



• 学术动态 •

前边缘皮质调控自发性疼痛的神经元机制

摘 要 疼痛的神经机制研究不足限制了慢性疼痛治疗方法的发展。本研究报告了大鼠慢性炎症性疼痛中前边缘皮质内的一个独特的神经元群体,该群体特异性编码自发性疼痛相关的信号。该神经元群体专门编码与自发性疼痛相关的行为,不受其他运动和诱发行为的影响。激活该神经元群体会引发明显的自发性疼痛样行为,增强疼痛反应,而长时间抑制其活动则会减轻自发性疼痛,促进炎症性疼痛的整体恢复。值得注意的是,来自初级躯体感觉皮质和边缘下皮质的传入纤维双向调节自发性疼痛响应神经元群的活动和疼痛行为。这些发现揭示了疼痛在神经水平上的大脑皮质基础,突出了前边缘皮质中一个独特的神经元群及其相关的疼痛调节神经环路。

疼痛是一种与实际或潜在的组织损伤相关的不愉快的感觉和情绪情感体验,或与此相似的经历。在组织损伤的早期阶段,急性疼痛对于个体的生存具有重要的警示和保护意义,但持续存在的慢性疼痛可能会导致多维度的行为异常,给社会和经济带来沉重负担。大量证据表明,慢性疼痛并非仅仅是一种持续的伤害感受状态,而是通过中枢神经系统中逐渐发展的可塑性变化所形成的一种稳态失衡状态,这反映在自发脑活动的动态变化以及疼痛相关神经元活动的神经可塑性之中。

自发性疼痛在没有明显的外部原因或触发因素的情况下发生,通常处于持续波动的状态。持续的自发性疼痛会调节对外部刺激(如伤害性刺激和负面情绪)的诱发反应,从而影响疼痛的整体进程。在临床上,自发性疼痛仅存在于病理性疼痛的情况下,是病人最常遭受且最为严重的痛苦之一,严重影响了生活质量。传统疼痛研究受到技术限制,绝大多数的临床前疼痛研究和药物开发都是基于诱发而非自发性疼痛模型,这也是新型镇痛药在临床试验中屡屡失败的一个关键原因。

多个脑区在疼痛过程中会经历动态变化。初级躯体感觉皮质(primary somatosensory cortex, S1)和外侧丘脑始终对伤害性信号做出响应,而边缘系统与持续性自发性疼痛以及疼痛的慢性化关系更为紧密。特别注意的是,内侧前额叶皮质(medial prefrontal cortex, mPFC)在自发性疼痛中发挥着重要作用,并且与S1相比,在疼痛方面表现出独特的特征。mPFC中伽马波段(60~90 Hz)的神经振荡与正在经历的疼痛的主观感知呈正相关,而正在经历的疼痛强度则

通过mPFC的血氧水平依赖(blood oxygenation level dependent, BOLD)信号得以体现。在慢性炎症痛模型中,mPFC的腹侧,即下边缘皮质(infralimbic cortex, IL)在持续性自发性疼痛期间表现出活动异常以及与腹侧海马CA1的连接紊乱,修复这种功能障碍可缓解自发性疼痛并加速整体恢复。相比之下,mPFC的背侧,即前边缘皮质 prelimbic cortex, PL)已被证实编码与恐惧、学习以及感知相关的特定行为。值得注意的是,PL深层的兴奋性锥体神经元表现出内在的兴奋性和转录变化,并成为慢性疼痛中的关键因素。然而,仍然缺乏关于PL神经元群体参与编码和调节自发性疼痛行为的直接证据。在本研究中,通过综合运用对疼痛行为的纵向监测、在体电生理动态、基于活性的稳健活性系统(RAM)标记、光遗传学/化学遗传学操作以及病毒介导的环路追踪,确定了PL中一个专门编码自发性疼痛的神经元群体,并在患有慢性炎症性疼痛的大鼠中验证了其电生理特性、行为功能和回路结构。

作者通过足底注射完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)诱发大鼠的自发性疼痛行为,包括自发性爪抬起、舔舐和抽搐,在模型建立前以及建立后的1、3、7和14天进行监测。为了对与自发性疼痛相关的脑网络进行总体可视化,在炎症痛期间,纵向同步监测了包括PL、IL、伏隔核核心(AcbC)、伏隔核壳(AcbSh)、S1、丘脑背内侧核(medial-dorsal thalamic nucleus, MD)、背侧海马CA1(dorsal hippocampus CA1, dCA1)、基底外侧杏仁核(basolateral amygdala, BLA)、中央杏仁核(central amygdaloid nucleus, CeA)和腹侧海马CA1(ventral-



hippocampalCA1, vCA1) 在内的 10 个脑区的神经活动。格兰杰因果关系 (Granger causality, GC) 表征了脑区之间信息流向。值得注意的是, 在自发抬足期间, 从 PL 到所有其他区域的信息流显示出显著增加的 GC 值。除了 vCA1 外, 其他区域的功率谱密度 (power spectral density, PSD) 也在自发抬足期间呈现显著增加。相比之下, 在其他非疼痛的自发性行为, 如自我梳理或自主运动, 这些脑区的 GC 值和 PSD 功率变化有限。这些发现表明 PL 在介导炎症诱导的自发性疼痛行为中可能具有关键作用。

