



## 免疫球蛋白受体 B 在痛性糖尿病周围神经病变中的作用及其调控机制 \*

张 钰 段柯杨 王敬萱 王雪莹 孙 涛<sup>△</sup>

(山东第一医科大学附属省立医院疼痛科, 济南 250021)

**摘要 目的:**探讨配对免疫球蛋白受体 B (paired immunoglobulin-like receptor B, PIRB) 在痛性糖尿病周围神经病变 (diabetic peripheral neuropathic pain, DPNP) 中的作用及其潜在机制, 特别关注其在神经炎症和炎性小体活化中的作用。**方法:**将小鼠按简单随机抽样方法随机分为 4 组: 假手术组 (Sham)、模型组 (DPNP)、模型 + PIRB 阴性对照组 (DPNP + AAV control)、模型 + PIRB 腺相关病毒组 (DPNP + PIRB), 每组 8 只。采用腹腔注射链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 构建小鼠 DPNP 模型, 并通过血糖升高及机械性痛觉过敏确认模型的成功建立。使用免疫印迹和 qRT-PCR 评估 DPNP 小鼠脊髓组织中 PIRB 的表达水平。通过鞘内注射腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 降低小鼠脊髓中 PIRB 的表达以进一步研究其作用。采用 qRT-PCR 检测神经炎症标志物 (如 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ ), 使用免疫印迹检测 NF- $\kappa$ B p65 的水平, 并通过免疫印迹和免疫组化观察 NLRP3 炎性小体成分的变化。**结果:**与 Sham 组相比, DPNP 组小鼠出现显著机械性痛觉过敏, 并观察到 PIRB 的蛋白和 mRNA 表达水平均显著上调 ( $P < 0.05$ )。通过 AAV 介导的 PIRB 敲低实验中, 结果显示 DPNP + PIRB 组小鼠机械性痛觉过敏减轻 ( $P < 0.05$ ), 并且神经炎症标志物 (IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ ) 的表达减少。此外, DPNP + PIRB 组较 DPNP + AAV control 组的 NF- $\kappa$ B p65 和 NLRP3 炎性小体成分 (如 Caspase-1、GSDMD 和 IL-1 $\beta$ ) 的表达也显著降低。**结论:**PIRB 可能通过调节神经炎症和激活 NLRP3 炎性小体在 DPNP 的发展中发挥了关键作用, 抑制 PIRB 的表达可以减轻痛觉过敏现象并减少神经炎症。

**关键词** 配对免疫球蛋白受体 B; 神经炎症; 炎性小体; 痛性糖尿病周围神经病变

## The role and regulatory mechanisms of immunoglobulin-like receptor B in diabetic peripheral neuropathic pain \*

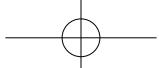
ZHANG Yu, DUAN Ke-yang, WANG Jing-xuan, WANG Xue-ying, SUN Tao<sup>△</sup>

(Department of Pain Medicine, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250021, China)

**Abstract Objective:** To investigate the role of paired immunoglobulin-like receptor B (PIRB) in diabetic peripheral neuropathic pain (DPNP) and its potential mechanisms, with a specific focus on its involvement in neuroinflammation and inflammasome activation. **Methods:** Mice were randomly divided into four groups: Sham group, diabetic peripheral neuropathic pain model group (DPNP), DPNP + PIRB negative control group (DPNP + AAV control), and DPNP + PIRB adeno-associated virus group (DPNP + PIRB), 8 mice in each group. A DPNP model was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ), and the successful establishment of the model was confirmed through elevated blood glucose levels and mechanical hyperalgesia. PIRB expression levels in the spinal cord of DPNP mice were assessed with Western Blot and qRT-PCR. To further investigate the role of PIRB, its expression in the spinal cord was knocked down via intrathecal injection of adeno-associated virus (AAV). Neuroinflammatory markers, such as IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ , were detected with qRT-PCR, while NF- $\kappa$ B p65 levels were evaluated by Western Blot. Changes in components of the NLRP3 inflammasome were observed through both Western Blot and immunohistochemistry. **Results:** Compared to the Sham group, the

\* 基金项目: 国家自然科学基金 (81972145); 山东省自然科学基金面上项目 (ZR2024MH208)

△ 通信作者 孙涛 suntaosdph@163.com



DPNP group exhibited significant mechanical hyperalgesia, along with a marked upregulation of PIRB protein and mRNA expression ( $P < 0.05$ ). In the AAV-mediated PIRB knockdown experiment, the DPNP + PIRB group showed reduced mechanical hyperalgesia ( $P < 0.05$ ) and decreased expression of neuroinflammatory markers (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ). Furthermore, compared to the DPNP + AAV control group, the DPNP + PIRB group exhibited significantly lower levels of NF- $\kappa$ B p65 and NLRP3 inflammasome components, including Caspase-1, GSDMD, and IL-1 $\beta$ . **Conclusion:** PIRB may play a key role in the development of DPNP by regulating neuroinflammation and activating the NLRP3 inflammasome. Inhibiting PIRB expression can alleviate hyperalgesia and reduce neuroinflammation.

**Keywords** paired immunoglobulin-like receptor B (PIRB); neuroinflammation; inflammasome; diabetic peripheral neuropathic pain (DPNP)

痛性糖尿病周围神经病变 (diabetic peripheral neuropathic pain, DPNP) 是糖尿病常见且复杂的慢性并发症<sup>[1]</sup>，显著影响病人生活质量和功能。我国糖尿病患病率为 11.6%，其中 10%~20% 的糖尿病病人患有糖尿病周围神经病变，而 50% 的糖尿病周围神经病变病人伴有 DPNP<sup>[2]</sup>。其表现为持续性疼痛、机械性痛觉异常及痛觉过敏，病理特征主要源于长期神经损伤及神经炎症，导致神经纤维退行性变化和感知异常<sup>[3]</sup>。目前，DPNP 治疗包括药物和非药物方法<sup>[4]</sup>，药物主要为抗惊厥药、抗抑郁药、阿片类药物及局部麻醉剂，非药物方法包括血糖控制、物理治疗和心理干预。新兴疗法如神经调控、干细胞和靶向神经炎症的免疫疗法也在研究中，但整体疗效仍有限，需进一步探索更有效的干预措施。

