

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2025.08.004

• 论 著 •

背根神经节感觉神经元 Dock4 缺失上调 Piezo1
表达调控机械性瘙痒 *左诗雨¹ 周子苏² 刘瑾鹏³ 何 颖¹ 王书航² 谢 彦³ 唐 好⁴ 张晓龙^{1,3,△}

(¹华南理工大学医学院, 广州 510006; ²中山大学中山医学院, 广州 510080; ³广东省心血管病研究所, 南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)医学研究部, 广州 510080; ⁴中山大学肿瘤防治中心麻醉科, 广东省肿瘤学国家重点实验室, 广州市肿瘤临床研究中心, 广州 510060)

摘 要 目的: 探究胞质分裂作用因子 4 (dedicator of cytokinesis 4, Dock4) 在瘙痒中的作用及其潜在的调控机制。**方法:** 通过鞘内注射 AAV-Cre 病毒实现条件性敲除背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 神经元中的 Dock4。利用行为学测试观察敲除 Dock4 后对小鼠机械性瘙痒、痒觉易化、组胺能化学性瘙痒和非组胺能化学性瘙痒的影响。通过蛋白免疫印迹 (Western Blotting, WB) 检测 Dock4 敲除后 Piezo1 蛋白在 DRG 中的表达变化。免疫荧光 (immunofluorescence, IF) 检测 Dock4 与 Piezo1 的共定位以及 Dock4 敲除后对 Piezo1 表达的影响。**结果:** 敲除 DRG 神经元中的 Dock4, DRG 神经元中 Piezo1 的表达显著上调, 且小鼠的机械性瘙痒行为明显增多。此外, Dock4 的缺失对氯喹 (chloroquine, CQ) 引起的非组胺能化学性瘙痒具有一定的抑制作用, 但不影响组胺 (histamine, His) 引起的组胺能化学性瘙痒及白细胞介素-31 (interleukin-31, IL-31) 引起的非组胺能化学性瘙痒。**结论:** 缺失 Dock4 显著上调 DRG 神经元中 Piezo1 的表达, 增强小鼠的机械性瘙痒。

关键词 Dock4; 机械性瘙痒; 化学性瘙痒; Piezo1

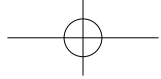
Dock4 deficiency in dorsal root ganglion sensory neurons upregulates Piezo1 expression to modulate mechanical itch *ZUO Shi-yu¹, ZHOU Zi-su², LIU Jin-kun³, HE Ying¹, WANG Shu-hang², XIE Yan³, TANG Hao⁴, ZHANG Xiao-long^{1,3,△}

(¹ School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; ² Zhongshan School of Medicine of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; ³ Guangdong Cardiovascular Institute, Guangdong Provincial People's Hospital (Guangdong Academy of Medical Sciences), Southern Medical University, Guangzhou 510080, China; ⁴ Department of Anesthesiology, Sun Yat-sen University Cancer Center, State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangdong Provincial Clinical Research Center for Cancer, Guangzhou 510060, China)

Abstract Objective: This study aims to elucidate the role of dedicator of cytokinesis 4 (Dock4) in the modulation of itch and its underlying regulatory mechanisms. **Methods:** Conditional knockout of Dock4 in dorsal root ganglion (DRG) neurons was achieved via intrathecal injection of AAV-Cre virus. Behavioral assessments were conducted to evaluate the impact of Dock4 deletion on mechanical itch responses, allodynia, histaminergic chemical itch, and non-histaminergic chemical itch in mice. Western blotting analysis was utilized to assess changes in Piezo1 expression in DRG following Dock4 knockout. Additionally, immunofluorescence was performed to examine the co-localization of Dock4 and Piezo1, as well as the effects of Dock4 deficiency on Piezo1 expression levels. **Results:** Knockout of Dock4 in DRG neurons led to a pronounced upregulation of

* 基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82001172)

△ 通信作者 张晓龙 zhangxiaolong@gdph.org.cn



Piezo1 expression in DRG and significantly amplified mechanical itch behavior in mice. Moreover, dock4 knockout partially mitigated non-histaminergic chemical itch induced by chloroquine (CQ), but did not influence histaminergic chemical itch triggered by histamine (His) or non-histaminergic chemical itch induced by interleukin-31 (IL-31). **Conclusion:** The absence of Dock4 significantly enhances Piezo1 expression in DRG neurons and exacerbates mechanical itch in mice, indicating a crucial role for Dock4 in the regulation of itch sensitivity.

Keywords Dock4; mechanical itching; chemical itching; Piezo1

瘙痒 (pruritus) 是一种令人不愉快的感觉, 通常会激发个体产生抓挠的欲望。它既是一种生理现象, 也可能是多种疾病的临床表现。瘙痒不仅限于皮肤病, 还可以在多种全身性疾病 (胆道梗阻、慢性肾衰竭等)、传染病 (病毒感染、真菌感染) 和神经系统疾病 (脊髓损伤、多发性硬化症) 中出现^[1,2]。流行病学数据显示, 普通人群中瘙痒的患病率为 8%~38%, 瘙痒症严重者有溃烂和毁容的风险, 严重影响病人的生活质量^[1-3]。

根据引起瘙痒刺激源的不同, 瘙痒可分为化学性瘙痒和机械性瘙痒^[4]。化学性瘙痒一般由内源性或外源性物质触发^[5]。机械性瘙痒是由外部物理刺激引起的瘙痒, 通常是由轻微的触碰、压力、摩擦或振动等机械性刺激触发^[6]。与被广泛研究的化学性瘙痒途径相比, 机械性瘙痒的传导机制在分子和细胞层面很大程度上是未知的。在慢性皮肤病 (如特应性皮炎和神经性皮炎) 及神经病理性瘙痒的病人中, 机械性刺激往往加重症状, 延长病程, 导致生活质量显著下降^[7]。然而, 关于机械性瘙痒的研究仍相对较少, 且缺乏针对性的有效治疗手段。因此, 探索机械性瘙痒的分子机制和神经回路, 特别是皮肤感受器和脊髓中枢的作用, 具有重要的基础医学意义。随着 Piezo2、TRPV4 等机械感受体的发现^[8], 研究者们逐步揭示了机械性刺激在瘙痒发生中的作用, 为理解其发病机制提供了新的理论依据。尽管现代医学在治疗慢性皮肤病和神经病理性瘙痒方面取得了一定进展, 但疗效仍然有限。许多病人依赖抓挠等行为来暂时缓解症状, 但这一行为不仅可能加重皮肤损伤, 还可能形成瘙痒的恶性循环。因此, 深入研究机械性瘙痒的基础机制, 对于理解皮肤感知和神经反应过程、开发新的治疗策略, 改善病人生活质量, 具有重要的现实意义。

Dock (Dedicator of cytokinesis) 家族, 是一类胞质分裂作用因子, 其包含 11 个成员即 Dock1-Dock11。根据其序列的同源性, Dock 被分为 4 个亚类, 分别为 Dock-A (包括 Dock1、Dock2 和 Dock5)、Dock-B (包括 Dock3 和 Dock4)、Dock-C (包括 Dock6, Dock7 和 Dock8) 和 Dock-D (包括 Dock9、Dock10 和

