

角质形成细胞 Wnt5a 调控 MMP9 参与 CRPS-I 型外周敏化机制研究

朱 贺, 闻 蓓, 许 力, 黄宇光

中国医学科学院北京协和医院麻醉科, 北京 100730

通信作者: 许 力, E-mail: pumchxuli@163.com

黄宇光, E-mail: garypumch@163.com

【摘要】目的 探究皮肤角质形成细胞 Wnt5a 通过靶向调控基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP9) 的表达参与复杂区域疼痛综合征 (complex regional pain syndrome, CRPS) -I 型外周敏化的机制, 寻找该慢性疼痛的潜在治疗策略。**方法** 本研究分为两部分, 第一部分为体外实验。体外培养人永生角质形成细胞 HaCaT 进行氧糖剥夺/复氧 (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 处理, 初步观察 OGD/R 早期 (24 h 内) 线粒体损伤及膜电位变化, 并探究给予不同浓度 Wnt5a 抑制剂 Box5 对 MMP9 的影响。第二部分为动物实验。将大鼠随机分为慢性缺血后疼痛 (chronic postischemia pain, CPIP) 组、Box5 (20) 组、Box5 (40) 组和对照组, 每组 8 只, CPIP 组、Box5 (20) 组、Box5 (40) 组先建立大鼠患肢缺血再灌注 CPIP 模型, 模拟 CRPS-I 型病理生理过程, Box5 (20) 组和 Box5 (40) 组在此基础上分别足底注射 20 $\mu\text{mol/L}$ 和 40 $\mu\text{mol/L}$ Box5 溶液 100 μL , 对照组和 CPIP 组则分别注射生理盐水 100 μL 。通过疼痛行为学测定观察 4 组大鼠 2 周内不同时间点 (D1, D2, D4, D10, D14) 机械痛和热痛阈值变化情况。HE 染色观察大鼠皮肤炎症浸润及角化情况, 免疫荧光染色观察 4 组 MMP9 的表达情况, ELISA 检测 4 组背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 的 IL-1 β 及肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平。**结果** 体外实验: HaCaT 细胞进行 OGD/R 处理后, MMP9 平均荧光强度显著增加 ($P < 0.001$); 透射电镜下观察到 OGD/R 组出现线粒体明显萎缩, 线粒体膜电位检测显示, 与对照组相比, OGD/R 组提示线粒体膜电位下降明显 ($P = 0.027$)。动物实验: 与 OGD/R 组相比, 仅 Box5 (40) 组线粒体膜电位上升具有统计学差异 ($P = 0.046$)。行为学检测发现 CPIP 组大鼠术后各时间点 (D1, D2, D4, D10, D14) 机械痛阈值和热痛阈值均显著降低 (P 均 < 0.05)。HE 染色提示 CPIP 组大鼠患足真皮层出现大量炎症细胞浸润, 表皮出现过度角化, 颗粒层及棘层厚度显著增加 ($P < 0.001$)。免疫荧光试验显示, CPIP 组角质形成细胞 MMP9 荧光强度显著增加 ($P < 0.001$); 与 CPIP 组相比, Box5 (20) 组 ($P = 0.002$) 和 Box5 (40) 组 ($P < 0.001$) MMP9 荧光强度均显著下降。ELISA 检测结果显示, CPIP 组 IL-1 β ($P = 0.048$) 和 TNF- α 浓度 ($P = 0.002$) 显著升高; 与 CPIP 组相比, Box5 (40) 组 IL-1 β ($P = 0.047$) 和 TNF- α 浓度 ($P = 0.047$) 显著下降。**结论** 外周局部缺血再灌注损伤可导致角质形成细胞 MMP9 过度表达, 引起 CRPS-I 型外周敏化。靶向抑制 Wnt5a/MMP9 可逆转 CPIP 大鼠疼痛行为, 为临床治疗慢性痛提供了参考依据。

【关键词】 复杂区域疼痛综合征; 角质形成细胞; Wnt5a; MMP9; 外周敏化

【中图分类号】 R614; R364 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-9081(2024)02-0335-09

