



## • 国外医学动态 •

## 脊髓和三叉神经脊束核尾侧亚核投射神经元亚群 负责痛觉和痒觉信息加工

**摘要** 初级感觉神经元和脊髓背角的中间神经元传递痛觉和痒觉相关信息，并具有显著的分子和功能异质性，而将痛、痒信息传递到脑的投射神经元分子标签目前尚不清楚。该研究使用逆行示踪-TRAP（翻译核糖体亲和纯化）和 RNA 测序技术，揭示了脊髓和三叉神经脊束核到臂旁核的投射神经元存在分子异质性。该研究在鉴定出的众多基因中，重点关注了 *Cck*<sup>+</sup>、*Nptx2*<sup>+</sup>、*Nmb*<sup>+</sup> 和 *Crh*<sup>+</sup> 投射神经元的不同亚群。结合逆行标记神经元的原位杂交和基于 *Fos* 表达变化的检测分析，也阐明了它们显著的功能异质性，包括痛觉和痒觉刺激输入在 NK1R 和非 NK1R 投射神经元不同亚群上的汇聚和分散。

研究表明，初级传入神经元和脊髓中间神经元类群具备区分痛觉和痒觉刺激模式的功能。然而，机体对特定刺激模式的感知并非源于脑对中间神经元活动的分析，而是源于脑对不同投射神经元类群活动的分析。因而，针对初级传入神经元和中间神经元的异质性和特异性的探究，已经拓展到脊髓背角和三叉神经脊束核尾侧亚核 (TNC) 的投射神经元。解剖学研究鉴定了脊髓背角 I 层的 3 种形态学不同的投射神经元，提示其可能具有功能异质性。然而，有观点认为在分子水平上投射神经元是相对同质性的（尽管也有反对的证据）。神经激肽 1 受体 (NK1R) 一直被认为是脊髓背角 I 层和脊髓外侧核 (LSN) 投射神经元的主要标志分子。最近研究表明 *Phox2a* 和 *Gpr83* 两个基因定义了大量的投射神经元（靶向臂旁核），其在传递不同疼痛刺激模式中发挥重要作用。近来，采用无偏向的单细胞转录组学技术鉴定出一类兴奋性神经元群体（表达 *Glut15*），其中也包括了表达 NK1R 的脊髓-臂旁核投射神经元。该研究中作者采用系列连续的过滤筛选步骤，鉴定出几种不同分子类型的投射神经元亚群，并探究了这些神经元亚群传递痛觉和痒觉信息的功能异质性。

首先，该研究采用基于复制缺陷的逆行单纯疱疹病毒 (HSV) 构建了编码绿色荧光蛋白 (GFP) 标记的大核糖体亚单位蛋白 L10 (HSV-GFPL10) 的病毒载体。该病毒载体被注射到小鼠的臂旁外侧核 (LPb) 中，诱导脊髓和 TNC 到臂旁核的投射神经元表达 GFP-L10，进而可以对投射神经元特异性的 RNA

进行纯化并测序。在平行研究中，作者将编码一个 Cre 重组酶依赖的 HA 标记 L10 (HSV-flex-HAL10) 的病毒载体注射到 NK1R-Cre 小鼠的 LPb 中（从注射 HSV-GFPL10 和 HSV-flex-HAL10 的小鼠中获得的数据集，在后文中称作“PN”或“NK”数据集）。2 周后分别在野生型和 NK1R-Cre 小鼠的脊髓和 TNC 投射神经元中记录 GFP- 和 HA- 标记的核糖体，并通过标记的核糖体和相关 mRNA 免疫沉淀反应 (IP) 实验证实特异性免疫标记的投射神经元。

在 qPCR 实验验证上述 IP 对投射神经元的特异性后，作为第一步筛选步骤，对所有 IP (GFP 或 HA 标记的核糖体) 和输入样本 (脊髓背角和 TNC) 进行核糖体 RNA 测序，绘制“PN”和“NK”数据集内以及相对于另一数据集的基因表达倍数变化图。鉴于脊髓到臂旁核所有的 I 层投射神经元约 90% 表达 NK1R，作者猜想这两个数据集有很大程度的重叠且大部分数据点应位于第一和第三象限，观察到的结果也证实了他们的猜想。同时，在成年小鼠 NK1R 亚群（而不是非 NK1R 亚群）的投射神经元中还观察到 *Phox2a* 的富集。采用荧光原位杂交 (ISH) 对投射神经元标记基因进行第二步筛选，主要关注几个位于第一象限且在 PN 或 NK 的 RNA-seq 和 qPCR 数据集中富集的与疼痛和/或痒觉信息处理相关的基因。首先从 TNC 中的投射神经元开始分析，*Cck* 基因编码的胆囊收缩素是一种具有抗阿片作用的物质。采用 HSV-GFPL10 逆行标记 LPb 投射神经元，并对 TNC 内的 *Gfp* 和 *Cck* 进行双荧光 ISH，证实了在 *Gfp*<sup>+</sup> 投射神经元中富集表达 *Cck* 基因。