DPNP 的发病机制复杂，涉及多种细胞因子、免疫反应及神经炎症的协同作用<sup>[5]</sup>。研究表明，神经炎症是 DPNP 的关键因素之一<sup>[6]</sup>，免疫系统的异常激活和促炎因子的过度释放会加剧神经损伤并维持疼痛状态<sup>[7]</sup>。目前，已有大量关于糖尿病引发的神经损伤及炎症反应的研究，但对 DPNP 发生机制中免疫调控的具体分子机制仍了解不足。因此调控免疫通路可能不仅能缓解疼痛，还可能促进神经修复，成为治疗 DPNP 的一个潜在策略。配对免疫球蛋白受体 B (paired immunoglobulin-like receptor B, PIRB) 是一种 I 型跨膜糖蛋白，最初发现于免疫系统中，负责调控免疫抑制反应<sup>[8]</sup>，防止过度活跃的免疫反应。近年来，研究表明 PIRB 不仅在免疫系统中发挥重要作用，也在神经系统中同样发挥重要作用，特别是调控神经再生和突触可塑性<sup>[9]</sup>。PIRB 通过与髓磷脂相关抑制因子 (如 Nogo、MAG 和 OMgp) 相互作用，阻碍轴突再生和神经网络重塑<sup>[10]</sup>。在多种神经损伤模型中，包括脊髓损伤，PIRB 的表达显著上调，特别是在灰质区的神经元中，并通过与髓磷脂抑制因子的相互作用

阻碍轴突的再生<sup>[11]</sup>。此外，PIRB 还可能通过调控神经炎症和抑制轴突生长来影响糖尿病相关的神经系统疾病。如 Pu 等<sup>[12]</sup> 研究发现，PIRB 通过调控轴突生长和树突重塑，负向调控神经可塑性，从而导致糖尿病相关的认知功能障碍。尽管已有研究揭示了 PIRB 在神经系统中的多重作用，但关于 PIRB 在 DPNP 中的具体作用机制仍然知之甚少。为了进一步探索 PIRB 在 DPNP 中的功能，本研究通过构建 DPNP 小鼠模型，利用腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 抑制 PIRB 表达，观察炎症因子和机械性痛阈的变化，旨在探讨 PIRB 在 DPNP 中的作用机制。

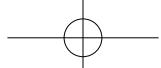
## 方 法

### 1. 实验动物

本研究采用 6~7 周雄性 C57BL/6 小鼠，体重 18~20 g，由北京唯尚立德生物科技有限公司提供。饲养于山东省立医院动物实验室，动物许可证号：SCXK(京) 2023-0004。在实验之前，被允许自由获得食物和水至少 1 周，以适应新环境。小鼠在室温  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $45\% \pm 5\%$  以及 12 h 光照/黑暗交替周期的环境下饲养，自由进食及饮水。所有动物程序均按照美国国立卫生研究院发布的《实验动物护理与使用指南》，已通过山东省立医院实验动物伦理委员会审核（伦理审批号：NO. 2023-177）。

### 2. 实验分组

将小鼠按简单随机抽样方法随机分为 4 组，每组 8 只：假手术组 (Sham)、模型组 (DPNP)、模型 + PIRB 阴性对照组 (DPNP + AAV control)、模型 + PIRB 腺相关病毒组 (DPNP + PIRB)。Sham 组：从 -4 天至 0 天连续 5 天腹腔注射等剂量柠檬酸钠缓冲液；DPNP 组：从 -4 天至 0 天连续 5 天腹腔注射链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导 DPNP 模型；DPNP +



AAV control 组：从-4 天至 0 天连续 5 天腹腔注射 STZ 诱导 DPNP 模型，注射结束后，模型建立进入 14 天的观察期，以确保模型成功建立。在第 14 天检测机械性痛觉过敏现象及血糖水平确定模型的成功建立后，对小鼠进行 PIRB 腺相关病毒阴性对照的鞘内注射；DPNP + PIRB 组：在第 14 天检测机械性痛觉过敏现象及血糖水平确定模型的成功建立后，对小鼠进行鞘内注射 PIRB 腺相关病毒以降低 PIRB 表达。

### 3. DPNP 模型小鼠构建

在 DPNP 模型组中，小鼠以 40 mg/kg 的剂量连续 5 天进行 STZ (Solarbio: S8050) 腹腔注射，每次注射前禁食不禁水 12 h。2 周后对小鼠进行机械痛阈评估和空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG) 检测，出现痛觉过敏现象且 FBG  $\geq 13.3$  mmol/L 的小鼠被认为 DPNP 造模成功并被纳入本研究。假手术组小鼠则以等体积柠檬酸钠缓冲液 (Solarbio: C1013) 替代 STZ。

### 4. 腺相关病毒介导的 PIRB shRNA 进行鞘内注射

使用干扰 PIRB 腺相关病毒，实现 PIRB 基因敲低。靶点 U6-shRNA (mPirb)\*3，将此 3 个靶点串联构建至 CV232 载体上，靶点序列为 GCCACTAG-GTGGACTGCATAT、GGACATGCAAATGAG-GATGG、GCAGGACATGTCTCACCTTCT。由上海吉凯基因科技有限公司生成，储存在-80℃直至使用。

将以上试剂进行鞘内注射：小鼠通过腹腔注射 1.2% 阿佛丁 (10 ml/kg) 麻醉后，左手用纱布覆盖小鼠的头部和上肢，右手用酒精棉球消毒小鼠下脊柱的皮肤，并以穿刺点为双侧髂棘线的中央凹陷处用记号笔标记。使用 10  $\mu$ l 微量进样器进行鞘内注射，当针尖穿透硬脊膜并引发明显的尾部弹动时，缓慢注入试剂。注射完毕后，针头在原位保持 2 min，并轻柔地旋转拔出针头以避免漏液。注射结束后将小鼠放在温暖环境中，等待其逐渐苏醒，准备后续实验。

### 5. 机械痛阈评估

根据 Chaplan 等<sup>[13]</sup> 报道的机械痛阈评估方法来测量小鼠的 50% 机械刺激缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, 50% MWT)。在小鼠开始腹腔注射 (-4 d) 和腹腔注射结束 (0 d)、3 天 (3 d)、7 天 (7 d)、模型建立并进行鞘内注射 (14 d)、鞘内注射后 1 周 (21 d)、鞘内注射后 2 周 (28 d)、鞘内注射后 3 周 (35 d)、鞘内注射后 4 周 (42 d) 进行疼痛行为学检测。每次测量前，小鼠在适应观察箱适应至少 30 min，直至探索活动消失。

