



• 学术动态 •

长期神经病理性疼痛行为学改变与突触可塑性和边缘回路改变的相关性研究：一项小鼠的对照观察研究

摘要 长期神经病理性疼痛会导致情感紊乱和认知障碍，提示可能有脊髓上高级中枢的参与。该研究采用选择性神经根损伤模型 (spared nerve injury, SNI) 研究神经病理性疼痛的感觉和情绪成分，探讨对前额叶皮质和边缘回路的电生理影响，以及 SNI 诱发的参与免疫反应和炎症反应的基因表达变化。结果显示 SNI 会诱发感觉超敏反应（寒冷和机械刺激）、抑郁样行为、认知能力下降以及长时程增强受损和参与免疫应答的特异性基因表达的变化。这些数据表明，神经病理性疼痛的疼痛和情绪成分可能由不同的大脑区域负责，为后续相关研究提供了方向。

长期的慢性疼痛会导致负责情绪和认知的大脑区域发生细胞重组和功能改变。除了感觉功能障碍外，慢性疼痛或神经病理性疼痛病人还可能出现情绪问题，包括抑郁、学习和记忆能力的下降等，其机制目前仍不清楚。有观点认为皮质和边缘系统结构（如前额叶皮质、杏仁核、海马体和伏隔核）的可塑性改变与疼痛诱发的情绪行为有关。神经炎症和免疫机制等因素，被认为也参与神经病理性疼痛的病理生理学。在大脑中，固有免疫细胞释放的促炎因子水平的增加可能参与神经重组，并参与神经病理性疼痛的感觉和情绪成分。

该研究采用多学科方法研究长期神经病理性疼痛的情感和认知变化。选用小鼠 SNI 模型，该模型可以复制人类的神经病理性疼痛和相关合并症。SNI 后 1 个月和 12 个月对疼痛、抑郁样行为和认知能力进行评估。

为了评估长期神经病理性疼痛可能出现的大脑功能和结构改变，该研究检测了前额叶皮质 (prefrontal cortex, PFC)-伏隔核核心通路 (nucleus accumbens core, NAcore) 和内嗅皮质 (lateral entorhinal cortex, LEC)-齿状回 (dentate gyrus, DG) 通路的突触可塑性（长时程增强 long-term potentiation, LTP）水平。这些通路是控制情感行为和奖赏机制的关键回路，最近被证实有可能参与慢性疼痛的发展。除此之外还研究了免疫系统在慢性疼痛中的作用：①分析在神经炎症反应中 PFC 和海马组织免疫因子相关基因的表达；②分析在神经病理性疼痛的小鼠中，

具有免疫抑制作用的调节性 T 细胞亚群百分比。

该研究是第一篇研究神经病理性疼痛行为学和电生理改变相关性的文章。结果显示 SNI 模型的特定行为缺陷与 PFC 和边缘回路功能障碍之间可能存在相关性。此外，研究证实了长期神经病理性疼痛会引起大脑不同区域免疫相关基因表达的变化，这可能是神经病理性疼痛新的分子机制通路。

1. 方法

(1) 构建 SNI 模型：选用 8 周龄雄性小鼠，适应环境 1 周后，开始构建 SNI 模型。方法参考 Decosterd 和 Woolf 的文献，SNI 组小鼠结扎胫神经和腓总神经，对照组仅暴露不离断。

(2) 神经病理性疼痛行为学检测：触诱发痛：采用一系列校准 von Frey 纤维丝法 (Ugo Basile, Varese, Italy)，缩足阈值显著降低即定义为触诱发痛阳性；低温诱发疼痛：使用丙酮实验检测低温诱发疼痛阈值，并按照小鼠对丙酮反应的严重程度得分进行分级；悬尾试验：小鼠没有表现出任何身体运动，被动悬挂、完全静止，被定义阳性反应的时间；溅水试验：超过 5 分钟的梳洗时间即被记录下来。

(3) 认知能力的检测：新物体识别实验 (novel object recognition, NOR)，采用大小和形状不同、颜色相同（黑色）或颜色不同的塑料制品替换的方法，记录 NOR 判别指数。

Y 迷宫试验，记录小鼠自发交替的次数和交替的百分比。

(4) 电生理学检测：对于 LEC-DG 和 PFC-NAcore



信号通路电生理学检测, 分别放置刺激电极和记录电极, 然后进行高频刺激 (high-frequency stimulation, TBS) 记录 LTP 的变化, 并采用重复测量的 2-way 方差分析 (ANOVA) 进行分析。

