



• 学术动态 •

缺氧诱导的碳酸酐酶对脊髓后角神经元的激活和神经病理性疼痛的诱导

摘要 有一部分神经病理性疼痛是由脊髓后角的中枢神经敏化引起的。但其敏化的形成机制仍不清楚。有证据表明, 脊髓血管网络完整性的破坏可能是神经病理性疼痛的致病因素。该研究验证了脊髓后角处的血流量和血管分布减少会导致神经病理性疼痛的发作。通过使用导致脊髓后角内皮退化的啮齿动物模型 (I 型糖尿病和可诱导的内皮特异性脊髓后角血管内皮生长因子受体 2 敲除小鼠), 发现脊髓血管病变导致伤害性行为超敏反应, 同时这也导致神经元缺氧增加, 表现为缺氧诱导因子 1 α 、葡萄糖转运脊髓后角蛋白 3 和碳酸酐酶 7 等缺氧标志物表达增加。此外, 通过鞘内递送二甲基草酰甘氨酸诱导缺氧导致脊髓后角激活神经元以及机械和热超敏反应, 表明由血管减少引起的缺氧信号会导致超敏反应和疼痛增加。通过腹膜内注射乙酰唑胺抑制碳酸酐酶活性, 抑制缺氧引起的疼痛行为表明在糖尿病中发生的脊髓后角缺氧微环境的诱导以激活神经元并引起神经性疼痛是一个完整的过程。该研究推测通过改善脊髓微血管血流来逆转缺氧状态可以逆转或预防神经病理性疼痛。

1. 研究背景

慢性疼痛是一种实际或潜在组织损伤相关的一种不愉快感觉和情绪情感体验。这种疼痛可能是另一种疾病 (如糖尿病) 造成的继发性疼痛, 也可能是治疗 (如化疗) 造成的疼痛。神经病理性疼痛是由于躯体感觉系统受损, 表现为对诱发的感觉刺激的超敏反应 (异常疼痛或痛觉过敏) 以及持续的疼痛。临床上对神经病理性疼痛缺乏有效的镇痛管理。

脊髓后角神经元具有通过导致非适应性可塑性的关键机制来适应神经元应激的能力。这些机制可以维持兴奋性和抑制性神经递质之间的平衡, 但在慢性疼痛过程中, 兴奋性通路主要由一个促 GABA 能神经兴奋引起。这些感觉神经元在压力下如何变化尚不清楚。尽管神经组织可以重新规划代谢途径维持持续的神经元功能, 但它们易受缺氧影响。血管功能紊乱常伴随着神经退行性疾病的发展 (如阿尔茨海默病), 周围肢体缺血与疼痛发作之间的因果关系已经被证明。既往的研究已经探索了神经系统对血流的水平调节及其对痛觉处理和疼痛行为调节的影响。糖尿病啮齿类动物模型中脊髓后角血流量的减少, 可能是由于血管分布减少, 并与疼痛超敏反应的发生有关。血管完整性是由血管内皮生长因子 (VEGF) 家族蛋白介导的, 通过 VEGF 受体 2 (VEGFR2) 传递信号。血管内皮生长因子是血管生成功能的主要调节因子, VEGF 表达的波动与生理

功能和发病机制相关的不同的内皮细胞活性有关。VEGF 的高表达和 VEGFR2 介导的信号通路驱动血管异常扩张相关, 而 VEGFR2 信号通路的减弱导致血管修剪。有趣的是, 系统性内皮特异性敲除 VEGFR2 可降低脊髓中的血管密度, 并通过减少脊髓小胶质细胞活化来降低关节炎动物模型中的伤害性行为超敏反应。因此, 该研究着手确定脊髓血管稀疏本身是否引发神经病理性疼痛表型。

该研究表明脊髓微血管系统在维持感觉神经元调节中至关重要, 并证明对脊髓后角的血管支持的改变有助于糖尿病神经病理性疼痛的发展。1 型糖尿病和转基因啮齿类动物 (内皮特异性 VEGFR2 基因敲除) 脊髓血管减少模型表明, 局限性血管变性诱导脊髓后角低氧微环境, 导致神经元激活和神经病理性疼痛的启动。神经病理性疼痛的发生依赖于低氧反应, 特别是低氧诱导基因的上调和碳酸氢盐代谢的改变, 而碳酸酐酶的抑制可以阻止这种改变。这些结果为镇痛的发展提供了一个潜在的新的治疗策略。

