

疼痛的神经环路及技术研究进展

黄军凯¹ 陈祁青^{2△} 赵继荣¹ 马东¹ 杨云云¹

[关键词] 疼痛;神经环路;钙成像;光遗传学;化学遗传学;综述

[中图分类号] R441.1 [文献标志码] A [文章编号] 1005-0205(2022)08-0085-04

疼痛是疾病最常见的症状之一,指身体受到损伤、疾患或外部刺激引起的不愉快的感觉、情绪和认知体验,并表现为某些自主神经、心理和行为反应^[1]。当前大脑对疼痛的感知机制尚不明晰导致疼痛诊疗的复杂性^[2]。近年来对疼痛的研究取得了很多关键性的进展,但对于疼痛的发生发展机制方面仍存在很多未知问题,疼痛依然是一个重大的临床问题。本文通过综述疼痛的神经环路以及疼痛领域研究中现代化钙成像、光遗传学、化学遗传学技术和应用,旨在为疼痛的研究提供新的思路 and 方向。

1 复杂的疼痛环路和传递途径

复杂的疼痛环路需要多个水平的神经系统组件共同参与形成^[3]。当机体受到有害刺激时,疼痛会经历三个事件—转导、传递和调制,顺序如下:1)刺激事件转化为化学组织事件;2)化学组织和突触间隙事件在神经元中转变为电事件;3)神经元中的电事件在突触中被转导为化学事件;转导完成后,紧接着是传递机制,它通过沿着神经元通路传输电事件而发生,突触间隙中的神经递质将这些信息从一个细胞的突触后末端传递到另一个细胞的突触前末端;同时通过上调或下调,调节事件通过初级传入神经元、背角和大脑高级中枢在所有水平的伤害性通路上发生^[4]。以上机制的完成代表复杂的疼痛环路启动并完成,使机体产生疼痛感。

疼痛的传递同样需要多个层次的中枢神经系统共同参与,且严格依靠于体感神经元回路的兴奋性和抑

制性平衡的影响^[5]。研究发现,脊髓背角在整合多个进入脊柱的输入信号中起着至关重要的作用^[6]。上行系统中,初级传入痛觉感受器负责把接收到的有害信息传递给脊髓背角的投射神经元;随后这些投射神经元的子集将这些感觉信息传递到丘脑,通过脊髓丘脑束到达机体感觉皮层,从而提供有害刺激强度和位置的信息^[7-8]。下行系统中,通过上行信息传入中脑里的导水管周围灰质来整合来自下丘脑、杏仁核和额叶等大脑高级中枢的信息,以及接收来自背角的上行伤害性输入,同时通过投射神经元到延髓头端腹侧和脑桥背外侧被盖来对脊髓背角中的伤害信息加工处理^[9-10]。

2 疼痛治疗领域中的技术与应用

2.1 钙成像技术

钙成像技术在解析疼痛生理或病理条件下神经环路调控机制过程中,通过实时监测钙离子的变化可精确的反映出大脑对疼痛感知过程的神经元活动,近年来已成为监测和分析神经元功能活动的常用技术。其原理是在细胞转导过程中,利用特殊的荧光染料或蛋白质荧光探针标记组织细胞内钙离子浓度的改变,通过钙离子浓度的变化与神经元信息的传递活动之间的联系,达到监测神经元活动的目的。要对钙离子的动态变化进行有效的检测和记录,钙离子指示剂的选择非常重要,现最常用的钙离子指示剂有化学性钙离子指示剂和基因编码钙离子指示剂两种。化学性钙离子指示剂可以与钙离子的小分子螯合,引起荧光发射光谱的改变,使细胞内钙离子浓度变化被准确的监测^[11]。化学性钙离子指示剂标记速度快,多用于标记单一细胞和小群细胞的应用当中,但持续标记时间短并且制作标记模型难度较大,基因编码钙离子指示剂的出现解决了这些难题^[12]。基因编码指示剂由来自后生动物的钙调蛋白(Calmodulin, CaM)、CaM 结合域(例如 M13)和循环排列的绿色荧光蛋白或其变体增强型荧光蛋白三个部分组成,具有很高的灵敏性

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(81760877)

甘肃省创新基地和人才计划-自然科学基金
(17JR5RA051)

甘肃省中医院博士启动基金项目(2018-1)

¹ 甘肃中医药大学(兰州,730000)