根据“up-down”法，使用 8 种 von Frey 纤维丝 (0.02 g 至 2.0 g, Stoelting, USA) 测量小鼠后爪的 50% MWT。测试从 0.4 g 长丝开始，若小鼠出现反应，则使用更轻的长丝，若无反应，则使用更重的长丝。反应包括缩爪、摇晃或舔舐。前后刺激变化后，再进行 4 次测试。使用公式  $50\% \text{ MWT} = 10^{(X_f + \kappa\delta)/10000}$  计算结果 ( $X_f$  为最后刺激值对数， $\kappa$  为反应序列对应值， $\delta = 0.224$ )。每次刺激间隔至少 2 min，最终取双侧后爪的平均值作为结果。

### 6. 组织样本收集

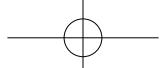
在各组小鼠完成行为学检测后，于实验终点时使用 1.2% 阿佛丁 (14 ml/kg) 对小鼠进行麻醉。随后进行预冷生理盐水的心脏灌注，直至右心房流出的液体变清澈。之后取小鼠脊髓腰膨大部位 ( $L_2 \sim L_4$  段)，并将其在-80℃下保存以备后续分析。对于免疫组化实验，采用生理盐水及 4% 多聚甲醛进行心脏灌注，随后分离脊髓腰膨大部位，并用 4% 多聚甲醛进行固定处理。

### 7. 蛋白免疫印迹分析 (Western Blot)

将组织在含有蛋白酶抑制剂 (Servicebio: G2008-1ML) 和磷酸化蛋白酶抑制剂 (Servicebio: G2007-1ML) 以及 RIPA 裂解缓冲液 (Epizyme: PC101) 的混合液中匀浆，在 4℃、13,000 rpm 条件下离心 20 min，收集含有组织蛋白的上清液并使用 BCA 测定方法测定蛋白质浓度。通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白质样品并转移到 PVDF 膜上。用 TBST 中的 5% 脱脂乳封闭 1 h，然后在 4℃下与一抗孵育过夜。一抗如下：PIRB (ABclonal: A16103); NLRP3 (Diagbio: db21453); Caspase-1 (ABclonal: A16792); GSDMD (Diagbio: db11033); 白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) (ABclonal: 16288); 核因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B) p65 (Abways: CY5034); anti- $\beta$ -actin (proteintech: 20536-1-AP)。第 2 天将膜与抗兔 (ABclonal, AS014) 或抗小鼠 IgG 二抗 (ABclonal: AS003) 在室温下孵育 1 h。最后使用 ECL 试剂 (Biosharp: BL520A) 和 Amersham Imager 600 (GE Healthcare) 可可视化蛋白质条带，并使用 ImageJ 软件 (NIH, Bethesda) 用于定量分析。

### 8. 定量逆转录聚合酶链反应 (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)

通过 Trizol (ABclonal: RM30129) 提取来自小鼠脊髓组织总 RNA 后，使用逆转录试剂盒 (ABclonal: RK20433) 将 mRNA 逆转录为 cDNA，然后进行实时定量 PCR 分析。 $\beta$ -肌动蛋白用作标准化的内部参考，按照公式  $2^{\Delta\Delta Ct}$  确定相对基因表达水平。PIRB、



IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  和  $\beta$ -actin 的引物见表 1。

#### 9. 免疫组织化学染色

使用 1.2% 阿佛丁 (14 ml/kg) 对小鼠进行麻醉, 依次用生理盐水和 4% 多聚甲醛进行心脏灌注, 解剖分离小鼠脊髓腰膨大部位。小鼠脊髓组织在 4% 多聚甲醛固定 24 h 后, 经 70%~100% 的梯度乙醇脱水, 进行石蜡包埋并切片。切片经过脱蜡后与 Tris-EDTA 抗原修复液 (Servicebio: G1218-1L) 高温孵育 20 min 并自然冷却后, 用 5% BSA (Servicebio: GC305010) 封闭非特异性结合位点。接着用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 10 min 以抑制内源性过氧化物酶活性。切片与 NLRP3 的一抗 (proteintech: 68102-1-Ig) 在 4℃ 下孵育过夜。第 2 天用相应的二抗 (Servicebio: G1214-100UL) 在室温下孵育 1 h。之后用 DAB 染液 (ZSGB-BIO: ZLI-9018) 和苏木素 (Servicebio: G1004-500ML) 染色, 经过脱水和透明化后用中性树脂封片。最后使用奥林巴斯 BX60 显微镜 (奥林巴斯光学有限公司, 日本东京) 对染色的组织切片进行拍照。

#### 10. 统计学分析

采用 GraphPad Prism 10.1.2 和 IBM 公司 SPSS 24.0 软件进行数据分析。所有结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm SD$ ) 表示。首先, 通过 Kolmogorov-Smirnov 检验确定数据是否符合正态分布。行为学实验数据采用重复测量方差分析, 随后进行 Tukey 事后检验比较各组间差异。对于 qRT-PCR、蛋白印迹、免疫组化结果, 使用单因素方差分析 (ANOVA) 和 Tukey 事后检验进行多组比较。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。为了确保数据的准确性, 每组实验重复至少 3 次, 所有数据均符合正态分布。

## 结 果

### 1. 抑制 PIRB 的表达可减轻 DPNP 小鼠的机械性痛觉异常

使用 50% MWT 测试小鼠的机械性异常疼痛,

与 Sham 组相比, DPNP 组小鼠在腹腔注射 STZ 后 14 天出现显著机械性痛觉超敏 ( $P < 0.05$ , 见图 1C), 并且血糖超过 13.3 mmol/L (见图 1B), 表明 DPNP 模型建立成功。在 DPNP 模型中, 免疫印迹 ( $P < 0.0001$ , 见图 1D) 和 qRT-PCR ( $P < 0.001$ , 见图 1E) 检测结果均显示 PIRB 在小鼠脊髓组织中表达上调。基于 DPNP 小鼠脊髓中 PIRB 过表达的发现, 通过鞘内注射 AAV 以抑制 PIRB 的表达。经过免疫印迹和 qRT-PCR 验证, 结果一致表明注射的 AAV 显著降低了脊髓组织中 PIRB 蛋白 ( $P < 0.01$ , 见图 1D) 和 mRNA 表达水平 ( $P < 0.001$ , 见图 1E)。注射 AAV 后 4 周对小鼠进行的行为测试表明, 抑制 PIRB 表达可缓解 DPNP 小鼠的机械性异常疼痛 ( $P < 0.05$ , 见图 1C)。

