

• 综 述 •

神经病理性疼痛中枢敏化的免疫炎症机制研究进展*

孙彩霞^{1,2}, 苏兆亮²综述, 许化溪^{2△}审校

(1. 江苏大学附属医院麻醉科, 江苏镇江 212001; 2. 江苏大学免疫学研究室, 江苏镇江 212013)

关键词: 神经痛; 中枢敏化; 免疫炎症反应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.03.034

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)03-0331-03

神经病理性疼痛 (neuropathic pain, NP) 是由外周或中枢神经系统的病变或功能紊乱而引起的疼痛, 其特征表现为痛觉异常、痛觉过敏甚至自发性疼痛。周围和中枢神经敏化是诱发异常疼痛的主要原因。迄今为止, NP 的治疗尚无确切有效的方法, 阐明其发病机制, 寻找新的治疗靶点是解决该难题的关键所在。传统的观念认为, NP 由单一的神元病变引起, 但近年来随着多种 NP 动物模型的成功建立及深入研究, 人们发现神经系统的免疫炎症是导致 NP 周围和中枢神经敏化的重要机制, 本文就 NP 中枢敏化的免疫炎症机制作一综述。

1 胶质细胞

胶质细胞广泛分布于大脑和脊髓, 占中枢神经系统细胞总数的 70% 以上。两种类型的胶质细胞, 即小胶质细胞和星型胶质细胞, 在 NP 的发生和发展中发挥着重要作用^[1]。胶质细胞是中枢神经系统 (CNS) 固有免疫细胞, 多种因素如神经损伤、病原微生物感染等可使其激活, 活化的胶质细胞分泌大量的炎症介质, 并通过活化的补体共同参与神经免疫炎症过程, 导致神经功能紊乱和痛敏形成 (见图 1)。

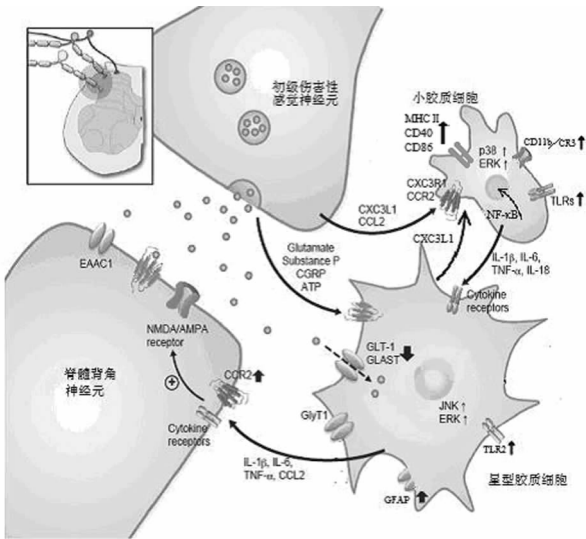


图 1 胶质细胞参与中枢敏化的免疫炎症机制

1.1 小胶质细胞 小胶质细胞是胶质细胞中体积最小的一类细胞, 起源于骨髓的造血干细胞, 在胚胎发育过程中移行到 CNS, 是 CNS 居留的免疫细胞, 约占胶质细胞总数的 5% ~ 10%。小胶质细胞具有与周围的巨噬细胞相似的免疫学特征, 静息状态的小胶质细胞在 CNS 发挥着免疫防御功能。神经损伤后, 在多种信号的刺激下, 小胶质细胞激活, 其形态、细胞表

型、细胞功能等均发生明显改变, 有利于其隔离和吞噬坏死或凋亡的细胞; 同时由于大量炎症介质的产生, 可诱发中枢敏化, 产生病理性疼痛^[2-3]。

1.1.1 细胞表面免疫分子的改变 CD11b/CR3 是小胶质细胞的激活标志物, 在 NP 的各种动物模型中, 其表达水平明显增高。CD11b/CR3 的表达水平与小胶质细胞的吞噬功能、促炎介质的分泌等相关, 但 CD11b/CR3 表达增强是否是 NP 产生的必要条件, 目前尚无直接证据。Ulmann 等^[4]在 P2X4R 缺陷的坐骨神经部分损伤的小鼠中发现, 单一的 CD11b/CR3 表达增强也并不足以导致 NP 产生。

