

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2021.06.003

## • 国外医学动态 •

## 脊髓背角内参与机械性痛觉超敏的神经环路 由损伤性质决定

**摘要** 脊髓背角是诱发和维持机械性痛觉超敏反应的主要部位，但参与该痛觉信号传递的神经环路至今仍不清楚。本研究发现，脊髓背角参与机械性痛觉超敏的神经环路因损伤性质而异。脊髓背角 II 层的钙结合蛋白 (CR) 神经元传递由炎性损伤诱导的机械性痛觉超敏反应，而 II/III 层边缘的蛋白激酶 C $\gamma$  (PKC $\gamma$ ) 神经元传递由神经损伤诱导的机械性痛觉超敏反应。胆囊收缩素 (CCK) 神经元位于脊髓背角深层 (III-IV 层)，对上述两种类型损伤诱导的机械性痛觉超敏均至关重要。有趣的是，Maf 阳性的 CCK 神经元由瞬时囊泡谷氨酸转运体 3 (tVGLUT3) 神经元组成，主要传递动态痛觉超敏反应。基于病因研究脊髓背角传递机械性痛觉超敏信号的神经环路具有重要的理论与临床意义。

机械性痛觉超敏 (mechanical allodynia) 反应是一种常见的慢性疼痛状态，即非疼痛机械刺激在损伤后可引起疼痛反应。研究显示，脊髓背角是外周感觉信号整合的主要部位，也是导致机械性痛觉超敏反应的神经环路信号转导的关键部位。脊髓背角中传递机械性痛觉超敏信号的兴奋性神经元主要包括生长抑素阳性神经元以及表达钙结合蛋白 (CR) 与蛋白激酶 C $\gamma$  (PKC $\gamma$ ) 的神经元。敲除上述兴奋性神经元可导致炎性损伤与神经损伤诱导的静态与动态机械性痛觉超敏反应形成缺陷。PKC $\gamma$  阳性神经元主要分布于脊髓背角 II/III 层交界，少数分布于 I 层和 III 层，被认为是损伤后允许低阈值机械感受信号传入的“闸门”。最新研究显示，分布于脊髓背角 II-IV 层的胆囊收缩素 (CCK) 阳性神经元也是低阈值机械感受器，与 PKC $\gamma$  阳性神经元高度重合，且在机械性痛觉超敏反应中发挥重要作用。此外，分布于脊髓背角 II-IV 层的瞬时囊泡谷氨酸转运体 3 (tVGLUT3) 阳性神经元以及分布于 II 层的 CR 阳性神经元在机械性痛觉超敏反应中同样发挥重要的作用。本文作者通过药理学和化学遗传学方法研究了上述神经元在机械性痛觉超敏反应中的作用，并探讨上述神经元的激活是否因损伤性质而异。

首先，本文作者对分布于脊髓背角 II 层的 CR 阳性神经元在机械性痛觉超敏反应中的作用进行了研究。结合前期研究结果，CR 阳性神经元能够响应角叉菜胶炎性痛模型中的低阈值机械刺激引起 c-Fos (一个公认的疼痛通路激活标志物) 显著上调，而在坐骨神经分支损伤 (SNI) 模型中响应较

少，作者提出假说：CR 阳性神经元主要传递炎性损伤而非神经损伤诱导的机械性痛觉超敏信号。为验证这一假说，作者首先通过脊髓注射腺相关病毒 8 (AAV8) 标记 CR 阳性神经元以研究其特异性表征。结果显示，脊髓背角 II 层的 CR 阳性神经元与速激肽 1 (Tac1)、速激肽 2 (Tac2)、胃泌素相关肽 (Grp) 阳性神经元的共表达比例分别为 52%、21%、11%，而与 PKC $\gamma$  阳性神经元无共表达。电生理实验表明，CR 阳性神经元中，91% 呈现延迟 (Delayed) 放电模式，9% 呈现强直 (Tonic) 放电模式，且 100% 接收 C 纤维传入信号，80% 接收 A $\delta$  纤维传入信号，但不接收 A $\beta$  纤维传入信号。CR 阳性神经元树突形态丰富，包括放射状、垂直状以及未知类型，有趣的是，CR 阳性神经元沿背腹方向明显拉长呈树枝状，提示其突触连接可能延伸至脊髓背角 II 层以外。

