



• 论 著 •

CXCL13 通过 CXCR5 激活星形胶质细胞中 JNK 参与痛觉过敏 *

张 敏 曹德利 姜保春[△] 高永静[△]

(南通大学疼痛医学研究院 特种医学研究院, 南通 226019)

摘 要 **目的:** 探讨 CXCL13 及其受体 CXCR5 参与痛觉过敏的机制。**方法:** 细胞培养和免疫荧光染色检测脊髓背角神经元中 CXCL13 的表达; 通过转染 CXCL13 和 CXCR5 过表达质粒研究 CXCL13 和 CXCR5 的相互作用; Western Blot 方法检测 CXCL13 重组因子刺激原代星形胶质细胞后 JNK 磷酸化水平变化和鞘内注射 CXCL13 后脊髓中 JNK 磷酸化水平变化; 行为学检测鞘内注射 JNK 抑制剂 SP600125 对 CXCL13 引起的热痛觉过敏和机械性触诱发痛的影响。**结果:** 体外培养的脊髓背角神经元表达并释放 CXCL13; CXCL13 分泌后与受体 CXCR5 结合并发生内化; CXCL13 孵育培养的星形胶质细胞快速而短暂地激活 JNK; 鞘内注射 CXCL13 快速且短暂激活脊髓中的 JNK; 鞘内注射 JNK 抑制剂缓解了 CXCL13 诱导的热痛觉过敏和机械性触诱发痛。**结论:** CXCL13 通过 CXCR5 激活星形胶质细胞中 JNK 参与痛觉过敏。

关键词 痛觉过敏; 趋化因子; CXCL13; CXCR5; 星形胶质细胞; JNK

CXCL13 activates JNK in astrocytes through CXCR5 to induce pain hypersensitivity *

ZHANG Min, CAO Dei-Li, JIANG Bao-Chun[△], GAO Yong-Jing[△]

(Institute of Pain Medicine and Special Environmental Medicine, Nantong University, Nantong 226019, China)

Abstract **Objective:** To explore the mechanism of CXCL13 and its receptor CXCR5 underlying pain hypersensitivity. **Methods:** The expression of chemokine CXCL13 in neurons of the spinal dorsal horn was examined via neuron culture and immunofluorescence staining. CXCL13 and CXCR5 overexpression plasmids were transfected to clarify the interaction between CXCL13 and CXCR5. Western Blot was used to detect the phosphorylation of JNK in primary astrocytes after CXCL13 incubation or in the spinal cord after intrathecal injection of CXCL13. Behavioral test was used to check pain hypersensitivity after intrathecal injection of JNK inhibitor SP600125 and CXCL13. **Results:** In vitro cultured spinal dorsal horn neurons express and release chemokine CXCL13, and CXCL13 was internalized via binding to the receptor CXCR5. CXCL13 rapidly and transiently activated JNK in cultured astrocytes. Intrathecal injection of CXCL13 also rapidly and transiently activated JNK in the spinal cord. Intrathecal injection of JNK inhibitor alleviated heat hyperalgesia and mechanical allodynia induced by CXCL13. **Conclusion:** CXCL13 activates JNK in astrocytes through CXCR5 to induce pain hypersensitivity.

Key words Pain hypersensitivity; Astrocytes; CXCL13; CXCR5; Chemokine; JNK

慢性疼痛是指持续或反复发作 3 个月以上的疼痛, 发病率占成年人口的 11%~19%, 影响全球上亿人群, 然而目前临床治疗效果不佳。近年来的研究表明, 由神经元或胶质细胞 (星形胶质细胞和小

胶质细胞) 释放的趋化因子、细胞因子、神经营养因子等炎症因子介导的神经炎症反应在慢性疼痛发生发展中起重要作用^[1,2]。趋化因子 CXCL13 又称 B 淋巴细胞趋化因子, 最初发现于 B 细胞滤泡的基

* 基金项目: 国家自然科学基金 (31671091, 31871064, 81771197, 81971054); 江苏省自然科学基金 (BK20171255); 江苏省高校青蓝工程; 江苏省六大人才高峰 (SWYY-070); 江苏省研究生创新基金项目 (KYCX18-2397)

[△] 通讯作者 高永静 gaoyongjing@ntu.edu.cn; 姜保春 Jiangbaochun@ntu.edu.cn



质细胞中,通过受体 CXCR5 调节 B 细胞和 T 细胞亚群的归巢。最近研究显示, CXCL13 和 CXCR5 在正常小鼠脊髓均有低表达;在神经损伤后, CXCL13 和 CXCR5 分别在神经元和星形胶质细胞的表达大幅度增加,而且 CXCR5 基因敲除的小鼠,神经损伤诱导的星形胶质细胞激活受到很大程度的抑制,神经病理性疼痛也显著缓解^[3],表明 CXCL13 通过 CXCR5 促进星形胶质细胞的激活和神经病理性疼痛。但 CXCL13 是否由神经元分泌、CXCL13 和 CXCR5 如何发生相互作用、CXCL13 如何激活星形胶质细胞,这些问题都缺乏研究。

有丝分裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 是在慢性疼痛发生发展中起重要作用的细胞内激酶,主要包括 c-Jun N 末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK)、细胞外信号调节激酶 (extracellular signaling-regulated kinase, ERK) 和 p38。以往的研究显示, JNK 在脊髓中只表达于星形胶质细胞,而且 JNK 的磷酸化对于脊髓星形胶质细胞的激活和慢性疼痛的维持起重要作用^[4,5]。CXCR5 表达于脊髓星形胶质细胞, JNK 是否参与 CXCL13 引起的星形胶质细胞激活以及痛觉过敏呢?本研究用体外神经元培养和转染 CXCL13 和 CXCR5 过表达质粒转染方法,研究了 CXCL13 在神经元中的表达和分泌以及 CXCL13 和 CXCR5 的相互作用,并采用星形胶质细胞原代培养和药理学方法,研究了 JNK 在 CXCL13 诱导的星形胶质细胞激活和痛觉过敏中的作用。