(5) 微透析实验: 微透析探针立体定向植入齿状回, 采用 ACSF 透析液进行透析, 透析液通过高效液相色谱法分析氨基酸释放量。

(6) 基因表达分析: 提取 RNA 并合成 cDNA 后, 使用 TaqMan 阵列小鼠免疫面板进行基因表达定量分析, 采用 PANTHER 在线工具, 对未知蛋白及其基因进行分类, 并对差异表达基因进行分析。

(7) 调节性 T 淋巴细胞检测: 采集外周血样本, 并用调节性 T 细胞单克隆抗体混合物孵育, 之后在 FACS Canto 流式细胞仪上检测, 并使用 Diva 软件 (BD Biosciences) 进行分析。

2. 结果

(1) SNI 模型诱发行为学改变

触诱发痛: 与对照组相比, SNI 组小鼠在术后 1 个月和 12 个月对机械和温度刺激的伤害感受阈值降低 (SNI 组 1 个月: 0.04188 ± 0.0092 g, 对照组 1 个月: 0.7275 ± 0.134 g, $P < 0.0001$; SNI 组 12 个月: 0.0735 ± 0.01374 g, 对照组 12 个月: 0.8475 ± 0.1428 g; $P < 0.001$)。

低温诱发痛: 丙酮实验显示与对照组相比, SNI 组小鼠挥足和舔足次数显著增加 (SNI 组 1 个月: 1.333 ± 0.2 , SNI 组 12 个月 2.039 ± 0.348 ; 对照组 1 个月: 0.1667 ± 0.10 , 对照组 12 个月: 0.5171 ± 0.1 ; $P = 0.0124$, $P = 0.0005$), 1 个月和 12 个月 SNI 组小鼠的缩足反射潜伏期明显缩短。

抑郁样行为改变: 悬尾实验中 SNI 组小鼠 1 个月和 12 个月静止时间明显长于对照组 (SNI 组 1 个月: 88.21 ± 6.3 s, SNI 组 12 个月 96.4 ± 6.75 s; 对照组 1 个月: 57.88 ± 4.8 s, 对照组 12 个月: 67.50 ± 6.591 s; $P = 0.0061$, $P = 0.0085$), 表明在长期的神经病理性疼痛导致小鼠出现主动逃避行为的缺失。溅水实验中, SNI 组小鼠修饰活动持续时间明显减少 (SNI 组 1 个月: 86.38 ± 5.539 s, SNI 组 12 个月 53.00 ± 5.9 s; 对照组 1 个月: 123 ± 9.2 s, 对照组 12 个月: 89.30 ± 7.1 s; $P = 0.0019$, $P = 0.0125$)。与 1 个月对照组小鼠相比, 12 个月对照组小鼠的修饰活动减少, 差异有统计学意义 ($P = 0.0149$)。

(2) SNI 影响小鼠的记忆能力

物体识别记忆能力: SNI 术后 1 个月, SNI 组小鼠在短期和长期探索实验中都不能完全区分不同或相似的物体 (1.5 小时 SNI 组: 0.1163 ± 0.02 , 24 小

时 SNI 组: 0.1213 ± 0.02 ; 1.5 小时对照组: 0.3588 ± 0.06 , 24 小时对照组 0.3188 ± 0.05 ; $P = 0.0173$, $P = 0.0379$)。SNI 术后 12 个月, 小鼠能够区分完全不同的物体 (1.5 小时 SNI 组: 0.348 ± 0.06 , 24 小时 SNI 组: 0.310 ± 0.06 ; 1.5 小时对照组: 0.455 ± 0.05 , 24 小时对照组 0.348 ± 0.06), 但不能识别相似的物体 (1.5 小时 SNI 组: 0.3238 ± 0.02 , 24 小时 SNI 组: 0.1643 ± 0.05 ; 1.5 小时对照组: 0.436 ± 0.03 , 24 小时对照组 0.3488 ± 0.07 ; $P = 0.06$ 和 $P = 0.03$)。