同时还观察到大量 *Cck*<sup>+</sup>/*Gfp*<sup>+</sup> 神经元, 表明大多数 *Cck*<sup>+</sup> 细胞是中间神经元, 脊髓背角也呈现出类似的表达模式。神经元正五聚蛋白 2 (*Nptx2*) 基因与多种神经精神障碍及疼痛信息的处理有关。与 *Cck* 类似, 该研究还观察到大量的 *Nptx2*<sup>+</sup>/*Gfp*<sup>+</sup> 神经元, 表明绝大多数 *Nptx2*<sup>+</sup> 细胞是中间神经元。Neuromedin B (*Nmb*) 是蛙皮素样多肽家族的一员, 并与疼痛和痒觉信息的处理有关。作者发现 *Nmb* 在 TNC 中表达较少, 且主要表达在浅层, 其中一部分是 *Gfp*<sup>+</sup> 的 LPb 投射神经元。促肾上腺皮质激素释放激素基因 (*Crh*) 与外周和中枢疼痛信息处理有关。作者观察到 TNC 浅层中存在 *Crh*<sup>+</sup>/*Gfp*<sup>+</sup> 的 LPb 投射神经元。

为了确定这些与投射神经元相关的基因在 NK1R 神经元亚群中的表达情况, 对 *Tacr1* 和每个富集的基因进行了双荧光和三荧光的 ISH 实验。采用逆行示踪荧光微粒直接标记投射神经元, 并观察 *Tacr1* 与富集基因共表达的细胞及只表达该基因或 *Tacr1* 的细胞。观察到脊髓背角深层存在 *Tacr1*<sup>+</sup>/*Cck*<sup>+</sup> 神经元, 而 I 层则几乎没有。另外, 在背角浅层和深层均观察到了 *Tacr1* 与 *Nptx2*、*Nmb* 和 *Crh* 共表达的神经元, 当然也有很多只表达 *Tacr1* 或者富集基因的神经元。对 *Tacr1*、*Cck* 和 *Nptx2* 进行三荧光 ISH, 观察了表达每种基因组合的神经元亚型, 并提出 *Tacr1*<sup>+</sup> 的神经元至少包含 4 个亚群: *Tacr1*<sup>+</sup>*Cck*<sup>+</sup>*Nptx2*<sup>+</sup>、*Tacr1*<sup>+</sup>*Cck*<sup>+</sup>*Nptx2*<sup>-</sup>、*Tacr1*<sup>+</sup>*Cck*<sup>-</sup>*Nptx2*<sup>+</sup> 和 *Tacr1*<sup>+</sup>*Cck*<sup>-</sup>*Nptx2*<sup>-</sup>。实际上, 表达 NK1R 的投射神经元群体并不是同质性的, 而 *Tacr1* 只是不同投射神经元类群的一个标志基因。近来研究发现, 表达 NK1R 的投射神经元亚群也表达 P 物质 (由 *Tac1* 编码)。该研究还发现 *Tac1* 和 *Tacr1* 共表达在投射神经元亚群中。

该研究通过 *Fos* 表达变化来监测逆行标记的投射神经元亚群对疼痛刺激 (将小鼠后脚掌置于 50°C 水中) 或痒觉刺激 (小鼠脸颊注射 5.0 μg/μl 氯喹) 的反应性。小鼠接受刺激 20 分钟后, 对其腰段脊髓和 TNC 进行三重荧光标记 ISH 实验。结果显示, 刺激同侧的脊髓浅层 (I/II 层) 和 III/IV 层观察到了热诱导的 *Fos*<sup>+</sup> 神经元, 并且这两个区域均观察到了 *Fos* 和 *Cck* 共标的投射神经元。平均约 27% 的 *Cck*<sup>+</sup> 投射神经元和约 50% 的 *Nptx2*<sup>+</sup> 投射神经元对伤害性热刺激有反应。在记录到少量 *Nmb*<sup>+</sup> 或 *Crh*<sup>+</sup> 细胞中, 约 27% 的 *Nmb*<sup>+</sup> 投射神经元和约 50% 的 *Crh*<sup>+</sup> 投射神经元对伤害性热刺激有反应。氯喹介导的 *Fos* 表达变化在刺激同侧的 TNC 浅层最显著。TNC 中对氯喹有反应的投射神经元中, 有约 29%

