



doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2023.01.002

• 学术动态 •

错误连接和终末器官靶向异常导致的 神经病理性疼痛

摘 要 神经损伤会导致慢性疼痛和痛觉超敏 (allodynia), 同时也会引起损伤和未损伤神经支配区域的感觉丧失, 这种混合性损伤引起矛盾感觉症状的机制尚不清楚。此研究在神经损伤超过 10 个月的小鼠中, 通过对基因标记的、分布在皮肤周围感知有害刺激 (伤害性感受器) 和轻柔触摸感觉 (低阈值传入神经) 的纤维群进行纵向和非侵入性方式成像, 同时对小鼠与疼痛相关的行为进行分析。结果表明: 去神经支配的皮肤区域最初失去感觉, 随后逐渐恢复正常敏感性, 在受伤几个月后出现痛觉超敏并厌恶轻触。这种神经再支配导致的神经病理性疼痛与伤害性感受器有关, 这些伤害性感受器在去神经支配的区域由血管引导生长, 精确地再现原始的支配模式, 在皮肤中显示出不规则的终端连接, 并模拟低阈值传入神经降低了激活阈值。相比之下, 损伤后通常在神经完整的区域内介导触觉和痛觉超敏的低阈值传入纤维没有重新建立神经支配, 而导致触觉末端器官 (如仅具有伤害感受器的 Meissner 小体) 出现了异常神经支配。伤害性感受器的基因消融可完全消除神经再支配引起的痛觉超敏。因此, 该研究揭示了一种慢性神经病理性疼痛出现的新机制, 即这种痛觉是由结构可塑性、异常末端连接和神经再支配过程中伤害性感受器功能障碍造成的。该发现为临床观察到的可能给病人带来沉重负担而又似自相矛盾的感觉表现提供了新的治疗思路。

近年来, 该文作者对基于中枢神经系统神经病理性疼痛机制的理解取得了重大突破, 主要得益于两项重大发现: 脊髓神经胶质细胞的激活及介导轻触解除疼痛抑制的细胞信号通路。目前尚不清楚周围神经改变是慢性神经病理性疼痛维持的原因, 还是仅作为中枢可塑性过程的初始诱因。

慢性疼痛与损伤后神经再生的关系研究甚少。物理创伤后, 受损的周围神经纤维在容许的环境中逐渐再生的能力有限。如果其再生受到躯体障碍或不利的局部环境阻碍, 邻近未受损的神经纤维可以通过“侧枝生芽”侵入去神经区域。然而, 这会导致正常感觉恢复和疼痛消失, 还是会因神经过度支配或侧枝错误连接而加剧神经病理性疼痛, 仍存在争议。

迄今为止, 由于在临床前研究中的尸检组织与神经病理性疼痛相关性的限制以及临床研究中人体实验的特殊性, 没有考虑到神经再生的动态性、神经支配模式个体间的差异性以及与末端器官的连通性, 要阐明周围神经再生在神经病理性疼痛中的作用一直存在困难, 加之这些研究缺乏因果分析。因此, 无法确定外周神经重构是神经病理性疼痛的原因还是结果。

1. 感觉神经支配的在体成像

该研究对特定的感觉传入神经亚群进行纵向成像, 明确了外周神经再生在慢性疼痛中的作用。本文作者在活体小鼠中观察了神经损伤前和神经损伤后 10 个月至 1 年内皮肤外周触觉纤维和伤害性感受器的衰退、再生、侧枝生芽和末端器官连接, 并对其感觉功能的协调行为进行了评估。

利用分子遗传技术获得了特异标记无髓鞘 C-纤维和薄髓鞘 A δ 伤害性纤维的 SNS-mGFP 小鼠, 以及标记触觉敏感低阈值机械感觉 A β 传入纤维 (A β -LTMRs) 的 Thy1-YFP 小鼠。并借助多光子激发荧光成像, 对小鼠活体结构进行了持续数月的稳定可视化检测。使用坐骨神经分支选择性损伤模型 (SNI), 选择小鼠后爪无毛表面的两个区域: ①损伤或去神经区域, 通常由在 SNI 中受损和结扎的胫神经和腓总神经支配, 模拟正常再生的障碍; ②主要由腓肠神经支配的非损伤区域, 在 SNI 后结构完好无损, 但会产生强烈的机械过敏反应。研究受损和未受损神经的混合型损伤导致的神经病理性疼痛。