2. 研究结果

(1) 脊髓后角缺氧与神经病理性疼痛的关系

为了确定糖尿病神经病理性疼痛的增加是否与血管损失和缺氧有关, 该研究使用了对机械性和热性伤害行为超敏反应的 I 型大鼠模型。与对照组相比, 糖尿病大鼠的缺氧脊髓后角神经元数量显著增



加,而在后角识别的神经元总数略有减少。这些结果表明,血管缺失引起的缺氧可能是糖尿病神经病理性疼痛的诱发因素之一。

既往研究证明, $VEGFR2^{ECKO}$ 小鼠与野生小鼠相比,对伤害性的反应无明显变化,但是对关节炎诱导引起的痛觉过敏和异常疼痛有抵抗作用。为了确定 $VEGFR2^{ECKO}$ 小鼠是否有血管密度、缺氧和细胞数量的变化,使用三苯氧胺对脊髓进行染色。与对照组相比, $VEGFR2^{ECKO}$ 小鼠胶原袖的数量增加,表明血管稀疏。尽管 $VEGFR2^{ECKO}$ 不影响脊髓后角神经元数量,但后角低氧探针标记的神经元数量显著增加,表明低氧是 $VEGFR2^{ECKO}$ 带来的结果。与野生型小鼠相比, $VEGFR2^{ECKO}$ 小鼠对热的戒断潜伏期较低。

血管存活需要内源性 $VEGFR2$ 激活,包括食管、皮肤、唾液腺以及其他组织。然而,形成部分血脑屏障的脊髓血管是否需要 $VEGFR2$ 信号传导尚不清楚。因此,该研究试图确定脊髓 $VEGFR2$ 信号在脊髓微血管中是否完整。已知 $VEGF-A_{165a}$ 直接作用于脊髓后角,可通过活体显像测量血管通透性。与被 $VEGFR2$ 抑制剂 ZM323881 阻断的载体对照相比, $VEGF-A_{165}$ 增加了血液-脊髓屏障的溶质通透性。

(2) 脊髓限制性后角血管病变诱发慢性疼痛

既往探索的实验模型是系统性血管病变啮齿动物模型,这意味着大脑和外周的疼痛处理可能会改变,从而影响敏感性。为了确定脊髓血管本身是否能调节伤害性反应,研究建立了一个精细的模型,诱导了局限于脊髓的血管病变。从 WT 小鼠和 $VEGFR2^{CreERT2}$ 小鼠脊髓中提取内皮细胞,4-羟基他莫西芬 (OHT) 处理后测定细胞活力。与 WT 小鼠相比,4-羟基他莫西芬 (OHT) 处理导致 $VEGFR2^{CreERT2}$ 小鼠脊髓内皮细胞活力显著降低,呈浓度依赖性。为了确定在体内是否也是明显的,将 OHT 鞘内注射到腰椎膨大区产生脊髓内皮特异性 $VEGFR2$ 敲除 ($VEGFR2^{scECKO}$) 小鼠。与 WT 小鼠相比, $VEGFR2^{scECKO}$ 小鼠脊髓中的内皮标志物 VE-cadherin、CD31 和葡萄糖转运蛋白 1 含量也降低。此外, $VEGFR2^{scECKO}$ 小鼠的内皮标记物的蛋白表达减少。值得注意的是,这些内皮标记物 (ZO1 和 CD31) 在 WT 或 $VEGFR2^{scECKO}$ 小鼠 $L_3\sim L_5$ 背根神经节中的蛋白表达没有变化,表明这种诱导仅限于脊髓。

鞘内 OHT 治疗导致 $VEGFR2^{scECKO}$ 小鼠脊髓后角微血管显著变性,血管直径和总血管覆盖体积减小。此外, $VEGFR2^{scECKO}$ 小鼠的脊髓后角血管灌注减少,表现为 Tritc 葡聚糖标记的血管减少。这种血

管灌注的减少伴随着脊髓后角 1~5 层中低氧探针标记的神经元的增加。在 WT 小鼠和 $VEGFR2^{scECKO}$ 小鼠中,后角神经元总数没有变化。 $VEGFR2^{scECKO}$ 小鼠有热超敏反应,但机械戒断阈值或运动行为没有变化。WT 小鼠在 OHT 处理后热戒断潜伏期和机械戒断阈值没有变化。