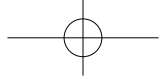
Dock11)。除了 DHR1 和 DHR2 结构域外, Dock-A 和 Dock-B 还包含 1 个 Src 同源结构域 (SH3) 和 1 个富含脯氨酸的结构域, 提示其在体内可能发挥不同于其他成员的独特功能^[9]。胞质分裂作用因子 4 (dedicator of cytokinesis 4, Dock4) 属于 Dock-B 亚类, 是一种广泛表达于神经系统的重要分子^[10], 作为 Rho GTP 酶激活蛋白 (RhoGEF), Dock4 通过调节小 GTP 酶 Rho 家族蛋白的活性, 在神经系统中发挥多种关键作用, 包括参与神经元发育^[11]、突触形成^[12]和调控神经系统功能^[13]等。研究表明, Dock4 通过调控细胞骨架的动态变化从而影响神经元在发育过程中的迁移和定位^[14]。此外, Dock4 还通过调节突触前端的小 GTP 酶活性, 对突触的形成、稳定性及神经递质的释放起到重要的作用^[15]。除了调控正常的神经发育, Dock4 的异常表达或功能失调与多种神经系统疾病相关。研究表明, Dock4 与一些神经性精神疾病, 如孤独症 (autism spectrum disorder, ASD)、阅读障碍症 (reading disorder, RD)、精神分裂症 (schizophrenia, SZ) 等有关^[16-19]。也有研究显示, ASD 病人常伴有异常的痒觉感知^[20]。但迄今为止, Dock4 是否对瘙痒有调控作用尚不清楚。

基于此背景, 本研究建立多种瘙痒动物模型, 旨在探究 Dock4 对机械性和化学性瘙痒的作用。揭示 Dock4 在背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 中对机械性瘙痒的调控作用, 还深入探讨了其通过电压型机械敏感离子通道组件 1 (piezotype mechanosensitive ion channel component 1, Piezo1) 调节机械性瘙痒的分子机制, 为基础研究和临床治疗提供了新的视角。这一发现为瘙痒的分子机制及其治疗策略, 特别是在机械性相关瘙痒方面, 开辟了新的研究领域。

方 法

1. 实验动物及分组

雄性 C57BL/6 小鼠 100 只, 6~8 周, 由中山大学实验动物中心提供。Dock4^{fllox/fllox} 小鼠购自赛业生物科技有限公司 (动物许可证号: SCXK (粤) 2020-0055)。小鼠随机分组, 分笼饲养, 自由饮食饮水,



控制室内温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ，室内相对湿度 50%~60%，按照动物生物节律进行 12 小时光照/黑暗循环照明。实验过程按照国家有关动物实验规定进行操作并尽量减轻实验动物的痛苦，本研究获得中山大学实验动物管理与使用委员会 (IACUC) 批准 (伦理审批号: KY-D-2020-094-03)。小鼠适应行为学测试 3 天后用于正式实验。雄性 Dock4^{flox/flox} 小鼠被随机分为 2 组，每组 11 只: 对照组: 鞘内注射 10 μl 空载体病毒 AAV-hSyn-GFP (1.0E + 12 vg/ml); Dock4 敲除组: 鞘内注射 10 μl AAV-hSyn-Cre-GFP (1.0E + 12 vg/ml), 21 天后, 可用于后续实验。

2. 药品

组胺 (histamine, His) (H7250-5G, 北京沃凯生物科技有限公司) 用无菌生理盐水 (4C210704016, 山东齐都药业有限公司) 配成 2 mg/ml, 现用现配; 氯喹 (chloroquine, CQ) (C6628, Sigma-Aldrich) 用无菌生理盐水配成 4 mg/ml, 现用现配。

3. 鞘内注射

使用 2% 异氟烷 (R510, RWD/瑞沃德) 吸入麻醉实验小鼠, 待小鼠深度麻醉后, 背部剃毛备皮, 碘伏消毒后, 开背暴露 L₆ 棘突, 用针头刺入 L₄₋₅ 间隙蛛网膜下腔, 针头进入正确位置小鼠尾巴会轻微摆动, 拔出针头同时用弯镊夹住一段 15 cm 左右的 PE-10 管慢慢插入先前针头刺入的小孔, PE-10 管缓慢推入约 1 cm, 若 PE-10 管内见脑脊液流出, 提示置管正确。用微量进样器给予 10 μl 配置好的溶液, 停留 8 分钟后拔出 PE-10 管, 止血, 分层缝合肌肉和皮肤, 消毒。术后常规条件喂养, 21 天后病毒浸染成功, 用于后续实验。

4. 行为学测试

(1) 化学痒行为学测试: 化学性瘙痒主要是由特定化学物质的作用通过激活皮肤中的感受器或神经通路引起的。本研究使用了 3 种化学性瘙痒模型, CQ 模型: 通过 CQ 抑制免疫细胞功能, 主要研究药物性瘙痒。白细胞介素-31 (interleukin-31, IL-31) 模型: 通过注射 IL-31, 模拟与免疫相关的慢性瘙痒, 常用于特应性皮炎等过敏性皮肤病。His 模型: 通过 His 引发的快速免疫反应, 主要用于研究过敏反应和抗组胺药物效果。将小鼠随机分为对照组和实验组, 并于实验开始前 2 天颈背部剃毛备皮, 适应 2 天后用于后续造模。造模前 2 天, 将小鼠置于透明玻璃盒内, 每天 1 小时适应时间。实验当天在小鼠颈背部注射致痒剂 50 μl (CQ 4 mg/ml; His 2 mg/ml; IL-31 0.2 $\mu\text{g/ml}$), 并拍摄记录 30 分钟瘙痒行为学。

(2) 机械痒: 机械痒是指由物理刺激引起的痒

感。小鼠剃去颈背部毛发, 并在实验开始前 1 周将小鼠置于 10 cm×10 cm×10 cm 的亚克力盒中适应环境, 实验当天用 0.008 g~1 g 的 von Frey 纤维丝在颈背部进行 5 次机械刺激, 记录每个刺激是否具有阳性反应和次数, 即针对机械刺激部位的后肢抓挠反应次数, 同一只小鼠第 1 次刺激中间间隔 5 秒后进行第 2 次刺激, 计算 5 次刺激小鼠的总抓挠反应次数和阳性反应率。

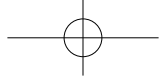
(3) 痒觉易化: 痒觉易化指皮肤、神经或大脑的感知系统对痒觉的反应方式发生变化, 可能表现为对某些正常刺激产生异常强烈或不同寻常的痒感。例如在无明确外部刺激的情况下产生痒觉。剃除小鼠颈背部毛发, 并于实验开始前 1 周将小鼠置于 10 cm×10 cm×10 cm 的亚克力盒中适应环境。实验当天在小鼠颈背部皮内注射 50 μl His (2 mg/ml), 于 30 分钟后进行机械瘙痒测试。用 0.008 g~1 g 的 von Frey 纤维丝在注射点周围进行 5 次机械刺激, 记录每个刺激是否具有抓挠的阳性反应和次数, 即针对机械刺激部位的后肢抓挠反应次数, 同一只小鼠第 1 次刺激中间间隔 5 秒后进行第 2 次刺激, 计算 5 次刺激小鼠的总抓挠反应次数和阳性反应率。

5. 免疫荧光

取 0.01M 磷酸盐缓冲盐水 (phosphate buffered saline, PBS) 快速冲净血液后, 再灌注 20 ml 4% 多聚甲醛溶液 (biosharp, BL539A) 进行 1 小时前固定。随后转入质量分数为 30% 蔗糖溶液脱水至沉底。用冰冻切片机 (LEICA CM1900) 将脱水沉底后的 DRG 组织切成 16 μm 薄组织片, 切好的组织片内加入 0.01M PBS, 置于摇床上快摇洗 3 次 (每次 10 分钟), 加入封闭液 (P0102, 碧云天) 常温慢摇 1 小时后, 加入一抗 (Dock4-Ms, Santa, S3878, 1:200; Piezo1-Rb, BISS, Fam38a, 1:200) 4 $^\circ\text{C}$ 过夜。次日用 0.01M PBS 洗 3 遍 (每次 10 分钟), 加入二抗 (cy3-Rb, Jackson, 711-165-152, 1:200; 488-Ms, 英潍捷基, A212, 1:200), 室温条件下避光孵育 1 小时。0.01M PBS 洗 3 次 (每次 10 分钟), 加入封片剂 (DAPI Fluoromount-G, TIJUMP/天骏, 0100-20) 封片, 等待玻片干燥, 放置在倒置荧光显微镜 (DMIRB, Leica) 下观察并成像。