方 法

1. 材料

动物:健康成年雄性 ICR 小鼠和新生 ICR 小鼠由南通大学动物实验中心提供。动物采用随机数字表方法进行分组。

试剂和药品: CXCL13 抗体 (Santa Cruz Biotechnology); MAP2 抗体 (Sigma-Aldrich); CXCL13 重组因子 (美国 PeproTech); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (美国 Thermal Scientific); Cy3-donkey anti-goat IgG 和 Alex-488-donkey anti-mouse 标记荧光二抗 (美国 Jackson Research); 组织裂解液 Lysis Buffer (Beyotime); DMEM 培养基 (Gibco); 胎牛血清 FBS (Gibco); SP600125 (Calbiochem); 其余化学试剂从美国 Sigma 公司购买。

实验所用主要仪器: von Frey filament (Stoelting); Model390 热痛觉过敏测试仪电 (IITC Life

Science); 电泳仪 (美国 Bio-Rad); 倒置激光共聚焦显微镜 SP8 (Leica); 高速冷冻离心机 (Eppendorf); Odyssey 双色红外荧光扫描仪 (美国 LI-COR); 多功能酶标仪 (美国 BioTek)。

2. 方法

(1) 脊髓背角神经元体外培养:提前用多聚赖氨酸包被玻片;将新生 3~4 天 ICR 小鼠用 75% 酒精消毒,断头。剪下脊柱放入预冷的 HBSS + HEPES 中,在解剖镜下进行腹侧椎板切除手术,除去脊髓外膜,取脊髓背角放入预热的 Papain 消化液中, 37℃ 消化 30 min。离心,弃 Papain 消化液,加 HBSS + HEPES 液洗 3 次,离心,弃上清;加完全培养基吹打,静置 1~2 min,吸取上层细胞悬液;用 40 μm 网筛过滤细胞悬液;离心, 1000 rpm, 5 min,弃上清,加完全培养基重悬,将细胞接种到小皿中,第 2 天换液。

(2) 原代星形胶质细胞体外培养:新生 2~3 天 ICR 小鼠用 75% 酒精消毒,断头,取大脑皮层,放置在预冷的 D-Hanks 液中;在解剖镜下剔除大脑皮层外膜和血管。吸去多余的 D-Hanks 液,用剪刀剪碎组织,转移至离心管,加入完全培养基吹打至无明显固体;过 100 μm 网筛; 3000 rpm 离心,弃上清;加低糖完全培养基重悬,过 10 μm 滤器,分至六孔板;第 2 天换液; 3~4 天换 1 次液, 10 天左右加 D-环腺苷酸, 1 天后可用。

(3) 行为学实验测定:①小鼠机械性触诱发痛行为检测:将成年 ICR 小鼠放置于行为检测架上适应至其安静,连续适应 3 天,适应时禁食、禁水,温度在 23℃ 左右,时间在上午 8 点至下午 6 点之间;连续适应 3 天后用 von Frey filament 进行小鼠足底刺激。触诱发痛检测采用 Dixon 建立的“up and down”方法,得到机械缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT)。缩足阈值越低,表示机械性触诱发痛越严重;②小鼠热痛觉过敏检测:将成年 ICR 小鼠放置在热痛检测的塑料盒中适应至其安静,适应时禁食、禁水,温度在 23℃ 左右,时间在上午 8 点至下午 6 点之间。适应后用一定强度的热辐射照射小鼠左足底,通过调节照射强度将基础缩足时间控制在 12~14 s,小鼠出现缩足时停止照射,记录时间。为避免灼伤足底,照射时间不超过 20 s。每只小鼠照射 3 次,间隔 15 min,计算其平均值,得到热缩足反射潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL)。缩足潜伏期越低,表示热痛觉过敏越严重。

(4) 小鼠脊髓鞘内给药:剔除小鼠背部毛发,

吸入异氟烷麻醉, 75% 酒精消毒, 用胰岛素针在第 L₄、L₅ 腰椎棘突间注射 10 μ l 药物至小鼠蛛网膜下隙, 尾巴甩动或颤抖证明注射成功, 注射结束后停留数秒后退针。

(5) Western Blot 蛋白检测: 组织/细胞蛋白质提取: 加入 RIPA 裂解液 70 μ l 裂解组织/细胞, 在冰上静置 30 min; 4 $^{\circ}$ C, 1 5000 rpm, 离心 20 min, 吸蛋白上清。吸取 3 μ l 上清加 21 μ l 双蒸水进行稀释 8 倍, 用 BCA 法测定蛋白浓度。每孔加入 30 μ g 蛋白进行电泳, 将蛋白转移到 PVDF 膜上; 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 4 $^{\circ}$ C 敷一抗过夜, 一抗用 5% 脱脂奶粉稀释 (p-JNK, 1:1000; GAPDH, 1:1 0000); 第 2 天室温复温 1 h 后用 TBST 洗 3 次, 每次 15 min; 荧光二抗用 5% 的脱脂奶粉稀释 1 0000 倍, 室温孵育 2 h; TBST 洗 3 次, 每次 15 min, 用 Odyssey 红外成像机器显影。

