



## • 学术动态 •

## 肠嗜铬细胞驱动内脏疼痛和焦虑机制

**摘要** 胃肠不适是大多数肠道疾病的表现，也是慢性内脏疼痛的重要成分之一。越来越多的肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 病人，即使组织损伤已经修复，其胃肠道高敏和疼痛也会长期存在。该研究聚焦于肠嗜铬 (enterochromaffin, EC) 细胞，EC 细胞是一类存在于肠道上皮中数量较少的可兴奋的 5-羟色胺 (5-HT) 能神经内分泌细胞。已知 EC 细胞能够检测和传导有害刺激至邻近黏膜神经末梢，但这一信号通路是否参与调节内脏疼痛及其性别差异尚待研究。该研究通过在体增强或抑制 EC 细胞功能，阐明了 EC 细胞的激活足以引起对肠扩张的高敏反应，且 EC 细胞是异戊酸（一种源于细菌的与胃肠道炎症相关的短链脂肪酸）的致敏作用所必需的。即使在缺少炎症反应的条件下，EC 细胞的长期激活会引起持续的内脏高敏状态。此外，干扰 EC 细胞活动会促进焦虑样行为，而阻断 5-HT 信号可使其恢复正常。该研究在一系列研究范式中均观察到显著的性别差异，表现为 EC 细胞-黏膜神经传入环路在雌性中处于紧张性操控状态。该研究证实了 EC 细胞-黏膜神经传入信号在急性和持续性胃肠道疼痛中的关键作用，还提供了研究内脏高敏和肠道疼痛的性别差异的遗传学模型。

胃肠道表面覆盖一层薄上皮细胞，其中包含少量的多功能的肠内分泌细胞，它们通过释放激素和神经递质来调节诸如营养物质吸收、消化、蠕动、摄食行为和感知觉等功能。肠嗜铬 (enterochromaffin, EC) 细胞是一类独特的肠内分泌细胞亚型，可以检测引起或加剧疼痛的环境和内源性刺激，包括饮食刺激物、微生物代谢产物、炎症介质、机械扩张以及应激相关的激素和神经递质等。EC 细胞一旦被激活，就会释放 5-羟色胺 (5-HT) 并作用于邻近表达 5-HT<sub>3</sub> 受体的感觉神经末梢上，将伤害性刺激信号传递到脊髓。肠道受到不同类型的脊髓传入神经的支配，包括对拉伸不敏感的黏膜神经和支配肌肉、血管或肠系膜并在一定阈值范围内对扩张有反应的神经。目前，EC 细胞及其邻近的黏膜传入神经在多大程度上参与急性或慢性内脏疼痛及其性别差异仍不清楚。该研究通过沉默或激活小鼠的 EC 细胞对这些问题进行探究，并评估其对结肠感觉神经活动、内脏敏感性及行为的影响。

源于细菌的短链脂肪酸可以激活肠内分泌细胞，其中异戊酸 (isovalerate, ISV) 在内脏高敏人群中的水平升高，提示其可能参与痛觉过敏。研究表明，在体外神经-肠道标本模型中异戊酸通过 G 蛋白偶联受体 Olf558 来激活 EC 细胞，以 5-HT 依赖的方式引起初级传入神经纤维的机械痛觉敏化。鉴于 EC 细胞和感觉神经都具有机械敏感性，为了验

证异戊酸是否使神经纤维对其他非机械刺激变得敏感，该研究首先使用光遗传学方法激活 Nav1.8<sup>+</sup> 感觉神经元（其在支配结肠的脊髓传入神经中占 95% 以上）。在 Nav1.8-ChR2 雄性小鼠的离体神经-肠组织标本上施加异戊酸，能够增强黏膜传入神经对光刺激的敏感性。然而，雌性小鼠神经纤维的基线反应较雄性小鼠明显更高（即使在最低光刺激强度下也是如此），且不能被异戊酸处理进一步增强。因此，异戊酸介导的致敏作用并非特异性针对 EC 细胞或感觉神经元的机械刺激，而是增强此环路的兴奋性（以性别二态性的方式）。