6. 蛋白免疫印记

使用 30 ml 0.01M PBS 快速冲净血液后解剖小鼠, 并迅速取出 DRG 组织 RIPA 裂解液 (P0013B, 碧云天) 中 100:1 加入蛋白磷酸酶抑制剂 PMSF (36978, 英潍捷基 (上海) 贸易有限公司) 混合后取 100 μl 加入 DRG 组织中, 冰上裂解 10 分钟后超声匀化, 转入 4 $^\circ\text{C}$ 离心机 (fresc021, 赛默飞 Thermo),



10,000×g 离心 20 分钟后取蛋白上清液。BCA 蛋白定量试剂盒 (23227, Thermo Fisher) 进行蛋白定量, 取等量蛋白上样。SDS-PAGE-凝胶 (TGX FastCast Acrylamide Kit, 10%, 1610183, BIO-RAD/伯乐) 电泳 80 V, 30 分钟后换为 60 分钟, 电泳结束后将凝胶转至 PVDF 膜 (IPVH00010, Millipore) 上, 200 mA, 250 分钟恒流转膜。然后将 PVDF-膜放入 BSA-TBST-溶液 (5%) 室温慢摇封闭 1 小时后, 加入一抗 (Dock4-Rb, Santa, S3878, 1:1000; Piezo1, BIOS, Fam38a, 1:1000) 4℃ 孵育过夜。次日 TBST-溶液洗膜 3 次 (每次 10 分钟)。加入相应二抗室温慢摇孵育 1 小时, TBST-溶液洗膜 3 次 (每次 10 分钟)。用超灵敏化学发光液 (Omni-ECL 超灵敏化学发光检测试剂盒, 雅酶, SQ201) 在多功能成像仪中进行曝光。最后用 ImageJ 软件对目的蛋白条带进行灰度值分析, 记录数值并统计。

7. 统计学分析

行为学测试数据使用 Graphpad Prism 9.0 软件的 two-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni post hoc test 方法进行分析。两组计量资料的均数比较, 如每组资料均正态分布且方差齐性, 组间比较采用 *t* 检验。使用 CorelDRAW X5 及 GraphPad Prism 9.0 做图。ImageJ 软件定量分析免疫染色图片, 组间比较采用 *t* 检验, 以均数 ± 标准误 ($\bar{x} \pm SEM$) 表示。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

1. 注射 AAV-Cre 显著降低 DRG 神经元中 Dock4 的表达

Dock4^{flax/flax} 小鼠是一种条件性基因敲除小鼠模型, 其中 Dock4 基因被两端插入 LoxP 位点 (floxed), 允许通过 Cre 重组酶特异性地在目标组织或细胞中删除该基因。首先, 通过在 Dock4^{flax/flax} 小鼠鞘内注射神经元特异性的 AAV-Cre-GFP 病毒 (hSyn-Cre-GFP) 来实现条件性敲除 DRG 神经元中的 Dock4 (见图 1A)。病毒感染 21 天后使用蛋白免疫印记和免疫荧光组织化学技术检测 Dock4 在 DRG 中的表达情况。结果发现注射 AAV-Cre-GFP 21 天后 DRG 神经元有显著的绿色荧光蛋白表达 (见图 1B), 表明 AAV 成功侵染了 DRG 神经元。进一步研究结果显示, 在注射 AAV-Cre-GFP 21 天后, DRG 组织中 Dock4 蛋白的表达水平显著降低 (见图 1C, 1D)。提示注射 AAV-Cre 可以有效降低 DRG 神经元中

Dock4 的表达。

2. 条件性敲除 DRG 神经元中 Dock4 增强小鼠的机械性瘙痒

评估敲除 Dock4 对机械性瘙痒的影响, 使用 0.008 g~1 g 的 von Frey 纤维丝对小鼠颈背部进行 5 次机械刺激, 记录小鼠的抓挠行为次数和阳性反应率。结果显示, 在使用 0.04 g、0.16 g 和 0.4 g von Frey 纤维丝进行刺激时, AAV-Cre 注射小鼠的抓挠次数明显高于 AAV-GFP 注射小鼠 (见图 2A)。尽管在其他克数的 von Frey 纤维丝刺激下, Dock4 敲除组与对照组的差异无统计学意义 (组间比较采用 *t* 检验, $P = 0.1929$), 但仍表现出一定的增加趋势 (见图 2A)。同样地, 0.04 g、0.16 g 和 0.4 g von Frey 纤维丝进行机械刺激的情况下, AAV-Cre 注射小鼠的抓挠阳性率也显著高于 AAV-GFP 注射小鼠 (见图 2B)。而在其他克数的刺激下, Dock4 敲除组与对照组的差异无统计学意义 (组间比较采用 *t* 检验, $P = 0.2481$), 但同样存在一定的增加趋势 (见图 2B)。这些结果表明, 在 DRG 感觉神经元中敲除 Dock4 能够增强小鼠的机械瘙痒反应。

3. 条件性敲除 DRG 神经元中的 Dock4 缓解 CQ 引起的化学性瘙痒

为了进一步探讨 Dock4 在化学性瘙痒中的作用, 使用 CQ、IL-31 诱导非组胺能瘙痒, His 诱导组胺能瘙痒, 来研究敲除 Dock4 对化学性瘙痒的调控作用。在颈背部皮肤注射 CQ 后, Dock4 敲除小鼠 CQ 诱导的化学性瘙痒在 CQ 注射早期 (5~10 分钟内) 显著减轻。统计分析 30 分钟内总的抓挠次数, 结果显示与对照组相比 Dock4 敲除小鼠的总抓挠次数降低 (见图 3A, 3B)。然而, 敲除 Dock4 不影响 IL-31 诱导的非组胺能瘙痒 (见图 3C, 3D), 以及组胺 (His) 诱导的组胺能瘙痒 (见图 3E, 3F)。以上结果提示, 敲除 DRG 神经元中的 Dock4 能够减轻 CQ 引起的非组胺能瘙痒的发生。

4. 条件性敲除 DRG 神经元中的 Dock4 增加 His 诱导的痒觉易化

为进一步探讨 Dock4 在病理性机械性瘙痒中的作用, 对注射了 AAV-GFP 的小鼠和 Dock4 敲除小鼠给予 His 颈背部皮下注射, 并在 30 分钟后对机械痒觉易化行为学进行测试。在 0.02 g、0.04 g 和 0.07 g von Frey 纤维丝刺激下, AAV-Cre 小鼠表现出较 AAV-GFP 小鼠显著增加的痒觉易化反应 (见图 4A)。同时, Dock4 敲除小鼠痒觉易化的阳性率也显著升高 (见图 4B)。这些结果表明, 条件性敲除 DRG 神经元中的 Dock4 增加 His 诱导的痒觉易化。