(6) 免疫荧光染色: 细胞吸去培养基, 0.01 M PBS 洗 1 次, 用 4% 多聚甲醛灌注固定 20 min。0.01 M PBS 洗片 3 次, 每次 5 min; 加 1%BSA 室温封闭 2 h; 用 1%BSA 稀释一抗 (CXCL13, 1:200; MAP2, 1:5000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 次日复温 1 h 后 0.01 M PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 分别加入用 0.01 M PBS 稀释 Cy3 和 Alexa 488 标记的荧光二抗 (1:1000, Jack-

son Immuno Research); 避光室温孵育 2 h, 0.01 M PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 晾干, 倒置荧光显微镜下拍照观察。

(7) 质粒构建和细胞转染: 分别构建 CXCL13 羧基端融合 RFP 和 CXCR5 羧基端融合 GFP 的表达质粒, 委托上海吉凯基因构建, 质粒信息见图 1。

HEK 293T 细胞密度达到 70%~80% 并状态良好时适合转染。分别转染 pCMV-RFP、pCMV-CXCL13-RFP、pCMV-GFP 和 pCMV-CXCR5-GFP 质粒。先用预热好的 Opti-MEM 稀释质粒, 再用 Opti-MEM 稀释 Lipofectamine 3000 [Lipofectamine 3000: 质粒 (ml:mg) = 1:2]; 然后将二者 1:1 混合均匀, 室温静置 10~15 min; 将混合液加入细胞中, 6 h 后换液, 质粒转染 48 h 即可进行观察荧光和细胞传代。

分别按照 pCMV-CXCL13-RFP 和 pCMV-GFP、pCMV-RFP 和 pCMV-CXCR5-GFP、pCMV-CXCL13-RFP 和 pCMV-CXCR5-GFP 分组, 将转染了不同质粒的细胞接种到一起。

3. 图像和统计学分析

处理使用 Image J 软件进行图像处理, 统计各条带的灰度值; 用目的条带的灰度值与内参 GAPDH 蛋白灰度值 (均扣除背景) 的比值作为最终统计数据, 用以表示相应蛋白的相对表达量。所有计

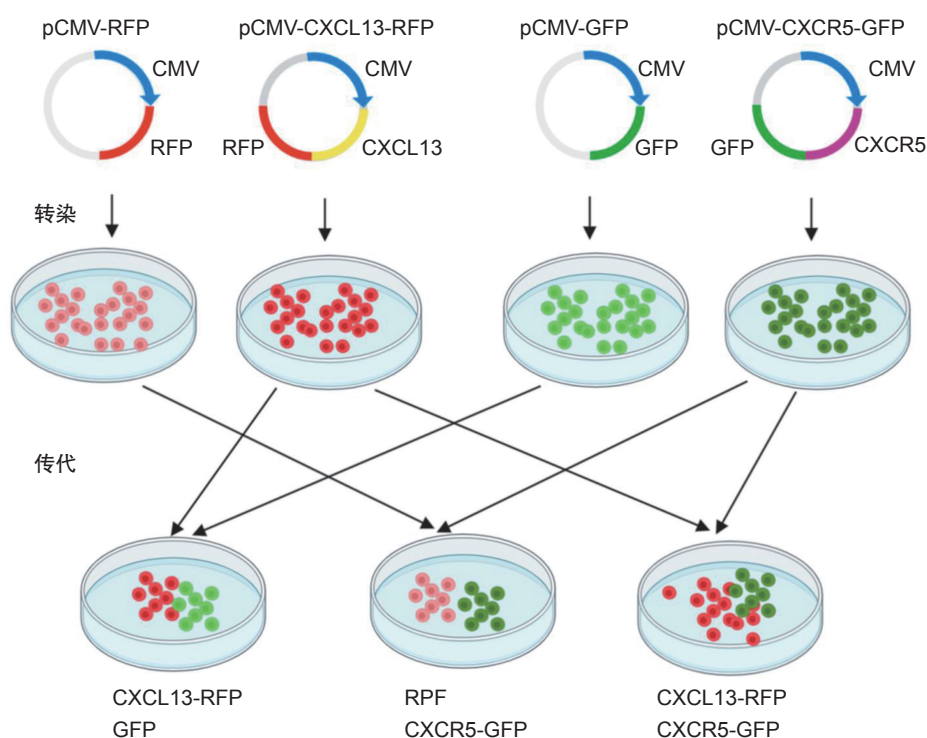


图 1 CXCL13 与 CXCR5 结合并内化实验示意图

Fig. 1 Schematic diagram showing the experimental design to prove the binding of CXCL13 with CXCR5 and the internalization

量资料统计数据使用 GraphPad Prism (version 8.01), 均采用均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm SEM$) 表示, 行为学实验结果采用双因素方差分析 (Two-way ANOVA), 多组之间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 两组之间比较采用 t 检验 (Student's t -test), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 脊髓背角神经元表达趋化因子 CXCL13

本课题组前期研究显示, 脊神经结扎诱导的神经病理性疼痛模型中, 脊髓背角神经元中 CXCL13 表达增加^[3], 为了明确小鼠正常生理状态下脊髓背角神经元表达 CXCL13 的情况, 本研究取新生 3~4 天的 ICR 小鼠脊髓背角神经元进行体外培养, 培养 5 天后固定进行免疫组化染色。结果显示, 趋化因子 CXCL13 在神经元的胞浆和突起中呈点状分布, 在胞外的培养基中也有散点状阳性荧光信号 (见图 2A), 且该神经元与微管相关蛋白 2 (MAP2) 共标 (见图 2B, C), 说明 CXCL13 表达于脊髓背角神经元并向胞外分泌。

2. 分泌型 CXCL13 与受体 CXCR5 结合并发生内化

为进一步研究趋化因子 CXCL13 作为分泌型蛋白如何与其受体 CXCR5 相互作用发挥功能, 本研究首先构建 CXCL13-RFP 过表达质粒、CXCR5-GFP 过表达质粒及相应对照质粒 (RFP 或 GFP 过表达质粒), 分别转染 HEK 293T 细胞, 观察 CXCL13 和 CXCR5 细胞表达、分布情况。结果显示 HEK293T

