



• 学术动态 •

小胶质细胞介导的神经元周围网络降解促进疼痛

摘要 周围神经损伤后脊髓背角小胶质细胞激活促进疼痛敏化产生。活化的小胶质细胞如何选择性地增强脊髓伤害性感受通路的机制目前尚不清楚。该研究发现在周围神经损伤后,小胶质细胞降解脊髓背角I层细胞外基质结构以及神经元周围网络(PNNs)。位于脊髓背角I层的PNNs选择性地包裹脊髓-臂旁核投射神经元,整合脊髓伤害性感受信息,并向脊髓上脑区传递并诱发疼痛感觉。小胶质细胞对PNNs的降解增强了投射神经元的活动并诱导疼痛相关行为。因此,神经损伤诱导的PNNs降解是小胶质细胞选择性地增加脊髓伤害性感受通路信号输出并引起疼痛敏化的一种机制。

一、主要研究背景

周围神经损伤导致疼痛敏化现象。受损的初级传入神经释放趋化因子、信号分子和蛋白酶激活脊髓小胶质细胞,进而增强脊髓伤害性感受通路的兴奋性。小胶质细胞释放一系列与细胞表面受体结合的生物活性物质,通过调节胞内过程来增加神经元活动。这些物质如何在不影响其他感觉形式的情况下特异性地敏化疼痛信号通路目前尚不清楚。既往对小胶质细胞影响脊髓神经元功能的研究主要集中在细胞内作用机制。中枢神经系统(CNS)细胞外基质成分为神经元提供结构支持,调控神经元的兴奋性和突触可塑性,但其在调节脊髓伤害性感受通路中的作用尚不明确。神经元周围网络(PNNs)是CNS中最重要的细胞外结构,由硫酸软骨素糖链修饰的蛋白聚糖核心蛋白组成。在新皮质中,PNNs选择性地包裹快放电的小清蛋白阳性的抑制性中间神经元的胞体和近端树突,通过调节突触输入和内在兴奋性来调节它们的神经可塑性。该研究探讨了PNNs在脊髓的分布以及在调节伤害性信息的脊髓神经元活动中的作用。

二、主要研究结果

1. 脊髓I层中的PNNs围绕投射神经元

紫藤凝集素(WFA)可特异性结合PNN糖蛋白的糖胺聚糖(GAG)侧糖链,因此WFA染色可以识别PNNs。此外,PNNs也可以通过标记其核心蛋白成分聚集蛋白聚糖来显示。对脊髓切片的聚集蛋白聚糖进行免疫染色显示,PNNs围绕背角I层大直径神经元的胞体,呈现出内-外侧方向。高分辨率共聚焦Airyscan成像显示,抑制性突触前末端结构位于PNNs孔内。将荧光金(FG)注入臂旁外侧核(LPb)的逆行追踪显示,脊髓I层中的PNNs选择性地存

在于脊髓-臂旁核投射神经元附近,而在其他细胞类型周围未发现。脊髓I层中PNN阳性(PNN⁺)投射神经元的胞体明显大于PNN阴性(PNN⁻)投射神经元或其他神经元细胞类型。PNNs稀疏分布在脊髓III层,几乎不存在于脊髓II层中。在脊髓IV和V层中,在抑制性(Pax2⁺)和兴奋性(Pax2⁻, NeuN⁺)神经元周围都发现了PNNs。将小鼠后爪暴露于机械(25 g活页夹夹30秒)或热(55℃水浴30秒)伤害性刺激下,可诱导Fos在脊髓I层PNN⁺投射神经元中的表达,表明这类神经元参与编码疼痛相关的信息。

2. 周围神经损伤后PNNs的变化

为了研究脊髓中的PNNs是否在周围神经损伤后发生改变,研究团队利用小鼠构建坐骨神经损伤模型(SNI),该模型的特征是在神经损伤2~3天后,小鼠的疼痛行为最为明显。SNI造模后第3天,WFA标记PNNs上的GAGs在脊髓I层投射神经元周围的丰度显著降低(降低76.3%),在损伤后1周和2周仍维持低水平;而聚集蛋白聚糖的丰度未受影响。在脊髓深层的PNNs未显示出明显的WFA染色变化。