#### 2. PIRB 表达的下调能够抑制脊髓组织中的神经炎症反应, 并减少 NF- $\kappa$ B p65 的表达

与 Sham 组相比, DPNP 组和 DPNP + AAV control 组小鼠脊髓组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达水平均显著增加 ( $P < 0.001$ , 见图 2A-2C)。而 DPNP + PIRB 组小鼠的促炎因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达水平显著低于 DPNP + AAV control 组 ( $P < 0.001$ , 见图 2A-2C)。此外, 通过免疫印迹评估 NF- $\kappa$ B p65 的表达水平, 结果显示与 Sham 组相比, DPNP 组和 DPNP + AAV control 组小鼠脊髓组织中 NF- $\kappa$ B p65 的表达显著上调 ( $P < 0.0001$ , 见图 2D), 鞘内注射抑制 PIRB 表达的 AAV 后, NF- $\kappa$ B p65 的表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ )。

#### 3. 抑制 PIRB 的表达可以抑制 NLRP3 炎性小体的活化

免疫印迹分析结果表明 (见图 3A), 与 Sham 组相比, DPNP 组小鼠的脊髓中 NLRP3 ( $P < 0.001$ )、Caspase-1 ( $P < 0.0001$ )、GSDMD-N ( $P < 0.001$ )、IL-1 $\beta$  ( $P < 0.001$ ) 的表达显著上调。与 DPNP + AAV control 组相比, DPNP + PIRB 组小鼠表现出较低的 NLRP3 ( $P < 0.05$ )、Caspase-1 ( $P < 0.0001$ )、GSDMD-N ( $P < 0.01$ )、IL-1 $\beta$  ( $P < 0.05$ )。免疫组化结果进一步显示

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

基因 Gene	前引物 Forward primer 5' → 3'	后引物 Reverse primer 5' → 3'
PIRB	CACAACCTCTCCTCTGAGTGGT	GTCCATTGACCAACACAGCAGG
IL-1 $\beta$	GGGATGATGACGACCTGCTA	ACAGCACGAGGCATTTTGT
IL-6	TTTCTCTCCGCAAGAGACTTCC	TGTGGGTGGTATCCTCTGTGA
TNF- $\alpha$	ATGGGCTCCCTCTCATCAGT	GCTTGGTGGTTGCTACGAC
$\beta$ -actin	GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	GACTCATCGTACTCCTGCTTG

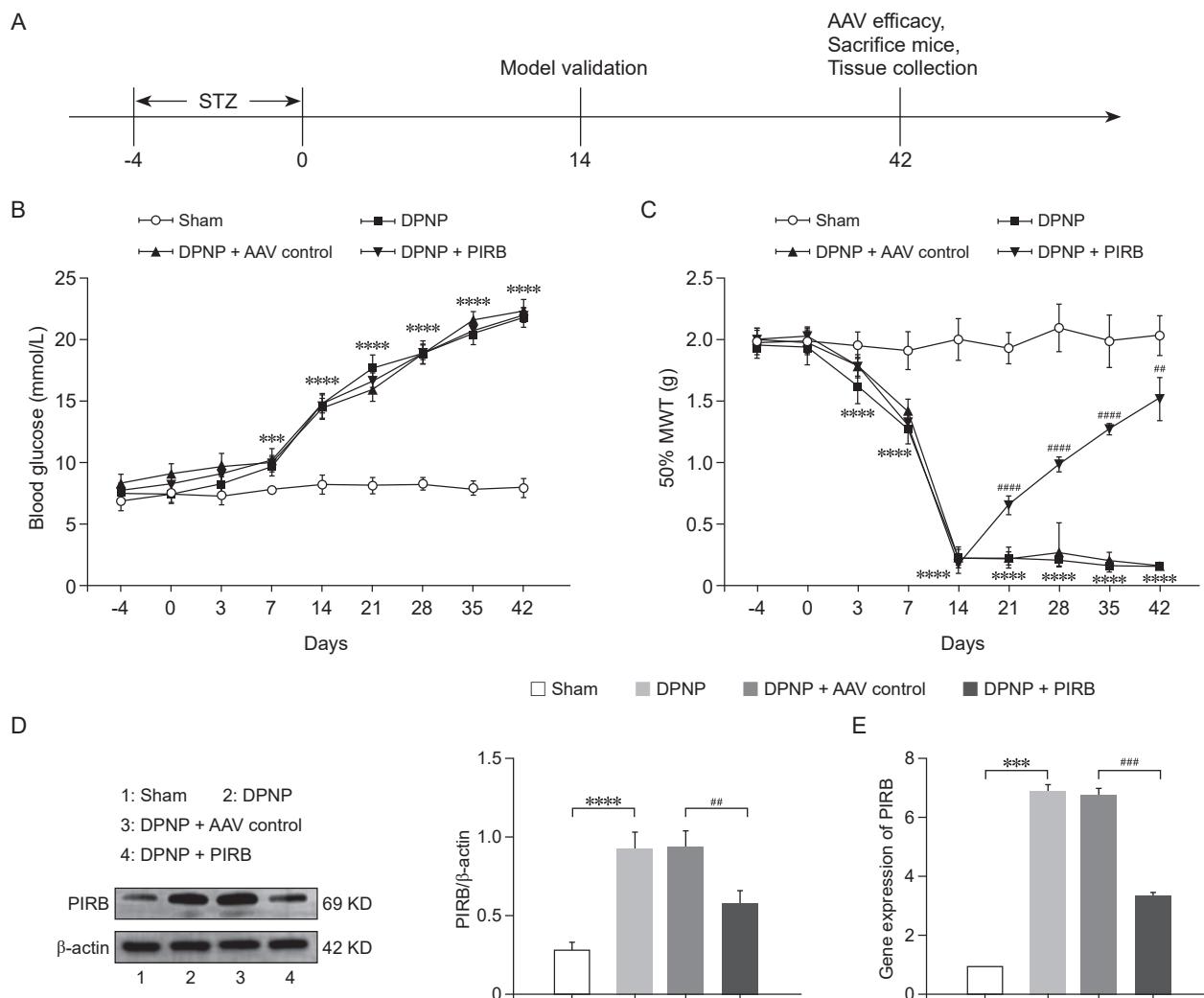
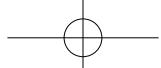


图 1 PIRB 对 DPNP 小鼠机械痛阈的影响 ( $n = 8$ ,  $\bar{x} \pm SD$ )