2. 神经再支配与疼痛产生

使用 von Frey 测试小鼠后爪对机械刺激的敏感性。在 SNI 后的 3 天至 1 周内, Thy1-YFP 和 SNS-



mGFP 小鼠的 $A\beta$ -LTMRs 和伤害性传入神经纤维都丢失后, 去神经的胫骨区域对非伤害性和伤害性机械刺激完全不敏感, 但随着时间的推移, 不敏感的胫骨区域逐渐重新获得反应。在第 8 周左右对伤害性机械刺激出现了反应, 在第 16 周时对非伤害性机械刺激也出现了反应; 同时, 小鼠胫骨区域出现了伤害性纤维的渐进性再支配, 而 $A\beta$ 纤维在这里仍然明显缺失。从 SNI 后第 20 周开始, SNS-mGFP 和 Thy1-YFP 小鼠在先前对机械刺激不敏感的胫骨区域都显示出明显的痛觉过敏 (hyperalgesia) 和痛觉超敏, 并持续到第 42 周。故推测小鼠在 SNI 后第 20 周, 伤害性感受器与触觉传入神经可能重新建立了一个广泛的网络联系。

结合对 SNS-mGFP 和 Thy1-YFP 小鼠的行为和纤维总长度的定量分析, 发现伤害性感受器密度恢复的最大值恰好在机械性痛觉超敏功能表现的时间点之前, 在 SNI 后 42 周实验结束时, 所有小鼠中均没有出现 $A\beta$ -LTMRs; 此外, 还发现这种机械性痛觉过敏并非反射亢进, 而是一种厌恶行为。因为在 SNI 后 24 周发现即使小鼠的胫骨区域接受的是非伤害性刺激, 也会回避黑暗小室 (通常小鼠喜好黑暗处); 而假手术组小鼠没有出现这种回避现象。表明只有 SNI 小鼠厌恶这种对胫骨区域的非伤害刺激。

总之, 这种从感觉缺失到痛觉过敏、痛觉超敏和厌恶的渐进转变揭示了迟发性慢性神经病理性疼痛的出现过程, 并表明这与伤害性感受器的重新支配有关, 而与 $A\beta$ -LTMRs 无关。

3. 神经纤维轨迹的差异

接下来, 该研究试图解释腓肠神经伤害性感受器能进入去神经的胫骨区域, 而 $A\beta$ -LTMRs 不能进入的原因。由于无髓鞘神经纤维总体上比有髓鞘神经纤维具有更强的再生能力, 且侧枝生芽的生长轨迹和远端连接对于实现功能恢复至关重要。基于这些特点, 提出了两个观点: ①发现基线条件下胫骨神经支配的伤害性感受器的三维结构与 SNI 后 42 周侵入胫骨区的腓肠神经伤害性感受器的三维结构几乎完全一致, 表明来自不同神经元的无关伤害性感受器能在侧枝生芽的时候准确回溯原始伤害性感受器的痕迹; ②通过静脉注射德克萨斯红标记的高分子葡聚糖标记 SNI 42 周后的小鼠血管, 观察到侧枝生芽中 mGFP 标记的伤害性感受器的小远端分支与小血管交织在一起; 而在对照组小鼠中, 虽然检测到了完整的血管, 却没有 Thy1-YFP 标记的 $A\beta$ 纤维。这表明伤害性感受器能够将小血管作为生长支架, 侧枝侵入去神经区域再现原始的轨迹模式。

4. 伤害性感受器末端连接异常

此外, 该研究解释了为什么伤害性感受器侧枝生芽进入去神经区域会导致痛觉超敏, 而不是简单地恢复正常伤害性感觉。不同类型的外部感觉刺激通过终末器官传递到皮肤中不同类型的神经纤维上, 不同类型的终末器官-神经末梢连接是分辨疼痛和触摸的关键。的确, 该研究发现了终末器官连接和侧枝生芽的伤害性感受器的功能缺陷, 合理解释了小鼠在 SNI 后出现正常痛觉向痛觉超敏的转换现象。

