内 有髓神经纤维相关神经元 (NF-200 阳性)的激活 密切相关 (见图 5A, C),而后者已被证实可由周 围神经的脱髓鞘病变导致,其机制包括 DRG 神经 元表型的改变 (包括肽类及离子通道的表达变化 等)、神经元的高兴奋性及异位冲动传导,这些改

变通常伴有初级传入纤维的异常自发性电活动及脊髓背角水平的中枢重塑变化<sup>[19]</sup>。因此,结合以上研究结果,我们推测有髓神经纤维的损害(脱髓鞘病变)可通过以上途径导致 DRG 内相关神经元的激活,易化有髓纤维介导的非伤害性刺激(粗触觉)的传入,后者在某些病理状态下(如糖尿病)可被感知为伤害性感受,即表现为机械性痛觉超敏。虽然也存在不同的观点认为机械性痛觉超敏是由于外周神经损伤后有髓神经纤维传入信号减少引起,但有髓神经纤维受到易化后传入增强引起机械性痛觉超敏这一结论也得到了电生理研究的验证和支持<sup>[20]</sup>。Xu等在一项体内研究通过阻断有髓 Aβ 纤维成功抑制神经病理性疼痛中的机械性痛觉超敏的发 生<sup>[21]</sup>,也支持了这一观点。

本研究在证实糖尿病大鼠脊髓背角神经元激活 的基础上<sup>[22,23]</sup>,进一步发现机械性痛觉超敏阳性组 大鼠的脊髓背角浅表 (I-II)、较深 (III-V) 板层的激活神 经元数量较阴性组显著增多,提示脊髓背角的神经元 激活数量与机械性痛觉超敏的发生发展密切相关,该 结果也支持了上述有髓神经纤维传入增强导致机械性 痛觉超敏的论点。且根据疼痛门控理论, Aβ纤维与脊 髓背角浅表板层 (I-II) 伤害性知觉感受区之间存在投 射关系,而在高糖环境的病理作用下,Aβ纤维在生 理状态下受到脊髓背角中间神经元的抑制作用被解 除(去抑制效应),使得其介导的非伤害性触觉刺 激由脊髓背角较深板层(III-V)传入浅表板层(I-II), 引起伤害性感受<sup>[24]</sup>。结合该理论,本研究的结果也 验证了脊髓背角的中枢重塑变化在机械性痛觉超敏 发生发展中的作用。因此,本研究在周围神经(神 经纤维、DRG)及中枢(脊髓背角)水平明确了机 械性痛觉超敏阳性与阴性的差异。

除了机械性痛觉超敏,本研究观察到大部分糖 尿病大鼠出现热痛觉过敏,相应地发现糖尿病周围 神经普遍存在无髓纤维的退变(见图3和表1), DRG内无髓纤维相关的CGRP阳性神经元普遍受 到激活,且在机械性痛觉超敏阳性与阴性组之间未 见明显差异(见图4B,C),结合无髓纤维容易受 到糖尿病炎性因素损害的特点<sup>[17,25]</sup>,可认为无髓纤 维的损害及DRG内CGRP阳性神经元的激活与糖 尿病热痛觉过敏的发生发展关系密切。

本研究通过将 DPN 疼痛症状进一步分类,在 周围神经系统和脊髓中枢水平发现机械性痛觉超敏 阳性与阴性的糖尿病大鼠之间的差异,证实 DPN 神经病理性疼痛一类异质性的病变,为今后不同表 型的痛性 DPN 的比较研究提供理论依据及思路。