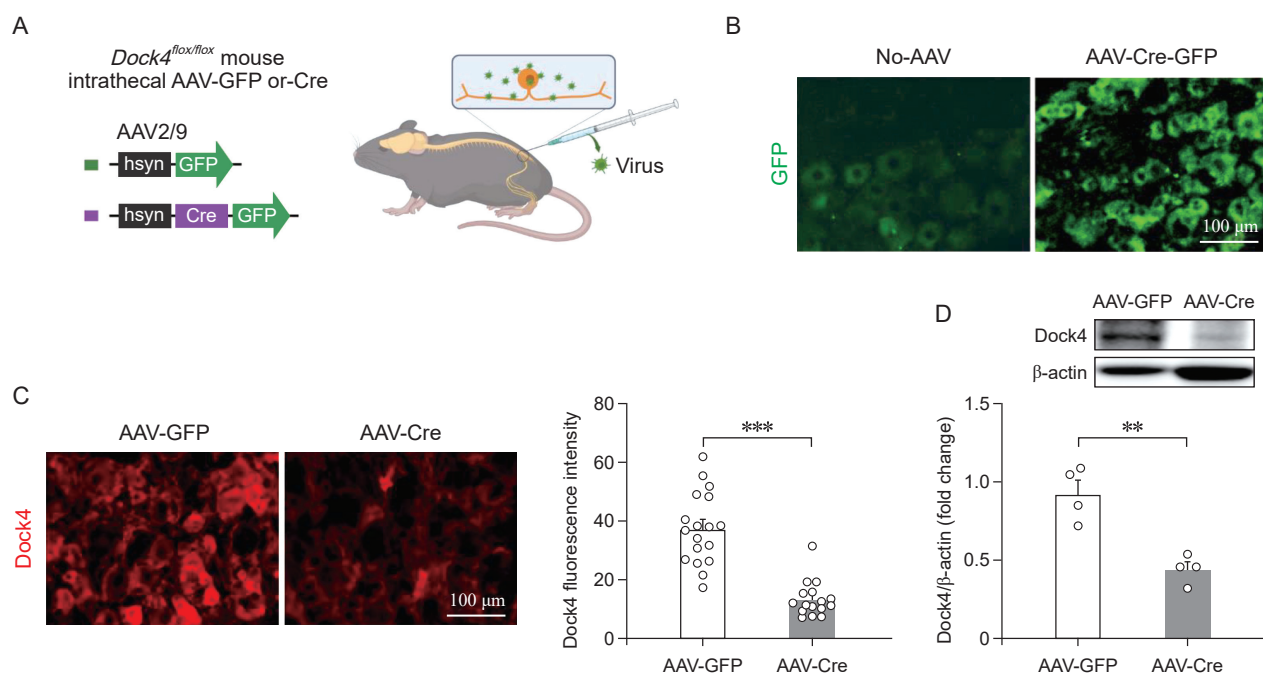


图1 AAV-Cre 病毒侵染后 Dock4^{flox/flox} 小鼠 DRG 内 Dock4 表达水平检测

(A) Dock4^{flox/flox} 小鼠分别鞘内注射 AAV2/9-hSyn-GFP (AAV-GFP) 及 AAV2/9-hSyn-Cre-GFP (AAV-Cre) 腺相关病毒; (B) 小鼠鞘内注射 AAV-Cre-GFP 21 天后, DRG 神经元中绿色荧光蛋白的表达情况 (标尺 = 100 μm); (C) 免疫荧光检测鞘内注射 AAV-GFP、AAV-Cre 对 Dock4^{flox/flox} 小鼠 DRG 中 Dock4 表达水平的影响 (n = 15~18 神经元/组, 标尺 = 100 μm); (D) Western Blot 检测鞘内注射 AAV-GFP、AAV-Cre 对 Dock4^{flox/flox} 小鼠 DRG 中 Dock4 表达水平的影响 (n = 4 只小鼠/组)

P < 0.01, *P < 0.001, 与 AAV-GFP 组相比

Fig. 1 Assessment of Dock4 expression levels in the DRG of Dock4^{flox/flox} mice following AAV-Cre viral infection

(A) Dock4^{flox/flox} mice were intrathecally injected with AAV2/9-hSyn-GFP (AAV-GFP) or AAV2/9-hSyn-Cre-GFP (AAV-Cre) adeno-associated viruses. Behavioral and molecular biological analyses were conducted 21 days post-injection; (B) Expression of green fluorescent protein (GFP) in DRG neurons 21 days after intrathecal injection of AAV-Cre-GFP (Scale bar = 100 μm); (C) Immunofluorescence analysis of Dock4 expression levels in the DRG of Dock4^{flox/flox} mice following intrathecal injection of AAV-GFP or AAV-Cre (n = 15-18 neurons/group. Scale bar = 100 μm); (D) Western Blot analysis of the impact of intrathecal injection of AAV-GFP or AAV-Cre on Dock4 expression levels in the DRG of Dock4^{flox/flox} mice (n = 4 mice/group).

P < 0.01, *P < 0.001, compared with AAV-GFP group.

5. Dock4 敲除后增加感觉神经元中 Piezo1 的表达

Piezo1 是 Piezo 家族中的一员, 近年来的研究发现, Piezo1 蛋白表达于神经系统^[21,22], 特别是在负责感知机械刺激的神经末梢中^[23]。可感知来自外部环境或内部的机械性刺激。当 Piezo1 蛋白的活性增加时, 神经末梢对轻微的机械刺激可能更为敏感, 而引发机械性瘙痒感觉^[24]。那么, Dock4 是否可能通过调控 Piezo1 来影响机械性瘙痒感知呢? 本研究采用免疫荧光法对小鼠 DRG 组织切片进行双重免疫荧光染色, 发现 Dock4 与 Piezo1 在 DRG 感觉神经元中呈现共定位现象 (见图 5)。在对小鼠 DRG 神经元的单细胞 RNA 测序数据进行分析时, 发现 Dock4 和 Piezo1 在 DRG 神经元的簇中有表达

且分布重合, 结合数据库中神经元分类分布图, 紫色方框中的区域主要为降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 相关类神经元 (见图 6)。上述结果表明 Dock4 与 Piezo1 存在共定位, 而两者的调控关系通过进一步研究发现, 敲除 DRG 神经元中的 Dock4 可以显著提高 Piezo1 的表达 (见图 7A, 7B)。以上结果提示, 敲除 Dock4 增加感觉神经元中 Piezo1 的表达, 可能是其调控机械性瘙痒的机制。