3. 小胶质细胞介导PNNs的降解

CD68的免疫荧光实验发现,SNI第3天,大多数小胶质细胞(有67.1%)的溶酶体中出现WFA标记的PNNs。在损伤后第1周和第2周,吞噬PNNs的小胶质细胞比例明显减少。为了研究小胶质细胞在神经损伤后PNNs降解中的作用,该研究团队使用在小胶质细胞中选择性表达白喉毒素受体(DTR)的Cre诱导型小鼠(iDTR; TMEM119^{CreERT2})耗竭小胶质细胞。在这些小鼠,周围神经损伤未引起机械痛敏,且在SNI造模后第3天,脊髓I层投



射神经元周围的 PNNs 没有出现明显减少, 说明未引起 PNNs 的降解。为了进一步证实小胶质细胞在 PNNs 降解中的作用, 使用缺乏 CX3CR1 的小鼠, 该受体介导小胶质细胞的激活和吞噬活性。免疫荧光实验结果表明, 周围神经损伤后, *Cx3crr'*~型小鼠的小胶质细胞的增生与对照小鼠相似, 但其小胶质细胞溶酶体数量显著减少, 提示小胶质细胞吞噬活性减弱。同时, 该基因型小鼠没有表现出疼痛过敏反应, 这与既往的实验报道一致。在神经损伤后, *Cx3crr'*~型小鼠未出现脊髓背角 I 层投射神经元周围的 PNNs 的大量降解, 并且在 SNI 造模后第 3 天检测到小胶质细胞中的 WFA 表达显著减少。这些结果表明小胶质细胞介导周围神经损伤后的 PNNs 降解。

4. 投射神经元周围 PNNs 的降解介导疼痛相关行为

为了研究去除投射神经元周围的 PNNs 是否会引起疼痛, 研究团队通过将 rAAV2-Cre 注射到 Acan 小鼠的 LPb 核中来敲除投射神经元中的聚集蛋白聚糖。rAAV2-Cre 逆向投射到 LPb 核的神经元并表达 Cre 重组酶, 这些神经元包括脊髓 I 层的投射神经元。验证发现, 注射 rAAV2-Cre 的 Acari 小鼠脊髓 I 层投射神经元周围的 PNNs 被破坏。正常小鼠在热板实验中会出现舔爪、跳跃等反应, 而注射 AAV2-Cre 的 Acan^{fl} 小鼠在热板实验中舔爪/跳跃的潜伏期显著缩短, 特异性敲除脊髓 I 层投射神经元周围 PNNs 后引起了热过敏反应。同时, 小鼠面部疼痛表情量表评估显示, 去除 PNNs 引起自发性疼痛。由于周围神经损伤减少 PNNs 上的 GAG 而不影响聚集蛋白聚糖, 并且既往方法靶向所有投射到 LPb 核的神经元, 研究团队利用表达硫酸软骨素酶 (chABC) 的 AAV 选择性去除腰脊髓投射神经元周围的 GAG。ChABC 特异性消化 PNNs 上的 GAG, 已广泛用于研究 PNNs 在神经系统中的作用。通过共同注射两种病毒载体: rAAV2-Cre 注射到 LPb 核, Cre 依赖性方式表达 chABC 的 AAV (AAV9-DIOchABC) 注射到腰脊髓, 以实现腰段脊髓投射神经元表达 chABC。这种方法导致脊髓 I 层上的 PNNs 中的 GAGs 被去除而不影响聚集蛋白聚糖的表达, 也不影响深层 PNNs 的结构亦或是小胶质细胞激活。行为结果显示, 腰脊髓投射神经元中去除 GAG 的小鼠在热板实验中产生热过敏反应, 并诱发自发性疼痛。