TLRs 是细胞表面的一类模式识别受体 (PRRs), 识别病原或损伤相关的分子模式 (DAMPs, PAMPs), 感知周围环境中的病原或损伤细胞。在 CNS 中, 小胶质细胞通过 TLRs 触发免疫应答, 其家族成员 TLR2、TLR3、TLR4 在 NP 中发挥着重要作用^[5]。脊神经结扎 (SNL) 后, 小胶质细胞 TLR4 表达增加, 并伴有痛敏形成; 研究发现, TLR4 敲除或给予 TLR4 拮抗剂 (FP-1) 的 NP 模型鼠, 小胶质细胞 CD11b 表达下降, 痛敏反应减轻, 此与 TLR4 信号通路能促进 NF-κB 转位进而导致促炎介质产生有关^[6]。TLR2、TLR3 在 NP 中的作用机制与 TLR4 相似, 通过促进小胶质细胞激活和 IL-1β、TNF-α、IL-6 等炎症介质的分泌而诱发中枢敏化^[7-8]。

生理状态下, 脊髓中的小胶质细胞不表达或低表达 MHC II、CD40、CD80、CD86, 但高表达 CD200、CD200R、CD172a 等免疫抑制性分子, 因而小胶质细胞的免疫活性较低^[9-10]。神经损伤后, 激活的小胶质细胞 MHC II、CD40、CD86 表达增加, 其向 T 细胞提呈抗原的能力增强^[10-11]。

1.1.2 促炎因子和神经敏化 在 NP 中, 激活的小胶质细胞钙内流增加, 诱导 NF-κB 转位并激活 MAPK 通路, 促进各类神经炎症介质如 IL-1β、IL-18、IL-6、TNF-α、COX2、PE2 等的合成和分泌, 这些炎症介质一方面通过自分泌或旁分泌的方式进一步使周围的胶质细胞激活并释放炎症因子, 形成炎症级联反应; 另一方面又能直接增强兴奋性突触传递和 (或) 削弱抑制突触效能, 从而改变伤害性传入神经元的极化特点, 诱发中枢敏化, 导致慢性疼痛产生^[12-13]。

1.2 星型胶质细胞 星型胶质细胞是 CNS 中数量最多的一类胶质细胞, 来源于神经外胚层, 其特定的活性标志分子为胶质纤维酸性蛋白 (GFAP); 静息状态的星型胶质细胞调节细胞外离子和神经递质浓度, 维持神经元微环境稳态^[14]。与小胶质细胞类似, 星型胶质细胞也具有免疫活性, 其细胞膜上广泛表达 TLRs^[15]。侵入 CNS 的病原微生物以及组织损伤释放的

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (项目号: 30972748, 81001319)、江苏大学临床医学研究课题 (项目号: JLY2010135)。△ 通讯作者, E-mail: xuhx@ujs.edu.cn。

警报分子与星型胶质细胞表面的 TLRs 绑定,吞噬活性增强,并分泌炎症介质,诱发免疫应答^[16]。

研究认为,星型胶质细胞与 NP 的维持有关,在所有创伤性神经损伤的 NP 动物模型中,损伤部位对应的脊髓背角 GFAP 表达增加,其表达特点与小胶质细胞的 CD11b/CR3 相比,激活时间迟,但持续时间较长^[12]。NP 中,星型胶质细胞激活除与细胞外增高的 K^+ 、谷氨酸、SP、小胶质细胞分泌的促炎因子等有关外,TLR2 亦发挥着重要作用^[14]。TLR2 缺乏的星型胶质细胞在损伤神经元的刺激下,其分泌促炎因子的能力显著下降;TLR2 敲除的 SNL 小鼠,星型胶质细胞的激活程度明显减弱,脊髓中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量下降,痛敏反应减轻,说明 TLR2 与星型胶质细胞维持 NP 有关^[7]。

尽管星型胶质细胞维持 NP 的作用已得到业界公认,但对神经元-星型胶质细胞与小胶质细胞-星型胶质细胞之间的激活信号机制及星型胶质细胞-神经元之间的信号机制仍知之甚少,是否有更多的免疫炎症反应参与其中,尚需进一步研究。