讨 论

本研究建立多种瘙痒动物模型, 探究 Dock4 对机械性瘙痒和化学性瘙痒的作用及其调控机制。研

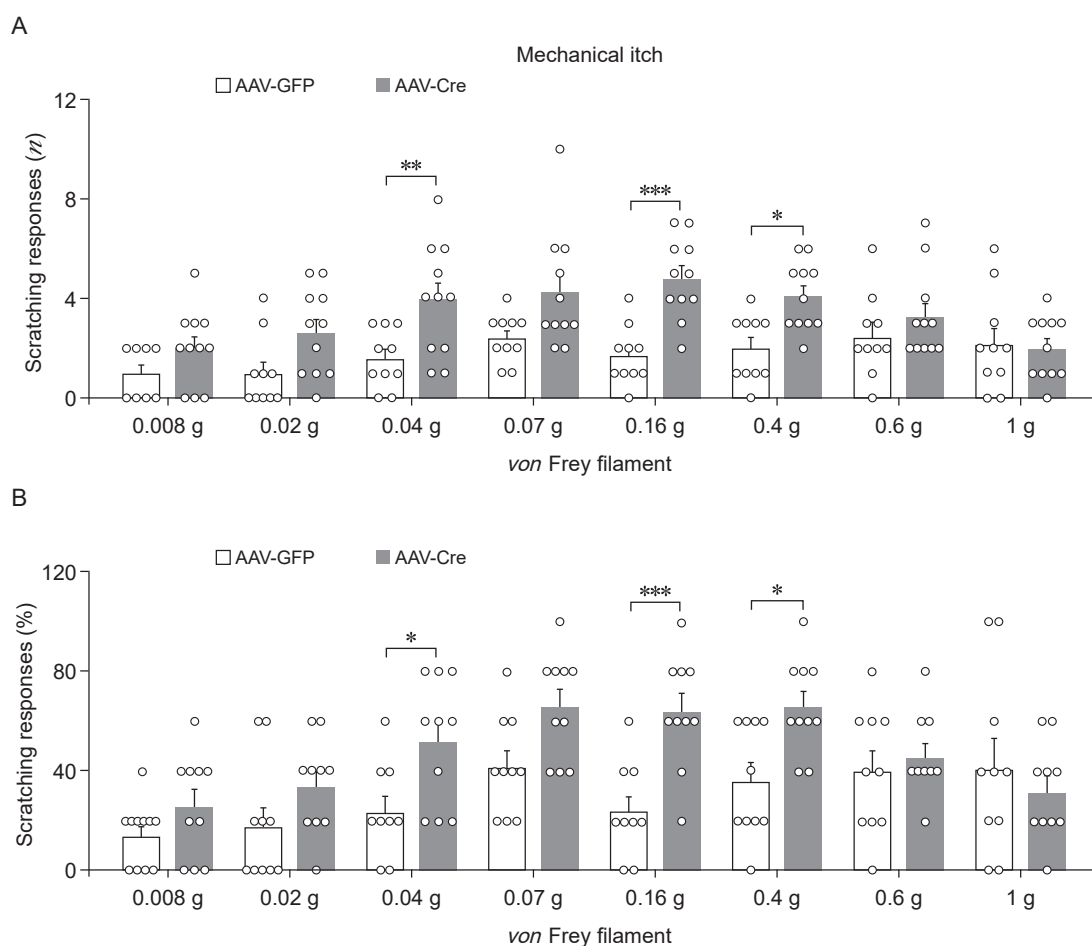


图 2 条件性敲除 DRG 神经元中 Dock4 增强小鼠的机械性瘙痒
0.008 g~1 g 的 von Frey 纤维丝刺激注射了 AAV-GFP、AAV-Cre 的 Dock4^{flox/flox} 小鼠颈部, 测试机械刺激后 (A) 小鼠抓挠次数和 (B) 小鼠阳性反应率 ($n = 11$ 只小鼠/组)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与 AAV-GFP 组相比

Fig. 2 Conditional knockout of Dock4 in DRG neurons enhances mechanical pruritus in mice

Dock4^{flox/flox} mice were intrathecally injected with either AAV-GFP or AAV-Cre at the cervical level, followed by mechanical stimulation using von Frey filaments with forces ranging from 0.008 g to 1 g. The number of scratching events (A) and the positive response rate (B) to mechanical stimuli were recorded ($n = 11$ mice/group).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with AAV-GFP group.

究发现, 敲除 DRG 中的 Dock4 可显著增强小鼠的机械性瘙痒行为, 上调 DRG 神经元中 Piezo1 的表达, 并对 CQ 引起的非组胺能化学性瘙痒有一定的抑制作用。但敲除 DRG 的 Dock4 不影响 His 引起的组胺能化学性瘙痒及 IL-31 引起的非组胺能化学性瘙痒。提示缺失 Dock4 是通过上调 DRG 神经元中 Piezo1 的表达来增强小鼠的机械性瘙痒行为。本研究揭示了 Dock4 调控机械性瘙痒的作用和机制, 也为病理性瘙痒的治疗提供潜在靶点。

机械性瘙痒是一种特定类型的皮肤反应, 其主要表现为皮肤在受到机械性刺激 (如摩擦、轻微的触碰或压力) 时产生的瘙痒感, 这种瘙痒感并非由于过敏或其他化学物质引起, 而是由于机械性刺

激直接作用于皮肤表面或神经末梢, 导致神经传导异常而引发的症状^[25]。在临床上, 机械性瘙痒带来的慢性瘙痒和不适感严重影响病人的健康和生活质量, 因此研究其神经生物学基础有助于更深入地理解神经信号传导的机制。在除去解决机械性瘙痒本身问题的同时, 也可能为其他类型瘙痒症状的治疗提供新的视角和方法。Dock4 是一种大分子蛋白, 其结构包括多个功能域^[26], 如 Dock-homology region 1 (DHR-1)、DHR-2、DHR-3 和 DHR-4 等, 这些结构域对其功能的调节至关重要。在本研究中, Dock4 被证实在 DRG 中存在。Dock4 通过其 DHR 域与 Rho GTP 酶结合, 并促使其从 GDP 结合状态转变为活性的 GTP 结合状态, 从而激活 Rho

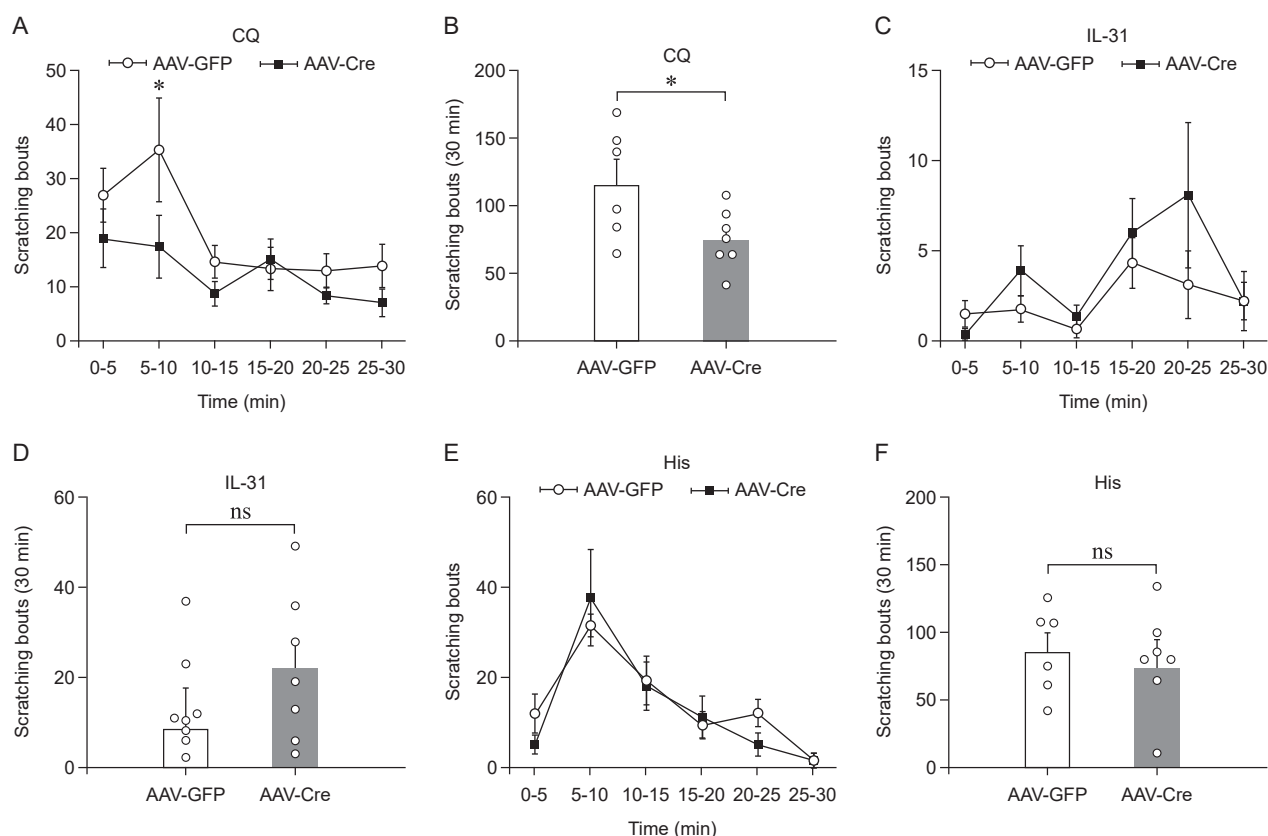


图 3 敲除 DRG 神经元的 Dock4 能缓解 CQ 引起的瘙痒，而对 His 及 IL-31 引起的瘙痒无影响 (A, B) 注射 AAV-GFP、AAV-Cre 的 Dock4^{flox/flox} 小鼠颈部皮内注射 CQ，测每 5 分钟的抓挠次数及 30 分钟抓挠总次数，结果显示，与对照组相比 Dock4 敲除小鼠的总抓挠次数降低 (AAV-GFP 组 $n = 6$ 只小鼠/组，AAV-Cre 组 $n = 7$ 只小鼠/组)；(C, D) 注射 AAV-GFP、AAV-Cre 的 Dock4^{flox/flox} 小鼠颈部皮内注射 IL-31，测每 5 分钟的抓挠次数及 30 分钟抓挠总次数 (AAV-GFP 组 $n = 8$ 只小鼠/组，AAV-Cre 组 $n = 7$ 只小鼠/组)，结果显示与对照组相比，Dock4 敲除小鼠的总抓挠次数无明显差异；(E, F) 注射 AAV-GFP、AAV-Cre 的 Dock4^{flox/flox} 小鼠颈部皮内注射 His，测每 5 分钟的抓挠次数及 30 分钟抓挠总次数 (AAV-GFP 组 $n = 6$ 只小鼠/组，AAV-Cre 组 $n = 7$ 只小鼠/组)，结果显示与对照组相比 Dock4 敲除小鼠的总抓挠次数无明显差异
* $P < 0.05$ ，与 AAV-GFP 组相比