(A) 连续腹腔注射 5 天 STZ 对小鼠进行建模, 于 2 周时测定 DPNP 相关指标, 确保模型的建立。随后进行 AAV 干预和行为学测试, AAV 鞘内注射 4 周后检测相关指标后取材进行后续的实验; (B) 各组小鼠在实验过程中的空腹血糖值; (C) -4、0、3、7、14、21、28、35、42 天各组小鼠的 50% MWT 变化; (D) 免疫印迹检测各组小鼠脊髓组织中 PIRB 蛋白表达量; (E) qRT-PCR 检测小鼠各组 PIRB mRNA 的表达

\*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , 与 Sham 组相比; # $P < 0.01$ , ## $P < 0.001$ , ### $P < 0.0001$ , 与 DPNP + AAV control 组相比

Fig. 1 Effect of PIRB on the mechanical pain threshold in DPNP mice ( $n = 8$ ,  $\bar{x} \pm SD$ )

(A) STZ was administered intraperitoneally for 5 consecutive days to induce the model, and DPNP-related indicators were measured 2 weeks later to confirm successful model establishment. Following this, adeno-associated virus (AAV) intervention and behavioral testing were conducted. After 4 weeks of intrathecal AAV injection, relevant indicators were assessed, and tissue samples were collected for further experiments; (B) Fasting blood glucose levels of mice in each group throughout the experiment; (C) Changes in 50% MWT in each group on days -4, 0, 3, 7, 14, 21, 28, 35, and 42; (D) Western Blot analysis of PIRB protein expression in the spinal cord tissues of each group of mice; (E) qRT-PCR analysis of PIRB mRNA expression in each group of mice.

\*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , compared with Sham group; # $P < 0.01$ , ## $P < 0.001$ , ### $P < 0.0001$ , compared with DPNP + AAV control group.

(见图 3B, 3C), 在 DPNP 组和 DPNP + AAV control 组小鼠的脊髓背角中, NLRP3 的表达显著增加 ( $P < 0.001$ ), 而抑制 PIRB 有效降低了 NLRP3 炎性小体的表达水平 ( $P < 0.001$ )。

## 讨 论

神经病理性疼痛是一种由神经系统损伤或功能障碍引起的慢性疼痛<sup>[14]</sup>, 尤其是在糖尿病病人中,

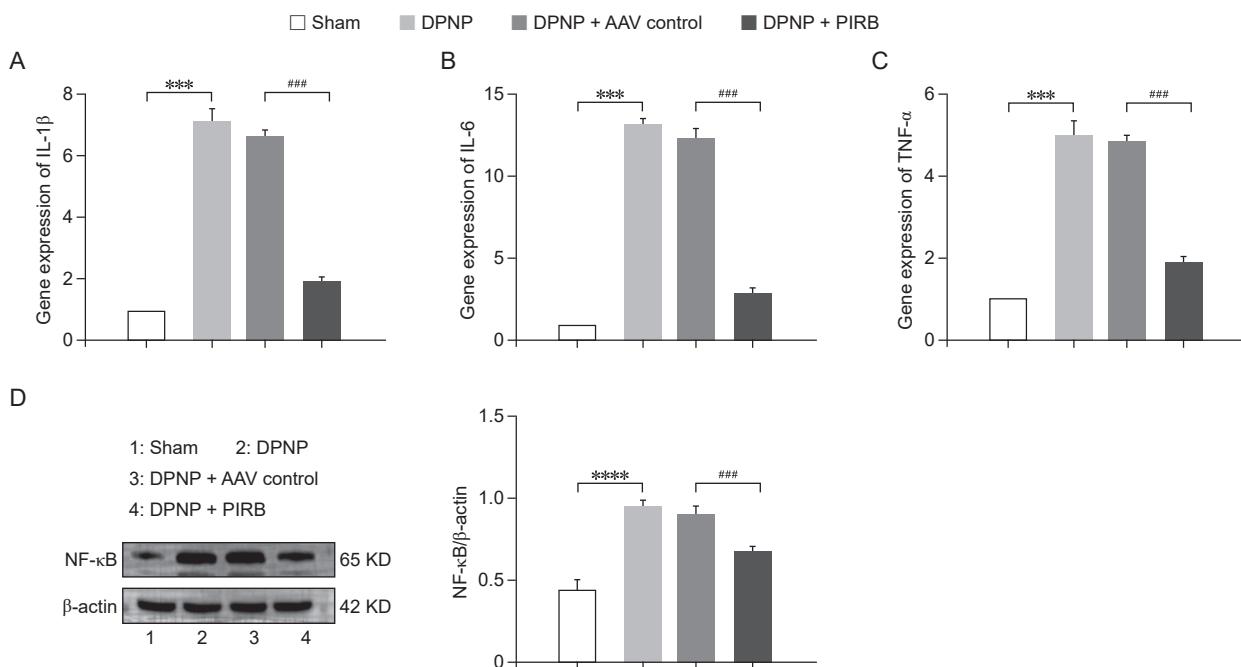
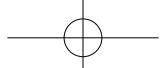


图 2 PIRB 对相关炎症因子表达以及 NF- $\kappa$ B p65 活化的影响 ( $n = 8$ ,  $\bar{x} \pm SD$ )

(A) qRT-PCR 检测各组小鼠脊髓组织中 IL-1 $\beta$  mRNA 表达的比较; (B) qRT-PCR 检测各组小鼠脊髓组织中 IL-6 mRNA 表达的比较; (C) qRT-PCR 检测各组小鼠脊髓组织中 TNF- $\alpha$  mRNA 表达的比较; (D) 免疫印迹检测各组小鼠脊髓组织中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达量

\*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , 与 Sham 组相比; ## $P < 0.001$ , 与 DPNP + AAV control 组相比

**Fig. 2** The impact of PIRB on the expression of associated inflammatory cytokines and the activation of NF- $\kappa$ B p65 ( $n = 8$ ,  $\bar{x} \pm SD$ )  
(A) qRT-PCR analysis comparing IL-1 $\beta$  mRNA expression in the spinal cord tissues of each group of mice; (B) qRT-PCR analysis comparing IL-6 mRNA expression in the spinal cord tissues of each group of mice; (C) qRT-PCR analysis comparing TNF- $\alpha$  mRNA expression in the spinal cord tissues of each group of mice; (D) Western Blot analysis of NF- $\kappa$ B p65 protein expression in the spinal cord tissues of each group of mice.

\*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , compared with Sham group; ## $P < 0.001$ , compared with DPNP + AAV control group.