(3) 缺氧信号在后角神经元中的诱导

$VEGFR2^{scECKO}$ 小鼠在后角神经元 (用神经元标记物 NeuN 标记) 显示缺氧诱导因子 1A (HIF1 α) 和葡萄糖转运蛋白 3 (GLUT3) 的表达增加, HIF1 α mRNA 和缺氧反应基因碳酸酐酶 VII (CA7) 和 GLUT3 显著增加。有趣的是,在 I 型啮齿动物和 2 型啮齿动物糖尿病模型中, HIF1 α 的增加也有所增加。

(4) 缺氧诱导与慢性疼痛的发病

这些结果都提示由于血管丢失而导致的缺氧可诱发行超敏反应。为了验证这一点,在 WT 小鼠鞘内注射化学缺氧模拟 DMOG。鞘内注射 DMOG 后 24 小时,与对照相比,机械刺激缩足阈值和热缩足潜伏期显著降低。脊髓神经元 CA7 表达增高, GLUT3 和 HIF1 α 表达增高。此外,鞘内注射 DMOG 后,表达 FOS 免疫反应的后角神经元数量增加。此外,与对照处理的样本相比,在模拟缺氧处理 24 小时后,分离的脊髓神经元表现出氯化钾诱导的钙内流增加。在脊髓切片上使用多电极阵列,发现 DMOG 处理后在脊髓后角方面与载药处理的腰段脊髓切片相比,基线神经元活性增加。在脊髓腰段的分离神经元暴露于不同的环境氧条件下,常氧和缺氧导致 HIF1 α 、CA7 和 GLUT3 增加。此外, KCC2 被下调。

(5) 碳酸酐酶介导低氧诱导的慢性疼痛

该研究通过敲除 $VEGFR2$ 基因发现低氧诱导后脊髓内皮细胞 CA7 上调。为了确定这是否介导了神经元超敏反应,该研究用 DMOG 处理 24 小时,结果显示与载体处理相比, HIF1 α 和 CA7 的蛋白表达增加。同样,鞘内注射 DMOG 导致 HIF1 α 和 CA7 蛋白表达增加。非选择性碳酸酐酶抑制剂 ACZ 腹腔注射可减轻 DMOG 引起的伤害性行为超敏反应。乙酰唑胺增加机械戒断阈值,恢复到与对照组相同的阈值。同样,在 DMOG 处理的实验队列中,热退出潜伏期增加到正常值。乙酰唑胺还增加了 $VEGFR2^{scECKO}$ 小鼠的戒断潜伏期,部分恢复了它们对照治疗的反应。

3. 讨论

慢性疼痛是通过神经元活动的改变引起的,其中血管系统通过诱导炎症信号在长期疼痛过敏的表



现中起着关键作用。该研究在这里探讨了血管功能障碍如何通过减少血流量和随后的脊髓水平的缺氧来调节伤害感受加工。目前, 这些与中枢敏化诱导相关的机制是神经病理性疼痛发展的基础, 氯化物和碳酸氢盐稳态是 GABA 介导的兴奋的组成部分。在这项研究中, 该研究发现脊髓血液灌注减少可诱导缺氧介导的后角脊髓神经元激活和慢性疼痛表现。重要的是, 慢性疼痛行为是通过抑制碳酸酐酶活性来抑制的。

(1) 血管病变、VEGFR2 信号转导与伤害性感觉

神经系统血流的损害与神经系统疾病的发展密切相关, 如阿尔茨海默病, 也是神经系统缺血性疾病(如卒中)的根本原因。中枢神经系统中的体感系统适应微环境中这种波动的潜在机制尚不清楚。这里提出的研究表明, 脊髓血管供应的减少足以引发疼痛。