细胞转染 CXCL13-RFP 过表达质粒后, 胞内有点状分布的 CXCL13 阳性颗粒 (见图 3A), 对照组 RFP 在胞浆内均匀分布 (见图 3D)。转染 GFP 对照质粒的细胞中也见 GFP 均匀分布 (见图 3B), 转染 CXCR5-GFP 过表达质粒后, CXCR5 在胞浆和胞膜上都有表达 (见图 3E)。图层拼合后的结果显示, 将分别转染 CXCL13-RFP 过表达质粒和 GFP 对照质粒的细胞传代后接种到一起, 两者信号不共标 (见图 3A-C); 将分别转染 RFP 对照质粒与 CXCR5-GFP 过表达质粒的细胞传代后接种到一起, 两者信号也不共标 (见图 3D-F)。但是将分别转染 CXCL13-RFP 过表达质粒与 CXCR5-GFP 过表达质粒后的细胞接种到一起, CXCL13 蛋白信号不但在转染 CXCL13-RFP 的细胞中表达, 也可见于表达 CXCR5-GFP 的细胞中, 且 CXCL13 和 CXCR5 两种蛋白信号有共标, 呈颗粒状分布在胞质中 (图 3G-I, 局部放大见图 3J-L), 说明分泌的 CXCL13 能够与受体 CXCR5 结合并发生内化。

3. CXCL13 激活星形胶质细胞中 JNK

本课题组前期研究发现, 受体 CXCR5 在脊髓星形胶质细胞中表达^[3], 为了研究 CXCL13 与受体 CXCR5 结合后激活的下游信号通路, 本文采用体外培养的原代星形胶质细胞, 用 10 ng/ml 的 CXCL13 重组因子刺激 0.5 h 或 1 h, 通过 Western Blot 检测 p-JNK 的表达。结果显示, CXCL13 孵育星形胶质细胞 0.5 h 后, 引起 JNK 磷酸化水平升高 (见图 4A, B); 但 CXCL13 孵育 1 h 后, p-JNK 的表达与对照组无显著性差异 (见图 4C, D), 说明 CXCL13 与受体 CXCR5 结合快速激活 JNK。

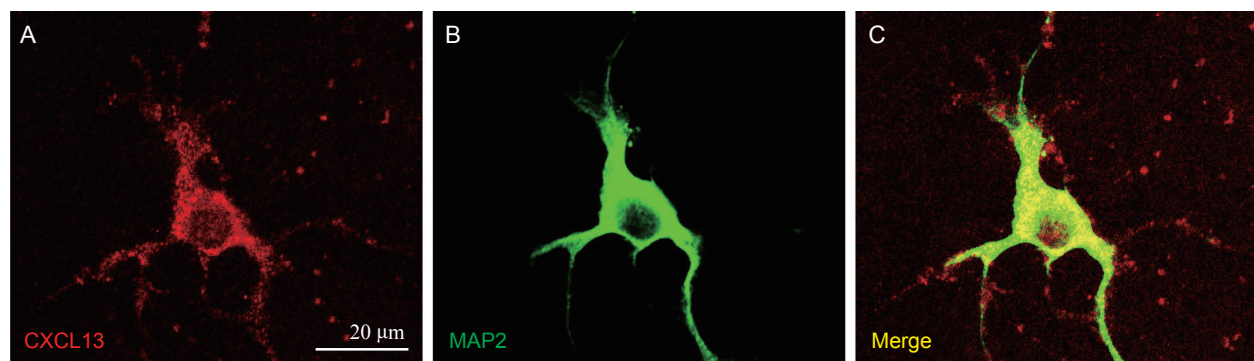


图 2 体外培养的脊髓背角神经元表达趋化因子 CXCL13

(A) 免疫荧光染色显示趋化因子 CXCL13 分布于神经元胞内及培养基中; (B) 神经元标记物微管相关蛋白 2 (MAP2) 免疫荧光染色; (C) CXCL13 与 MAP2 共定位

Fig. 2 In vitro cultured spinal dorsal horn neurons express chemokine CXCL13

(A) Immunofluorescence staining showing the distribution of CXCL13 in the neuron and culture medium; (B) Immunofluorescence staining of neuronal marker microtubule-associated protein 2 (MAP2); (C) CXCL13 is co-localized with MAP2.