5. 去除 GAG 抑制脊髓 I 层投射神经元

既往对皮质和海马的研究表明, PNNs 调节突

触传递并影响神经元内在兴奋性。该研究团队发现 PNNs 降解促进疼痛行为, 促使他们研究去除 PNNs 的 GAG 是否会增加脊髓背角 I 层投射神经元的活动。

首先, 研究通过量化抑制性 (VGAT⁺) 和兴奋性 (VGLUT2⁺) 突触前的 puncta 来评估 PNN⁺ 投射神经元上的兴奋性和抑制性突触输入的数量。在 PNN⁺ 投射神经元的胞体上, VGAT⁺ 显著多于 VGLUT2⁺ (多 60%)。通过将 AAV-chABC 注射到腰椎脊髓来消除 PNNs 中的 GAG 并没有改变 PNN⁺ 投射神经元上兴奋性和抑制性突触前末端的数量。SNI 造模后第 3 天, 兴奋性和抑制性突触前末端的数量也保持不变。

为了研究 GAG 去除对脊髓 I 层投射神经元的活动的影响, 使用全细胞膜片钳记录测量了离体脊髓片上这类神经元的突触输入及其内在兴奋性。采用带有 LED 的倾斜红外照明设备可识别并用膜片钳记录完整脊髓中被 PNN 包围的大直径 (> 20 μm) 且呈内-外侧方向的脊髓 I 层神经元。为了确认这些神经元周围是否存在 PNNs, 将钳到的细胞中注入染料 Alexafluor488, 然后进行固定和蛋白聚糖免疫染色。用 chABC 降解 GAG 导致膜电位去极化 (4.8±1) mV 和动作电位放电频率增加, 而不会改变 PNN⁺ 神经元的膜电位和放电率, 并且这种效应是 PNN⁺ 神经元特有的。对自发微小突触活动的分析表明, chABC 降低了微小抑制性突触后电流的频率 (mIPSC, 减少 48%), 但不降低其幅度。此外, 在存在突触受体拮抗剂混合物 (AP-5、DNQX、荷包牡丹碱和土的宁) 以抑制兴奋性和抑制性突触活动的情况下, PNNs 的降解对投射神经元的被动膜特性和内在兴奋性没有影响。为了证实神经损伤后 PNNs 的破坏伴随着抑制性输入的减少, 在 SNI 造模后第 3 天记录了脊髓 I 层 PNN⁺ 投射神经元, 发现 mIPSC 的频率显著降低。这种减少在小胶质细胞耗竭的小鼠中得到抑制, 但可以通过用 chABC 去除 PNNs 来恢复。与这些结果一致的是, 神经损伤引起的自发性疼痛通过消除小胶质细胞得到缓解, 但能通过去除脊髓 I 层投射神经元周围的 PNNs 来恢复。

三、讨论

该研究表明在脊髓背角 I 层存在一类投射到外侧臂旁核的神经元, 可选择性被 PNNs 包裹。当周围神经损伤后, 以小胶质细胞依赖性方式降解。PNNs 的降解足以通过减少抑制性突触输入来增强投射神经元的活动, 并促进疼痛行为。

在皮质和海马中, PNNs 主要存在于小清蛋白



阳性的抑制性中间神经元周围，而在脊髓背角中，PNNs 仅存在于脊髓 I 层大直径投射神经元周围，并在深层中围绕各种神经元类型。PNNs 在投射神经元周围的选择性定位具有高度的特异性，使通过调节 PNNs 来调节投射神经元的活动具有可操作性。由于投射神经元是脊髓疼痛环路的主要输出，因此通过降解周围的 PNNs 来激活投射神经元是增加脊髓伤害感受环路输出的一种特定且有效的机制。