慢性疼痛是一种非常普遍的病理状态, 影响着大部分人群, 其发病和严重程度与年龄或疾病的进展有关。毛细血管健康也受到年龄和疾病的很大影响, 血管数量减少和血管收缩张力频率增加与神经病理有关。脊髓毛细血管网的内皮变性与神经病理性疼痛的发展有关, 内皮特异性 VEGFR2 信号的丢失高度归因于疼痛超敏反应的增强。在健康和疾病中, 血管内皮生长因子 2 信号通过成熟的毛细血管网络和血管通透性的调节对血管功能的发展和维持是不可或缺的。在神经疾病中, VEGFR2 信号的改变导致血管缺损, 从而导致神经元功能下降。此外, 补充 VEGF-A 已被证明可以防止神经系统血管病变的发展, 从而抑制神经疾病。在脊髓方面, VEGFR2 的表达和活性通过调节血管通透性与脊髓内皮功能有关。因此, 研究表明 VEGFR2 在脊髓内皮细胞中表达的缺失导致了整个后角毛细血管网络的减少, 支持了 VEGFR2 在维持毛细血管健康中的整体作用。先前的研究探索了系统的 VEGFR2 敲除, 似乎影响了与体感网络有关的更广泛的背景。目前的认识表明, 脊髓内的微血管功能通过后角内形成一个明显的促炎环境来诱导疼痛超敏性。最近的证据强调内皮源性紧密连接蛋白的丢失和炎细胞黏附的增强推动了脊髓血管通透性的增加。因此, 脊髓内皮细胞 VEGFR2 依赖性功能的损伤阻止了血管通透性, 并抑制了促炎源性疼痛超敏性的发生。在本研究中, VEGFR2 敲除仅限于脊髓内皮, 能够探究血管和神经元系统之间与疼痛调制有关的相互作用。诱导 VEGFR2 特异性地在脊髓内皮细胞中被击倒导致热伤害性超敏反应。

(2) 缺氧性慢性疼痛

在慢性疼痛的啮齿类动物模型中, 脊髓后角微血管的丢失和随后毛细血管灌注的丢失与缺氧信号的诱导有关。神经元组织代谢活跃; 神经元的活动与营养支持的提供相结合, 因此, 神经组织的血供是至关重要的。而且神经元对氧和营养输送的波动高度敏感, 神经元的完整性因营养支持的减少而受到损害。神经组织环境的改变, 如组织氧水平的降低, 损害了神经组织的完整性, 改变了神经元的活动, 导致病理性神经残疾、癫痫和认知障碍。在诱导血管变性和诱导缺氧机制后, 后角神经元的神经元活动水平增加。在慢性疼痛的啮齿类动物模型和糖尿病神经病理性疼痛病人的脊髓损伤中观察到了这种活性。此外, 本研究强调的缺氧是疼痛过敏发作的一个重要诱因。然而, 其他因素(包括代谢紊乱和炎症)也是神经病理性疼痛发展的罪魁祸首, 在糖尿病神经病理性疼痛的时间过程中需要考虑。向外周感觉神经系统的血流受损导致啮齿类动物疼痛行为加剧, 伴随着外周感觉活动增强典型的血管阻塞后慢性疼痛状态的开始。目前, 关于脊髓水平的后角神经元与血流量减少之间关系的研究很少。然而, 血流量和组织氧水平的减少会损害运动神经元的活动, 这是血流量对神经元功能的意义的基础。在这项研究中, 使用引起慢性疼痛的血管病变啮齿类动物模型, 证明了脊髓后角明显的缺氧信号, 与神经元激活有关。c-fos (神经元激活标志物) 的表达增加伴随着 HIF1 α 、GLUT3 和 CA7 等缺氧标志物的表达水平升高。前人对低氧对感觉神经元影响的研究表明, 背根神经节感觉神经元在低氧条件下是激活的。此外, 糖尿病神经病理性疼痛的发展与神经血管破坏和感觉神经退行性变导致的氧减少内在相关。后角神经元的活动以前被证明受到缺氧和 HIF1 α 激活的影响。在外周感觉神经元激活后, 背根神经节感觉神经元中 HIF1 α 表达的减少与 c-fos 表达神经元数量的减少有关。然而, 缺氧诱导的神经元特异性 GLUT3 和 CAR7 的表达强调了脊髓后角神经元对组织微环境变化的假定适应, 突触可塑性可能演变为慢性疼痛表现的可能途径。有趣的是, 该研究在 VEGFR2^{seECKO} 中没有看到 DRG 血管标记物的变化, 但疼痛行为发生了变化, 这表明尽管 DRG 可能有所贡献, 但也有明显的脊髓受累。

识别那些负责调节神经元功能和突触可塑性的神经元适应机制对于理解慢性疼痛是如何发展的是不可或缺的。GABA 能信号的失调通过对氯、钾和重碳酸氢盐稳态的差异调节在慢性疼痛状态的发展