Fig. 3 Conditional knockout of Dock4 in DRG neurons alleviates CQ-induced pruritus but does not affect pruritus induced by histamine or IL-31

(A, B) Dock4^{flox/flox} mice were intradermally injected with CQ at the cervical region following intrathecal injection of AAV-GFP or AAV-Cre. The number of scratching bouts was recorded every 5 minutes, and the total number of scratches over 30 minutes was quantified (AAV-GFP group: $n = 6$ mice/group, AAV-Cre group: $n = 7$ mice/group); (C, D) Dock4^{flox/flox} mice were intradermally injected with IL-31 at the cervical region after AAV-GFP or AAV-Cre injection. Scratching frequency every 5 minutes and total scratching over 30 minutes were measured (AAV-GFP group: $n = 8$ mice/group, AAV-Cre group: $n = 7$ mice/group); (E, F) Dock4^{flox/flox} mice were intradermally injected with histamine (His) at the cervical region following AAV-GFP or AAV-Cre injection. The number of scratching events every 5 minutes and the total number of scratches over 30 minutes were recorded (AAV-GFP group: $n = 6$ mice/group, AAV-Cre group: $n = 7$ mice/group).

* $P < 0.05$, compared with AAV-GFP group.

GTP 酶的信号传导通路^[26]。这一过程在神经元的轴突导向、树突形态的发育、突触的形成和稳定等方面发挥着关键作用。本研究发现了瘙痒的新机制，证实了 Dock4 在机械性瘙痒中的作用。通过鞘内给 Dock4^{flox/flox} 小鼠注射 AAV-Cre，抑制 Dock4 在 DRG 中的表达可增加机械性瘙痒的发生，同时在化学性瘙痒中能够减轻 CQ 诱导的非组胺类瘙痒反应。

以上结果证明 Dock4 参与机械性瘙痒的传导过程。

本研究中，条件性敲除 DRG 神经元中的 Dock4 基因引发了一个有趣的现象，即机械性瘙痒增强而化学性瘙痒减弱。这一现象的背后可能与两者依赖的不同感知通路和神经回路相关。机械性瘙痒通过皮肤机械受体和 DRG 神经元的传导通路传递信号，而化学性瘙痒则涉及化学感受器的激活。

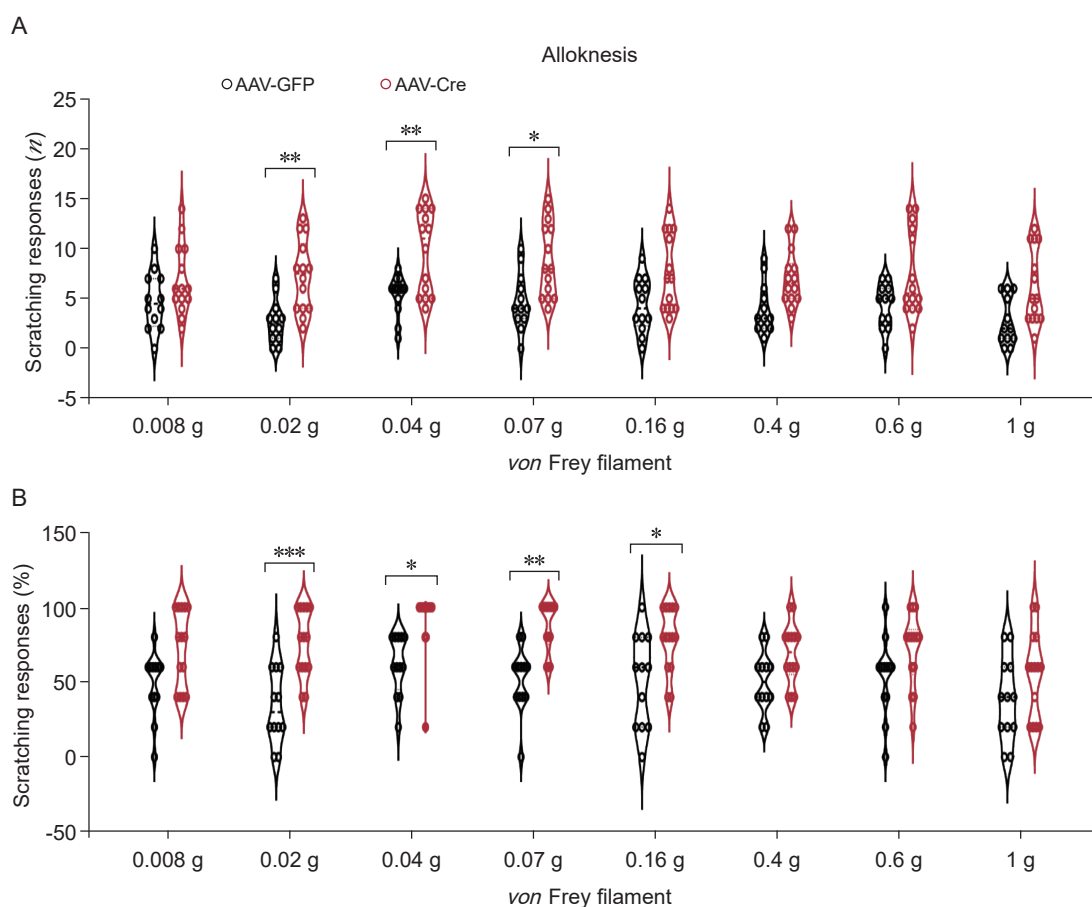


图 4 条件性敲除 DRG 神经元中的 Dock4 增加 His 诱导的痒觉异化。注射 AAV-GFP、AAV-Cre 的 Dock4^{fllox/fllox} 小鼠颈部皮内注射 His，30 分钟后测试机械刺激引起的 (A) 搔痒次数和 (B) 阳性率。结果显示，条件性敲除 DRG 神经元中的 Dock4 增加 His 诱导的痒觉异化 (AAV-GFP 组 $n = 12$ 只小鼠/组，AAV-Cre 组 $n = 14$ 只小鼠/组)。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与 AAV-GFP 组相比。

Fig. 4 Conditional knockout of Dock4 in DRG neurons enhances histamine-induced pruriceptor sensitization

Dock4^{fllox/fllox} mice, administered AAV-GFP or AAV-Cre, were intradermally injected with histamine (His) at the cervical region. Thirty minutes post-injection, (A) the number of scratch bouts and (B) the positive response rate to mechanical stimulation-induced pruritus were quantified (AAV-GFP group: $n = 12$ mice/group, AAV-Cre group: $n = 14$ mice/group).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with AAV-GFP group.