² 甘肃省中医院

△通信作者 E-mail:15294181975@163.com

且可以被长久标记,更容易被检测和记录,研究发现 GCaMP6 指示剂具有较高的敏感性和稳定性,现广泛应用于在体钙成像研究中^[13-14]。

近年来钙成像技术在研究在体神经元方面越来越重要,且钙离子荧光指示剂及新型显微镜技术的发展和应用起到了巨大的推动作用,该技术已成为探索疼痛环路和其它神经元回路的有力工具,运用该技术标记特定细胞类型的神经元,追踪神经元动作电位,可以精确的检测神经元集群的活动并更准确的反映大脑环路生理条件的现象。Fowler 等^[15]开发研究一种膝状神经节神经元的体内钙成像技术,通过特定的手术方式暴露小鼠的膝状神经节,成功的测量了膝状神经节神经元集合对口腔中的味觉刺激的反应,这个技术可以用来监测外周味觉神经元的活动并且为基础味觉行为分析提供补充信息。Hornung 等^[16]在小鼠腹侧后内核注入腺相关病毒,使用 GCaMP 和植入的微型显微镜对小鼠丘脑腹侧后内侧核中的兴奋神经元进行成像,研究发现雌二醇可以通过增加网状丘脑内抑制性神经元的活动来减轻带状疱疹的疼痛,同时可以抑制腹侧后内侧核的兴奋性活动,减轻口面部疼痛感觉。Oguchi 等^[17]通过应用体内钙成像技术应用于猕猴大脑,并开发新型荧光显微镜对猕猴的初级视觉皮层的神经元进行成像,在猕猴大脑半球中成功的发现了数十个清晰的荧光信号,且这些神经元的一个子集显示出清晰的视网膜定位和方向调整,最后成功地解码了刺激方向并对细胞进行了跟踪,这为人脑机制研究提供了重要的实验依据。

2.2 光遗传学技术

光遗传学技术由光学和遗传学两个领域融合而成,在生理或病理条件下,该技术可以调控特定的疼痛神经环路,观察出现的疼痛行为学效应,以此来确定疼痛行为与特定神经元活动之间的因果关系,进而研究疼痛神经环路的功能。其原理是通过转换光敏蛋白产生的电流来操纵细胞活动,利用病毒作为载体,在特定神经元里表达光敏蛋白离子通道,然后依靠特定波长的照射刺激下激活,使特定类型的神经元被激活或抑制,达到特异性地调节这些神经元活动的目的^[18]。视紫红质(Channelrhodopsin-2, ChR2)最早在绿藻中发现,是最常用的一种兴奋性光敏蛋白,在受到蓝光(+470 nm)照射刺激下被激活,光刺激会引起阳离子内流入细胞使得细胞去极化和动作电位的激发,最终使神经元产生兴奋^[19];盐视紫红质(Natronomonas-phAraonishalorhodopsins, NpHRs)最早是从古细菌中发现并被鉴定提取出来,是常用的抑制性光敏感蛋白,它在黄光(+580 nm)照射刺激下被激活,光刺激使得氯离子增高泵入细胞,从而产生细胞膜超极化并

抑制受刺激细胞中动作电位的激发,最终使神经元受到抑制^[20]。

电信号和动作电位的发生是神经元之间信息传递的主要方式,这就凸显了区分和识别神经环路的重要性,而光遗传学刚好可以通过特定光刺激区分识别并控制各个神经环路,进而调控特定神经元之间信息的传递,在疼痛领域研究中取得了很大的进展。Cai 等^[21]运用光遗传学技术刺激激活大鼠基底外侧杏仁核到杏仁核中央核的神经通路,研究表明大鼠的基础疼痛和致敏疼痛在刺激下被有效抑制。Zhou 等^[22]通过改变前额叶皮层到伏隔核的投射,利用光遗传学技术在前额叶皮层的锥体神经元中表达卤化视紫红质,选择性地抑制这些神经元向伏隔核核心中神经元的轴突投射,结果表明通过抑制前额叶皮层或投射到伏隔核,大鼠的急性疼痛感增大。Tashima 等^[23]通过光遗传学技术刺激 ChR2 的非伤害性 A β 纤维,对患有周围神经损伤的大鼠模型的足底皮肤进行蓝光照射后,引起大鼠产生疼痛反应。