在 SNS-mGFP 小鼠中, mGFP 标记的大多是细纤维, 终止于表皮中微小的游离神经末梢, 这是伤害性感受器的特征。正常情况下, 表皮内有丰富的游离神经末梢支配, 而胫骨区域侧枝生芽的伤害性感受器被限制在表皮和真皮之间的基底膜中, 直到 SNI 后 42 周实验终止也没有进入表皮。这说明神经再支配引起的神经病理性痛觉超敏与伤害性感受器侵入的去神经区域缺乏表皮内游离神经末梢有关。这种缺失再现了人类几种疼痛超敏的 C-纤维病的一个显著特征。

另外, 还观察到传入神经终止于传递触觉的 Meissner 小体上, 并发现 YFP 标记的大直径 $A\beta$ 传入神经在无毛皮肤中以椭圆形终端呈现出来, 这是 Meissner 小体的特征 (通过标记迈斯纳神经胶质鞘的蛋白质 S100 证实); 同时, 也发现一些 mGFP 标记的伤害感受纤维终止于表皮和真皮之间的交界处, 并直接与表达 S100 的 Meissner 小体相对; $A\beta$ 纤维支配 Meissner 小体是通过盘绕在其神经胶质鞘上, 而伤害性感受器则形成了一个稀疏的横向终末网络并与 Meissner 小体胶质细胞共存。几十年来, 大多认为 Meissner 小体是由有髓鞘的低阈值传入神经专一支配, 但这种传入神经最近被报道分成两个在系统发育上截然不同的 $A\beta$ 神经元种群; 虽然, 也有少部分报道人类皮肤中小直径无髓鞘纤维定位在 Meissner 小体内, 但这些纤维还没有受到关注, 其功能重要性也完全不知。

为了证实终末器官的异常连接的问题, 在 SNI 后 24 周使用序列块面扫描电镜成像技术生成胫骨区域内终末连接的高分辨率图像。与对照组小鼠相比, SNI 小鼠的真皮中明显缺乏有髓鞘纤维, 无髓鞘轴突构成了神经支配后唯一存在的神经, 这进一步验证了前面的光学显微镜结果。在对照组小鼠的 Meissner 小体中, 有髓鞘传入神经的末端被胶质细胞板层的同心图案所包围, 这个部位对机械压力的感知至关重要; 无髓鞘 C 纤维的末端则位于这些板



层垫的外缘。相比之下,在 SNI 后的胫骨区域,显示侧枝生芽的无髓鞘传入神经纤维的多个末端散布在松散图案的板层之间,并与板层紧密接触;其中有一些占据板层垫的中心,这一位置在对照组小鼠中只被 A β 纤维末端占据。

对照组和 SNI 小鼠 Meissner 小体的 3D 高分辨率重建进一步证实了这个发现:在对照组小鼠中,有髓鞘传入神经显示出经典的缠绕在整个 Meissner 小体上的模式,并被胶质细胞片层完全覆盖;而无髓鞘传入神经在 Meissner 小体内没有广泛分支,也没有被同心圆板包围。而在 SNI 小鼠的胫骨区,在没有 A β 纤维末端的情况下,观察到侧枝发芽的无髓鞘传入纤维侵入整个触觉小体,蜿蜒到中间部位,并被神经胶质细胞板层包围。这种形态模式显示了终末器官连接的异常,即无髓鞘传入神经作为 Meissner 小体内唯一传入神经成分,其功能可能是用于感受机械刺激后板层的物理凹陷引起的变化。