空间记忆能力: 1 个月后, SNI 组小鼠 Y 迷宫交替百分率显著下降 (对照组 $69.19 \pm 3.5\%$, SNI 组 $49.05 \pm 3.293\%$, $P = 0.0002$), 但是 12 个月后, 与对照组相比 ($63.00 \pm 2.079\%$), 两组 Y 迷宫交替百分率 ($59.88 \pm 2.41\%$) 无显著变化 ($P = 0.8710$), 表明 SNI 后 12 个月小鼠空间记忆能力基本恢复。

(3) SNI 影响 PFC-NAcore 和 LEC-DG 信号通路的突触可塑性

PFC-NAcore 信号通路, 在 SNI 组 1 个月和 12 个月的小鼠中, PFC 应用 TBS 未能诱导 NAcore 的 LTP ($96.82 \pm 3.21\%$ 和 $94.39 \pm 4.95\%$)。

LEC-DG 信号通路, SNI 小鼠 1 个月后应用 TBS 后, 振幅 (30~60 分钟: $103.06 \pm 4.40\%$; $P = 0.40$, $t_{21} = 0.84$) 和斜率 (30~60 分钟: $103.7 \pm 6.2\%$, $P = 0.19$, $t_{21} = 1.33$) 没有任何变化; 而 SNI 术后 12 个月, 应用 TBS, 小鼠 DG 场兴奋性突触后电位 (field excitatory postsynaptic potential, fEPSPs) 振幅 ($151.26\% \pm 20.39\%$, $P < 0.001$, $t_{21} = 36.63$) 和斜率 ($189.40\% \pm 15.09\%$, $P < 0.0001$, $t_{21} = 28$) 部分重建。

(4) SNI 对齿状回细胞外氨基酸水平的影响

12 个月后, SNI 组小鼠 γ -氨基丁酸 (GABA) 水平 (14.53 ± 2.1 pmol/ μ l) 显著高于对照组小鼠 (5.669 ± 0.71 pmol/ μ l) ($P < 0.001$)。而 SNI 组小鼠的细胞外 L-谷氨酸 (Glu) 水平、D-天冬氨酸 (Asp)、甘氨酸 (Gly) 水平与对照组相比无显著变化 (L-Glu, SNI 组小鼠: 8.029 ± 1.0 pmol/ μ l, 对照组小鼠: 9.625 ± 0.3 pmol/ μ l; D-Asp, SNI 组小鼠: 0.2073 ± 0.04 pmol/ μ l, 对照组小鼠: 0.3127 ± 0.04 pmol/ μ l; Gly, SNI 组小鼠: 33.02 ± 1.16 pmol/ μ l, 对照组小鼠: 28.58 ± 2.039 pmol/ μ l)。

(5) SNI 影响海马和 PFC 促炎因子相关基因的表达

与 1 个月对照组小鼠相比, 12 个月对照组小鼠海马和 PFC 中有 11 个基因显著上调, 这些基因主要涉及促炎和应激相关的介质, 且以海马组织为主。与 1 个月对照组小鼠相比, 1 个月 SNI 组小鼠海马有 26 个基因显著上调, 主要是凋亡相关因子 Bax



和 Bcl-2、内皮标志物 CD34、巨噬细胞集落刺激因子-1 等。与 1 个月对照组小鼠相比, 1 个月 SNI 组小鼠 PFC, 只有一个基因显著下调, 即转录因子 TBX21。12 个月 SNI 组小鼠中, 只有少数同时在海马和 PFC 出现基因表达变化。

总之, 在 1 个月 SNI 组小鼠的海马中观察到炎症和免疫介质的激活, 从而恢复了对照组小鼠的基础免疫结构。此外, 在 1 个月和 12 个月的 SNI 小鼠的 PFC 中, 只观察到指向正向调节免疫反应的少数介质表达有变化。

(6) SNI 不影响外周血调节性 T 细胞的比例

SNI 组与对照组的相比, 调节性 $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$ T 淋巴细胞的百分比, 以及 $CD4^+CD251^+T$ 淋巴细胞总数的百分比差异无统计学意义。

3. 讨论

该研究利用 SNI 模型, 将行为学检测和体内电生理学检测、PFC 和边缘区域的特定回路功能障碍联系起来, 结合 SNI 相关的参与免疫反应和炎症反应的基因的调控, 探讨小鼠长期神经病理性疼痛行为改变的机制。