为了阐明 PL 在自发性疼痛中的神经元基础, 作者在自发抬足期间监测了 PL 和 IL 的神经元活动。首先, 在 CFA 注射后的早期阶段 (第 3 天), 当自发性疼痛明显时, PL 中 c-Fos (神经元活动的即时早期基因标记) 的表达增加, 而在 IL 中减少。在自发抬足期间, IL 锥体神经元的平均放电率降低, 而在 PL 中未观察到变化。考虑到不同神经元亚群的不同响应特性, 提取了在抬足期间表现出兴奋、抑制或中性响应的 PL 和 IL 中的神经元集合。有趣的是, 表现出兴奋响应的 PL 神经元的比例与自发性疼痛的水平一致, 在早期阶段 (1~3 天) 表现出强烈的抬足行为时比例更高。为了进一步确认它们在编码自发性疼痛中的作用, 在给予布洛芬 (一种常用的非甾体抗炎镇痛药) 时记录了 PL 神经元的活动。与自发抬足行为的缓解一致, 布洛芬显著抑制了 PL 中兴奋性响应神经元集合的活动, 体现在放电率的降低和比例的降低上。相比之下, 在其他自发性行为, 如自我梳理或运动期间, 未观察到此类变化。在注射 CFA 的雌性大鼠和具有保留性神经损伤 (spared nerve injury, SNI) 的雄性大鼠 (一种具有持续性自发性疼痛行为的神经病理性疼痛模型) 中也观察到了类似的神经元集合, 这表明在不同性别和不同的慢性疼痛模型中都存在对自发性疼痛响应的神经元集合。

PL 神经元集合在自发性疼痛中存在独特的编码策略。作者将神经元响应模式与其他自发性行为或诱发行为进行了比较。首先, 评估了对自发抬足响应的神经元集合与对运动或自我梳理响应的神经元集合之间的重叠, 超几何概率分布显示这两个比较之间的重叠度较低。接下来, 评估了编码自发抬足和其他诱发行为的神经元集合之间的重叠。与编码诱发行为的神经元集合之间的一些高重叠不同, 编码自发抬足和大多数诱发行为的神经元集合之间观察到低重叠。在雌性 CFA 大鼠中进行了相同的实验, 并证实了编码自发抬足和诱发疼痛行为的神

经元集合的分离分布。

进一步探究该群 PL 神经元是否因果性地编码自发性疼痛行为, 采用由 RAM 启动子 (一种具有强活动依赖性诱导特征的合成启动子) 驱动的 ChR2, 对自发疼痛期间激活的 PL 神经元予以标记。该标记流程依赖多西环素 (Dox) 来把控制标记时间窗口。RAM 的活动依赖性启动子所控制的四环素控制转激活剂 (tTA) 通过与 tTA 响应启动子元件 (TRE) 相结合, 促使 ChR2 等得以表达, 而 Dox 会抑制这一表达过程。故而, 使大鼠脱离 Dox (Dox OFF) 能够开启一个有限的时间窗口, 用于标记处于给定行为状态下激活的神经元群。通过此方式, 首先对大鼠进行足底内注射 CFA, 而后撤去 Dox, 借此以 ChR2 和 EGFP 的表达来标记 CFA 诱导的自发性疼痛激活的神经元群。多数被标记的 PL 神经元处于深层, 且主要由兴奋性神经元 (EAAC1⁺) 组成 (99.21±0.66%)。在整个 PL 神经元群体中, 16.46%±1.21% 的谷氨酸能神经元因自发性疼痛被激活, 并被 RAM 系统标记。为确认 RAM 系统的特异性, 在标记大鼠的 PL 中开展了光电极记录。为识别被标记的神经元, 施加 1 Hz 的蓝光来激活 RAM 阳性神经元。17.8% 的记录神经元被光标记, 其中 62.3% 和 37.7% (分别占有所有记录神经元的 11.1% 和 6.7%) 为自发抬足兴奋性和中性响应神经元, 这表明了 RAM 标记的高效性。基于 1 Hz 光刺激后神经元活动的变化, 所记录的神经元可被划分为 21 个符合标记标准的神经元、56 个无关神经元 (1 Hz 刺激后放电率无显著变化) 和 46 个相关神经元 (1 Hz 刺激后出现延迟抑制)。接下来, 应用在后续行为实验中所采用的 20 Hz 光刺激方案。正如预期, 在光刺激期间, 标记神经元的平均活动增加, 而相关神经元的活动减少, 无关神经元则无显著变化, 从而证实了分类的准确性。