5. C-纤维触觉响应性发生改变

紧接着,研究了周围神经连接的重塑是否会使侵入去神经组织的伤害性感受器功能发生异常。在 SNI 后 24 周,使用皮肤神经标本(包含无毛腓肠和胫骨区域)对 A β -LTMRs 和 C-纤维伤害性感受器进行电生理记录。在假手术组小鼠中,只有刺激腓肠区域才能引起腓肠神经纤维的反应;而在 SNI 后 24 周的小鼠中,当机械刺激胫骨区域时,腓肠神经纤维产生了显著的反应。同时,在 SNI 小鼠中,发现这些新获得腓肠传入神经的胫骨区域内只有伤害性感受器,而没有 A β -LTMRs。因此,这些数据证实了来自腓肠神经的是伤害性感受器,而非 A β -LTMRs。此外,通过测量 C-纤维的传导速度来确定其激活阈值。观察到从 SNI 小鼠的胫骨区域由机械刺激诱发的腓肠神经 C-纤维反应与生理神经支配的(即来自无神经损伤小鼠的胫骨神经 C-纤维反应)相比,其激活阈值显著降低。这表明,侧枝生芽的伤害性感受器已经改变了其激活特性,使它们像低阈值传入神经一样,对无害的机械刺激做出反应,也表明它们在胫骨区域的神经再支配期间获得了这种特性。

去神经支配的胫骨区域的炎性环境和持续的外周敏感化可能是神经再支配期间伤害性感受器敏感性改变的原因,但下面的观察结果否定了这种可能性。首先,当 24 周后出现神经病理性疼痛时,在胫骨区域没有发现任何免疫细胞(如巨噬细胞或 T 细胞)的聚集;其次,对经典致敏相关介质(如前列腺素、TRPV1 和 TRPA1)的药理抑制,或神经

生长因子(NGF)的分离,并没有阻止神经病理性痛觉超敏;最后,在 SNI 后 24 周的胫骨区域,通过对逆行标记识别的侧枝生芽的伤害性感受器的 DRG 胞体进行无偏倚基因转录分析,没有显示关键敏化相关基因的调控。这些结果表明:具有其他类型疼痛特征的伤害性感受器敏化并不会导致神经再支配所观察到的机械激活阈值的变化(如急性和慢性炎症性疼痛);然而与对照组相比,发现大多数在侧枝生芽的伤害性感受器中,表达发生变化的基因(如 NGF 依赖的轴突生长、轴突路径寻找、神经保护和轴突存活)与结构变化有关,从而进一步表明了外周敏化是神经纤维结构重塑的结果。

6. 伤害性感受器介导神经再支配引发的疼痛

最后,使用白喉毒素(DTX)介导去神经和不敏感区域的伤害性感受器消融,探讨伤害性感受器是否与神经再支配诱导的神经病理性疼痛发展有关。与消融伤害性感受器结果一致,在没有神经损伤(sham)的情况下,DTX 处理的小鼠对机械 von Frey 伤害刺激的基础反应性显著降低。SNI 后,机械阈值测量显示,伤害性感受器的消融逆转了去神经胫骨区域的机械性超敏反应,但在未损伤的腓肠神经支配区域没有出现这种情况。

为了排除观察到的表型差异是由于 SNS-Cre 小鼠背根神经节(DRG)神经元以外的其他部位的细胞被消融所致,在 SNI 后 24 周将表达 caspase-3 的腺相关病毒以 Cre 依赖的方式直接注射到 SNS-Cre 小鼠的 L₃-L₄ DRG 中,注射绿色荧光蛋白(EGFP)到同一部位作为对照组,与表达 EGFP 的小鼠相比,caspase-3 介导的伤害性感受器消融完全消除了胫骨区域的机械性超敏反应,而腓肠区的超敏反应仅有部分短暂减轻。因此,这些发现最终证明,神经再支配诱导的神经病理性痛觉超敏是由伤害性感受器介导的。

7. 小结

前期研究通过“功能丧失”或“功能获得”的实验表明,A β 传入神经是诱导机械性痛觉超敏的必要条件和充分条件,即使在伤害性感受器被基因消融的情况下也会发生。显然,该研究的发现揭示了神经损伤后存在两种完全不同的形式和机制,即:①传统模式:是一种研究较清楚、早发性、慢性 A β 纤维依赖的形式,由未损伤的神经区域引起;②崭新模式:是在神经受损的去神经区域、依赖伤害性感受器、迟发性地神经再支配过程中表现出来的一种新形式,而这种模式在大多数神经病理性疼痛的临床前工作中被忽视。因此,这项新发现填