Nav1.8-GCaMP6s 小鼠背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 活体钙成像显示，雌性小鼠腰骶段 DRG 神经元的基线活性较雄性小鼠更强，表明支配内脏靶器官（包括结肠）的神经元活性更强。雄性小鼠结肠内注射异戊酸能够激活 6.5% 的神经元，而雌性小鼠对异戊酸敏感的神经元要少得多 (2.2%)。在雄性小鼠中，5-HT<sub>3</sub> 受体选择性拮抗剂阿洛司琼 (alosetron) 可以抑制异戊酸诱导的反应，这一现象与异戊酸激活 EC 细胞释放 5-HT 并随后激活附近感觉神经末梢上的 5-HT<sub>3</sub> 受体这一机制相吻合。然而，阿洛司琼并没有改变雌性小鼠对异戊酸敏感的神经元的比例。为了确定异戊酸能否增强疼痛相关行为，检测了小鼠结肠内注射异戊酸后结肠扩张 (colorectal distension, CRD) 的反射运动。结



果表明,在一定扩张压力范围内异戊酸增强了雄性小鼠内脏运动反射 (visceromotor response, VMR),而这一行为效应在雌性小鼠中严重削弱。

为探究异戊酸的致敏作用是否由 EC 细胞特异性介导,该研究利用了破伤风毒素 (tetanus toxin from *Clostridium tetani*, TeNT) 抑制兴奋性细胞的突触囊泡融合和神经递质释放的能力。通过交叉遗传学手段获得了 *Pet1Flp; Tac1Cre* 系小鼠 ( $EC^{PFTox}$ ),以实现在 EC 细胞中特异性表达 TeNT。为了验证表达 TeNT 的功能,使用异硫氰酸烯丙酯 (allyl-isothiocyanate, AITC) 激活 EC 细胞表达的 TRPA1 通道并刺激 5-HT 释放。与  $Tac1^{Cre}$  对照组相比,AITC 引起  $EC^{PFTox}$  组小鼠肠道类器官的 5-HT 释放大幅减少 (约为 30%)。 $EC^{PFTox}$  小鼠血清的 5-HT 水平也有降低,提示 EC 细胞是外周 5-HT 的主要来源之一。

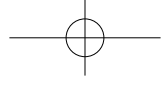
在  $Tac1^{Cre}$  对照组小鼠的离体肠道-神经标本中,异戊酸增强了黏膜感觉神经对机械刺激的反应,尤其是在雄性小鼠中。然而,在  $EC^{PFTox}$  雄性或雌性小鼠的离体肠道神经标本均未观察到这种敏化作用,从而证明异戊酸的致敏作用是通过 EC 细胞介导的。雌性  $EC^{PFTox}$  小鼠基线 VWR 反应与对照组相比降低。与体外实验结果一致,在  $EC^{PFTox}$  小鼠中,结肠内施加异戊酸对扩张压力引起的雄性小鼠 VMR 的敏化作用消失了。结果证实 EC 细胞在内脏伤害性感受中发挥主要作用。此外,沉默 EC 细胞对雌性小鼠有更大的影响,而雄性小鼠则表现出更强的异戊酸的致敏作用。结果提示,与雄性小鼠相比,EC 细胞-伤害性感受器环路在雌性中处于紧张性操控状态从而具有较窄的动力学范围。

该研究采用化学遗传学方法探究 EC 细胞的激活是否足以引起内脏高敏。在 EC 细胞上表达激活性 DREADD 受体 ( $hM3Dq$ ),使其能够被去氯氮平 (deschloroclozapine, DCZ) 或氯氮平 N-氧化物 (clozapine-N-oxide, CNO) 选择性激活。将 DREADD 激动剂应用于源自  $EC^{hM3Dq}$  小鼠的肠道类器官可导致 EC 细胞的激活和 5-HT 的释放。此外,在 DCZ 处理 15 分钟后,  $EC^{hM3Dq}$  雌性小鼠 (而不是雄性) 的血清中 5-HT 含量增加,并在 30 分钟后逐渐下降。DREADD 激动剂可以使  $EC^{hM3Dq}$  小鼠的神经纤维对黏膜机械刺激的敏感性增强,而对  $Tac1^{Cre}$  对照组小鼠无显著影响,且这种致敏作用在雄性小鼠中更明显。为了检测内脏过敏反应,在结直肠扩张实验前 15 分钟给  $EC^{hM3Dq}$  小鼠注射 DREADD 激动剂,结果表明雄性小鼠在一定范围结肠压力下 VMR 显著增加,而雌性小鼠的 VMR 没有显著变化。给予阿

