



• 学术动态 •

真皮巨噬细胞通过 SNX25/Nrf2 通路调控组织中的 NGF 而调节痛敏

摘 要 外周神经元和免疫细胞之间的相互作用在疼痛感受中发挥重要作用。该研究基于 *Snx25*^{CKO} 转基因鼠实验,发现 *Snx25* 是降低痛敏的疼痛调控基因。条件性敲除单核细胞和巨噬细胞中、而不是外周感觉神经元中的 *Snx25*,可以降低正常和神经病理性条件下的痛反应。*Snx25*^{CKO} 鼠和 WT 鼠的骨髓移植实验表明巨噬细胞调节痛敏。真皮巨噬细胞中表达的 SNX25 (sorting nexin 25) 通过抑制泛素化介导的 Nrf2 (一种激活 *Ngf* 转录的转录因子) 降解,进而增强神经营养因子 NGF 的表达。因此,真皮巨噬细胞通过产生和分泌 NGF 进入真皮组织并与背根神经节 (DRG) 中的巨噬细胞协同作用而影响痛敏。

一、研究背景

肌体皮肤常受到机械创伤,其感觉由外周感觉神经元编码,这些神经元可分为感受非伤害性触觉刺激的低阈值机械感受器和感受伤害性刺激的痛觉感受器。DRG 小直径神经元是痛觉神经元,而中和大直径神经元优先感受低阈值机械刺激。皮肤损伤通过激活伤害性感受器、损伤部位常驻或浸润的非神经细胞(包括巨噬细胞、肥大细胞和角质细胞)导致炎症介质释放。组织巨噬细胞可分为神经相关亚群和血管相关亚群。皮肤巨噬细胞亚群与外周神经密切相关,并在受损时促进后者再生。在神经病理性疼痛时,巨噬细胞通过组织血管紧张素 2 或补体 5a 促进痛觉。

神经生长因子 NGF 是一种分泌型小蛋白,参与多种急、慢性疼痛。NGF 在包括巨噬细胞在内的免疫细胞中表达,通过多种机制作用于感觉神经元促进痛觉的传递。NGF 可增强感受伤害性离子通道的活性、基因表达和膜定位,而增高感觉神经元的兴奋性。人 *NGF* 突变导致遗传性感觉神经和自主神经 V 型病变 (HSAN-V),其主要临床表现是痛感缺失。HSAN-V 小鼠模型也表现出感觉神经所支配区域的痛敏降低,但其机制是否通过 NGF 调控仍有待明确。

该研究的作者偶然发现了一个缺乏痛敏的转基因鼠品系,通过正向遗传分析确认 *Snx25* 是一个痛觉调节基因。SNX 蛋白有参与膜转运、细胞信号传导和细胞器运动等功能。该研究表明,真皮巨噬细胞 (dMacs) 中 SNX25 通过抑制泛素化介导的转录因子 Nrf2 的降解、进而促进 NGF 生成。dMacs 中的 SNX25 通过 NGF/TrkA 通路调控正常和病理状态下

的急性疼痛。因此,皮肤巨噬细胞-神经元轴是在正常、神经病理性或炎症等条件下,皮肤感受疼痛的重要一环。

二、研究结果

1. *Snx25*^{+/-} 鼠对痛不敏感

先天性白质脑病相关基因 *Mlc1* 转基因鼠 (*Mlc1*^{Tg}) 与 WT 鼠 (C57BL/6J 背景) 比较,表现出对机械痛敏降低。由于 *Mlc1*^{Tg} 鼠具有 129S6、CBA 和 C57BL/6J 混合遗传背景,所以 *Mlc1*^{Tg} 鼠与 C57BL/6J 鼠被回交七代后,再与 C57BL/6J 背景的 WT 鼠进行比较研究。正常状态下 *Mlc1*^{Tg} 鼠表现出对 von Frey 纤毛检测的机械刺激阈值 (VF 阈值) 增高、对皮内注射 5% 福尔马林引起的急性炎症疼痛反应 (福尔马林反应,如舔爪子、甩脚等反应) 显著降低;在 L₄ 脊髓背角中也少见 c-Fos⁺ 神经元。*Mlc1*^{Tg} 鼠是细菌人工染色体 (BAC) 转基因鼠,由于 BAC 插入导致 *Snx25*、*Slc25a4* 和 *Cap97* 三个基因缺失。为研究 *Snx25* 对疼痛的调控功能,构建了 *Snx25* 全敲鼠。*Snx25*^{+/-} 雄鼠的 VF 阈值比 WT 高,与 *Mlc1*^{Tg} 鼠相似;*Snx25*^{+/-} 鼠对福尔马林反应也比 WT 低。尽管 2 月龄的 *Snx25*^{+/-} 鼠的热伤害感受正常,但 6~8 月龄的 *Snx25*^{+/-} 鼠对热刺激的反应潜伏期比 WT 长。