2 趋化因子及其受体触发的脊髓神经免疫应答

趋化因子是一类对白细胞迁移具有趋化活性的小分子蛋白,在急性炎症反应中发挥着重要作用,也是许多慢性炎症性疾病如关节炎、炎症性肠病等的重要介导者^[17];另外,趋化因子也参与神经系统不同部位慢性神经炎症形成,包括神经损伤部位、背根神经节(DRG)、脊髓、脑^[18]。近年来,在多种 NP 动物模型的研究中发现,多种趋化因子都能介导胶质细胞的激活、中枢敏化的形成,尤其是 CCL2/CCR2、CX3CL1/CX3CR1 的相互作用^[19-20],对 NP 的形成和发展至关重要^[21]。

2.1 CCL2/CCR2 CCL2 亦命名为单核细胞趋化蛋白 1 (MCP1),组成性低表达于初级伤害性传入神经元,神经损伤可诱导其高表达,并以活性依赖的方式由中枢段的突触囊泡释放至脊髓^[20,22]。CCR2 是 CCL2 的受体,组成性表达于背角神经元和胶质细胞,周围神经损伤可诱导小胶质细胞高表达,其分布空间与高表达的 CCL2 一致^[19-20],且 CCL2/CCR2 的表达增高先于小胶质细胞的激活^[19],CCL2 中和性抗体或 CCR2 缺陷小鼠均可抑制神经损伤诱导的小胶质细胞激活和增殖^[23],由此推论,神经损伤后,CCL2/CCR2 的相互作用是小胶质细胞活化的前提。

另外,CCL2 在脊髓中的表达并不局限于神经元,脊神经结扎后,星型胶质细胞亦高表达 CCL2。培养的星型胶质细胞在 TNF- α 的刺激下,CCL2 的表达增加 100 倍以上并以 JNK 依赖的方式迅速释放。星型胶质细胞分泌的 CCL2 作用于背角神经元上的 CCR2,通过增强伤害性神经元突触前膜谷氨酸的释放和后膜谷氨酸受体功能,抑制 GABA 诱导的抑制性突触传递,快速磷酸化 ERK 进而激活 NMDA 受体,以直接、快速和非基因转录的方式诱导中枢敏化,因此 CCL2/CCR2 是星型胶质细胞维持 NP 机制之一。CCL2、CCR2 的过度表达或缺乏均对 NP 行为有直接影响^[20,23-24]。

2.2 CX3CL1/CX3CR1 在神经系统中,CX3CL1 以膜固定的形式组成性表达在 DRG 和脊髓的神经元中,神经损伤可诱导其从膜上裂解并释放,神经损伤亦可上调星型胶质细胞表达 CX3CL1。CX3CR1 是 CX3CL1 的唯一受体,在多种 NP 动物模型中,小胶质细胞的 CX3CR1 表达上调^[25]。研究认为^[25-26],CX3CL1 与小胶质细胞上的 CX3CR1 结合,激活 p38、MAPK 通路,诱导小胶质细胞激活并合成 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等促炎细胞因子,从而触发 CNS 的神经免疫应答,诱发中枢敏化,导致病理性疼痛产生。

3 α - β T 细胞

α - β T 细胞在适应性免疫应答中发挥着重要作用,根据其细胞表面分子及功能不同, α - β T 细胞分为 CD4⁺ 及 CD8⁺ T 细胞。2004 年,Moalem 等^[27]首次证实 α - β T 细胞参与了 NP 的外周敏化形成。随后,Hu 和 Cao 的研究小组^[28-29]也相继发现,CCI 或 SNL 后,腰段脊髓伴有明显的 CD4⁺ T 细胞的浸润,CD4⁺ 受体缺乏的模型鼠痛敏行为明显改善。这些研究表明,CD4⁺ T 细胞介导的适应性免疫应答亦参与了中枢敏化的形成。其机制可能与神经损伤后小胶质细胞的抗原提呈能力增强及 CD4⁺ T 细胞表面的 CD154 与小胶质细胞 CD40 相互作用促进小胶质细胞分泌促炎介质有关^[11]。目前对中枢神经系统 T 细胞在神经损伤所致的 NP 中的作用研究都集中在疼痛促进方面,其是否对疼痛的产生或发展有抑制作用,尚无报道。