洛司琼阻断了 DCZ 介导的雄性小鼠 VMR 的增强,这与在体实验结果一致。总的来说,这些性别差异与如下观念相一致,即 EC 细胞-黏膜传入神经环路对雌性的结肠敏感性有更高的紧张性贡献而对于增强反应的窗口更窄。为了验证持续的 EC 细胞激活能否产生类似于在 IBS 中观察到的持续敏化,持续 3 周每日给小鼠注射 DCZ,并在停止给予 DCZ 后 72 小时评估结肠扩张引起的 VMR 反应。结果显示,相较于  $Tac1^{Cre}$  对照组小鼠,  $EC^{hM3Dq}$  小鼠在药物洗脱后仍然保持高敏感性,表明 EC 细胞的激活足以驱动急性和持续性内脏疼痛。

初级传入神经纤维终止于肠道的不同分层,包括黏膜、肌肉和血管腔室以及肠系膜。一般认为,内脏疼痛是由对扩张敏感的低阈值和高阈值神经纤维所驱动,而非对扩张不敏感的黏膜传入神经。鉴于 EC 细胞介导内脏疼痛的必要性,为确定除了黏膜传入神经外,是否还有其他神经受 EC 细胞激活的影响,该研究使用了一种改良的离体神经-肠道标本模型,在这个模型中对完整的结肠环进行加压,可以激活对扩张敏感的传入神经 (包括低阈值、高阈值和广动力域神经纤维),这些传入神经负责检测其感受区域内的环向张力。支配黏膜层的传入神经不会在这种范式下产生反应,从而能够将它们与其他传入神经区分开来。记录实验是在选择性表达 TeNT 或 DREADD 受体的小鼠 EC 细胞中进行的。在对照组小鼠中,异戊酸不能增强支配非黏膜层的扩张敏感传入神经的活性。 $EC^{PFTox}$  雌性或雄性小鼠的离体神经-肠道组织对结直肠扩张的 VMR 降低,在给予异戊酸之前或之后表现出正常的扩张敏感神经激活。对于  $EC^{hM3Dq}$  雌性和雄性小鼠的离体神经-肠道组织,CNO 处理对扩张敏感的神经纤维没有显著影响。结果表明,内脏疼痛的调节是由对扩张不敏感的黏膜传入神经驱动的,这些纤维对局部组织变敏感,并直接与黏膜层中的 EC 细胞相互作用。

功能性胃肠疾病通常与焦虑的增加有关。焦虑是影响肠-脑信号的双向传递的复杂疼痛或感觉信息处理障碍的重要表征之一。因此,接下来通过高架十字迷宫进一步探究慢性激活或者抑制 EC 细胞是否会影响焦虑样行为。结果显示,经过 DCZ 处理的  $EC^{hM3Dq}$  小鼠在开放臂中停留时间较短,表明小鼠的焦虑样行为增加。给予 5-HT<sub>3</sub> 受体拮抗剂阿洛司琼逆转 DCZ 导致的焦虑样行为增加。结果表明 5-HT 能 EC 细胞-黏膜传入神经信号在调节肠-脑通讯紊乱的伤害性感觉成分和情感成分发挥重要作用。此外,  $EC^{PFTox}$  小鼠在开放臂中停留时间也较短,



表明长期抑制 EC 细胞活性, 扰乱胃肠道功能, 同样具有致焦虑作用。

综上所述, 该研究阐明了肠内分泌细胞与黏膜传入神经之间的相互作用, 以及这种相互作用如何影响内脏疼痛和焦虑。结果表明, EC 细胞和黏膜传入神经是与 IBS、炎症性胃肠道疾病或其他炎症相关的内脏疼痛和焦虑的关键诱发因素, 凸显了肠-脑轴在神经胃肠病学中的重要性。此外, 功能性胃肠疾病在女性中的发病率更高, 该研究表明 EC 细胞-黏膜传入神经在雌性小鼠的紧张性输入更强。异戊酸或者急性化学遗传学激活 EC 细胞不能进一步增

加雌性小鼠的内脏敏感性。因此, EC 细胞-黏膜传入神经增强的活性可能使得雌性内脏疼痛的发病率更高。在 EC 细胞鉴定性别特异性的分子和功能, 可能会提供内脏疼痛性别差异机制的新见解。此外, 鉴于功能性胃肠疾病与增加的焦虑有关, 选择性 5-HT 再摄取抑制剂的治疗可能通过其外周和中枢靶点对病人有双重益处。