Snx25^{+/-} 鼠在 SNI 模型时的机械痛敏比 WT 明显减弱。3 周龄和成年 *Snx25*^{+/-} 鼠的 DRG 中大、小直接感觉神经元的数量、分布与同龄的 WT 相近,表明痛觉异常不是因为神经元亚群丢失所造成的;2 月龄 *Snx25*^{+/-} 鼠后足皮肤中 PGP9.5⁺ 纤维面积与 2 月龄 WT 相当,表明 SNX25 缺失不影响外周感觉纤维的出芽/分枝等发育过程。



检测疼痛相关分子标志物的表达时发现, TRPV1 和 TrkA 在 *Snx25*^{+/-} 鼠 DRG、坐骨神经和脊髓中的表达比 WT 鼠显著降低。原代培养的 *Snx25*^{+/-} 鼠 DRG 神经元, 辣椒素诱导的 Ca²⁺ 水平比 WT 幅度小; *Snx25*^{+/-} 鼠 DRG 中 *TRPV1*、*Scn9a* (编码 Na_v1.7) 和 *Scn10a* (编码 Na_v1.8) 的 mRNA 表达比 WT 低。表明 *Snx25*^{+/-} 鼠的疼痛不敏感表型与其外周感觉神经元中疼痛相关因子的表达减少有关。

2. 特异性敲除 DRG 神经元内 *Snx25* 对疼痛仍敏感

Snx25^{fl/fl} 鼠与 *Advillin* (*Avil*)^{CreERT2} 鼠杂交, 并口服 0.05% 他莫昔芬 (TAM) 2 周以诱导基因重组, 条件性敲除 DRG 神经元中的 *Snx25* (*Snx25*^{Avil-cKO} 鼠)。在给予 TAM 后第 3 周, *Snx25*^{Avil-cKO} 鼠 DRG 中 SNX25 的表达显著比 *Snx25*^{fl/fl} 鼠低; 但 *Snx25*^{Avil-cKO} 鼠的 VF 阈值和福尔马林反应正常, *TRPV1*、*Scn9a* 和 *Scn10a* 的 mRNA 表达也正常。表明 DRG 神经元中 SNX25 不参与疼痛相关因子的表达和痛觉的调控。

3. 骨髓源性巨噬细胞 (BMDMs) 的 SNX25 调控痛觉

免疫组化研究显示, *Snx25*^{+/-} 鼠后足皮肤中 MHC-II⁺CD206⁺ F4/80⁺ 巨噬细胞的数量以及 CD206 的表达与 WT 相似。透射电镜观察发现, *Snx25*^{+/-} 鼠 BMDMs 的总体形态与 WT 鼠比较没有显著差异。为了进一步明确 dMacs 对痛觉的贡献, 用 WT 或 *Snx25*^{+/-} 鼠的巨噬细胞相互移植制作巨噬细胞嵌合体鼠, 在移植后 28 天, 发现接受 *Snx25*^{+/-} 骨髓移植的 WT 鼠的 VF 阈值增高, 而接受 WT 骨髓巨噬细胞的 *Snx25*^{+/-} 鼠的 VF 阈值降低。

免疫组化分析发现, *Snx25*^{+/-} 鼠在注射福尔马林后 3 天, Iba1⁺CD206⁺ 标记的 dMacs 比 WT 鼠更少、趋化因子表达更低; 在 SNX25^{+/-} 鼠后足皮肤中的 TGF-β 受体 1 (TGF-βR1) 表达上调, 该受体有抑制免疫反应的作用, 并可被 SNX25 所降解; 在注射后 7 天, *Snx25*^{+/-} 鼠后足皮肤和 DRG 中 CCR2⁺ 免疫细胞浸润程度低于 WT, 但差异无统计学意义。以上研究表明, SNX25 在 BMDMs 的 dMacs 中缺失, 影响了正常和炎症条件下的痛觉感受。