DOI: 10.12290/xhyxzz.2023-0551

Mechanism of Wnt5a on Keratinocyte Regulating MMP9 for CRPS-I Peripheral Sensitization

ZHU He, WEN Bei, XU Li, HUANG Yuguang

Department of Anesthesiology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

Corresponding authors: XU Li, E-mail: pumchxuli@163.com

HUANG Yuguang, E-mail: garypumch@163.com

基金项目: 国家自然科学基金 (82271262)

引用本文: 朱贺, 闻蓓, 许力, 等. 角质形成细胞 Wnt5a 调控 MMP9 参与 CRPS-I 型外周敏化机制研究 [J]. 协和医学杂志, 2024, 15 (2): 335-343. doi: 10.12290/xhyxzz.2023-0551.

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of Wnt5a on keratinocyte involved in the peripheral sensitization of complex regional pain syndrome type-I (CRPS-I) by regulating the expression of MMP9, and search for potential therapeutic strategies. **Methods** Cultured HaCaT cells were treated with oxygen glucose deprivation/re-oxygenation (OGD/R). The early stage of mitochondrial damage and membrane potential changes after OGD/R and the effects of Box5 (Wnt5a inhibitor) at different concentrations (20 $\mu\text{mol/L}$, 40 $\mu\text{mol/L}$) on MMP9 were explored. Adult male Sprague-Dawley rats were divided into Control group ($n=8$), CPIP group ($n=8$), Box5 (20) group ($n=8$) and Box5 (40) group ($n=8$). The rat chronic post-ischemia pain (CPIP) model was established to mimic the pathophysiological process of CRPS-I. Box5 (20) group and Box5 (40) group were treated with intraplantar injection of 20 $\mu\text{mol/L}$ and 40 $\mu\text{mol/L}$ Box5 100 μL , respectively. The changes of mechanical withdrawal threshold and thermal withdrawal latency were measured within two weeks, and the skin inflammatory infiltration and keratosis were observed by HE staining. The expression of MMP9 was observed by immunofluorescence, and the levels of IL-1 β and TNF- α in dorsal root ganglion of different groups were detected by ELISA. **Results** *Vitro* experiment: After OGD/R treatment, the mitochondrial atrophy was observed in OGD/R group under transmission electron microscope and the average fluorescence intensity of MMP9 was found to increase significantly ($P<0.001$). Compared with Control group, the mitochondrial membrane potential in OGD/R group decreased significantly by JC-1 detection ($P=0.027$). Compared with OGD/R group, only Box5 (40) group had a statistically significant increase in mitochondrial membrane potential ($P=0.046$). Animal experiment: Behavioral tests showed that the mechanical pain threshold and thermal pain threshold of CPIP group were significantly decreased at each time point (D1, D2, D4, D10, D14) (all $P<0.05$). HE staining indicated that there was a large-scale infiltration of inflammatory cell in the dermis and excessive keratosis in the epidermis, and the thickness of stratum granulosum and stratum spinosum increased significantly ($P<0.001$). Immunofluorescence analysis showed that the expression of MMP9 in CPIP group was significantly increased ($P<0.001$). Compared with CPIP group, the fluorescence intensity of MMP9 in Box5 (20) group ($P=0.002$) and Box5 (40) group ($P<0.001$) were significantly decreased. ELISA results showed that the concentrations of IL-1 β ($P=0.048$) and TNF- α ($P=0.002$) in CPIP group were significantly increased. Compared with CPIP group, the concentrations of IL-1 β ($P=0.047$) and TNF- α ($P=0.047$) were significantly decreased in Box5 (40) group. **Conclusions** Peripheral ischemia reperfusion injury leads to overexpression of MMP9 on keratinocytes, resulting in CRPS-I peripheral sensitization. Targeted inhibition of Wnt5a/MMP9 pathway can reverse pain behavior in rat model of CPIP, thus providing a strategy for clinical treatment of chronic pain.