(Bayrer JR, Castro J, Venkataraman A, *et al.* Gut enterochromaffin cells drive visceral pain and anxiety. *Nature*, 2023, 616(7955):137-142. 南通大学特种医学研究院, 孙世宇, 陆屹, 周国坤 译, 刘通 校)

## • 国际译文 •

### 大脑表面存在第 4 层脑膜结构-蛛网膜下淋巴样膜

传统观点认为, 中枢神经系统脑膜由硬脑膜、蛛网膜和软脑膜三层组成。该研究重新定义了教科书中的脑膜系统, 发现了蛛网膜下腔中存在一类淋巴样膜 (第 4 层脑膜), 并将该腔室分为深浅两层, 即蛛网膜下淋巴样膜 (SLYM)。目的: 探究 SLYM 能否形成非渗透性膜分隔蛛网膜下腔及其功能。结果: (1) 首先, 为了深入分析膜结构, 该研究使用双光子显微镜观测了 Prox1-EGFP<sup>+</sup> (Prox1: 一种决定淋巴管发育的转录因子) 小鼠皮层脑膜。并对胶原纤维、血管和星形胶质细胞进行可视化标记, 以区分各层结构。结果发现, 在硬脑膜纤维束下方存在一层连续扁平 Prox1-EGFP<sup>+</sup> 的细胞, 可将蛛网膜下腔分为浅层和深层, 这层膜被命名为 SLYM。(2) 为了进一步探究 SLYM 是否具有通透性。采用 1 μm 的红色和蓝色荧光微球注射到蛛网膜下腔的浅层和深层, 结果显示, 两色微球分别被限制在各自层; 进一步采用直径远小于 1 μm 的 TMR-葡聚糖 (3 kDa) 注射到深层, 结果显示其仍然无法透过 SLYM。然而, 在硬脑膜损伤和脑脊液漏的小鼠中, SLYM 的两侧均可观察到示踪剂。以上结果证实 SLYM 可限制多数多肽和蛋白质在浅、深层的交换。(3) 对 SLYM 免疫表型进行表征。结果发现 SLYM 中另一种淋巴管标志 PDPN 呈阳性, 而淋巴管内皮细胞受体 1 (LYVE1) 表达呈阴性。此外, SLYM 中细胞维甲酸结合蛋白 2 (CRABP2) 表达呈阳性。同时, 分析成人人类大脑皮质的蛛网膜下腔同样存在 CRABP2<sup>+</sup>/PDPN<sup>+</sup> 的膜结构。因此, 证实 SLYM 在人大脑中同样存在。(4) CLDN-11 是形成蛛网膜屏障细胞层 (ABCL) 紧密连接的主要成分, 为了进一步证明 SLYM 与蛛网膜是不同的膜结构, 采用 CLDN-11 染色显示, SLYM 中 CLDN-11 表达阴性, 而 CLDN-11 在 ABCL 和脉络丛基质细胞中均有密集表达, 表明两者是不同两层。同时, SLYM 与软脑膜的免疫标记特征同样存在差异。证实 SLYM 为小鼠和人类大脑的第 4 层脑膜结构, 在免疫表型上有别于硬脑膜、蛛网膜和软脑膜, 并显示出淋巴样特征。有意思的是, SLYM 与外周器官表面的间皮层具有相同特征。因此, SLYM 可能起到减少运动时脑组织与颅骨间摩擦的作用。(5) 进一步发现 SLYM 中常驻着免疫细胞, 可阻止外周免疫细胞直接进入深层的脑脊液中, 具有免疫监视作用。当脑部出现炎症或退行性改变, SLYM 中免疫细胞显著增多, 如 LYVE1<sup>+</sup>、CD206<sup>+</sup> 和 CD68<sup>+</sup> 巨噬细胞和 CD11c<sup>+</sup> 树突状细胞会在 SLYM 上聚集。综上所述, 该研究首次发现了大脑表面存在第 4 层膜结构——SLYM, 一方面可以控制脑脊液和血液的物质交换, 另一方面具有免疫屏障和免疫监视作用。SLYM 的发现将更新教科书中的解剖学知识, 其与中枢神经系统感染和神经退行性疾病的关系值得进一步深入研究。

(Møllgård K, Beinlich FRM, Kusk P, *et al.* A mesothelium divides the subarachnoid space into functional compartments. *Science*, 2023, 379(6627):84-88. 北京大学神经科学研究所, 苏新然 译, 王佳昕, 刘风雨 校)