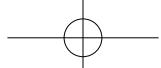
的 *Cck*<sup>+</sup> 投射神经元, 约 36% 的 *Nptx2*<sup>+</sup> 投射神经元, 约 32% *Nmb*<sup>+</sup> 投射神经元和 28% *Crh*<sup>+</sup> 投射神经元。与氯喹反应性的 *Cck*<sup>+</sup> 神经元有所不同, *Nptx2*<sup>+</sup> 神经元主要分布在 I 层。结果表明, 在脊髓背角和 TNC 的投射神经元中, 表达 *Cck*、*Nptx2*、*Crh* 和 *Nmb* 的每个投射神经元亚群中, 约有三分之一对热刺激和/或氯喹有反应。

该研究采用 TRAP2 (活性类群神经元靶向重组) 小鼠来实现激活神经元的可视化。在小鼠暴露于特定时间内的刺激后, 被激活的神经元以 Cre 和 Fos 依赖性方式永久表达 *tdTomato* (*tdT*) 红色荧光。在小鼠注射 4-OH- 他莫西芬前 1 周, 在 LPb 中注射荧光金 (FG), 从而实现对投射神经元中汇聚处理刺激信息的分析。结果显示, *tdT* 荧光和 *Fos* 免疫反应性在刺激同侧的脊髓背角最显著, *FG*<sup>+</sup>*Fos*<sup>+</sup>*tdT*<sup>+</sup> 三标的投射神经元主要分布于 I 层。而 *FGFos*<sup>+</sup>*tdT*<sup>+</sup> 双标的中间神经元主要位于 II 层。I 层和 V 层中存在只对伤害性热刺激有反应的其他投射神经元 (如 *tdT*<sup>+</sup>/*Fos*<sup>+</sup> 神经元) 和只对痒觉刺激有反应的其他投射神经元 (如 *tdT*<sup>+</sup>/*Fos*<sup>+</sup> 投射神经元)。结果表明, 大部分投射神经元对两种刺激的其中一种有反应。只对热刺激有反应的投射神经元主要分布在 I 层和 II 层, 而只对氯喹有反应的投射神经元在脊髓各层都有分布。同一投射神经元亚群既传递疼痛也传递痒觉信息给大脑, 也存在对疼痛或痒觉或对其他刺激更具选择性的神经元亚群。

为了整合理解投射神经元的分子异质性与功能异质性, 对受到疼痛或瘙痒刺激的 TRAP2 小鼠脊髓背角组织进行多色非定量 ISH 分析。在注射 4-OH- 他莫西芬后, 首先通过向小鼠后爪注射氯喹来激活痒觉反应神经元, 1 周后将同一只后爪浸泡在 50°C 的水中激活痛觉反应性神经元。在氯喹刺激 1 周前, 这些小鼠 LPb 注射逆行示踪荧光微粒标记投射神经元。在第 2 次刺激后, 对 *tdT* (标记瘙痒反应神经元)、*Fos* (标记疼痛反应神经元)、*Tacr1*、*Cck*、*Nptx2* 和 *Crh* 基因进行多色 ISH。在脊髓背角浅层、深层以及 LSN 中, 观察到仅对疼痛刺激有反应的投射神经元 (即 *Fos*<sup>+</sup>/*tdT*<sup>+</sup> 投射神经元), 同时也存在只对痒觉刺激有反应的神经元。此外, 有一些投射神经元对疼痛和瘙痒的刺激均有反应, 而另一些对两者均无反应。

最后, 该研究发现大多数投射神经元表达 NK1R 以及一个或多个标记基因, 然而 TRAP2 分析表明这些投射神经元也具有功能异质性。目前认为, 初级感觉神经元和脊髓背角的中间神经元是异质性

(下转第 887 页)