【Key words】 complex regional pain syndrome; keratinocyte; Wnt5a; MMP9; peripheral sensitization

Funding: National Natural Science Foundation of China (82271262)

Med J PUMCH, 2024, 15(2):335-343

复杂区域疼痛综合征 (complex regional pain syndrome, CRPS) 是一种继发于创伤或基础疾病后, 主要发生于四肢且顽固难治的疼痛综合征, 常伴有区域性自主神经功能紊乱、运动功能受损、组织营养不良及微循环变化 (水肿、体温调节障碍) 等^[1-2]。CRPS 在人群中的发生率为 26.2/10 万人年, 根据其于交感神经的关系, 可分为 I 型 (无明确神经损伤) 和 II 型 (伴明确神经损伤证据), 其病理机制尚未明确, 临床治疗效果较差^[3-4]。Wnt 信号通路在神经发育中对细胞增殖分化起重要作用, 不同特异性配体结合 Frizzled (卷曲蛋白) 受

体和共受体 LRP5 (低密度脂蛋白受体家族) 通过依赖 β -catenin (β 连环蛋白) 的经典信号通路和非经典信号通路发挥生物学效应, 其中关键性 Wnt5a 配体可通过调控神经损伤修复及炎症反应参与慢性疼痛的发生^[5-7]。

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 不仅可切割水解组织蛋白, 还可降解炎症因子、趋化因子以及神经递质受体等^[8]。近期研究发现, MMP9 在脑损伤、神经退行性疾病、胶质瘤及慢性疼痛进展中发挥重要作用^[9-10]。Martin 等^[11] 研究指出, 表皮生长因子受体通过激活 MMP9 及 PI3K/AKT/mTOR 通

路增强伤害性感受。此外,基于 CRPS 患者血液组织的蛋白互作网络及富集分析发现差异基因 MMP9 在炎症反应中扮演重要角色^[12]。Rodriguez-Trillo 等^[13]研究发现,敲低内源性 Wnt5a 能够抑制肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 诱导的 MMP9 水平升高,从而抑制类风湿关节炎中成纤维样滑膜细胞引起的炎症反应。因此, MMP9 可能是介导疼痛外周敏化的重要靶点之一。

本研究通过对人永生角质形成细胞 HaCaT 进行氧糖剥夺/复氧 (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 处理及建立大鼠患肢缺血再灌注慢性缺血后疼痛 (chronic postischemia pain, CPIP) 模型 (模拟 CRPS- I 型),探讨角质形成细胞 Wnt5a 通过靶向调控 MMP9 进而参与 CRPS 外周敏化的机制,旨在为临床治疗 CRPS 提供指导依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 动物

成年雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司。本研究已通过北京协和医院实验动物福利伦理委员会审批 (审批号: XHDW-2022-149)。

1.1.2 材料及主要试剂

HaCaT [由国家生物医学实验细胞资源库 (NSTI-BMCR) 提供], Box5 (Wnt5a 抑制剂, P121601, Selleck, 美国), 培养基 (MEM) α (112571063, Gibco, 美国), 10%胎牛血清 (16000044, Gibco, 美国), 1%青霉素-链霉素 (15140-122, Gibco, 美国), MMP9 (ab283575, Abcam, 英国), JC-1 试剂盒 (C2006, 碧云天生物公司, 中国), 角蛋白 keratin (ab8068, Abcam, 英国), 苏木素-伊红染色试剂盒 (C0105S, 碧云天生物公司, 中国), IL-1 β 酶联免疫吸附测定试剂盒 (ZC-36391, 茁彩, 中国), TNF- α 酶联免疫吸附测定试剂盒 (ZC-37624, 茁彩, 中国)。

1.2 分组与干预

1.2.1 体外实验

将生长状态良好的 HaCaT 细胞取对数生长期接种于 6 孔板,并随机分为 OGD/R 组、Box5 (20) 组、Box5 (40) 组和对照组。OGD/R 损伤模型建立:弃去完全培养基后, PBS 润洗 3 次,添加无糖培养基及厌氧包置于细胞培养箱 3 h,之后更换高糖培养基进行复糖复氧。