2.3 化学遗传学技术

化学遗传学技术由化学类药物和基因技术两部分结合而成,是一种利用化学工具对细胞过程调控的新型技术,该技术可以对神经元进行高时空分辨率的控制,进而有选择性的调控特定的疼痛神经环路,使得细胞膜内外电压和动物行为变化被有效检测,以此达到研究疼痛神经环路的功能以及疼痛相关行为的调控机制。其原理是利用基因技术对生物体蛋白质进行改造,改造后的生物体蛋白质可以与先前无法识别的生物小分子进行相互作用,从而可以实现对生物小分子的活性进行控制,以此来探索和控制细胞过程。近年来,科研者们完成了很多基因改造后的蛋白,例如蛋白质激酶、G 蛋白偶联受体(G Protein Coupled receptors, GPCRs)、配体门控离子通道及各种代谢酶等,其中由 Armbruster 等基于 GPCRs 发明的“由设计药物专门激活的设计受体”(Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs, DREADDs)的化学遗传学技术被广泛应用^[24]。DREADDs 技术通过一系列基因工程改变了 G 蛋白偶联受体—乙酰胆碱受体的结构,让这些改变后的受体只能被特定的药物化合物氯氮平—氧化氮(Clozapine N-oxide, CNO)激活或抑制^[25]。当前最常用的受体为 Gq-DREADDs (hM1Dq, hM3Dq 和 hM5Dq) 和 Gi-DREADDs (hM2Di, hM4Di 和 KORD), Gq 通过与乙酰胆碱受体 M3 偶联使细胞去极化,增强细胞兴奋性从而使神经元放电增加, Gi 通过与乙酰胆碱受体 M4 偶联使细胞超级化,从而抑制神经元的放电使神经元沉默^[26]。

和光遗传学一样,化学遗传学也依靠病毒为载体,

利用基因技术把改造后的受体在特定的神经元里表达,进一步来调控神经元的活性,更好的去解析研究疼痛神经环路。同时由于该技术门槛低、操作便捷并且可以无创、特异性地增强或抑制神经元活动,现阶段主要用于疼痛、焦虑等神经系统疾病的基础研究中。Zhu 等^[27]在小鼠身上建立了坐骨神经损伤和膝关节骨关节炎的模型,利用化学遗传学技术抑制小鼠模型腹外侧导水管周围灰质的谷氨酸能神经元,最后在对特定穴位电针治疗下对小鼠进行伤害性行为测试,研究表明中医电针穴位治疗能够通过腹外侧导水管周围灰质的 cb1 受体的激活或抑制来调节 γ -氨基丁酸(GABA)能和谷氨酸能的神经元活动,可以达到治疗镇痛的效果。Bian 等^[28]探索了从前扣带回皮层到腹侧海马体的神经投射,利用化学遗传学技术双向调节它们之间的神经元活动,研究发现前扣带回皮层到腹侧海马体的神经回路能够控制恐惧泛化的表达,并且为预防和治疗焦虑症患者提供了新思路。Saika 等^[29]通过化学遗传学技术,利用 Gq 化学激活表达 CX3CR1 的脊髓小胶质细胞,通过观察不同性别的小鼠在激活下的行为和功能结果,发现脊髓小胶质细胞的激活可以引起雄性小鼠的疼痛超敏反应,表明脊髓小胶质细胞在调节疼痛方面有性别差异性。

2.4 不同技术的联合应用

虽然在一些基础神经领域研究中证明了这两种遗传学技术和钙成像技术是非常实用的工具,但是随着对疼痛神经环路研究的深入,单一的技术应用已经满足不了需求,越来越多的研究者把这些技术联合起来应用。

2.4.1 钙成像技术与光遗传学技术 钙成像技术与光遗传学技术的结合,可以在短时间内精确可控地调节神经元的活动,然后通过钙离子成像监测神经元群活性的改变,为诊疗疼痛提供新的思路。Sun 等^[30]运用钙成像结合光遗传学在腓总神经小鼠模型上研究外侧臂旁核对基础性伤害感受和神经性疼痛的影响,发现激活 GABA 能外侧臂旁核神经元不影响基础伤害感觉但可以减轻神经性疼痛,抑制谷氨酸能外侧臂旁核神经元可同时减轻基础伤害感觉和神经性疼痛,这说明激活或抑制外侧臂旁核神经元活动可以控制神经性疼痛的进程,为疼痛的研究提供了有力的实验依据。