前期研究证实, 时间是影响慢性疼痛相关的情感/认知障碍发展的关键因素。疼痛症状会在损伤后立即出现, 而情感/认知障碍会在受伤后几周或几个月才出现, 有时甚至在疼痛超敏反应消失后仍会持续。该研究的数据证实 SNI 模型可诱发至少持续 12 个月的机械刺激过敏, 且都表现出类似于慢性疼痛病人经常出现的缺乏动机或抑郁行为, 如保持不动时间延长、梳理活动减少、行为绝望的迹象等。在 12 个月的 SNI 小鼠中, 有抑郁样行为但不伴随认知障碍。在 SNI 组小鼠中, 认知功能减退和记忆缺陷是疼痛病人的主要并发症。周围神经损伤可能会导致负责学习和空间记忆任务的特定脑回路的海马突触可塑性降低。既往的研究表明, SNI 持续 30 天会导致 LEC-DG 通路中 LTP 的消失。LTP 的缺失, 响应单脉冲的更高的基底振幅和斜率, 可能是由于齿状回中谷氨酸水平的增加有关。这种功能和结构的改变可能归因于, 至少部分归因于神经元的重组, 类似于外周神经病理性疼痛模型中前额叶皮质锥体神经元重组。SNI 皮质和海马的基部和顶端树突的形态变化, 可能反过来驱动 LTP 的变化。

研究发现, 12 个月 SNI 组小鼠的空间记忆和辨别记忆基本恢复正常, 海马 LTP 也基本恢复。细胞外谷氨酸水平没有变化, 而 GABA 水平升高。神经生化数据表明, 在 12 个月 SNI 小鼠中, 由于谷

氨酸溢出导致的高敏状态可能被 GABA 活性的增加所抵消。

NOR 测试中采用完全不同或相似的物体检测 SNI 对小鼠识别能力的影响。神经损伤后 1 个月小鼠出现识别障碍, 表现为 NOR 记忆的紊乱。但 SNI 后 12 个月小鼠表现出正常的 NOR 和空间记忆能力。这些发现说明, LEC-DG 的破坏可能至少部分地影响了神经病理性疼痛的认知能力。同时还应考虑辨别能力的下降有一部分原因是衰老。区分性能与成人 DG 神经功能相关, 而新生 DG 神经元的产生随着年龄的增长而显著减少。因此, 不能排除 SNI 后 12 个月可能是衰老加重了相关的缺陷, 或者可能是衰老影响到了负责辨别能力的其他结构(如皮质)。

众所周知, 奖赏机制可能参与抑郁和慢性疼痛的发生。刺激 NAc 可以缓解慢性疼痛相关的抑郁症状。该研究发现 SNI 后 1 个月和 12 个月小鼠在 PFC-Nacore 信号通路中均出现 LTP 受损。这些数据与最近的研究结果一致, 即小鼠 PFC-Nacore 信号通路失活可导致 SNI 感觉和厌恶表型的加重。因此, 我们推测, PFC 投射到 Nacore 信号通路的突触可塑性降低可能在 SNI 的负面情绪中发挥作用。

免疫系统与神经病理性疼痛的病理生理学密切相关。既往的研究证实, 促炎介质启动的免疫-神经元沟通可能参与神经病理性疼痛的感觉成分和情绪成分。由固有胶质细胞和星形胶质细胞的变化驱动神经炎症, 触发神经元重组, 该过程被认为诱发周围神经损伤后认知缺陷和抑郁的发生。此外, 根据损伤的性质, T 细胞可能有助于疼痛的发生或缓解。该研究的数据显示, SNI 后 1 个月或 12 个月不会影响调节性 T 细胞的百分比, 但是海马中免疫相关基因表达发生变化, 即在 SNI 后 1 个月的小鼠中, 检测到参与炎症和凋亡信号通路基因的表达增强, 而 SNI 后 12 个月没有该变化。此外 IL-1 β 表达增加, 同时伴有与神经炎症、脑损伤和衰老高度相关的其他底物(如 NF- κ B、C3、CD38、CD68 和 Socs2)的表达上调。因此, 不能排除 IL-1 β 的增加, 可能至少部分地, 通过损害记忆和学习过程, 影响了 SNI 后 1 个月小鼠 LTP。

12 个月对照组小鼠, 与 1 个月的对照组小鼠相比, CD38 的表达明显上调, 表明 M1 型极化巨噬细胞(促炎作用)和辅酶 NAD 的减少可能与衰老有关。该研究发现 CCR2(特异性 CCL2(MCP-1)趋化因子受体)的表达增加, 既往的研究表明 CCR2 在慢性疼痛的发展中至关重要, 并与不同大脑区域的多