1.2.2 动物实验

SD 大鼠适应性饲养 2 周后,随机分为 CPIP 组、Box5 (20) 组、Box5 (40) 组和对照组,每组 8 只。CPIP 组、Box5 (20) 组、Box5 (40) 组先建立缺血再灌注 CPIP 模型:采用 40 mg/kg (2%) 戊巴比妥腹腔注射麻醉,将内径 0.56 cm O 型环套入大鼠右后肢踝关节处,造成肢端缺血,3 h 后剪断 O 型环,模拟缺血后再灌注过程。参考体外细胞实验给药剂量并稀释药物浓度^[14],对照组和 CPIP 组分别抽取生理盐水 100 μ L, Box5 (20) 组和 Box5 (40) 组分别抽取 20 μ mol/L 和 40 μ mol/L Box5 溶液 100 μ L,于大鼠右后肢足底中间完成皮下注射。

1.3 观察指标及具体方法

OGD/R 早期 (24 h 内) 观察角质形成细胞 HaCaT 线粒体损伤及膜电位变化。通过疼痛行为学测定观察不同处理组 2 周内不同时间点 [第 1 天 (D1), D2, D4, D10, D14] 机械痛和热痛阈值变化情况。HE 染色观察大鼠皮肤炎症浸润及角化情况,免疫荧光染色观察不同处理组 MMP9 表达情况,ELISA 检测不同处理组背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) IL-1 β 及 TNF- α 水平。

1.3.1 线粒体膜电位测定

向生长状态良好的 HaCaT 细胞中加入 JC-1 染色工作液,于细胞培养箱中 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min,之后离心 3~4 min (600 \times g, 4 $^{\circ}$ C),用 JC-1 染色缓冲液洗涤沉淀细胞 2 次,再用适量 JC-1 染色缓冲液重悬后,用荧光显微镜观察。正常状态下 JC-1 聚集在线粒体基质中,形成聚合物 J-aggregates (红色荧光);当线粒体受损而膜电位下降时,JC-1 无法聚集在线粒体基质中而呈现单体状态 Monomer (绿色荧光)。使用 ImageJ 软件计算绿色/红色荧光强度相对比例以分析线粒体膜电位变化情况。

1.3.2 机械痛阈值测定

将大鼠单独放置于可自由活动的透明有机玻璃笼内,底部为金属网底,适应 30 min 后,用 von Frey Filaments 垂直刺激大鼠右后足底中部,缓慢用力至出现突然缩足、舔足或扬足反应为阳性。每足至少测量 3 次,每次至少间隔 30 s,取平均值作为机械缩足反射阈值^[15]。

1.3.3 热痛阈值测定

将大鼠单独放置于可自由活动的玻璃透明笼中,适应 30 min 后,用热辐射疼痛刺激仪照射大鼠右后足底,大鼠产生快速缩足、舔足或扬足反应为阳性,记录照射持续时间。每足至少测量 3 次,间隔 10 min

以上,取平均值作为热刺激缩足反射的潜伏期^[15]。

1.3.4 免疫荧光染色

取出制作好的皮肤冰冻切片,室温干燥 30 min,用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,用含 0.5% Triton X-100 的 PBS 室温孵育 30 min,5%山羊血清抗体封闭液室温封闭 1 h,4 ℃ 孵育一抗过夜 (MMP9 1:100, keratin 1:100)。皮肤切片室温平衡 30 min, PBS 漂洗 3 次,室温下避光孵育二抗 90 min [山羊抗鼠 IgG (Alexa Fluor® 488) (1:500) 和山羊抗兔 IgG (Alexa Fluor® 594) (1:500)], PBS 漂洗 3 次,含 DAPI 的封片剂封片,荧光显微镜下观察拍照。

1.3.5 HE 染色

在 D14 时间点麻醉大鼠并将其处死,快速取患足皮肤。经不同浓度的乙醇溶液进行逐级脱水,二甲苯澄清,进行浸蜡、包埋切片制作,HE 染色后凝胶密封,置于显微镜下观察。

1.3.6 ELISA 检测

用预冷的 PBS 冲洗 DRG 组织,加入相应蛋白酶抑制剂充分混合后,在冰上研磨。将匀浆液 5000×g 离心 5~10 min,取上清检测。标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μL。样本孔中加入待测组