突触终末包埋于 PNNs 中，因此 PNNs 的组成和稳定性对突触活动有重要影响。去除 PNNs 中带负电的硫酸盐基团可能导致突触结构的不稳定并降低突触传递的有效性。小胶质细胞通过多种机制促进疼痛状态。例如，小胶质细胞介导的 KCC2 下调使胞内氯增加并减少抑制性传入，从而促进神经病理性疼痛。在神经损伤后 7 天，I 层和 II 层多种细胞类型出现 KCC2 的下调和氯的异常。在损伤后 3

天，小胶质细胞介导的 PNNs 降解选择性地增强了一部分脊髓 I 层投射神经元的活动。因此，小胶质细胞可能以不同的机制发挥作用，反映了神经病理性疼痛机制的复杂性和鲁棒性，表明有效的治疗应该针对几个过程来逆转过敏反应。此外，小胶质细胞参与介导慢性疼痛的性别差异已经得到证实，但该研究发现 PNNs 的小胶质细胞依赖性降解及其对突触活动和疼痛相关行为的影响在雌性和雄性中都存在。

综上所述，该研究团队的工作揭示了小胶质细胞在周围神经损伤后去抑制投射神经元。这些发现提示靶向这个新机制可能是开发神经病理性疼痛治疗的新策略。

(Tansley S, Gu N, Guzman AU, *et al.* Microglia-mediated degradation of perineuronal nets promotes pain. *Science*, 2022, 377(6601):80-86. 南通大学疼痛医学研究院, 袁宝童译, 高永静校)

• 国际译文 •

享受大自然：在大自然中行走减少杏仁核的活动

人脑具有很强的可塑性。随着城市化的发展，居民患焦虑症、抑郁症和精神分裂症等精神疾病的风险也逐步提高。另一方面，接触大自然可以帮助我们恢复注意力，缓解压力。该研究目的：探讨城市环境 (urban environment) 和自然环境 (natural environment) 如何影响压力相关脑区的活动。方法：共 69 名被试（女性 29 人，男性 40 人）。受试者首先填写情绪相关的问卷，并执行工作记忆任务。接着，受试者在进行 fMRI 扫描的同时，完成以下问卷调查：沉浸-反思问卷 (RRQ)、恐惧面孔测试 (FFT)、蒙特利尔脑成像应激任务 (MIST) 等。首轮 fMRI 扫描结束后，受试者分为两组：在城市环境行走 1 小时（即城市中的繁华街道）、在大自然中行走 1 小时（即城市中绿色森林的步道）。行走 1 小时后，受试者再次进行 fMRI 扫描及相关问卷调查。结果：（1）在恐惧条件下（观看恐惧面孔），双侧杏仁核存在显著的环境-时间相互作用 (environment-by-time interaction)。类似的结果也出现在中性条件下（观看中性面孔），以及合并恐惧和中性条件下。在恐惧条件、中性条件以及合并恐惧和中性条件下，前扣带回 (ACC) 或背外侧前额叶皮质 (dlPFC) 无显著的时间与环境相互作用。（2）在城市环境行走 1 小时候后，杏仁核活动保持稳定，无明显变化。在大自然行走 1 小时候后，杏仁核活动显著降低。进一步分析发现，杏仁核的活动具有偏侧性，主要由右侧杏仁核的活动驱动。（3）进一步分析杏仁核的不同亚区，发现基底外侧杏仁核 (BLA) 存在显著的环境-时间相互作用。在大自然中行走后，BLA 活动减少。（4）与城市环境中行走相比，大自然中行走的被试者，其知觉恢复 (perceived restorativeness) 明显增加，并且更喜欢这种行走方式。结论：在大自然中行走，降低杏仁核的活动，可能成为预防精神疾病的一种措施。

(Sudimac S, Sale V, Kühn S. How nature nurtures: amygdala activity decreases as the result of a one-hour walk in nature. *Mol Psychiatry*, 2022. doi: 10.1038/s41380-022-01720-6. 北京大学神经科学研究所, 刘风雨 译)