巴胺能或胆碱能神经元共定位, 它调节单核细胞向炎症部位的迁移。巨噬细胞集落刺激因子-1 的大量上调表明单核吞噬细胞对 ECM 蛋白的刺激和随后的激活的敏感性增加, 这不仅是简单的促炎功能, 可能与神经损伤后再生有关。值得注意的是, 转铁蛋白受体 TFRC 诱导的转铁蛋白结合铁摄入量的相关增加, 是一种损伤后的代谢重组。但在 SNI 后 12 个月小鼠中没有检测到这种改变。这些结果可能与行为学(和电生理学)表型的部分恢复相一致。然而, 相应年龄的对照组小鼠神经炎症介质基础水平的增加可能会掩盖 SNI 后 12 个月小鼠这些因子的变化。关于 PFC, 研究发现在近 50 个失调基因中, SNI 后 1 个月小鼠中只有 Tbx21 表达有显著性差异, 在 SNI 后 12 个月小鼠 Ctl4 和 Vcam 表达有显著性差异。值得一提的是, 对 SNI 小鼠 PFC 中差异 DNA 甲基化进行详细分析, 发现时间特异性 CpG 甲基化动力学。尽管甲基化的基因不包括该研究中发现的 3 个失调 PFC 基因中的任何一个, 但观察到的甲基化提示可能是基于该研究发现的功能改变。在整个研究过程中, 证实了神经病理性疼痛过程有与炎症和 T 细胞适应性免疫反应有关的基因的特定富集, 包括 Toll 受体信号通路, 以及一系列黏附分子的参与。综上所述, 这些发现表明了与该研究中讨论的

基因的功能联系。

4. 局限性

首先, 该研究的分析不包括性别对 SNI 后 12 个月小鼠的影响。考虑到免疫细胞在疼痛处理过程中有性别差异, 这可能是一个比较重要的问题。第二, 基因表达分析组织来源是整个 PFC 和海马, 而不是特定的亚区。因此, 不能排除一些有意义的基因表达差异可能被稀释。第三, SNI 表型涉及分子途径, 但尚未对分子机制进行研究。在后续关于长期神经性疼痛相关的功能改变的研究中, 要解决这些问题。

5. 结论

该研究的数据表明, SNI 后 12 个月小鼠存在疼痛和抑郁样行为, 而认知障碍基本恢复, 这表明负责神经病理性疼痛的疼痛成分和情绪成分可能是不同的脑区。此外, 该研究提示海马神经炎症可能影响神经病理性疼痛情绪成分的发展。这项发现为以后研究周围神经损伤的远期损害奠定了基础。

(Guidaa F, Iannotta M, Misso G, *et al.* Long-term neuropathic pain behaviors correlate with synaptic plasticity and limbic circuit alteration: a comparative observational study in mice. *Pain*, 2022, 163(8):1590-1602. 山东第一医科大学附属省立医院疼痛科, 李芸 译, 孙涛 校)

· 消 息 ·

中国医师协会 2022 年疼痛科医师年会通知

为进一步开展学术交流与合作, 促进我国疼痛科专业医护人员临床技术水平的提高。由中国医师协会、中国医师协会疼痛科医师分会、《中国疼痛医学杂志》编辑部主办, 山西省医师协会疼痛科医师分会承办, 山西医科大学第一医院、中日友好医院协办的“中国医师协会 2022 年疼痛科医师年会”将于 2022 年 12 月 16~18 日在北京召开。

本次会议将为您提供展示最新研究成果或进展的平台, 同时给您提供与疼痛相关研究领域的专家、学者面对面交流的机会, 深入探讨疼痛学前沿理论和诊疗进展, 共同推动疼痛医学的发展与进步。会议将设置学科建设与管理、临床技术应用与发展、癌痛、神经病理性疼痛、骨与关节疾病、脊柱内镜技术、青年医师论坛、疑难病例讨论等专题。大会组委会诚挚地邀请全国各地的疼痛科同道踊跃参加此次盛会! 全程参会并通过考核者将授予国家级 I 类继续医学教育学分。

联系人: 李水清 13521191662

孙永海 010-66938017 13552265533

任莉梅 010-82801705 13910566182

中国医师协会: 李磊 010-63313681