4. 巨噬细胞特异性 *Snx25*^{cKO} 鼠对痛觉不敏感

Snx25^{fl/fl} 鼠与 *Cx3cr1*^{CreERT2/WT} 鼠杂交, 培育出条件性敲除单核细胞和巨噬细胞中 SNX25 鼠 (*Snx25*^{Cx3cr1-cKO})。与 *Snx25*^{fl/fl} 鼠比较, *Snx25*^{Cx3cr1-cKO} 鼠 VF 阈值升高、福尔马林反应减少; DRG 中 *Scn9a* 和 *Scn10a* 表达也减少, 而 DRG 神经元的大小与分布都正常; 后足皮肤中 *Cxcl5*、*Cxcl2*、*Il1b* 和 *Cxcl3* 的 mRNA 表达降

低; 皮肤 CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺ 细胞中 *Ccl2*、*Ccl3*、*Ccl4* 和 *Cxcl2* 的 mRNA 表达也降低, 而 CD11b⁺F4/80⁺ 细胞的比例没有变化。表明 dMacs 的 SNX25 对化学刺激后的炎性痛以及正常状态下的痛觉有贡献。

为确定 SNX25⁺ dMacs 与外周神经之间的关系, 该研究将 *Snx25*^{Cx3cr1-cKO} 鼠与 *Ai39*^{Tg/+} 鼠杂交培育 *Snx25*^{Cx3cr1-cKO/Ai39}^{Tg/+} 鼠, TAM 诱导黄色荧光蛋白 (YFP) 在 CX3CR1⁺MHC-II⁺ 标记的 dMacs 表达, 而在 CD117⁺ 肥大细胞中不表达。*Snx25*^{Cx3cr1-cKO/Ai39}^{Tg/+} 鼠的真皮中, YFP⁺CX3CR1⁺ 标记的 dMacs 与 PGP9.5⁺ 纤维相靠近, 表明 SNX25⁺ dMacs 与外周感觉纤维密切相关; 而免疫组化研究发现 WT 鼠皮肤中的 F4/80⁺ 细胞和 CD206⁺ 细胞与 PGP9.5⁺ 神经末梢明显共定位。

将 *Snx25*^{Cx3cr1-cKO} 鼠骨髓移植到 *Snx25*^{fl/fl} 鼠, 制备骨髓巨噬细胞嵌合体, TAM 口服 2 周进行诱导, 测试 *Snx25*^{Cx3cr1-cKO} 鼠小胶质细胞对疼痛不敏感是否有贡献。TAM 诱导 BMT 组的 VF 阈值比 BMT 前以及未诱前显著升高; SNI 模型中, 诱导组机械性痛敏较未诱导组减弱。表明在正常和神经病理状态下, 调控痛敏的是 dMacs 中的 SNX25, 而非小胶质细胞中的 SNX25。

5. SNX25 通过 NGF 信号调控痛敏

Snx25^{+/-} 鼠在正常状态和福尔马林注射 30 min 后, 后足皮肤中表达 NGF 比 WT 低; NGF 在 WT 鼠 MHC-II⁺F4/80⁺ Iba1⁺ 标记的 dMacs 中原位表达, 在 *Snx25*^{+/-} BMDMs 中的表达减少。免疫组化研究发现, *Snx25*^{+/-} 鼠的 TrkA 在坐骨神经结扎 8 h 后的神经结扎远端的积聚比 WT 显著减少, 表明 *Snx25*^{+/-} DRG 中 NGF/TrkA 复合物的逆行转运减少。*Snx25*^{Cx3cr1-cKO} 鼠与 *Ai32*^{Tg/+} 鼠杂交培育 *Snx25*^{Cx3cr1-cKO/Ai32}^{Tg/+} 鼠, 通过 YFP 来追踪 *Snx25*-KO 巨噬细胞, 以检测 SNX25 对调节巨噬细胞来源 NGF 表达的作用。通过观察诱导 *Snx25*^{Cx3cr1-cKO/Ai32}^{Tg/+} 鼠的 BMDMs 表达 YFP, 发现 YFP⁺ BMDMs 中 *Ngf* 的 mRNA 表达比 YFP⁻ BMDMs 中的明显减少, 表明 SNX25 调控 *Ngf* 的 mRNA 表达。接受 *Snx25*^{Cx3cr1-cKO/Ai32}^{Tg/+} 鼠骨髓移植的 WT 鼠, 经诱导后有 44% MHC-II⁺ dMacs 检测到有 *Ai32*^{Tg/+} 来源的 YFP 表达。免疫印迹研究显示, *Snx25*^{Cx3cr1-cKO} 鼠后足皮肤中 NGF 表达比 *Snx25*^{fl/fl} 鼠更低。