在小鼠的内脏痛模型中,CD4⁺ T 细胞对疼痛具有抑制作用^[30]。在 CNS 的其他疾病中,T 细胞扮演着保护或损伤的双重角色,如促进轴突再生或退变,改善或削弱运动能力等,T 细胞的多重作用可能与其异质性有关。CD4⁺ T 细胞根据其分泌的细胞因子可分为 Th1、Th2、Th17、Treg 等,在 NP 外周敏化机制中,上述各功能亚群发挥的作用不同,如坐骨神经损伤后,其周围浸润的 Th17 细胞或经腹腔过继转移的 Th1 细胞维持了 NP 的发展,但 Th2 作用与此相反^[27,31]。然而,神经损伤后,脊髓中浸润的 CD4⁺ T 细胞单一的疼痛促进作用显然迥异于周围神经系统,其是否与特定的功能亚群浸润或 CNS 的微环境有关,目前尚不清楚。

4 结 论

近年来,随着对多种神经病理性疼痛动物模型研究积累,人们对免疫细胞及炎症介质在 NP 中所发挥的作用已经有较深入的了解,尤其是小胶质细胞在 CNS 中的作用。但众多的研究结果也提示了 NP 发病机制的复杂性。星型胶质细胞维持 NP 的确切机制、T 细胞在 NP 发展中的作用仍不清楚。然而,随着对神经病理性疼痛免疫致病机制研究的深入,有望为 NP 的治疗提供新的靶点。

参考文献

- [1] Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage[J]. Annu Rev Neurosci, 2009, 32: 1-32.
- [2] Beggs S, Salter MW. Stereological and somatotopic analysis of the spinal microglial response to peripheral nerve injury. Brain Behav [J]. Immun, 2007, 21(5): 624-633.
- [3] Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain[J]. Nat Rev Neurosci, 2009, 10(1): 23-36.
- [4] Ulmann L, Hatcher JP, Hughes JP, et al. Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain[J]. J Neurosci, 2008, 28(44): 11263-11268.
- [5] Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs[J]. J Immunol, 2004, 173(6): 3916-3924.
- [6] Bettoni I, Comelli F, Rossini C, et al. Glial TLR4 receptor as new target to treat neuropathic pain: Efficacy of a new receptor antagonist in a model of peripheral nerve injury in mice[J]. Glia, 2008, 56(12): 1312-1319.
- [7] Kim D, Kim MA, Cho IH, et al. A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity[J]. J Biol Chem, 2007, 282(20): 14975-14983.