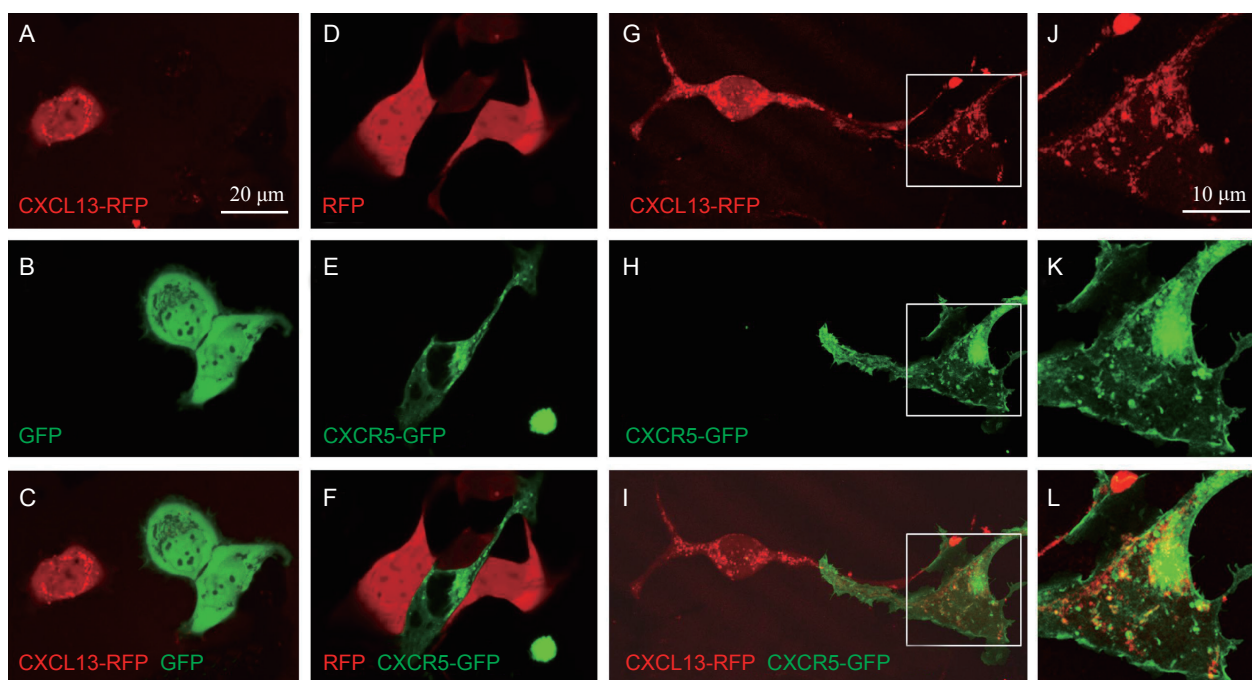


图 3 CXCL13 与受体 CXCR5 结合并发生内化
(A-C) 分别转染 CXCL13-RFP 过表达质粒和 GFP 对照质粒后接种到一起的 HEK 293T 细胞; (D-F) 分别转染 CXCR5-GFP 过表达质粒和 RFP 对照质粒后接种到一起的 HEK 293T 细胞; (G-I) 分别转染 CXCL13-RFP 和 CXCR5-GFP 过表达质粒后接种到一起的 HEK 293T 细胞

Fig. 3 CXCL13 binds to the receptor CXCR5 and is internalized

(A-C) Mix of HEK 293T cells that were transfected with CXCL13-RFP overexpression plasmid or GFP control plasmid; (D-F) Mix of HEK 293T cells that were simultaneously transfected with CXCR5-GFP overexpression plasmid or RFP control plasmid; (G-I) Mix of HEK 293T cells that were transfected with CXCL13-RFP or CXCR5-GFP overexpression plasmids.

4. 脊髓鞘内注射 CXCL13 重组因子激活 JNK

为进一步体内验证 CXCL13 激活 JNK, 鞘内注射 100 ng CXCL13 重组因子 0.5 h 或 1 h 后, Western Blot 检测了脊髓中 JNK 磷酸化水平 (即 p-JNK 的表达)。结果显示, 与鞘内注射 PBS 相比, CXCL13 注射后 0.5 h, JNK 磷酸化水平显著升高 (见图 5A, B)。注射后 1 h, PBS 组和 CXCL13 组的 JNK 磷酸化水平无显著性差异 (见图 5C, D)。说明在脊髓中 CXCL13 对 JNK 的激活也是快速而短暂。

5. 抑制 JNK 激活缓解 CXCL13 诱导的痛敏反应

为了明确脊髓 JNK 信号通路是否参与 CXCL13 诱导的痛敏反应, 本研究使用 JNK 抑制剂 SP600125 (20 nmol) 进行鞘内注射, 30 min 后再鞘内注射 100 ng 的 CXCL13, 检测小鼠痛敏反应行为。结果显示, 鞘内注射 CXCL13 诱导正常小鼠产生明显的机械性触诱发痛和热痛觉过敏, 痛敏反应持续 6 h 以上; 而提前注射 SP600125 有效缓解了 CXCL13 诱导的热痛觉过敏 (见图 6A) 和机械性触诱发痛 (见图 6B), 说明抑制 JNK 激活能够缓解 CXCL13 诱导的痛觉过敏。

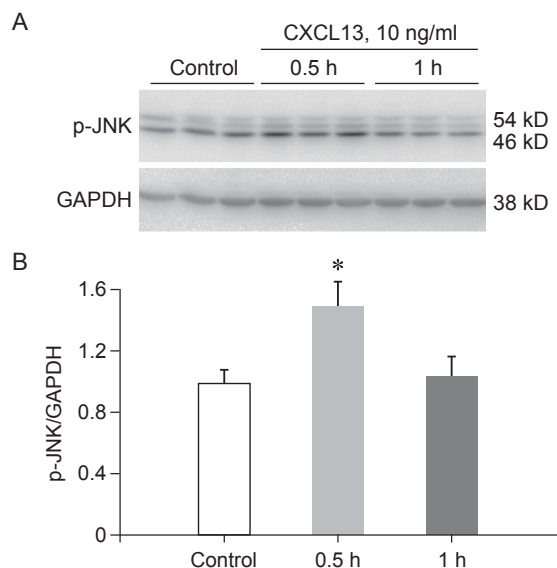


图 4 CXCL13 激活星形胶质细胞中 JNK ($n=3$, $\bar{x} \pm SEM$)
(A) p-JNK, GAPDH Western Blot 条带; (B) p-JNK 条带统计图, * $P < 0.05$, 与 Control 组相比

Fig. 4 CXCL13 activates JNK in astrocytes ($n=3$, $\bar{x} \pm SEM$)
(A) Western Blot bands for p-JNK and GAPDH; (B) The statistics of p-JNK band. * $P < 0.05$, compared with the Control group.