为研究 dMacs 中 *Ngf* 的 mRNA 表达, 在 WT 鼠后背皮肤分选 Lin⁻CD11b⁺CD64⁺Ly6C⁺MHC-II⁺ 标记的 dMacs、Lin⁻CD11b⁺CD64⁺Ly6C⁺MHC-II^{lo} 标记的真皮单核细胞 (dMonos) 和 Lin⁻CD11b⁺CD64⁻Ly6C⁻MHC-II⁺ 标记的真皮树突细胞 (dDCs)。RT-qPCR 研究显示, WT 鼠 *Snx25* 的 mRNA 表达在 dDCs 中低于



dMacs 和 dMonos, 但 dMacs 和 dMonos 之间无显著性差异。*Snx25*^{+/-} 或 *Snx25*^{Cx3cr1-cKO} 鼠 dMacs 中 *Ngf* 的 mRNA 表达比 WT 的 dMacs 低; 通过移植整个 *Snx25*^{Cx3cr1-Cko}/*Ai32*^{Tg/+} 鼠的骨髓巨噬细胞到 WT 鼠制备骨髓巨噬细胞嵌合体, 在诱导后从受体鼠皮肤中分选 MHC-II⁺YFP⁺ 标记的 dMacs 中的 *Ngf* 的 mRNA 表达, 比供体来源的 MHC-II⁺YFP⁺ 标记的 dMacs 要低; *Snx25*^{+/-} 鼠在皮内注射 NGF 24 h 后, 检测到 VF 阈值恢复正常, 而注射 PBS 则没有恢复。以上研究表明, dMacs 中的 SNX25 通过调节 NGF 表达进而调控痛敏。

6. SNX25 通过 Nrf2 调节 *Ngf* 的 mRNA 表达

特异性 siRNA 敲减 BMDMs 中的 *Nrf2* 后可显著降低 *Ngf* 的 mRNA 表达。细胞 Nrf2 的表达受泛素化和蛋白酶体降解的调控, 该调控可被 Keap1 蛋白阻断。293T 细胞在蛋白酶体抑制剂 MG132 处理后, 多聚泛素化的 Nrf2 蛋白增加, 并在 siRNA 敲减 *Snx25* 后进一步升高; 相反, 与仅过表达 *Nrf2* 相比, 293T 细胞在瞬时转染过表达 SNX25 和 *Nrf2* 后, 多聚泛素化的 Nrf2 则降低。293T 细胞过表达鼠源的 *Snx25* 和 *Nrf2* 后, SNX25 与 Nrf2 可免疫共沉淀; 体外泛素化检测发现, 敲减 *Snx25* 的 BMDMs 中泛素化 *Nrf2* 蛋白的表达比对照有所增加。*Snx25*^{+/-} 鼠后足皮肤中受 Nrf2 调控的血红素加氧酶 1 比 WT 有所减少, 通过 siRNA 敲减加速 Nrf2 降解的 Keap1, 可以恢复 *Snx25*^{+/-} BMDMs 中的 *Ngf* 表达。以上研究表明, SNX25 通过调控 Nrf2 泛素化进而调控 *Ngf* 的 mRNA 表达。

7. SNX25 是 dMacs 的关键痛觉调控因子

该研究在小鼠后足皮内连续 2 次注射 Clodronate liposome 消除小鼠体内的 dMacs, 用免疫组化分析发现, 在第 2 次注射后 3 天, Clodronate liposome 处理鼠皮内 CD206⁺ 或 MHC-II⁺ 巨噬细胞比脂质体对照显著减少, 但 VF 阈值增高; 免疫印迹分析显示, Clodronate liposome 处理鼠皮内 NGF、SNX25 和 CD206 的表达低于脂质体对照组。表明在正常状态下 dMacs 是痛觉所必需的。