织 50 μL。每孔加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体 100 μL,并用封板膜封孔。37 ℃ 恒温箱温育 60 min 后每孔加满洗涤液 350 μL 并静置 1 min,重复洗板 5 次。每孔加入相应底物并避光孵育 15 min。加入终止液 50 μL 后在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值并计算相应组织浓度。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 软件 (Chicago, IL, USA) 进行统计学分析,并用 Graphpad prism 9 软件作图。痛阈值等符合正态分布的计量资料以均数±标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较选用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HaCaT 细胞 OGD/R 后 MMP9 表达变化

对生长状态良好的 HaCaT 细胞进行缺氧及无糖培养基处理 3 h,与对照组相比,OGD/R 组 MMP9 荧光强度显著增加 ($P < 0.001$);与 OGD/R 组相比,Box5 (20) 组 ($P = 0.002$) 及 Box5 (40) 组 ($P < 0.001$) MMP9 相对荧光强度均显著下降,不同浓度 Wnt5a 抑制剂组间比较差异无统计学意义 ($P = 0.320$),见图 1。

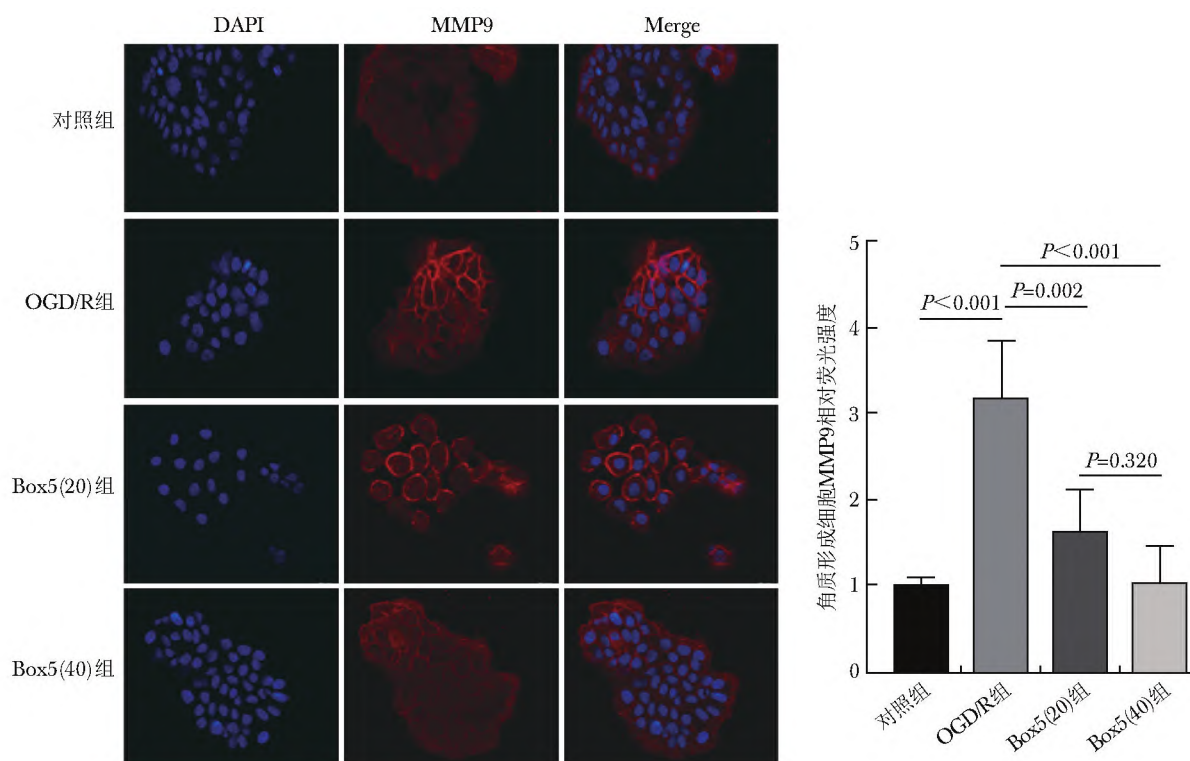


图 1 HaCaT 细胞 OGD/R 后不同处理组角质形成细胞 MMP9 表达变化 (标尺 = 20 μm, ×20)