DPNP 是一种常见的并发症。DPNP 的机制复杂, 主要涉及神经炎症、氧化应激和代谢紊乱。长期高血糖会导致神经细胞损伤, 促进氧化应激和炎性介质的释放 (如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等), 进而引发神经炎症, 导致神经纤维的进一步损伤。目前, DPNP 的治疗手段有限, 许多病人依然难以获得有效的疼痛缓解<sup>[15]</sup>。

本研究结果显示, 在 STZ 诱导的 DPNP 小鼠模型中, PIRB 的表达显著上调, 且该表达与机械性痛觉异常的发生密切相关。通过使用 AAV 抑制 PIRB 的表达后, DPNP 小鼠的机械性超敏反应得到了显著缓解。这一结果表明, PIRB 在 DPNP 中的上调可能促进了机械性痛觉过敏, 而抑制 PIRB 的表达则通过减少痛觉异常来缓解糖尿病引发的疼痛症状。现有研究表明, PIRB 在免疫细胞中的功能主要是负向调控免疫反应, 而其在神经系统中的作用则涉及到神经炎症的调控<sup>[16]</sup>。Bombeiro 等<sup>[17]</sup> 在坐骨神经损伤模型中发现, PIRB 在中枢和外周神

经系统中显著上调, 主要存在于巨噬细胞和施万细胞中, 且在髓鞘形成阶段其表达增强。Meng 等<sup>[18]</sup> 研究表明, ANGPTL8 通过 PIRB 促进神经炎症因子的表达, 导致糖尿病相关的突触损伤和神经可塑性受损。阻断 PIRB 可减轻炎症反应, 改善突触结构, 并缓解糖尿病引发的认知功能障碍。本研究的发现进一步验证了 PIRB 在神经炎症及疼痛感知中的重要作用, 暗示 PIRB 可能通过其免疫调节作用对 DPNP 的发生和维持产生负向影响。尤其在糖尿病这一高血糖的环境下, PIRB 在神经细胞中的异常表达可能会破坏神经网络的稳定性, 进而增强神经炎症, 最终导致持久的疼痛感觉。

神经炎症被认为是 DPNP 的关键病理机制之一<sup>[19]</sup>。糖尿病小鼠在高血糖状态下疼痛症状可能与高血糖诱发的促炎性介质 (如 TNF- $\alpha$ ) 和一氧化氮的上调有关, 从而导致神经损伤和炎症反应<sup>[20]</sup>。Üçeyler 等<sup>[21]</sup> 研究表明, 神经病理性疼痛病人的 IL-2、TNF- $\alpha$  mRNA 和蛋白质水平升高, IL-4 和 IL-10 水

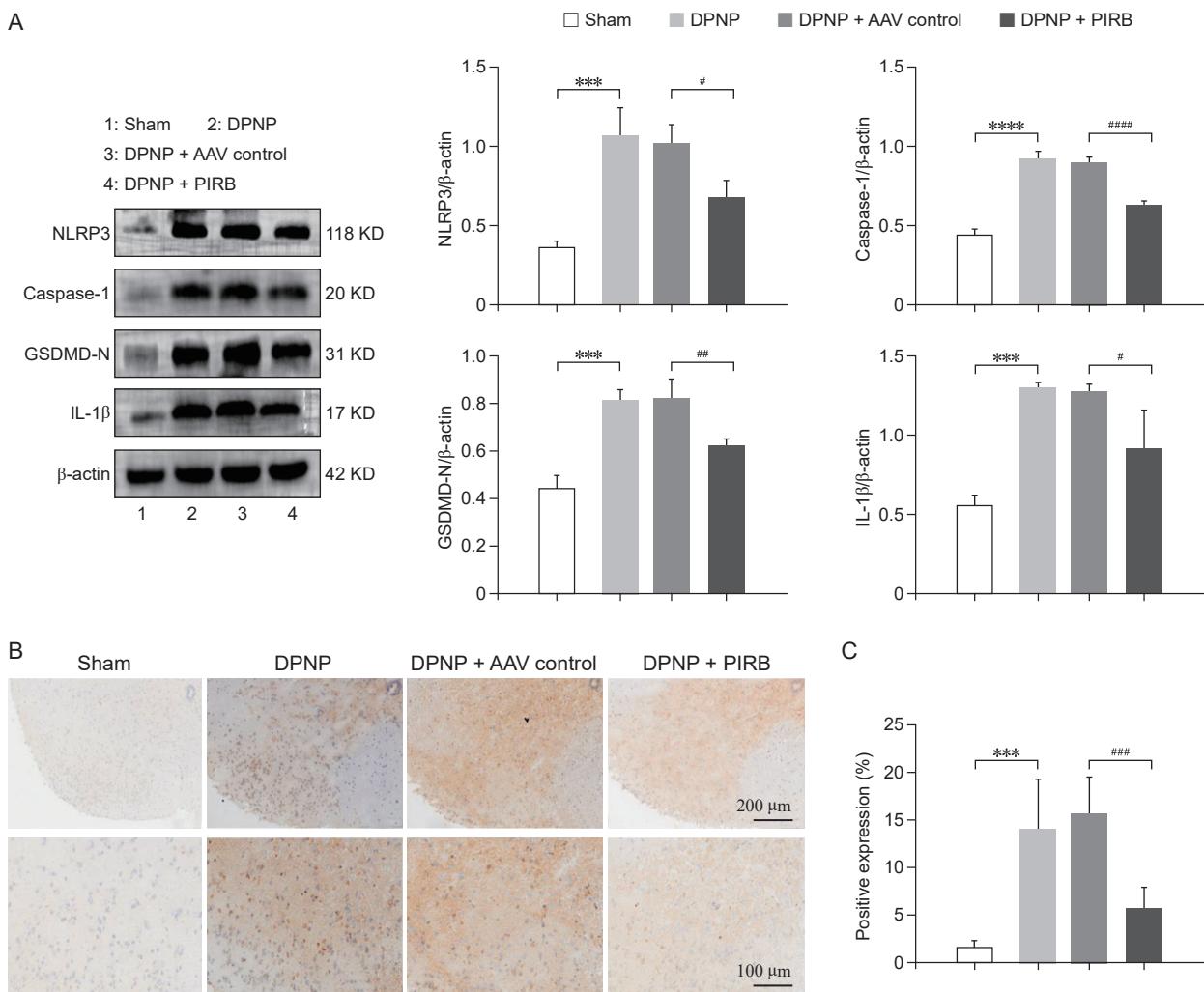
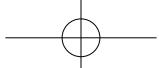


图 3 抑制 PIRB 的表达可以抑制 NLRP3 炎性小体的活化 ( $n = 8$ ,  $\bar{x} \pm SD$ )