DRG 中的巨噬细胞可参与神经病理性疼痛的调控。免疫组化共标显示, WT 和 *Snx25*^{+/-} 鼠 DRG 的 MHC-II⁺ 巨噬细胞与 PGP9.5⁺ 神经相接近, CD206⁺ 或 F4/80⁺ 巨噬细胞低中度表达 *Snx25*。GFP⁺ 鼠的全骨髓巨噬细胞静脉移植到 WT 鼠后 5 周检测发现, 约 60% 的 MHC-II⁺DRG 巨噬细胞表达 GFP, 而坐骨神经中的 GFP⁺MHC-II⁺ 巨噬细胞很少, 表明 DRG 中发生了巨噬细胞的稳态转换。为检测 DRG 巨噬细胞对疼痛过敏的影响, 研究者手术暴露 *Snx25*^{Cx3cr1-Cko}/

Ai32^{Tg/+}、*Snx25*^{fl/fl} 和 *Ai32*^{Tg/+} 鼠的 L₄₋₅ DRGs, 注射 4-OHT 诱发条件性敲除 DRG 内的 *Snx25*; 在注射后第 5 天用免疫组化检测发现, *Snx25*^{Cx3cr1-Cko}/*Ai32*^{Tg/+} 鼠 DRG 中检测到 *Ai32*^{Tg/+} 来源的 YFP⁺ 巨噬细胞, *Snx25*^{fl/fl}/*Ai32*^{Tg/+} 鼠则没有; *Snx25*^{Cx3cr1-Cko}/*Ai32*^{Tg/+} 鼠 DRG 中 91% YFP⁺ 细胞是 SNX25⁻, 表明局部给予 4-OHT 诱导基因重组并成功条件性敲除 SNX25。SNX25 免疫荧光定量分析显示, 在注射 4-OHT 后 5 天, *Snx25*^{Cx3cr1-Cko}/*Ai32*^{Tg/+} 鼠 DRG 内 CD206⁺ 巨噬细胞仅 14% 是 SNX25⁺ (与 *Snx25*^{fl/fl}/*Ai32*^{Tg/+} 鼠比较), 证实 4-OHT 处理基本消除了 DRG 巨噬细胞中的 SNX25。注射 4-OHT 后 5 天, *Snx25*^{Cx3cr1-Cko}/*Ai32*^{Tg/+} 鼠同侧后足 VF 阈值与对侧接近、同侧后足 VF 阈值与注射前接近、且与 *Snx25*^{fl/fl}/*Ai32*^{Tg/+} 鼠 VF 阈值接近, 表明 DRG 巨噬细胞中的 SNX25 在正常条件下不参与痛觉调控。在正常状态下, F4/80⁺DRG 巨噬细胞表达 NGF 较低, 表明 DRG 巨噬细胞对 NGF 表达及疼痛传导的调节机制不同于 dMacs, 即 dMacs 的 SNX25 而非 DRG 巨噬细胞内的 SNX25 在正常状态下调节急性疼痛。

三、讨论

综上所述, 该研究发现 *Snx25*^{+/-} 鼠和 *Snx25*^{Cx3cr1-cKO} 鼠在正常和诱导疼痛条件下都可以降低痛反应。SNX25 通过抑制 Nrf2 的泛素化和蛋白酶降解, 以调节 *Ngf* 的 mRNA 转录, 并进一步维持 dMacs 中 *Ngf* 的生成。SNX25 的缺失加速了 Nrf2 的降解而降低 NGF 表达, 从而导致对疼痛不敏感。

已证实 HSAN-V 病人的主要临床表现是痛觉丧失, 是由 NGF 基因突变导致的。该研究在 *Snx25*^{Cx3cr1-cKO} 鼠中减少 NGF 表达在一定程度上模拟了 HSAN-V 的病理, 但该研究没有继续观察 NGF 缺失的长期效应如神经末梢退化和收缩等形态学改变。NGF 的中和单克隆抗体已在研发过程中, 可能作为缓解顽固性疼痛的治疗手段。尽管关节痛和骨坏死等意想不到的不良反应阻碍了这些单克隆抗体进入临床, 但 NGF 仍然是研发镇痛药物的良好靶标。dMacs 中 SNX25/Nrf2 轴可能将 HSAN-V 的无痛表型桥联到痛敏状态, 可能成为代替抗 NGF 单克隆抗体的非常有前景的药物靶标。但 NGF 也可以由如角质细胞等非炎症细胞产生, 因此需要进一步来研究调控外周 NGF 的细胞和分子机制。

(Tanaka T, Okuda H, Isonishi A, *et al.* Dermal macrophages set pain sensitivity by modulating the amount of tissue NGF through an SNX25-Nrf2 pathway. *Nat Immunol*, 2023, 24(3):439-451. 汕头大学医学院, 陈浩浩 译, 刘兴君 校)