- and long-term recovery of choline acetyltransferase immunoreactivity in adult cat somatosensory cortex after peripheral nerve transections[J]. *J Comp Neurol*, 1995, 354:321-332.
- [20] Wu CL, Agarwal S, Tella PK, et al. Morphine versus mexiletine for treatment of postamputation pain: a randomized, placebo-controlled, crossover trial[J]. *Anesthesiology*, 2008, 109:289-296.
- [21] Kumar V, Garg R, Bharati SJ, et al. Long-term high-dose oral morphine in phantom limb pain with no addiction risk[J]. *Indian J Palliat Care*, 2015, 21:85-87.
- [22] Mitra S, Kazal S. Oral ketamine for phantom limb pain: an option for challenging cases[J]. *Indian J Anaesth*, 2015, 59:446-448.
- [23] Nagoshi Y, Watanabe A, Inoue S, et al. Usefulness of milnacipran in treating phantom limb pain[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2012, 8:549-553.
- [24] Bone M, Critchley P, Buggy D. Gabapentin in postamputation phantom limb pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over study[J]. *Reg Anesth Pain Med*, 2002, 27:481-486.
- [25] Smith DG, Ehde DM, Hanley MA, et al. Efficacy of gabapentin in treating chronic phantom limb and residual limb pain[J]. *J Rehabil Res Dev*, 2005, 42:645-654.
- [26] Battista B, D'Addabbo M, White PF, et al. Effect of continuous peripheral nerve block after lower extremity amputation: Effect on symptoms of phantom limb syndrome[J]. *Anesth Analg*, 2010, 111:1308-1315.
- [27] 王磊, 孙海玉. 幻肢痛临床治疗新进展 [J]. 中国民康医学, 2018, 4:73-95.
- [28] Viana R, Payne MW. Use of calcitonin in recalcitrant phantom limb pain complicated by heterotopic ossification[J]. *Pain Res Manag*, 2015, 20:229-233.
- [29] Moon Y, Choi JH, Park HJ, et al. Ultrasound-Guided nerve block with botulinum toxin type A for intractable neuropathic pain[J]. *Toxins (Basel)*, 2016, 8:18.
- [30] Haley MA, Ehde DM, Campbell KM, et al. Self-reported treatments used for lower-limb phantom pain: Descriptive findings[J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 2006, 87:270-277.
- [31] Lim KB, Kim YS, Kim JA. Sonographically guided alcohol injection in painful stump neuroma[J]. *Ann Rehabil Med*, 2012, 36:404-408.
- [32] 胡永生, 李勇杰, 张晓华. 脊髓后根入髓区毁损术对幻肢痛的治疗作用初探 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2005, 11:201-202.
- [33] Ramachandran VS, Rogers-Ramachandran D, Cobb S. Touching the phantom limb[J]. *Nature*, 1995, 377:489-490.
- [34] 李宁宁, 勾丽洁, 王凯旋. 镜像神经元系统的基础研究与临床应用现状 [J]. 中国康复医学杂志, 2019, 34:243-247.
- [35] 张大富, 吴银义, 曲建蕊, 等. 针灸联合康复治疗截肢后幻肢痛疗效分析 [J]. 河南中医, 2014, 34:867-868.
- [36] Rasmussen KG, Rummans TA. Electroconvulsive therapy for phantom limb pain[J]. *Pain*, 2000, 85:297-299.
- [37] Snow PW, Sedki I, Sinisi M, et al. Robotic therapy for phantom limb pain in upper limb amputees[J]. *IEEE Int Conf Rehabil Robot*, 2017, 17:1019-1024.

(上接第 882 页)

的, 即它们选择性地对疼痛和/或瘙痒刺激作出不同程度的反应。有证据表明, 传递痛觉和痒觉信息的投射神经元在分布、投射靶标、形态学和电生理特性上呈现多样性。该研究表明, 投射神经元亚群存在分子和功能异质性, 可以通过其在脊髓背角和TNC中的基因表达、空间位置以及对疼痛或瘙痒刺激的反应性来进行区分。

综上所述, 该研究首次对投射神经元亚群的分子标签和功能特性进行了系统研究。首先对投射神经元进行RNA测序, 获得投射神经元候选标记基因的数据集, 接下来结合逆行追踪和多色原位杂交鉴定出一些新的标记基因。最后, 采用TRAP2小鼠进行了功能研究, 评估疼痛和瘙痒刺激下投射神

经元的反应程度, 并阐明了分子多样性的投射神经元类群亦具有功能异质性。该研究报道了疼痛和痒觉信息在表达NK1R和不表达NK1R的不同投射神经元亚群中的信息汇聚。这与痛觉和痒觉信息处理的群体编码模型相吻合, 然而在痛觉和痒觉的产生过程中, 如何整合专一线路(a labeled line)与使用群体编码的投射神经元的输出以及大脑如何解读这些信息, 仍有待进一步探究。

(Werberger R, et al. Pain and itch processing by subpopulations of molecularly diverse spinal and trigeminal projection neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(28):e2105732118. 南通大学特种医学研究院, 许文静 王若蒙 周国坤 译, 刘通校)