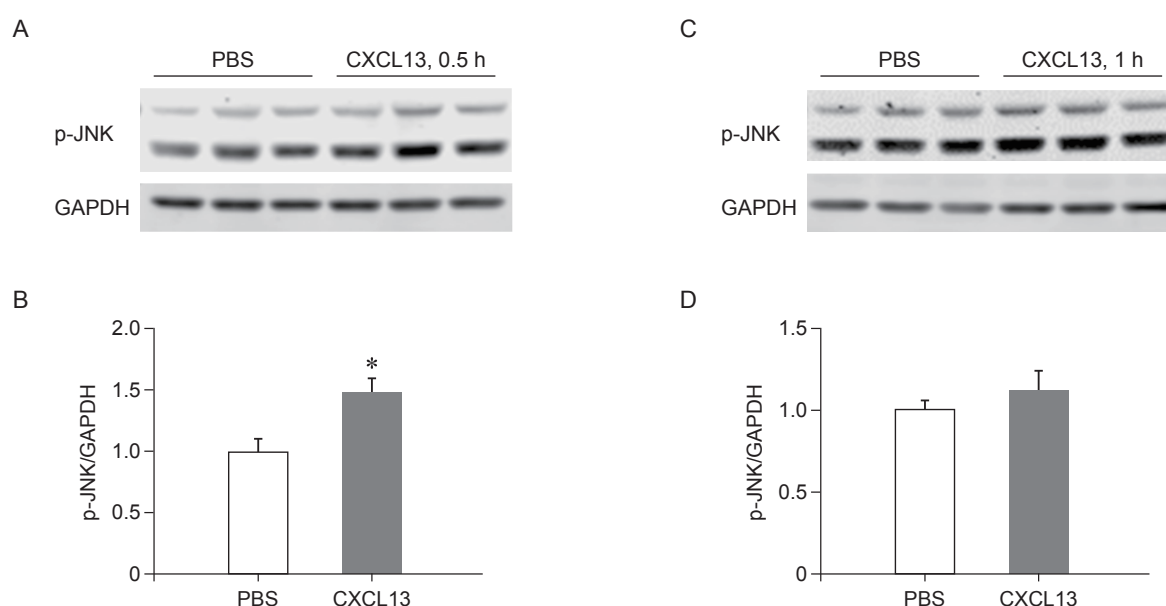


图 5 鞘内注射 CXCL13 重组因子激活脊髓 JNK ($n = 3$, $\bar{x} \pm SEM$)
(A) 鞘内注射 100 ng CXCL13 后 0.5 h, p-JNK 和 GAPDH Western Blot 条带图; (B) p-JNK 条带统计图, $*P < 0.05$, 与 PBS 组相比; (C) 鞘内注射 CXCL13 后 1 h, p-JNK 和 GAPDH Western Blot 条带图; (D) p-JNK 条带统计图, $P > 0.05$, 与 PBS 组相比

Fig. 5 Intrathecal injection of CXCL13 activates JNK in the spinal cord ($n = 3$, $\bar{x} \pm SEM$)
(A) p-JNK and GAPDH Western Blot 0.5 h after intrathecal injection of CXCL13 (100ng); (B) The statistics for p-JNK band. $*P < 0.05$, compared with PBS group; (C) p-JNK and GAPDH Western Blot 1 h after intrathecal injection of CXCL13; (D) The statistics for p-JNK band. $P > 0.05$, compared with PBS group.

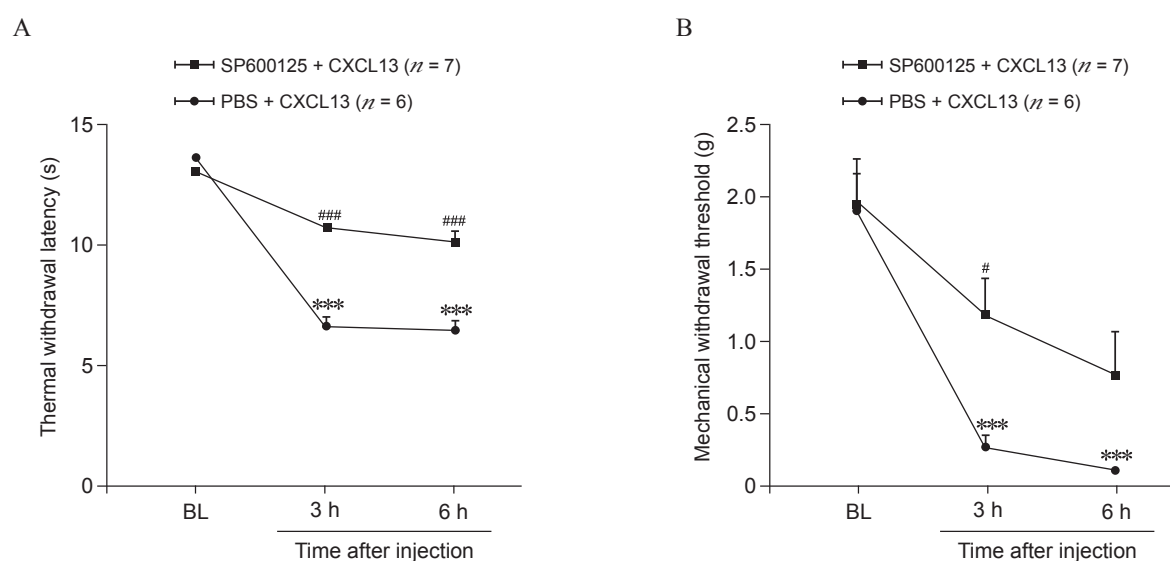
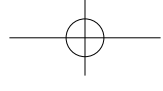