Fig. 1 MMP9 expression in different treatment groups after OGD/R in HaCaT cells (scale = 20 μm, ×20)

OGD/R (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation): 氧糖剥夺/复氧

2.2 Box5 对 HaCaT 细胞 OGD/R 后线粒体影响

透射电镜下观察 HaCaT 细胞 OGD/R 后早期出现线粒体明显萎缩，线粒体嵴发生形态结构紊乱。JC-1 荧光探针检测显示，与对照组相比，OGD/R 组绿/红荧光比例显著增加 ($P=0.027$)，提示线粒体膜电位下降；与 OGD/R 组相比，Box5 (40) 组线粒体膜电位有所上升，差异具有统计学意义 ($P=0.046$)，见图 2。

2.3 大鼠 CPIP 后行为学改变

与对照组相比，CPIP 组大鼠术后各时间点

(D1, D2, D4, D10, D14) 机械痛阈值和热痛阈值均显著降低 (P 均 <0.05)；与 CPIP 组相比，Box5 (40) 组在 D4 和 D14 时间点机械痛阈值改善具有统计学差异 ($P<0.05$)，在 D4, D10 和 D14 时间点热痛阈值明显上升 ($P<0.05$)。Box5 (20) 组与 Box5 (40) 组在 D4 和 D14 时间点机械痛阈值差异具有统计学意义，而热痛阈值在各个时间点均无明显差异，见图 3。