补了神经病理性疼痛复杂临床症状表现方面的长期空白。临床上更常见的混合性神经挤压损伤与慢性神经病理性疼痛有关，在研究神经损伤引起疼痛的机制和治疗时，应结合引起痛觉超敏的这两种形式进行考虑。

值得注意的是，再生和慢性疼痛领域的研究在主流文献中大多是相互独立的，而该研究的发现将两个独立的领域进行了整合，并强调结构可塑性和神经再支配过程中的错误连接的重要性，为阐明神经病理性疼痛形成机制开辟了新方向。此外，本文作者对神经再支配过程中非典型 Meissner 小体连接的超微结构形态观察后也提出新概念，即 Meissner

小体的重构在解剖学上将轻柔触摸与神经病理性疼痛中的伤害性感受器激活联系起来，本质上是将伤害性感受器“转换”为低阈值传入神经，感觉的特异性是由皮肤中专门的感官‘细胞器’的属性决定，而不是由神经纤维本身决定。总的来说，该研究对导致不同类型感觉传入神经出现错配的细胞和分子机制的发现将有助于预防或逆转神经损伤后的慢性神经病理性疼痛。

(Gangadharan V, Zheng H, Taberner FJ, *et al.* Neuropathic pain caused by miswiring and abnormal end organ targeting. *Nature*, 2022, 606(7912):137-145. 南京中医药大学医学院整合医学院, 黄昀 张雅君 译, 唐宗湘 校)

• 国际译文 •

绿光镇痛的脑环路机制

光疗已用于治疗慢性疼痛、癌症、皮肤病和睡眠障碍等疾病，具有无创、安全有效、易操作和设备成本低等优势。前期研究表明，绿光可以缓解急性疼痛和慢性疼痛。视网膜存在 3 种光感受神经元：视锥细胞、视杆细胞和内部感光视网膜神经节细胞 (ipRGC)。前两种属于经典的光感受器。后者属于非经典的光感受器，主要表达黑色素。何种光感受神经元参与绿光镇痛？其脑环路机制是什么？复旦大学张玉秋教授团队及合作者采用神经示踪及化学遗传学等方法，对上述问题进行解析。主要结果：（1）将小鼠放置在绿光光照环境中（每天 8 小时，持续 6 天），可显著缓解完全弗氏佐剂 (CFA) 诱导的关节炎性疼痛。选择性破坏视锥细胞和视杆细胞，绿光镇痛作用消失。特异性破坏视锥细胞，绿光镇痛作用消失。特异性破坏视杆细胞，绿光镇痛作用部分消失。特异性破坏 ipRGC，绿光镇痛不受影响。以上结果表明，视锥细胞在调控绿光镇痛效应中发挥关键作用。（2）采用 CTB 顺行标记，发现视网膜和上丘 (SC)、背外侧膝状体 (dLGN) 以及腹外侧膝状体 (vLGN) 存在直接投射。化学遗传学抑制 SC 和 dLGN，不影响绿光镇痛。化学遗传学抑制 vLGN，或者抑制视网膜-vLGN (retina-vLGN) 通路，绿光镇痛消失。光遗传学激活 retina-vLGN 通路，缓解 CFA 引起的热痛敏和触诱发痛。（3）vLGN 区域 penk 阳性神经元投射到中缝背核 (DRN)，慢性抑制该神经环路后可阻断绿光的镇痛作用。光激活该神经环路可发挥明显的镇痛作用。结论：绿光镇痛脑环路机制是，视锥细胞将光信息经 vLGN 区域 penk 阳性神经元传递给中缝背核。该研究不仅探讨多模态感觉信息的相互作用，同时为绿光镇痛的临床应用提供理论依据。

(Tang YL, Liu AL, Lv SS, *et al.* Green light analgesia in mice is mediated by visual activation of enkephalinergic neurons in the ventrolateral geniculate nucleus. *Sci Transl Med.* 2022, 14(674):cabq6474. 北京大学神经科学研究所, 刘风雨 译)