图 6 抑制 JNK 的激活缓解了 CXCL13 诱导的痛敏反应 ($n = 6-7$, $\bar{x} \pm SEM$)
(A, B) 鞘内注射 PBS + CXCL13 诱导正常小鼠产生明显的热痛敏反应和机械性触诱发痛, 持续 6 h 以上; 提前鞘内注射 SP600125 有效缓解了 CXCL13 引起的小鼠的 (A) 热痛觉过敏和 (B) 机械性触诱发痛
 $***P < 0.001$, 与 BL 组相比; $#P < 0.05$, $###P < 0.001$, 与 PBS + CXCL13 组相比

Fig. 6 Inhibition of JNK activation alleviates the hyperalgesia induced by CXCL13 ($n = 6-7$, $\bar{x} \pm SEM$)
(A, B) Intrathecal injection of PBS + CXCL13 induced obvious heat hyperalgesia and mechanical allodynia which lasted for more than 6 h; Pretreatment with SP600125 effectively relieved CXCL13 induced heat hyperalgesia (A) and mechanical allodynia (B).
 $***P < 0.001$, compared with the BL (baseline); $#P < 0.05$, $###P < 0.001$, compared with the PBS + CXCL13 group.



讨 论

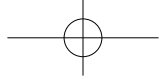
本研究采用原代细胞培养、质粒转染、Western Blot、免疫荧光染色以及行为学检测等方法,研究了 CXCL13 和 CXCR5 的相互作用以及参与痛觉过敏的下游信号通路。研究结果显示:正常小鼠脊髓背角神经元表达分泌趋化因子 CXCL13; CXCL13 与其受体 CXCR5 结合并发生内化; CXCL13 激活星形胶质细胞和脊髓中 JNK; 鞘内注射 JNK 抑制剂缓解 CXCL13 诱导的痛敏反应。

趋化因子是一类特殊类型的细胞因子,因其具有白细胞趋化性和细胞因子活性而被命名为“趋化因子”。趋化因子家族共有 50 多个成员,其中 30 多个在脊髓中表达。近年来的研究揭示了多种趋化因子如 CCL2, CCL7, CXCL1, CXCL10, CXCL12, CXCL16, CX3CL1 通过介导神经元-星形胶质细胞、神经元-小胶质细胞、星形胶质细胞-小胶质细胞间的相互作用参与不同类型的慢性疼痛^[6,7]。CXCL13 在正常小鼠脑中不表达,但在神经纤维蛋白沉着症、自身免疫性脱髓鞘、原发性中枢神经系统淋巴瘤、手术等情况下, CXCL13 在脑中表达增加^[8-11]; 在神经损伤或糖尿病引起的神经病理性疼痛状态下, CXCL13 在脊髓的表达增加^[3,12]。本研究通过体外培养脊髓背角神经元,检测到 CXCL13 在神经元胞体和突起中呈点状分布,且在培养基中也有较多的 CXCL13 阳性信号,支持 CXCL13 在神经元的表达,并向细胞外分泌,从而作用于其他细胞,参与不同类型细胞间的相互作用。

趋化因子受体是具有 7 次跨膜结构的 G 蛋白偶联受体,共有 20 多种类型,少于趋化因子的种类,因此趋化因子和受体并不一一对应。尽管 CXCR5 被认为是 CXCL13 的唯一受体,但在 CXCR5 基因敲除的小鼠,鞘内注射 CXCL13 引起的痛觉过敏并没有完全消除,只是大幅度下降,提示 CXCL13 可能有其他受体^[3]。本研究中用体外转染的方法,观察到 CXCL13 不但向胞外分泌,还进入到转染了 CXCR5 表达质粒的细胞中,并且 CXCL13 与 CXCR5 形成共标颗粒,说明 CXCL13 与 CXCR5 结合后发生了内化。有文献报道,趋化因子受体 CCR2 介导沿脑微血管的趋化因子 CCL2 的结合和内化^[13],并且内化后的 CCR2 到达早期的内小体,然后到达溶酶体降解^[14]。CXCL13 和 CXCR5 结合并内化后也可能通过溶酶体途径降解,这仍有待以后进一步的研究; CXCL13 的其他受体也需要以后的研究。

以往的研究显示,趋化因子和受体结合后使 G 蛋白的 α 亚基和 $\beta\gamma$ 亚基分离,激活不同的信号通路,如 MAPK 通路、磷脂酶 C (phospholipase C, PLC) 通路和磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) 通路^[7]。JNK 和 ERK 是 MAPKs 激酶家族的重要成员。脊髓背角中 ERK 的激活与外周刺激是否具有伤害性密切相关,而且 ERK 表达的细胞类型与外周刺激的类型与时程相关。例如,在辣椒素诱导的急性炎症性疼痛模型中, pERK 表达于脊髓背角神经元中^[15]; 在神经病理性疼痛模型中, pERK 在神经损伤初期表达于神经元,之后表达于脊髓小胶质细胞,但后期则表达于星形胶质细胞中^[16]。与 ERK 的分布不同, JNK 只表达于脊髓背角的星形胶质细胞,且在组织炎症或神经损伤后, p-JNK 只在脊髓星形胶质细胞的持续增加^[5]。本课题组以往的研究显示,鞘内注射 CXCL13 激活 p-ERK 在脊髓背角星形胶质细胞中表达,而且 MEK 抑制剂 PD98059 缓解了 CXCL13 诱导的痛觉过敏,说明 CXCL13/CXCR5 信号通路可以通过激活 ERK 促进痛敏。基于 CXCR5 主要表达于星形胶质细胞^[3], 本实验研究检测了 CXCL13 对培养的星形胶质细胞中 JNK 的激活,观察到 CXCL13 只在刺激后 30 min 激活了 JNK,在 1 h 恢复正常;鞘内注射 CXCL13 也在 30 min 后使脊髓中的 p-JNK 显著增加;而 CXCL13 对 ERK 的激活时间也从 30 min 开始,持续 1 h 以上^[3],说明 CXCL13 对 ERK 和 JNK 的激活时程不完全相同。以往的研究证明, JNK 抑制剂 SP600125 可减轻炎症性疼痛和神经性疼痛^[5,17,18], 本研究中行为学结果也显示鞘内注射 JNK 抑制剂缓解了 CXCL13 诱发的触诱发痛,表明 JNK 和 ERK 共同作用介导 CXCL13 引起的痛觉过敏。