中被广泛认识。脊髓中氯化钾共转运蛋白 2 (KCC2) 的严重丢失导致慢性疼痛和后角神经元兴奋的发生。氯化钾共转运蛋白 2 的抑制或下调 (如在病理性疼痛和缺氧时 KCC2 活性降低) 导致细胞内氯化物的积累。随后 GABA 受体 A (GABA_A) 的激活导致氯化物外排, 导致后角神经元兴奋。GABA_A 功能的紊乱, 涉及 KCC2 的表达和活性, 在脊髓水平参与了糖尿病神经病理性疼痛的发展。然而, 最近的证据表明氯化物和碳酸氢盐转运的调节影响了脊髓神经元的激活和慢性疼痛状态。GABA 受体 A 不仅诱导氯化物外排, 而且碳酸氢盐也被转运出神经元。因此, 通过给予 ACZ 抑制碳酸酐酶活性的碳酸氢盐合成抑制了脊髓水平上的后角神经元活动和伤害性感觉。乙酰唑胺抑制脊髓后角神经元功能, 与糖尿病神经病理性疼痛状态的抑制有关。同样, 研究表明 ACZ 治疗可以改善缺氧引起的疼痛, 这部分是由缺氧引起的 CA7 表达上调驱动的。碳酸酐酶 7 是一种利用二氧化碳和水合成碳酸氢盐的细胞质异构体。在神经元功能方面, 已确定在海马中, GABA_A 介导的神经兴奋依赖于

由胞浆碳酸酐酶活性维持的细胞内碳酸氢盐水平, CA7 与引起癫痫发作的异常海马神经活动有关。此外, CA7 在脊髓中表达主要在兴奋性神经元中, 与膜结合的 CA12 一起, 然而, CA7 基因敲除小鼠与对照组小鼠相比, 在伤害性感受行为方面没有表现出改变。值得注意的是, 这项研究探索了幼小的动物, 该研究的结果强调了 CA7 在这种情况下低水平表达。在缺氧引起的病理性疼痛状态下, 如糖尿病, 诱导 GABA 去抑制是诱导 CA7 依赖性感觉神经兴奋所必需的。

该研究提出了一种新的机制, 激活脊髓中的兴奋性神经网络来启动慢性疼痛。通过了解感觉神经网络内在的可塑性与特定疾病状态对躯体感觉神经系统的影响之间的关系, 可以极大地促进新型止痛药疗法的发展。

(Da Vitoria Lobo ME, Weir N, Hardowar L, *et al.* Hypoxia-induced carbonic anhydrase mediated dorsal horn neuron activation and induction of neuropathic pain. *Pain*, 2022, 163(11):2264-2279. 复旦大学附属华东医院, 李千译, 郑拥军 校)

• 消 息 •

2024 年《中国疼痛医学杂志》征稿与征订

《中国疼痛医学杂志》是由中华人民共和国教育部主管, 北京大学和中华医学会疼痛学分会共同主办的专业性学术期刊。报道有关疼痛基础研究和临床诊疗的综合性学术刊物。现已被中文核心期刊 (北京大学图书馆)、中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库 (CSCD) 来源期刊、世界期刊影响力指数 (WJCI) 报告等国内权威的文献检索系统收录。《中国疼痛医学杂志》诚邀您投稿、订阅。

投稿: 来稿可在杂志官网在线投稿 <http://casp.ijournals.cn>, 请署真实姓名、工作单位、职称, 附单位介绍信 (信中须注明未“一稿两投”、署名无争议、对文章内容的真实性负责、无泄密内容)。投稿时请注明通信作者、提供伦理审查批号及证明、基金资助信息, 以及详细的通信地址、邮编、联系电话、E-mail 等。衷心希望《中国疼痛医学杂志》成为您了解疼痛医学发展和发表科研成果的平台之一。

订购: 邮发代号: 82-832, 本刊为月刊, 大 16 开本, 80 页, 每册定价 32.00 元, 全年 12 期, 共 384.00 元。欢迎在当地邮局订阅或直接联系编辑部订阅。

编辑部地址: 北京市海淀区学院路 38 号, 北京大学医学部《中国疼痛医学杂志》编辑部

杂志官网: <http://casp.ijournals.cn>

联系电话: 010-82801712; 010-82801705

电子邮箱: pain1712@126.com

联系人: 赵 磊