2.4 CPIP 后患足表皮 HE 染色及免疫荧光染色

D14 时间点麻醉后，处死大鼠并取材患足皮肤进行

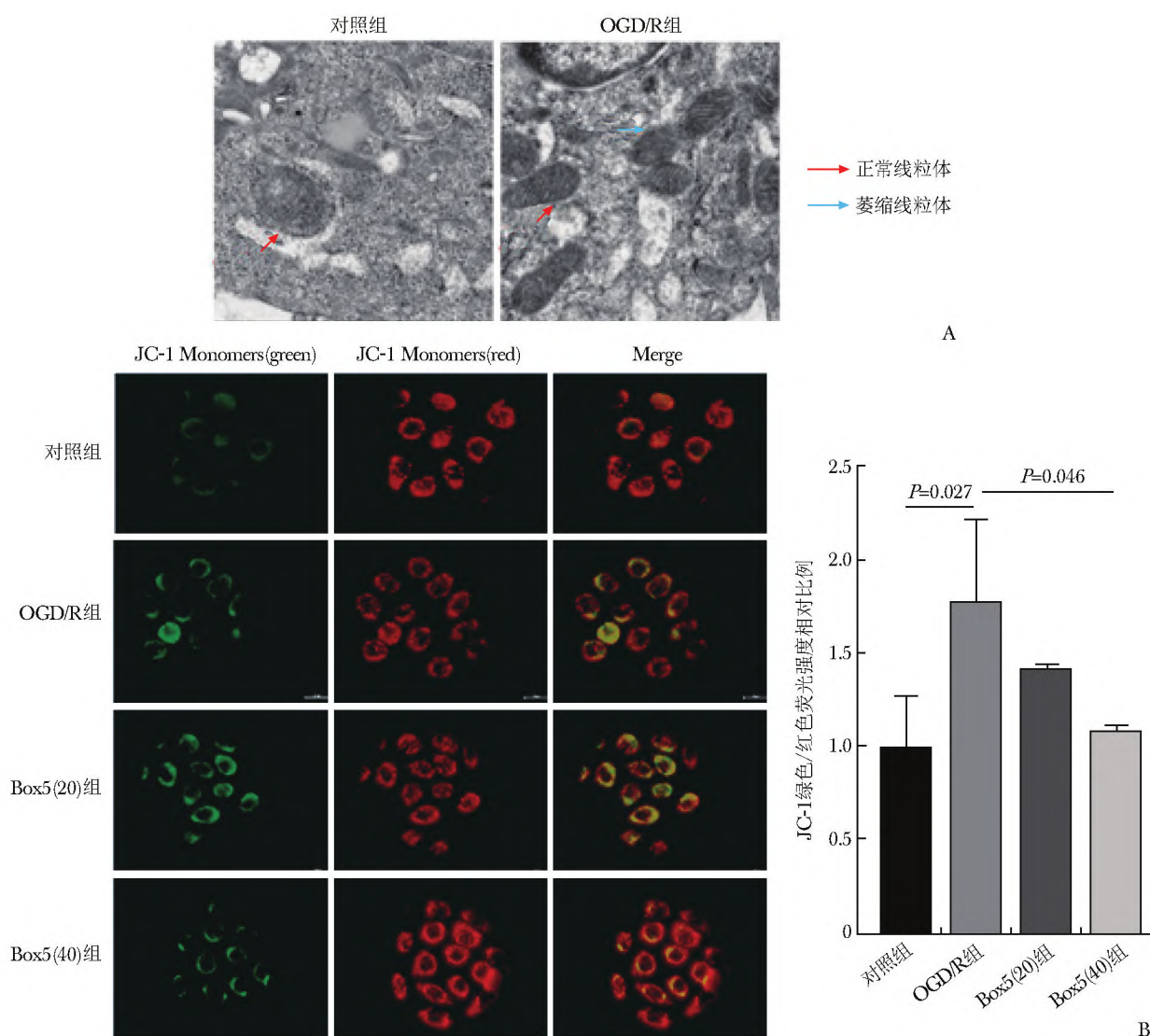


图 2 Wnt5a 抑制剂 Box5 对 HaCaT 细胞线粒体影响

A. 透射电镜下 OGD/R 组线粒体萎缩情况 (标尺 = 500 nm)；B. JC-1 染色检测各组线粒体膜电位变化 (标尺 = 20 μm , $\times 20$)

Fig. 2 The effect of Wnt5a inhibitor Box5 on the mitochondria of HaCaT cells

A. Mitochondrial atrophy in OGD/R group under transmission electron microscopy (scale = 500 nm)；B. Mitochondrial membrane potential in each group by JC-1 detection (scale = 20 μm , $\times 20$)

OGD/R; 同图 1

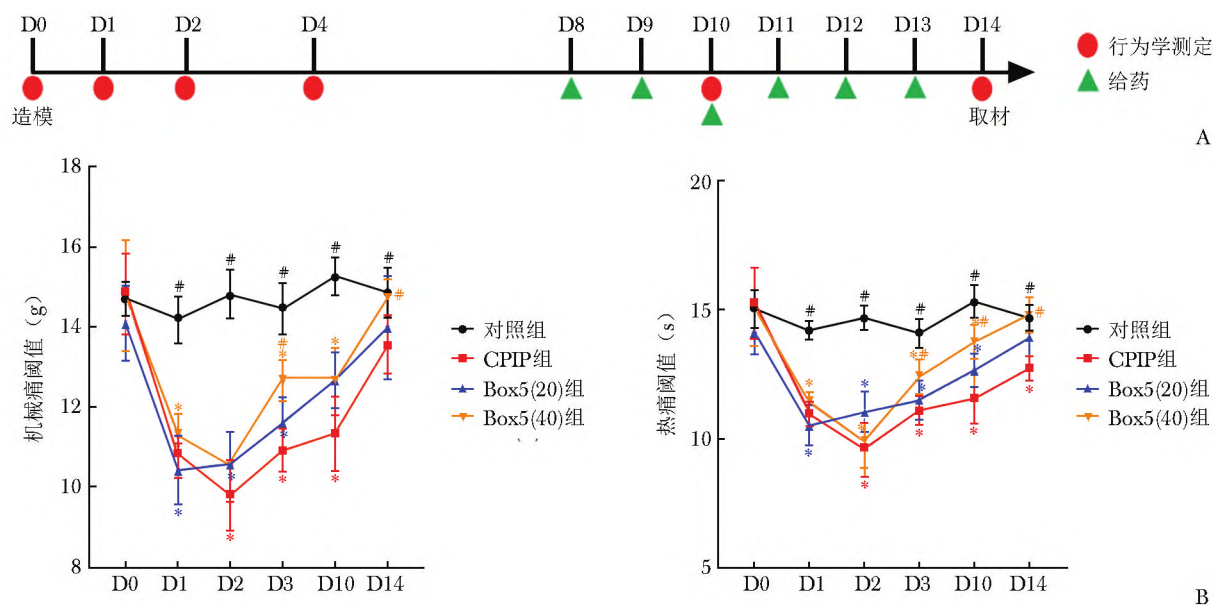


图3 大鼠建模给药流程图(A)及造模后疼痛行为学改变(B)