#### 参考 文 献

- [1] 李婷,陈旭辉,张玥,等.糖尿病周围神经病变及痛 性糖尿病神经病变机制新方向[J].中国疼痛医学杂 志,2019,25(9):643-647.
- [2] Spallone V, Greco C. Painful and painless diabetic neuropathy: One disease or two?[J]. Curr Diab Rep, 2013, 13(4):533-549.
- [3] Obrosova IG. Diabetic painful and insensate neuropathy: Pathogenesis and potential treatments[J]. Neurotherapeutics, 2009, 6(4):638-647.
- [4] Shillo P, Sloan G, Greig M, et al. Painful and painless diabetic neuropathies: What is the difference?[J]. Curr Diab Rep, 2019, 19(6):32.
- [5] Gylfadottir SS, Weeracharoenkul D, Andersen ST, et al. Painful and non-painful diabetic polyneuropathy: Clinical characteristics and diagnostic issues[J]. J Diabetes Investig, 2019, 10(5):1148-1157.
- [6] 中国医师协会神经内科医师分会疼痛和感觉障碍专委会.糖尿病性周围神经病理性疼痛诊疗专家共识[J]. 中国疼痛医学杂志,2018,24(8):561-567.
- [7] Peltier A, Goutman SA, Callaghan BC. Painful diabetic neuropathy[J]. BMJ, 2014, 348:g1799.
- [8] Liao C, Yang M, Liu P, et al. Stable rat model of mechanical allodynia in diabetic peripheral neuropathy: The role of nerve compression[J]. J Reconstr Microsurg, 2018, 34(4):264-269.
- [9] Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats[J]. Curr Protoc Pharmaco, 2015, 70: 5.47.1-5.47.20.
- [10] 廖陈龙,周晗,杨晓笙,等.神经减压缓解糖尿病 大鼠触诱发痛的机制研究 [J]. 中华神经外科杂志, 2020, 36(2):194-199.
- [11] Dixon WJ. Efficient analysis of experimental observations[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1980, 20:441-462.
- [12] Britland ST, Young RJ, Sharma AK, et al. Acute and remitting painful diabetic polyneuropathy: A comparison of peripheral nerve fibre pathology[J]. Pain, 1992, 48(3):361-370.
- [13] Dellon AL, Mackinnon SE, Seiler WA 4th. Susceptibility of the diabetic nerve to chronic compression[J]. Ann Plast Surg, 1988, 20(2):117-119.
- [14] Lee D, Dauphinee DM. Morphological and functional changes in the diabetic peripheral nerve: Using diagnostic ultrasound and neurosensory testing to select candidates for nerve decompression[J]. J AM Podiatr Med Assoc, 2005, 95(5):433-437.
- [15] Remacle AG, Dolkas J, Angert M, et al. A sensitive and selective ELISA methodology quantifies a demyelination marker in experimental and clinical samples[J]. J Immunol Methods, 2018, 455:80-87.
- [16] Battista AF, Alban E. Effect of graded ligature compression on nerve conduction[J]. Exp Neurol, 1983, 80(1):186-194.
- [17] Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, et al. Cellular and molecular mechanisms of pain[J]. Cell, 2009,

• 427 •

139(2):267-284.

- [18] Liao C, Nickerson DS, Visocchi M, et al. Mechanical allodynia predicts better outcome of surgical decompression for painful diabetic peripheral neuropathy[J]. J Reconstr Microsurg, 2018, 34(6):446-454.
- [19] Wallace VC, Cottrell DF, Brophy PJ, *et al*. Focal lysolecithin-induced demyelination of peripheral afferents results in neuropathic pain behavior that is attenuated by cannabinoids[J]. J Neurosci, 2003, 23(8):3221-3233.
- [20] Khan GM, Chen SR, Pan HL. Role of primary afferent nerves in allodynia caused by diabetic neuropathy in rats[J]. Neuroscience, 2002,114(2):291-299.
- [21] Xu ZZ, Kim YH, Bang S, *et al*. Inhibition of mechanical allodynia in neuropathic pain by TLR5-mediated A-fiber

・国际译文・

blockade[J]. Nat Med, 2015, 21(11):1326-1331.

- [22] Morgado C, Tavares I. C-fos expression at the spinal dorsal horn of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2007, 23(8):644-652.
- [23] Morgado C, Terra PP, Tavares I. Neuronal hyperactivity at the spinal cord and periaqueductal grey during painful diabetic neuropathy: Effects of gabapentin[J]. Eur J Pain, 2010,14(7): 693-699.
- [24] Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: A new theory[J]. Science, 1965,150(3699):971-979.
- [25] Herder C, Kannenberg JM, Huth C, et al. Proinflammatory cytokines predict the incidence and progression of distal sensorimotor polyneuropathy: KORA F4/FF4 Study[J]. Diabetes Care, 2017, 40(4):569-576.