Dock4 缺失可能引起了一些相关信号通路的变化，从而显示出机械性搔痒增强而化学性搔痒减弱。此外，Dock4 在神经元可塑性中的作用可能对适应性反应有重要影响。长期的化学性刺激可能使 Dock4 缺失的小鼠在面对化学性搔痒时表现出较低的适应性，反应减弱；而在机械性搔痒的情境下，Dock4 的缺失可能打破适应性机制，使小鼠对机械刺激更加敏感。综上所述，Dock4 通过影响突触传导以及不同类型搔痒信号的调节，可能在机械性和化学性搔痒的感知过程中发挥着不同的作用，从而导致这两种类型搔痒反应的相反变化。Piezo1 是一种能够感知和响应机械性刺激的离子通道蛋白，研究发

现 Piezo1 广泛表达在多种细胞和组织类型中，如心脏^[27]、血管^[28]、平滑肌^[29]等，且在皮肤的神经末梢和 DRG 中也有不同程度的表达^[30]。皮肤受到机械性刺激时，通道激活会改变离子的通透性，并激活细胞内的信号通路。敲除 DRG 神经元的 Piezo1 可以显著抑制小鼠的机械性搔痒行为，而增强 Piezo1 的功能显著提高小鼠的机械痒觉感知，提示 Piezo1 是感知机械性搔痒行为的重要通道。在本研究中，探讨了 Dock4 与 Piezo1 之间是否存在调控作用，发现 Dock4 与 Piezo1 在 DRG 神经元存在共定位。此外，本研究发现敲除 Dock4 后，能够增强 Piezo1 在 DRG 神经元中的表达。提示敲除 Dock4



图 5 免疫荧光染色 Dock4 与 Piezo1 存在共定位 (标尺 = 100 μm)

Fig. 5 Immunofluorescence analysis demonstrates co-localization of Dock4 and Piezo1 (Scale bar = 100 μm)

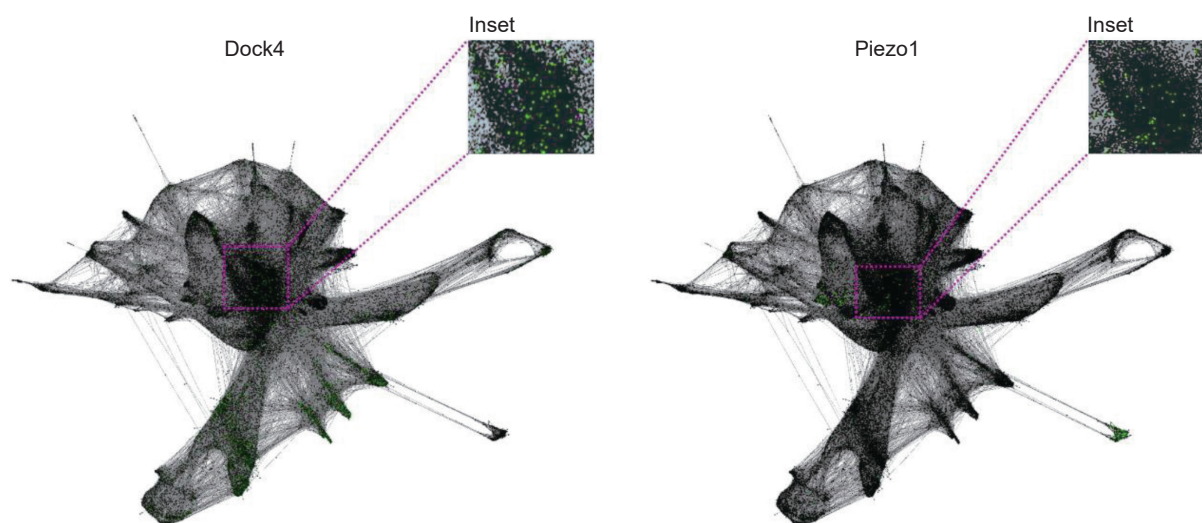


图 6 Dock4 和 Piezo1 在感觉神经元中的表达模式

单细胞 RNA 测序数据呈现为力导向布局, 显示 Dock4 和 Piezo1 在 DRG 神经元的簇中有表达且分布重合 (https://kleintools.hms.harvard.edu/tools/springViewer_1_6_dev.html?datasets/Sharma2019/all)

Fig. 6 Expression patterns of Dock4 and Piezo1 in sensory neurons.

Single-cell RNA sequencing data, visualized using a force-directed layout, reveal that Dock4 and Piezo1 are co-expressed in clusters of DRG neurons, with overlapping distribution.

(https://kleintools.hms.harvard.edu/tools/springViewer_1_6_dev.html?datasets/Sharma2019/all)

增加 DRG 神经元中 Piezo1 的表达, 可能是其调控机械性瘙痒的机制。Piezo1 能够感知细胞刚度的变化, 并通过调节细胞骨架的动态过程, 影响 DRG 神经元轴突的再生。同时, Piezo1 通过调控钙信号通路、细胞骨架重塑以及与细胞外环境的相互作用, 在神经细胞的结构动态和再生过程中发挥着至关重要的作用。Dock4 作为一种 RhoGTP 酶激活因子, 能够激活小 GTP 酶 (如 Rac1 和 Cdc42), 从而调节细胞骨架的动态变化、细胞迁移和形态改变。因此, 我们推测 Dock4 可能通过调节小 GTP 酶与细胞骨架的相互作用, 改变细胞对机械力的感知, 进而影响 Piezo1 的功能。例如, Dock4 通过调控 RhoGTP 酶活性, 改变细胞的刚度感知和形变能力,

进而可能增强或抑制 Piezo1 的机械感知功能, 影响机械性瘙痒的感知程度。虽然 Dock4 对 Piezo1 基因表达的直接调控机制尚不完全明确, 但 Dock4 可能通过调节细胞骨架, 间接影响 Piezo1 的基因表达。细胞骨架的重塑常伴随转录因子的激活, 这些转录因子可能参与 Piezo1 基因的转录调控。未来的研究将进一步探讨敲除 Dock4 后通过何种途径调节 Piezo1 表达。这些研究成果为基于 Dock4 作为干预靶点的机械性瘙痒治疗策略提供了新的视角、思路和研究基础。本研究揭示了 Dock4 调控机械性瘙痒的作用和机制, 也为病理性瘙痒的治疗提供了潜在靶点。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

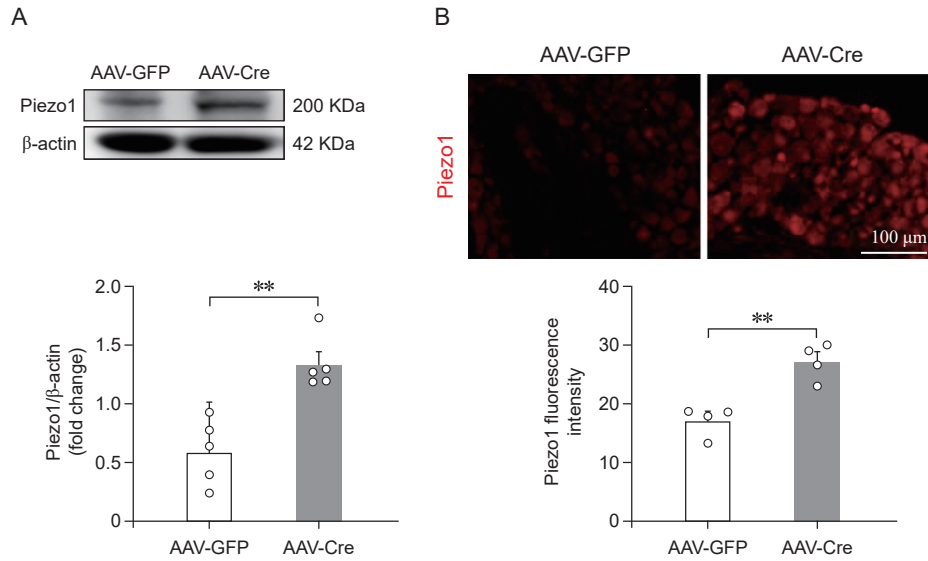
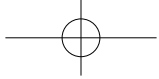


图 7 敲除 Dock4 能够增加 Piezo1 在感觉神经元中的表达
(A) 蛋白免疫印记验证 Dock4 敲除后 Piezo1 表达增加 ($n = 5$ 只小鼠/组); (B) 免疫荧光显示 Dock4 敲除后 Piezo1 表达水平上调, 柱状图为平均荧光强度统计 ($n = 4$ 只小鼠/组, 标尺 = 100 μm)
** $P < 0.01$, 与 AAV-GFP 组相比

Fig. 7 Knockout of Dock4 enhances Piezo1 expression in sensory neurons
(A) Western Blot analysis demonstrates an increase in Piezo1 expression following Dock4 knockout ($n = 5$ mice/group); (B) Immunofluorescence imaging shows upregulation of Piezo1 expression in Dock4 knockout mice, with the bar graph representing the average fluorescence intensity ($n = 4$ mice/group, Scale bar = 100 μm).
** $P < 0.01$, compared with AAV-GFP group.