随后采用化学遗传学方法，通过脊髓背角注射 AAV8 将抑制性受体 PSAM-GlyR 导入 CR<sup>Cre</sup> 小鼠，给予 PSAM-GlyR 的配体 PSEM<sup>89S</sup> 能够急性抑制 CR 神经元的活性。为验证 CR 神经元是否为炎性损伤或神经损伤诱导机械性痛觉超敏所必需，作者建立了多种炎性痛与神经痛模型。在角叉菜胶炎性痛模型中，von Frey 缩爪阈值 (静态疼痛敏化) 显著降低，棉签擦拭反应性 (动态疼痛敏化) 明显增加，注射 PSEM<sup>89S</sup> 抑制 CR 神经元活性后，von Frey 缩爪阈值显著上调，而棉签擦拭反应性无改变。脚掌注射完全弗氏佐剂 (CFA) 炎性痛模型中，注射 PSEM<sup>89S</sup> 能够完全逆转静态与动态机械性痛觉超敏状态。而



在 SNI 神经损伤模型中, 注射 PSEM<sup>89S</sup> 对静态与动态机械性痛觉超敏状态均无影响。Brennan 切口术后炎性痛模型中, 注射 PSEM<sup>89S</sup> 能够完全逆转静态与动态机械性痛觉超敏状态。此外, 本文作者还通过皮内注射辣椒素 (激活 TRPV1) 或芥子油 (激活 TRPA1) 建立继发性机械性痛觉超敏反应模型。令人惊讶的是, 注射 PSEM<sup>89S</sup> 能够逆转芥子油而非辣椒素诱导的机械性痛觉超敏, 因为辣椒素模型被认为是一种神经源性炎性痛模型。随后研究发现, 皮内注射芥子油能够诱导多种炎性介质释放, 而与溶剂组相比, 注射辣椒素对炎性介质释放无影响。结合以上实验结果, CR 阳性神经元主要传递炎性损伤而非神经损伤诱导的机械性痛觉超敏信号, 且辣椒素诱导的继发性机械痛觉超敏属于非 CR 神经元依赖型。

接下来, 对 PKC $\gamma$  阳性神经元在机械性痛觉超敏反应中的作用进行了探讨。本文作者前期研究发现, PKC $\gamma$  阳性神经元响应 SNI 神经损伤模型而非角叉菜胶炎性痛模型诱导的机械性痛觉超敏, 从而促进 c-Fos 表达, 提示 PKC $\gamma$  阳性神经元可能传递神经损伤而非炎性损伤诱导的机械性痛觉超敏。为了验证这一推论, 首先通过在 PKC $\gamma$  起始密码子插入膜结合 GFP (mGFP) 标记 PKC $\gamma$  阳性神经元以研究其特异性表征。结果显示, PKC $\gamma$  阳性神经元放电模式较 CR 神经元更丰富, 包括强直型 (Tonic, 35.7%), 相位型 (Phasic, 28.6%), 延迟型 (Delayed, 28.6%) 和间歇型 (Gap, 7.1%)。此外, PKC $\gamma$  阳性神经元能够接收 A $\delta$ 、A $\beta$  与 C 纤维传入信号, 其中绝大多数传入信号来自于 A $\delta$  纤维。PKC $\gamma$  阳性神经元形态主要呈中央和放射状, 少数呈现垂直状。

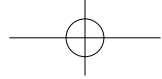
本文作者采用 PKC $\gamma$  KO 小鼠或鞘内注射 PKC $\gamma$  选择性抑制剂 tat-gV5-3 抑制 PKC $\gamma$  的活性, 研究了 PKC $\gamma$  在炎性损伤或神经损伤诱导机械性痛觉超敏中的作用。结果显示, PKC $\gamma$  KO 或鞘内注射 tat-gV5-3 对角叉菜胶、CFA 炎性痛模型, Brennan 切口术后炎性痛模型, 芥子油继发性痛觉超敏模型诱导的机械性痛觉超敏反应均无影响。然而, PKC $\gamma$  KO 或鞘内注射 tat-gV5-3 均能缓解 SNI 模型诱导的疼痛超敏反应。此外, 鞘内注射 tat-gV5-3 还能缓解辣椒素诱导的机械性痛觉超敏反应。提示 PKC $\gamma$  本身是神经损伤而非炎性损伤诱导机械性疼痛异常信号传递所必需。