# 新冠病毒 SARS-CoV-2 刺突蛋白通过镇痛促进隐性感染

目前,新冠病毒 SARS-CoV-2 引发的 COVID-19 仍在全球肆虐。大多数 SARS-CoV-2 感染者表现出轻到 重度的呼吸道症状,如发烧、咳嗽和呼吸急促等。然而,还有一部分无明显临床症状但核酸检测呈阳性的 隐性感染者。这些隐性感染者给疫情控制造成了很大的困难。2021年1月,美国亚利桑那州立大学 Rajesh Khanna 实验室发表文章报道, SARS-CoV-2 病毒表面刺突 (spike) 蛋白可以阻断血管内皮生长因子 -A (vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A) 与其受体——神经纤毛蛋白 -1 (neuropilin-1 receptor, NRP-1) 的结合发挥 镇痛作用,因此刺突蛋白介导的这种镇痛作用可能是造成病毒隐性感染的原因之一。为了评估刺突蛋白在 VEGF-A/NRP-1 通路中的作用,研究人员首先进行了酶联免疫吸附实验,结果显示随着重组刺突蛋白浓度 的升高, NRP-1 与之的结合也升高。通过微电极阵列 (microelectrode array, MEA) 记录背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 神经元的放电,他们发现 VEGF-A 处理可显著增加 DRG 神经元的自发放电,而该效应可被 刺突蛋白的 S1 结构域或 NRP-1 抑制剂 EG00229 所阻断。进一步的蛋白结构分析显示, VEGF-A 和刺突蛋白 在 NRP-1 上存在共同结合位点,因此二者可能竞争与 NRP-1 的结合。那么刺突蛋白是否可以通过竞争抑制 VEGF-A/NRP-1 信号而影响痛行为呢?研究人员分别向大鼠后足注射 PBS、VEGF-A、VEGF-A+ 刺突蛋白或 VEFG-A+EG0029,发现注射 VEGF-A 会降低大鼠机械缩足阈值,缩短热痛阈,发挥致痛作用。而当刺突蛋 白或 EG00229 与 VEGF-A 混合注射时,可以阻断 VEGF-A 的上述效应,表明刺突蛋白可以发挥与 NRP-1 抑 制剂类似的作用,阻断 VEGF-A/NRP-1 信号通路的致痛作用。为进一步了解 VEGF-A 敏化伤害性感受神经 元的机制,研究人员通过全细胞膜片钳记录发现 VEGF-A 可显著增加神经元的 Na<sup>+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup> 电流,提高胶状 质神经元自发兴奋性突触后电流 (spontaneous excitatory postsynaptic current, sEPSC) 的频率,即增强背根向脊 髓背角神经元的兴奋性突触传递。上述效应可以被刺突蛋白或 NRP-1 抑制剂共同孵育所阻断。这些结果表明 刺突蛋白可干扰 VEGF-A/NRP-1 信号通路对下游离子通道的效应,从而抑制 VEGF-A 对 DRG 神经元的敏化 作用。最后研究人员证明,在慢性病理痛的保留神经损伤 (spared nerve injury, SNI) 模型中, VEGF-A 刺激可 以引起其受体 VGFR2 (epidermal growth factor receptor 2) Y1175 位点的磷酸化,而鞘内注射刺突蛋白可以降低 VEGFR2-Y1175 磷酸化,且剂量依赖性地升高缩足阈值,发挥镇痛作用。综上所述,该研究提示新冠肺炎病 人体内普遍升高的 VEGF-A,可作用于 NRP-1,通过细胞内的一系列级联反应,升高 Na<sup>+</sup>通道和 Ca<sup>2+</sup>通道活 性,引起伤害性感受神经元敏化,进而加剧疼痛。但一些 SARS-CoV-2 感染者由于刺突蛋白与 VEGF-A 竞争 NRP-1,沉默 VEGF-A/NRP-1 通路引起的致痛作用,由此参与无症状隐性感染的形成。

(Moutal A, *et al.* SARS-CoV-2 spike protein co-opts VEGF-A/neuropilin-1 receptor signaling to induce analgesia. Pain, 2021, 162(1):243-252. 北京大学神经科学研究所, 姜金艳译 张瑛校)

2021/6/21 10:11:56

• 428 •