参 考 文 献

- [1] Butler DC, Berger T, Elmariah S, *et al.* Chronic pruritus: a review[J]. JAMA, 2024, 331(24):2114.
- [2] Misery L, Brenaut E, Le Garrec R, *et al.* Neuropathic pruritus[J]. Nat Rev Neurol, 2014, 10(7):408-416.
- [3] Jazani AM, Azgomi RND, Shirbeigi L. Pruritus treatment in viewpoints of traditional Persian medicine[J]. Iran J Med Sci, 2016, 41(3 Suppl):S53.
- [4] Ayoub C, Girard F, Boudreault D, *et al.* A comparison between scalp nerve block and morphine for transitional analgesia after remifentanyl-based anesthesia in neurosurgery[J]. Anesth Analg, 2006, 103(5):1237-1240.
- [5] Baraniuk JN. Rise of the sensors: nociception and pruritus[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2012, 12(2):104-114.
- [6] Andersen HH, Akiyama T, Nattkemper LA, *et al.* Allodynia and hyperknesis-mechanisms, assessment methodology, and clinical implications of itch sensitization[J]. Pain, 2018, 159(7):1185-1197.
- [7] Leader B, Carr CW, Chen SC. Pruritus epidemiology and quality of life[M]//Cowan A, Yosipovitch G. Pharmacology of Itch: Vol. 226. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015:15-38.
- [8] Pan Q, Guo SS, Chen M, *et al.* Representation and control of pain and itch by distinct prefrontal neural ensembles[J]. Neuron, 2023, 111(15):2414-2431.e7.
- [9] Shi L. Dock protein family in brain development and neurological disease[J]. Commun Integr Biol, 2013, 6(6):e26839.
- [10] Yazbeck P, Cullere X, Bennett P, *et al.* DOCK4 regulation of Rho GTPases mediates pulmonary vascular barrier function[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2022, 42(7):886-902.
- [11] Ueda S, Fujimoto S, Hiramoto K, *et al.* DOCK4 regulates dendritic development in hippocampal neurons[J]. J Neurosci Res, 2008, 86(14):3052-3061.
- [12] Ueda S, Negishi M, Katoh H. Rac GEF DOCK4 interacts with cortactin to regulate dendritic spine formation[J]. Mol Biol Cell, 2013, 24(10):1602-1613.
- [13] Xiao Y, Peng Y, Wan J, *et al.* The atypical guanine nucleotide exchange factor DOCK4 regulates neurite differentiation through modulation of Rac1 GTPase and actin dynamics[J]. J Biol Chem, 2013, 288(27):20034-20045.
- [14] Herbst C, Bothe V, Wegler M, *et al.* Heterozygous loss-of-function variants in DOCK4 cause neurodevelopmental delay and microcephaly[J]. Hum Genet, 2024, 143(3):455-469.
- [15] 肖艳归. 鸟苷酸交换因子 Dock4 在神经突分化和发育中的功能及作用机制研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2015.



- [16] Alkelai A, Lupoli S, Greenbaum L, *et al.* DOCK4 and CEACAM21 as novel schizophrenia candidate genes in the Jewish population[J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2012, 15(4):459-469.
- [17] Poelmans G, Buitelaar JK, Pauls DL, *et al.* A theoretical molecular network for dyslexia: integrating available genetic findings[J]. *Mol Psychiatry*, 2011, 16(4):365-382.
- [18] Pagnamenta AT, Bacchelli E, De Jonge MV, *et al.* Characterization of a family with rare deletions in CNTNAP5 and DOCK4 suggests novel risk loci for autism and dyslexia[J]. *Biol Psychiatry*, 2010, 68(4):320-328.
- [19] Imgsac, Maestrini E, Pagnamenta AT, *et al.* High-density SNP association study and copy number variation analysis of the AUTS1 and AUTS5 loci implicate the IMMP2L-DOCK4 gene region in autism susceptibility[J]. *Mol Psychiatry*, 2010, 15(9):954-968.
- [20] Helt MS, De Marchena AB, Schineller ME, *et al.* Contagious itching is heightened in children with autism spectrum disorders[J]. *Dev Sci*, 2021, 24(2): e13024.
- [21] Roh J, Hwang SM, Lee SH, *et al.* Functional expression of Piezo1 in dorsal root ganglion (DRG) neurons[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11):3834.
- [22] 谢亚飞, 杭黎华. 机械门控离子通道 Piezo1 调节巨噬细胞参与炎症反应研究进展 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2024, 30(2):119-124.
- [23] Shin SM, Itson-Zoske B, Fan F, *et al.* Peripheral sensory neurons and non-neuronal cells express functional Piezo1 channels[J]. *Mol Pain*, 2023, 19:17448069231174315.
- [24] Hill RZ, Loud MC, Dubin AE, *et al.* PIEZO1 transduces mechanical itch in mice[J]. *Nature*, 2022, 607(7917): 104-110.
- [25] Ding H, Zhou L, Zhou J, *et al.* Peripheral mechanisms of mechanical itch[J]. *J Invest Dermatol*, 2024, 144(7): 1449-1453.
- [26] Laurin M, Côté JF. Insights into the biological functions of Dock family guanine nucleotide exchange factors[J]. *Genes Dev*, 2014, 28(6):533-547.
- [27] Liang J, Huang B, Yuan G, *et al.* Stretch-activated channel Piezo1 is up-regulated in failure heart and cardiomyocyte stimulated by AngII[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(6):2945-2955.
- [28] Gunin AG, Golubtzova NN. Role of the mechanosensitive protein Piezo1 in age-dependent changes in the number of fibroblasts and blood vessels in human skin[J]. *Adv Gerontol*, 2019, 9(4):411-416.
- [29] Sun W, Chi S, Li Y, *et al.* The mechanosensitive Piezo1 channel is required for bone formation[J]. *eLife*, 2019, 8:e47454.
- [30] Pereira MP, Wiegmann H, Ständer S. PIEZO1 channels in cutaneous free nerve endings: novel insights into itch-scratch mechanisms[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1):4.

• 消 息 •

中华医学会疼痛学分会第二十一届学术年会会议通知

由中华医学会、中华医学会疼痛学分会主办，重庆市医学会、重庆市医学会疼痛学分会承办，重庆医科大学附属第一医院、南昌大学第一附属医院、中日友好医院协办的中华医学会疼痛学分会第二十一届学术年会定于 2025 年 9 月 5~7 日在重庆市召开。本次年会将进行大会主题报告、开展专题讲座、手术演示来全方位地展示疼痛医学领域的基础研究成果、临床诊疗进展，探讨疼痛学科发展的热点与难点问题。

一、会议报名方式

1. 会议注册系统网址: <https://www.eventomeeting.com/casp2025/>
2. 通过扫描二维码注册

二、联系方式

学术筹备: 李水清 13521191662 张学学 13979182357
朱 谦 13701068424 任莉梅 13910566182
网站技术支持: 杨健 13141012645