随后, 通过光遗传学激活自发性疼痛标记的神经元来表征 PL 神经元的伤害性反应动态。与自发性疼痛行为的神经元特异性相符, 激光伤害性刺激对标记神经元的神经反应无影响, 而相关神经元的放电频率显著增加 (通过 z 评分的变化体现)。此外, 还测量了伤害性刺激诱导的伽马振荡, 发现激活光标记神经元后, 伤害性刺激诱导的伽马振荡增强。

那么, 这群神经元又具备怎样的行为学功能? 首先, 激活这些神经元会引发强烈的自发性疼痛样行为, 遵循先前的标记策略, 激活自发性疼痛标记的 PL 神经元群会立即引发强烈的抬足行为, 同时不影响其他自发行为; 激活该 PL 神经元群引发



的自发性疼痛进一步通过实时位置厌恶 (real-time place avoidance, RTPA) 得到证实, 即光刺激配对侧的停留时间减少; 有趣的是, 在 RTPA 测量的测试期间, 观察到光刺激下大鼠的排便次数显著增加, 这也反映了情绪厌恶。其次, 鉴于激活标记神经元群对伤害性神经元反应的影响以及自发性疼痛对诱发疼痛的强烈影响, 调节自发性疼痛神经元群也会影响诱发疼痛行为。最后, 考虑到持续性自发疼痛对神经可塑性的显著影响, 长期抑制 PL 中的自发性疼痛神经元群将促进炎症性疼痛的整体恢复, 将标记的 PL 神经元群用含有 hM4Di 的病毒转染 (hM4Di 是一种人工设计的受体, 可被设计药物 CNO 选择性抑制), 观察到自发抬足时间显著减少以及对 CNO 配对腔室的强烈偏好; 对于诱发疼痛, 短暂和持续的抑制均能减轻炎症性疼痛中的热痛觉超敏和机械性异常疼痛; 该策略加速了热痛觉超敏和机械性异常疼痛的恢复。值得注意的是, PL 神经元群的激活或抑制均不影响运动或类似焦虑的行为。综上所述, 这些发现表明标记的 PL 神经元群在自发疼痛中具有因果作用, 并调节疼痛的整体进程。

PL 与其他脑区之间存在着大量的传入和传出连接, 由此构建起一个疼痛调节网络。特定的上游区域是否向 PL 的自发性疼痛响应神经元群传递伤害性信息或者对其活动予以调控? 为了回答该问题, 依据功能连接性数据对格兰杰连接性的量化, 结果显示 PL 至其他区域的信息流存在显著且广泛的变化, 然而在相反方向上, 仅有 S1 和 IL 至 PL

的信息流呈现显著差异。为明晰 S1 和 IL 对 PL 的直接神经支配状况, 将携带 Cre (AAV1-Cre) 的逆行病毒注入 S1 或 IL, 其通过跨突触方式与注入 PL 的 Cre 依赖性病毒协同转染 PL 神经元。这些投射还通过 Ai9 小鼠的逆行示踪剂进行了检测。然而接受来自 S1 和 IL 直接投射的 PL 神经元, 多数未与由 RAM 系统标记的 PL 神经元共同标记, 这意味着被标记的 PL 神经元群是间接受到 S1 和 IL 调控的。作者选择激活 S1 和 IL 通路的投射末梢, 并通过光电极记录来观察自发性疼痛响应的 PL 神经元群的活动变化。S1 至 PL 末梢的激活提升了兴奋性响应神经元群的平均放电率, 但对抑制性反应神经元群并无影响; 相反, IL 至 PL 轴突末梢的激活降低了兴奋性反应神经元群的平均放电率, 但对抑制性反应神经元群也无影响。总体来讲, 增强脑区之间的功能连接能够对自发性疼痛标记的神经元活动进行调节。进一步, 对 S1 → PL 和 IL → PL 通路在疼痛行为方面的贡献进行了评估。与电生理研究结果相符, 激活 S1 → PL 通路加重了自发和诱发的疼痛行为; 相反, 激活 IL → PL 通路减少了自发性抬足的时长, 并缓解了热痛敏和机械痛敏。这些数据表明, S1 和 IL 对 PL 神经元群的活动和疼痛行为具有相反的调节作用。

(Ma LY, Yue LP, Liu ST, *et al.* A distinct neuronal ensemble of prelimbic cortex mediates spontaneous pain in rats with peripheral inflammation. *Nat Commun*, 2024, 15(1):7922. 北京大学神经科学研究所, 马龙雨 译)

《中国疼痛医学杂志》编辑部

地址: 北京市海淀区学院路 38 号, 北京大学医学部

联系电话: 010-82801712; 010-82801705

电子邮箱: pain1712@126.com

杂志官网: <http://casp.ijournals.cn> 在线投稿

微信公众平台号: 中国疼痛医学杂志 (cjpm1712)