为了进一步验证 PKC $\gamma$  神经元的作用, 本文作者通过脊髓背角注射 PSAM-GlyR 导入 PKC $\gamma$ <sup>creERT2</sup> 小鼠, 给予 PSAM-GlyR 的配体 PSEM<sup>89S</sup> 能够急性

抑制 PKC $\gamma$  神经元的活性。结果显示, CFA 炎性痛模型中, 注射 PSEM<sup>89S</sup> 对 von Frey 缩爪阈值及棉签擦拭反应性均无影响。SNI 神经损伤模型中, 注射 PSEM<sup>89S</sup> 后 von Frey 缩爪阈值显著增加, 棉签擦拭反应性明显降低。此外, 注射 PSEM<sup>89S</sup> 还能部分缓解辣椒素诱导的机械性痛觉超敏反应。上述结果首次证明除了 PKC $\gamma$  本身, PKC $\gamma$  阳性神经元对传递神经损伤而非炎性损伤诱导的机械性痛觉超敏信号同样具有重要的作用。

接着, 研究了脊髓背角深层神经元在机械性痛觉超敏反应中的作用。CCK 神经元遍布整个脊髓背角, 主要集中在 II-IV 层。通过脊髓注射 AAV8 标记 CCK 阳性神经元以研究其特异性表征, 结果显示, 标记神经元主要分布于脊髓背角深层 (III-IV 层), 且与 CR 或 PKC $\gamma$  阳性神经元均无共表达, 其放电模式包括相位型 (Phasic, 67%) 与强直型 (Tonic, 33%), 神经元轴突主要向背腹方向延伸。为了进一步验证 CCK 神经元的作用, 作者通过脊髓背角注射 PSAM-GlyR 导入 CCK<sup>cre</sup> 小鼠。行为学实验表明, 注射 PSEM<sup>89S</sup> 能够显著缓解炎性痛模型 (角叉菜胶与 CFA 模型) 与神经病理性疼痛模型 (SNI 模型) 诱导的静态及动态机械性痛觉超敏反应, 且可缓解角叉菜胶模型引起的热痛超敏反应, 提示位于脊髓背角 III-IV 层的 PKC $\gamma$ CCK 神经元能够传递炎性损伤以及神经损伤诱导的机械性痛觉超敏信号。

最后, 研究了 tVGLUT3 神经元在机械性痛觉超敏反应中的作用及其与 CCK 神经元之间的关系。前期研究结果提示, tVGLUT3 神经元分布于脊髓背角 II-IV 层, 敲除 tVGLUT3 神经元后能够显著抑制动态而非静态机械性痛觉超敏反应。通过脊髓注射 AAV8 标记 tVGLUT3 阳性神经元, 结果显示标记神经元分布于 III-IV 层, 且与 CR 或 PKC $\gamma$  阳性神经元均无共表达。作者通过脊髓注射 PSAM-GlyR 导入 tVGLUT3<sup>cre</sup> 小鼠, 注射 PSEM<sup>89S</sup> 能够完全逆转角叉菜胶及 SNI 模型诱导的机械性动态疼痛超敏反应。为了进一步研究 tVGLUT3 神经元与 CCK 神经元之间的关系, 作者通过脊髓注射 AAV8 将 EGFP 导入 tVGLUT3<sup>cre</sup> 小鼠进行标记, 10~14 天后与探针标记 CCK 及 Maf, Cpne4, Trh (CCK 神经元根据基因表达可分为三类: Maf<sup>+</sup>, Cpne4<sup>+</sup>, Trh<sup>+</sup> 神经元) 的小鼠进行原位杂交, 结果显示大部分 EGFP 标记的 III-IV 层 tVGLUT3 神经元与 CCK 神经元共表达 (81%), 且共表达的 CCK 神经元主要为 Maf 阳性 CCK 神经元 (81%), 少数为 Cpne4 阳性 CCK 神经元, 但无 Trh 阳性 CCK 神经元, 提示传递神经损伤与