(A) 免疫印迹检测各组小鼠脊髓组织中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 $\beta$  的蛋白水平; (B) 各组小鼠脊髓背角 NLRP3 表达的免疫组化染色图; (C) 各组小鼠脊髓背角免疫组化染色 NLRP3 的平均光密度值

\*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , 与 Sham 组相比;  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{##}P < 0.01$ ,  $^{###}P < 0.001$ ,  $^{####}P < 0.0001$ , 与 DPNP + AAV control 组相比

Fig. 3 Inhibition of PIRB expression suppresses the activation of the NLRP3 inflammasome ( $n = 8$ ,  $\bar{x} \pm SD$ )

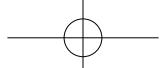
(A) Western Blot analysis of NLRP3, Caspase-1, GSDMD-N, and IL-1 $\beta$  protein levels in the spinal cord tissues of each group of mice; (B) Immunohistochemical staining images showing NLRP3 expression in the dorsal horn of the spinal cord in each group of mice; (C) Analysis of the mean optical density values for NLRP3 immunohistochemical staining in the dorsal horn of the spinal cord in each group of mice.

\*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , compared with Sham group;  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{##}P < 0.01$ ,  $^{###}P < 0.001$ ,  $^{####}P < 0.0001$ , compared with DPNP + AAV control group.

平降低。在动物模型中, 疼痛行为的改变与 TNF- $\alpha$  水平升高有关, 促炎细胞因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的神经内应用会诱导与疼痛相关的行为体征<sup>[22]</sup>。本研究中数据显示, 对 DPNP 小鼠进行鞘内注射 AAV 抑制 PIRB 表达显著降低了脊髓组织中促炎因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达水平, 表明 PIRB 可能通过调控这些促炎因子的表达, 影响神经炎症过程。此外, NF- $\kappa$ B 信号通路在神经炎症中扮演着

至关重要的角色, 激活后的 NF- $\kappa$ B p65 能够调控多种炎症因子的表达, 导致神经炎症的加重。本研究结果表明, DPNP 小鼠脊髓中的 NF- $\kappa$ B p65 的表达显著上调, 而抑制 PIRB 后, NF- $\kappa$ B p65 的水平显著降低。这一发现进一步证明了 PIRB 通过调节 NF- $\kappa$ B 信号通路在 DPNP 中的神经炎症反应中发挥作用。

NLRP3 炎症小体广泛存在于神经元、神经胶质细胞及免疫细胞中, 并通过调控促炎因子 (如 IL-1 $\beta$



和 IL-18) 的释放, 导致神经炎症加剧和疼痛维持<sup>[23]</sup>。本研究发现, 在 DPNP 小鼠脊髓中, NLRP3 炎性小体及其下游分子(如 Caspase-1、GSDMD 和 IL-1 $\beta$ )显著上调, 提示 NLRP3 炎性小体在 DPNP 中的激活可能是疼痛维持的一个重要机制。通过抑制 PIRB 表达, NLRP3 的激活得到了有效抑制, 相关分子的表达水平显著下降。这一发现提示 PIRB 可能通过调节 NLRP3 炎性小体的活化, 从而在神经炎症的发生中发挥重要作用。具体机制可能涉及 PIRB 通过 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活, 间接促进了 NLRP3 的激活和神经炎症的加剧<sup>[24]</sup>。

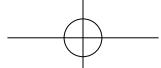
尽管本研究初步揭示了 PIRB 在 DPNP 中的关键作用, 但仍存在一些不足之处。首先, 研究仅在小鼠模型中进行了验证, 尚未在其他物种或临床人群中得到验证, 因此结果的外推性需要进一步确认。其次, 研究主要集中在炎症因子和免疫反应的变化上, 尚未深入探讨 PIRB 如何与其他信号通路(如神经生长因子或痛觉调控因子等)相互作用。第三, 本研究未考虑到 PIRB 在不同免疫细胞(如巨噬细胞、施万细胞等)中的特异性作用, 未来研究需进一步阐明这些细胞在 PIRB 介导的免疫调节中的角色。此外, 在机制探索的初步阶段, 缺乏单细胞测序或空间转录组技术的应用, 未能从全基因组层面揭示 PIRB 表达动态变化与 DPNP 表型的因果关系, 亦无法精准定位介导该过程的关键细胞亚群。

综上所述, 本研究首次揭示了 PIRB 在 DPNP 中的关键作用, 抑制 PIRB 的表达可以缓解 DPNP 小鼠的机械痛, 并证明 PIRB 通过调控 NF- $\kappa$ B 信号通路和 NLRP3 炎症小体的活化, 参与了 DPNP 中的神经炎症反应及疼痛感知机制。与传统的非甾体抗炎药和阿片类药物相比, PIRB 靶向干预不依赖全身免疫抑制或广泛抗炎, 具有较低的不良反应风险, 避免了胃肠不适、肾损害和药物依赖等问题, 为临床治疗提供了更安全的选择。此外, 基因治疗可通过精准靶向递送系统, 实现在分子层面的持久性干预。结合现代精准医学理念, 针对个体的基因型、炎症水平和代谢状况进行个性化治疗, 将为糖尿病周围神经病变病人提供更加精准和高效的治疗手段。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