2.4.2 钙成像技术与化学遗传学技术 钙成像与化学遗传学技术的结合,可以在药理学作用下调控神经元活动,并且在这个过程中可以长时间观察不同行为刺激下的神经元的变化,同时在使用病毒载体示踪各个不同神经元时,可以在不同的神经脑区特异性表达钙离子,从而准确观察到特定的神经元的活动变化,这为筛选和开发治疗疼痛相关疾病的药物提供了有力的

途径并为探索新的神经环路提供了有力的手段。Hua 等^[31]通过在体钙成像技术结合光遗传学技术,在使用不同麻醉药物的全身麻醉后小鼠内标记神经元,然后通过工具进行记录追踪神经元和观察小鼠的各种应激行为,研究表明小鼠在全身麻醉作用下激活了中央杏仁核中不同的 GABA 能神经元群,并且这些细胞具有很好的镇痛作用,可以抑制急性和慢性神经疼痛感觉。

2.4.3 光遗传学技术与化学遗传学技术 光遗传学技术与化学遗传学技术由于对特定神经元活性表达时间的不同以及空间上的相似性,常被研究人员用来对同一大脑回路中的神经元变化进行综合研究,能够多维度地去调控和观察神经元的变化,也更好地为解析疼痛神经环路提供了方向。Zhang 等^[32]使用光遗传学和化学遗传学技术等工具探究慢性疼痛和抑郁的神经回路及机制,并系统地研究了中脑腹侧被盖区中多巴胺能神经元在慢性疼痛的三叉神经痛模型中合并抑郁行为中的作用,该团队建立了一条从脊髓三叉神经尾亚核到外侧臂旁核再到中脑腹侧被盖区的谷氨酸能投射通路,同时在此基础上发现同一通路能够控制慢性神经性疼痛状态下抑郁样行为的发展,为治疗 and 了解疼痛与抑郁共存疾病提供了有力的支撑。

3 小结

研究疼痛的核心就是解析疼痛神经环路及发生发展机制,近年来钙成像和光遗传学以及化学遗传学等现代化技术的发展,为探索疼痛环路及机制提供了前所未有的机会,让笔者对疼痛的认知也有了质的提升。但目前这些技术应用仅仅局限在动物身上,在动物身上构建模型去解析疼痛,而实际应用到人体中仍旧存在很多问题。相信随着疼痛领域这些新型技术的不断发展,人们在未来终将解决疼痛的未知问题。

参考文献

- [1] WALTERS E T, WILLIAMS A C C. Evolution of mechanisms and behaviour important for pain[J]. Philos Trans Roy Soc: Biol Sci, 2019, 374(1785): 20190275.
- [2] LEFAUCHEUR J P. Clinical neurophysiology of pain[J]. Handb Clin Neurol, 2019, 161: 121-148.
- [3] MERCER LINDSAY N, CHEN C, GILAM G, et al. Brain circuits for pain and its treatment[J]. Sci Transl Med, 2021, 13(619): eabj7360.
- [4] PEIRS C, SEAL R P. Neural circuits for pain: recent advances and current views[J]. Science, 2016, 354(6312): 578-584.
- [5] LEE G I, NEUMEISTER M W. Pain: pathways and physiology[J]. Clin Plast Surg, 2020, 47(2): 173-180.
- [6] HARDING E K, FUNG S W, BONIN R P. Insights into spinal dorsal horn circuit function and dysfunction using optical approaches[J]. Front Neural Circuits, 2020, 14:

- 31.
- [7] TAN L L, KUNER R. Neocortical circuits in pain and pain relief[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2021, 22(8): 458-471.
- [8] TSUDA M, KOGA K, CHEN T, et al. Neuronal and microglial mechanisms for neuropathic pain in the spinal dorsal horn and anterior cingulate cortex[J]. *J Neurochem*, 2017, 141(4): 486-498.
- [9] BASBAUM A I, BAUTISTA D M, SCHERRER G, et al. Cellular and molecular mechanisms of pain[J]. *Cell*, 2009, 139(2): 267-284.
- [10] YAM M F, LOH Y C, TAN C S, et al. General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(8): 2164.
- [11] 陈星卉, 李政懋, 卢应梅, 等. 采用 GCaMP 活体钙成像解析神经环路调控机制的研究策略及意义[J]. *生理科学进展*, 2021, 52(4): 246-252.
- [12] OH J, LEE C, KAANG B K. Imaging and analysis of genetically encoded calcium indicators linking neural circuits and behaviors[J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2019, 23(4): 237-249.
- [13] CHEN T W, WARDILL T J, SUN Y, et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity[J]. *Nature*, 2013, 499(7458): 295-300.
- [14] WU N, NISHIOKA W K, DERECKI N C, et al. High-throughput-compatible assays using a genetically-encoded calcium indicator[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 12692.
- [15] FOWLER B E, MACPHERSON L J. In vivo calcium imaging of mouse geniculate ganglion neuron responses to taste stimuli[J]. *J Vis Exp*, 2021, 168: 10.3791/62172.
- [16] HORNUNG R, PRITCHARD A, KINCHINGTON P R, et al. Reduced activity of GAD67 expressing cells in the reticular thalamus enhances thalamic excitatory activity and varicella zoster virus associated pain[J]. *Neurosci Lett*, 2020, 736: 135287.
- [17] OGUCHI M, JIASEN J, YOSHIOKA T W, et al. Microendoscopic calcium imaging of the primary visual cortex of behaving macaques[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 17021.
- [18] SHIRAI F, HAYASHI-TAKAGI A. Optogenetics: applications in psychiatric research[J]. *Psychiatry Clin Neurosci*, 2017, 71(6): 363-372.
- [19] MÜLLER M, BAMANN C, BAMBERG E, et al. Light-induced helix movements in channelrhodopsin-2[J]. *J Mol Biol*, 2015, 427(2): 341-349.
- [20] ZHANG F, VIEROCK J, YIZHAR O, et al. The microbial opsin family of optogenetic tools[J]. *Cell*, 2011, 147(7): 1446-1457.
- [21] CAI Y Q, WANG W, PAULUCCI-HOLTHAUZEN A, et al. Brain circuits mediating opposing effects on emotion and pain[J]. *J Neurosci*, 2018, 38(28): 6340-6349.
- [22] ZHOU H, MARTINEZ E, LIN H H, et al. Inhibition of the prefrontal projection to the nucleus accumbens enhances pain sensitivity and affect[J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 240.
- [23] TASHIMA R, KOGA K, SEKINE M, et al. Optogenetic activation of non-nociceptive A β fibers induces neuropathic pain-like sensory and emotional behaviors after nerve injury in rats[J]. *eNeuro*, 2018, 5(1): ENEURO.0450-17.
- [24] ARMBRUSTER B N, LI X, PAUSCH M H, et al. Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(12): 5163-5168.
- [25] BURNETT C J, KRASHES M J. Resolving behavioral output via chemogenetic designer receptors exclusively activated by designer drugs[J]. *J Neurosci*, 2016, 36(36): 9268-9282.
- [26] ROTH B L. DREADDs for Neuroscientists[J]. *Neuron*, 2016, 89(4): 683-694.
- [27] ZHU H, XIANG H C, LI H P, et al. Inhibition of GABAergic neurons and excitation of glutamatergic neurons in the ventrolateral periaqueductal gray participate in electroacupuncture analgesia mediated by cannabinoid receptor[J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 484.
- [28] BIAN X L, QIN C, CAI C Y, et al. Anterior cingulate cortex to ventral hippocampus circuit mediates contextual fear generalization[J]. *J Neurosci*, 2019, 39(29): 5728-5739.
- [29] SAIKA F, MATSUZAKI S, KISHIOKA S, et al. Chemo-genetic activation of CX3CR1-expressing spinal microglia using Gq-DREADD elicits mechanical allodynia in male mice[J]. *Cells*, 2021, 10(4): 874.
- [30] SUN L, LIU R, GUO F, et al. Parabrachial nucleus circuit governs neuropathic pain-like behavior[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5974.
- [31] HUA T, CHEN B, LU D, et al. General anesthetics activate a potent central pain-suppression circuit in the amygdala[J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23(7): 854-868.
- [32] ZHANG L, WANG J, NIU C, et al. Activation of parabrachial nucleus-ventral tegmental area pathway underlies the comorbid depression in chronic neuropathic pain in mice[J]. *Cell Rep*, 2021, 37(5): 109936.

(收稿日期: 2022-01-02)