炎性损伤诱导的动态机械性痛觉超敏信号的 CCK 神经元主要由 tVGLUT3 神经元组成。

综上所述, 虽然炎性损伤与神经损伤诱导的机械性痛觉超敏反应相似, 但脊髓背角神经环路的激活却因损伤性质而异。本研究发现, 脊髓背角兴奋性神经元对机械性痛觉超敏信号的传递至关重要, 其中脊髓背角 II 层的 CR 神经元主要传递由具有显著炎症指标的炎性损伤引起的机械性痛觉超敏信号, PKC $\gamma$  神经元传递由神经损伤而非炎性损伤诱导的机械性痛觉超敏信号, 且 PKC $\gamma$  激酶本身也参与该信号的传递, 脊髓背角深层的 CCK 神经元在传递炎性损伤及神经损伤诱导的机械性痛觉超敏信号中发挥重要作用。研究还证明, 位于 III-IV 层的 Maf 阳性 CCK 神经元由 tVGLUT3 神经元组成, 主要传递动态机械性痛觉超敏信号。

本研究证实了 PKC $\gamma$  神经元在神经损伤诱导的

机械性痛觉超敏反应中的关键作用, 该类神经元的突起向脊髓背角腹侧方向延伸, 提示来自抑制性 II<sub>1</sub> 层神经元的感受信号能够在脊髓背角深层神经元整合以传递痛觉超敏信号。这一门控机制是否存在于炎性损伤诱导的痛觉超敏反应中还需进一步研究。本研究数据表明, 脊髓背角深层神经元对炎性损伤痛觉超敏神经环路至关重要, 这可能并不依赖于垂直细胞, 因为 CR 神经元轴突同样与 I 层的外周神经元连接。根据损伤性质研究机械性痛觉超敏神经环路是未来的主要研究方向, 对理解机械性痛觉超敏的形成机制以及寻找有效的治疗方法具有重要的意义。

(Peirs C, Williams SG, Zhao X, *et al.* Mechanical allodynia circuitry in the dorsal horn is defined by the nature of the injury. *Neuron*, 2021, 109(1):73-90.e7. 南京中医药大学医学院·整合医学学院 郁梅 译, 唐宗湘 校)

## · 消息 ·

### 2021 年《中国疼痛医学杂志》征稿与征订

《中国疼痛医学杂志》是由中华人民共和国教育部主管, 北京大学和中华医学会疼痛学分会共同主办的专业性学术期刊。报道有关疼痛基础研究和临床诊疗的综合性学术刊物。现为中文核心期刊(北京大学核心期刊)、中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊。《中国疼痛医学杂志》诚邀您投稿、订阅。

**投稿:** 来稿可在杂志官网投稿 <http://casp.ijournals.cn>, 请署真实姓名、工作单位、职称, 附单位介绍信(信中须注明未“一稿两投”、署名无争议、对文章内容的真实性负责、无泄密内容)。投稿时请注明通信作者及基金资助信息, 并提供详细的通信地址、邮编、联系电话、E-mail 等。衷心希望《中国疼痛医学杂志》成为您了解疼痛医学发展和发表科研成果的平台之一。

**订购:** 邮发代号: 82-832, 本刊为月刊, 大 16 开本, 80 页, 每册定价 32.00 元, 全年 12 期, 共 384.00 元。欢迎在当地邮局订阅或直接汇款至编辑部订阅。

编辑部地址: 北京海淀区学院路 38 号, 北京大学医学部《中国疼痛医学杂志》编辑部

投稿网址: <http://casp.ijournals.cn>

联系电话: 010-82801712; 010-82801705

电子邮箱: [pain1712@126.com](mailto:pain1712@126.com)

联系人: 赵磊

QQ 群: 222950859 微信公众平台号: pain1712