## 参考文献

- [1] Gordois A, Scuffham P, Shearer A, et al. The health care costs of diabetic peripheral neuropathy in the US[J]. Diabetes Care, 2003, 26(6):1790-1795.
- [2] Martin CL, Albers JW, Pop-Busui R. Neuropathy and related findings in the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study[J]. Diabetes Care, 2014, 37(1):31-38.
- [3] 王想迪, 朴莲善. 糖尿病性周围神经病理性疼痛的研究进展[J]. 糖尿病新世界, 2022, (13):194-198.
- [4] Elafros MA, Callaghan BC. Effective treatment pathways exist for DPNP[J]. Lancet (London, England), 2022, 400(10353):639-641.
- [5] 李婷, 陈旭辉, 张玥, 等. 糖尿病周围神经病变及痛性糖尿病神经病变机制新方向[J]. 中国疼痛医学杂志[J]. 2019, 26(9):643-647.
- [6] Chen J, Guo P, Liu X, et al. Sinomenine alleviates diabetic peripheral neuropathic pain through inhibition of the inositol-requiring enzyme 1 alpha-X-box binding protein 1 pathway by downregulating prostaglandin-endoperoxide synthase 2[J]. J Diabetes Investig, 2023, 14(3):364-373.
- [7] Patel B, Greenland JC, Williams-Gray CH. Clinical trial highlights: anti-inflammatory and immunomodulatory agents[J]. J Parkinsons Dis, 2024, 14(7):1283-1300.
- [8] Gou Z, Mi Y, Jiang F, et al. PirB is a novel potential therapeutic target for enhancing axonal regeneration and synaptic plasticity following CNS injury in mammals[J]. J Drug Target, 2014, 22(5):365-371.
- [9] Huh GS, Boulanger LM, Du H, et al. Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity[J]. Science (New York, NY), 2000, 290(5499):2155-2159.
- [10] Filbin MT. PirB, a second receptor for the myelin inhibitors of axonal regeneration Nogo66, MAG, and OMgp: implications for regeneration in vivo[J]. Neuron, 2008, 60(5):740-742.
- [11] Zhou Y, Qian R, Rao J, et al. Expression of PirB in normal and injured spinal cord of rats[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2010, 30(4):482-485.
- [12] Pu K, Wu M, Jiang T, et al. Involvement of paired immunoglobulin-like receptor B in diabetes-associated cognitive dysfunction through modulation of axon outgrowth and dendritic remodeling[J]. Mol Neurobiol, 2022, 59(4):2563-2579.
- [13] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw[J]. J Neurosci Methods, 1994, 53(1):55-63.
- [14] 邵仪, 蓝心, 陈运淦, 等. 神经病理性疼痛的研究进展. 疑难病杂志[J]. 2024, 23(4):491-495.
- [15] Iyer S, Tanenberg RJ. Pharmacologic management of diabetic peripheral neuropathic pain[J]. Expert Opin Pharmacother, 2013, 14(13):1765-1775.
- [16] Atwal JK, Pinkston-Gosse J, Syken J, et al. PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration[J]. Science (New York, NY), 2008, 322(5903):967-970.



- [17] Bombeiro AL, Thomé R, Oliveira Nunes SL, *et al.* MHC-I and PirB upregulation in the central and peripheral nervous system following sciatic nerve injury[J]. PloS One, 2016, 11(8):e0161463.
- [18] Meng X, Li D, Kan R, *et al.* Inhibition of ANGPTL8 protects against diabetes-associated cognitive dysfunction by reducing synaptic loss via the PirB signaling pathway[J]. J Neuroinflammation, 2024, 21(1):192.
- [19] Austin PJ, Moalem-Taylor G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines[J]. J Neuroimmunol, 2010, 229(1-2):26-50.
- [20] Sharma S, Chopra K, Kulkarni SK. Effect of insulin and its combination with resveratrol or curcumin in attenuation of diabetic neuropathic pain: participation of nitric oxide and TNF- $\alpha$ [J]. Phytother Res, 2007, 21(3):278-283.
- [21] Üçeyler N, Rogausch JP, Toyka KV, *et al.* Differential expression of cytokines in painful and painless neuropathies[J]. Neurology, 2007, 69(1):42-49.
- [22] Zelenka M, Schäfers M, Sommer C. Intraneuronal injection of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain[J]. Pain, 2005, 116(3):257-263.
- [23] 庞淼一, 马奕然, 王培培, 等. NLRP3 炎症小体与神经病理性疼痛关系的研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志 [J]. 2022, 28(10):776-782.
- [24] Paik S, Kim J K, Silwal P, *et al.* An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation[J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(5):1141-1160.

## • 国际译文 •

## 胰腺癌驱动神经元重编程进而促进癌症进展

胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 因其高度恶性被称为“癌中之王”。其复杂的肿瘤微环境中富含外周神经系统成分，包括交感神经和感觉神经纤维。既往研究多聚焦于神经末梢，已证实这些神经纤维可通过“神经-肿瘤”信号调控肿瘤的生长、转移及免疫反应。然而，支配胰腺的神经元胞体位于远离肿瘤的外周神经节，迄今缺乏健康与肿瘤状态下其分子特征的系统解析。目的：绘制健康胰腺和 PDAC 所支配的交感及感觉神经元分子图谱，解析肿瘤对这些神经元的重编程特征，并评估靶向神经系统对肿瘤进程和免疫治疗反应的影响。结果：（1）通过构建 Trace-n-Seq 方法实现从轴突逆行荧光标记神经元胞体、分选和测序。结果表明，75%~90% 的交感神经元和 4%~15% 的背根神经节感觉神经元投射到胰腺，并在单细胞水平获得健康胰腺与肿瘤支配神经元的完整转录谱。（2）单细胞测序结果揭示，PDAC 重编程神经元的分子特征包括神经元亚型比例失衡和广泛基因表达改变。PDAC 改变神经元相互作用并吸引特定亚型进入肿瘤微环境，同时涉及神经发育、轴突引导和免疫调节等，形成胰腺癌神经特征 (pancreatic-cancer nerve signature, PCN)。（3）进一步将神经元数据与肿瘤微环境的单细胞数据集进行整合，建立“神经元-癌症-微环境”互作网络，描绘癌症驱动神经元重编程，而重编程的神经元能够调节癌症相关成纤维细胞，促进其增殖与促炎因子分泌。（4）去神经支配可显著减缓 PDAC 生长、减少癌症相关成纤维细胞的数目，增加免疫细胞浸润和增强对免疫检查点抑制剂（如 PD-1 抗体）的敏感性（即增强抗肿瘤效果）。（5）在肿瘤切除术后 4 周，交感神经元依然保持促肿瘤特征，揭示了 PDAC 切除术后常出现局部复发的重要机制。（6）白蛋白结合型紫杉醇 (Nab-paclitaxel) 不仅通过细胞毒性直接杀伤肿瘤细胞，还可降低肿瘤内感觉神经纤维密度；去交感神经支配的抗儿茶酚胺神经毒素 (6-OHDA) 与其联合使用时，具有抗癌的协同效应。二者单独治疗使 PDAC 肿瘤生长分别减少 2.5 倍和 5.5 倍；联合用药可使肿瘤体积缩小高达 16.5 倍，为临床联合策略提供依据。结论：PDAC 可重编程支配胰腺的交感与感觉神经元，改变其分子特征并参与塑造免疫微环境，靶向神经系统（如去神经或联合化疗）能够增强免疫治疗反应，是 PDAC 治疗中潜在且重要的干预靶点。该研究不仅建立了高精度分析外周神经元的新方法，还为“神经-肿瘤”互作的治疗策略提供了理论与技术基础。

（Thiel V, Renders S, Panten J, *et al.* Characterization of single neurons reprogrammed by pancreatic cancer. Nature, 2025, 640(8060):1042-1051. 北京大学神经科学研究所, 宋嘉芸译, 王佳昕 刘风雨 校）