本研究同时观察到鞘内注射 CXCL13 诱导的热痛觉过敏持续了 6 h 以上,但 JNK 和 ERK 都是短暂的激活,提示 JNK 和 ERK 可能通过下游通路促进了疼痛的持续。以往的研究证明,鞘内注射 CXCL13 诱导星形胶质细胞标记物 GFAP 在 6 h 和 24 h 的表达显著升高, MEK 抑制剂 PD98059 抑制 CXCL13 引起的 GFAP 的表达增加和星形胶质细胞的激活^[3],说明 ERK 可能通过激活星形胶质细胞促进痛觉过敏的长时间存在。而且, ERK 和 JNK 磷酸化后均可转位到细胞核内,促进新的基因的合成,如 JNK 的下游基因 c-Jun 直接促进趋化因子 CCL2 的表达,而 CCL2 由星形胶质细胞释放后通过受体 CCR2 增加神经元的兴奋性突触传递^[19],从而促进中枢敏化和疼痛慢性化。



综上所述,本研究揭示了 CXCL13 与受体 CXCR5 直接结合并激活星形胶质细胞中 JNK 信号通路,促进痛觉过敏的产生,拓展了 CXCL13/CXCR5 参与慢性疼痛的机制,说明靶向趋化因子和 MAPKs 可能缓解慢性疼痛。

参 考 文 献

- [1] 高永静, 纪如荣. 星形胶质细胞调节慢性疼痛的分子机制 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2013, 19(9):545-552.
- [2] 沈怡佳, 陈辉, 熊源长. 趋化因子在慢性疼痛中的作用研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2017, 23(11): 846-850.
- [3] Jiang BC, Cao DL, Zhang X, *et al.* CXCL13 drives spinal astrocyte activation and neuropathic pain via CXCR5[J]. J Clin Invest, 2016, 126(2):745-761.
- [4] Gao YJ, Xu ZZ, Liu YC, *et al.* The c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in spinal astrocytes is required for the maintenance of bilateral mechanical allodynia under a persistent inflammatory pain condition[J]. Pain, 2010, 148(2):309-319.
- [5] Zhuang ZY, Wen YR, Zhang DR, *et al.* A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: Respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance[J]. J Neurosci, 2006, 26(13):3551-3560.
- [6] 顾军, 高永静, 姜保春. 趋化因子 CXCL16 及受体 CXCR6 在神经病理性疼痛小鼠背根神经节中的表达变化 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2017, 23(8):569-574.
- [7] Jiang BC, Liu T, Gao YJ. Chemokines in chronic pain: Cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential[J]. Pharmacol Ther, 2020, 212:107581.
- [8] Sellebjerg F, Bornsen L, Khademi M, *et al.* Increased cerebrospinal fluid concentrations of the chemokine CXCL13 in active MS[J]. Neurology, 2009, 73(23): 2003-2010.
- [9] Ljostad U, Mygland A. CSF B-lymphocyte chemoattractant (CXCL13) in the early diagnosis of acute Lyme neuroborreliosis[J]. J Neurol, 2008, 255(5): 732-737.
- [10] Fischer L, Korfel A, Pfeiffer S, *et al.* CXCL13 and CXCL12 in central nervous system lymphoma patients[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(19):5968-5973.
- [11] Shen Y, Zhang Y, Chen L, *et al.* Chemokine CXCL13 acts via CXCR5-ERK signaling in hippocampus to induce perioperative neurocognitive disorders in surgically treated mice[J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1):335.
- [12] Liu S, Liu X, Xiong H, *et al.* CXCL13/CXCR5 signaling contributes to diabetes-induced tactile allodynia via activating pERK, pSTAT3, pAKT pathways and pro-inflammatory cytokines production in the spinal cord of male mice[J]. Brain Behav Immun, 2019, 80:711-724.
- [13] Dzenko KA, Andjelkovic AV, Kuziel WA, *et al.* The chemokine receptor CCR2 mediates the binding and internalization of monocyte chemoattractant protein-1 along brain microvessels[J]. J Neurosci, 2001, 21(23): 9214-9223.
- [14] Garcia Lopez MA, Aguado Martinez A, Lamaze C, *et al.* Inhibition of dynamin prevents CCL2-mediated endocytosis of CCR2 and activation of ERK1/2[J]. Cell Signal, 2009, 21(12):1748-1757.
- [15] Ji RR, Baba H, Brenner GJ, *et al.* Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity[J]. Nat Neurosci, 1999, 2(12):1114-1119.
- [16] Zhuang ZY, Gerner P, Woolf CJ, *et al.* ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model[J]. Pain, 2005, 114(1-2):149-159.
- [17] Obata K, Yamanaka H, Kobayashi K, *et al.* Role of mitogen-activated protein kinase activation in injured and intact primary afferent neurons for mechanical and heat hypersensitivity after spinal nerve ligation[J]. J Neurosci, 2004, 24(45):10211-10222.
- [18] Ni HD, Xu LS, Wang Y, *et al.* Astrocyte activation in the periaqueductal gray promotes descending facilitation to cancer-induced bone pain through the JNK MAPK signaling pathway[J]. Mol Pain, 2019, 15:1744806919831909.
- [19] Gao YJ, Zhang L, Samad OA, *et al.* JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain[J]. J Neurosci, 2009, 29(13):4096-4108.