- [8] Obata K, Katsura H, Miyoshi K, et al. Toll-like receptor 3 contributes to spinal glial activation and tactile allodynia after nerve injury[J]. J Neurochem, 2008, 105(6): 2249-2259.
- [9] Olson JK. Immune response by microglia in the spinal cord[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1198: 271-278.
- [10] Colton CA. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain[J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2009, 4(8): 399-418.
- [11] Cao L, Palmer CD, Malon JT, et al. Critical role of microglial CD40 in the maintenance of mechanical hypersensitivity in a murine model of neuropathic pain[J]. Eur J Immunol, 2009, 39: 3562-3569.
- [12] Vallejo R, Tilley DM, Vogel L, et al. The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain[J]. Pain Pract, 2010, 10(16): 167-184.
- [13] Kawasaki Y, Zhang L, Cheng JK, et al. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord[J]. J Neurosci, 2008, 28(33): 5189-5194.
- [14] Nakagawa T, Kaneko S. Spinal astrocytes as therapeutic targets for pathological pain[J]. J Pharmacol Sci, 2010, 114(2): 347-353.
- [15] Carpentier PA, Duncan DS, Miller SD. Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity[J]. Brain Behav Immun, 2008, 22(1): 140-147.
- [16] Gao YJ, Ji RR. Chemokines, neuronal-glial interactions, and central processing of neuropathic pain[J]. Pharmacol Ther, 2010, 126(1): 56-68.
- [17] Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation[J]. N Engl J Med, 2006, 354(4): 610-621.
- [18] Miller RJ, Rostene W, Apartis E, et al. Chemokine action in the nervous system[J]. J Neurosci, 2008, 28(23): 11792-11795.
- [19] Zhang J, De Koninck Y. Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury[J]. J Neurochem, 2006, 97(5): 772-783.
- [20] Thacker MA, Clark AK, Bishop T, et al. CCL2 is a key mediator of microglia activation in neuropathic pain states[J]. Eur J Pain, 2009, 13(2): 263-272.
- [21] Abbadie C, Bhangoo S, De Koninck Y, et al. Chemokines and pain mechanisms[J]. Brain Res Rev, 2009, 60(1): 125-134.
- [22] Dansereau MA, Gosselin RD, Pohl M, et al. Spinal CCL2 pronociceptive action is no longer effective in CCR2 receptor antagonist-treated rats[J]. J Neurochem, 2008, 106(4): 757-769.
- [23] Zhang J, Shi XQ, Echeverry S, et al. Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain[J]. J Neurosci, 2007, 27(25): 12396-12406.
- [24] Gao YJ, Zhang L, Samad OA, et al. JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain[J]. J Neurosci, 2009, 29(1B): 4096-4108.
- [25] Zhuang ZY, Kawasaki Y, Tan PH, et al. Role of the CX3CR1/p38 MAPK pathway in spinal microglia for the development of neuropathic pain following nerve injury-induced cleavage of fractalkine[J]. Brain Behav Immun, 2007, 21(5): 642-651.
- [26] Clark AK, Yip PK, Grist J, et al. Inhibition of spinal microglial cathepsin S for the reversal of neuropathic pain[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(17): 10655-10660.
- [27] Moalem G, Xu K, Yu L. T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats[J]. Neuroscience, 2004, 129(5): 767-777.
- [28] Hu P, Bembrick AL, Keay KA, et al. Immune cell involvement in dorsal root ganglia and spinal cord after chronic constriction or transection of the rat sciatic nerve[J]. Brain Behav Immun, 2007, 21(4): 599-616.
- [29] Cao L, DeLeo JA. CNS-infiltrating CD4⁺ T lymphocytes contribute to murine spinal nerve transection-induced neuropathic pain[J]. Eur J Immunol, 2008, 38(3): 448-458.
- [30] Verma-Gandhu M, Bercik P, Motomura Y, et al. CD4⁺ T-cell modulation of visceral nociception in mice[J]. Gastroenterology, 2006, 130(12): 1721-1728.
- [31] Kleinschnitz C, Hofstetter HH, Meuth SG, et al. T cell infiltration after chronic constriction injury of mouse sciatic nerve is associated with interleukin-17 expression[J]. Exp Neurol, 2006, 200(4): 480-485.

(收稿日期: 2011-10-09)

• 综 述 •

蜡样芽胞杆菌聚合酶链式反应实验室检测技术进展

黄永亮 综述, 金雄章 校审

(广西壮族自治区百色市乐业县疾病预防控制中心 533200)

关键词: 芽胞杆菌, 蜡状; 聚合酶链式反应

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 03. 035

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)03-0333-03

蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*, *B. cereus*)是一种革兰阳性需氧芽孢杆菌, 广泛分布于植物和土壤等环境中, 它是一种食源性致病菌, 通常引起食物中毒的 *B. cereus* 为呕吐型和腹泻型两类, 常在世界范围内引起食物中毒^[1-3]。检测 *B. cereus* 的传统方法是培养法, 但其敏感性低且耗时长。聚合酶链式反应(PCR), 是一种 DNA 扩增技术, 当存在模板 DNA、底物、上下游引物和耐热 DNA 聚合酶时, 经过多次“变性-复性-延伸反应”的循环过程, 模板 DNA 就可得到大量扩增。2004 年, *B.*

cereus 的全基因组测序已经完成, 并在其 36 个基因序列中确定了 *bcr1*~18 等 18 个不同的 DNA 重复片段; 根据 *B. cereus* 不同性质的重复片段可分为 3 组^[4]: A 组是 *bcr1*~3, 每株具有从 4~116 高度可变的拷贝数, 是染色体之间的非保守区域, 该区域的基因编码与炭疽芽胞杆菌及苏云金芽胞杆菌具有高度的同源性; B 组在 *bcr4*~6 区域, 其保守性介于 A 组和 C 组之间; C 组分布在 *bcr7*~18, 为高度保守基因区域。根据 *B. cereus* 特异性基因片段中的开放阅读框架部份序列设计引物, 可