Fig. 3 Drug administration process diagram for rat modeling (A) and pain behavioral changes after modeling (B)

CPIP (chronic postischemia pain): 慢性缺血后疼痛; 与对照组比较, $^*P<0.05$; 与 CPIP 组比较, $^{\#}P<0.05$

HE 染色。与对照组相比, CPIP 组大鼠患足真皮层出现大量炎症细胞浸润, 表皮出现过度角化, 颗粒层及棘层厚度显著增加 ($P<0.001$); 与 CPIP 组相比, Box5 (40) 组颗粒层及棘层厚度降低明显 ($P<0.001$), 见图 4A。

D14 时间点麻醉后处死大鼠并取材患足皮肤进行免疫荧光试验。与对照组相比, CPIP 组角质形成细胞 MMP9 荧光强度显著增加 ($P<0.001$); 与 CPIP 组相比, Box5 (20) 组 ($P=0.002$) 和 Box5 (40) 组 ($P<0.001$) MMP9 荧光强度均显著下降, 不同浓度组间比较无统计学差异 ($P=0.480$), 见图 4B。

2.5 大鼠 CPIP 后 DRG 组织炎症因子改变

D14 时间点麻醉后处死大鼠取 DRG 组织, ELISA 法检测炎症因子 IL-1 β 及 TNF- α 浓度。与对照组相比, CPIP 组 IL-1 β ($P=0.048$) 和 TNF- α 浓度 ($P=0.002$) 显著升高; 与 CPIP 组相比, Box5 (40) 组 IL-1 β ($P=0.047$) 和 TNF- α 浓度 ($P=0.047$) 显著下降, 见图 5。

3 讨论

CRPS 是重要的慢性疼痛综合征之一, 其病理生理机制较为复杂, 近年来是疼痛领域的研究热点。目前大量研究证实 Wnt 信号通路中关键性配体 Wnt5a 在慢性疼痛机制中发挥重要作用^[16-17], 但其是否与

CRPS 的发生相关尚无研究报道。Ji 等^[18] 研究指出 MMP 常作为炎症反应的下游产物而在慢性疼痛进展过程中显著升高, 其中以 MMP9 和 MMP2 升高尤为明显。同样, Pan 等^[19] 研究发现, 靶向抑制 MMP9 的活性可有效抑制坐骨神经损伤引起的神经病理性疼痛。本研究以此为切入点, 通过体外、动物双重实验, 探究角质形成细胞 Wnt5a 通过调控 MMP9 参与 CRPS 的外周敏化机制。

3.1 Wnt5a 参与调控线粒体膜电位

Shan 等^[20] 研究表明, 体外培养的星形胶质细胞进行 OGD/R 处理后 MMP9 表达显著上升, 体内胰高血糖素样肽-1 受体激动剂 Ex-4 能够降低 MMP9 的表达, 进而保护血脑屏障。同样, 本研究发现 HaCaT 细胞 OGD/R 后 MMP9 表达明显上升, Wnt5a 特异性抑制剂 Box5 能够显著降低 MMP9 的荧光强度, 然而不同浓度 (20 $\mu\text{mol/L}$ 和 40 $\mu\text{mol/L}$) 间未发现统计学差异, 尚需进一步探究。OGD/R 处理早期会产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS), ROS 的过度积累能够导致线粒体膜通透性增加, 进而引起线粒体跨膜电位降低, 表现为线粒体萎缩及细胞色素 C 释放, 诱导细胞凋亡的发生并激活凋亡蛋白酶 caspase, 进一步导致炎症和疾病的产生^[21-22]。本研究通过透射电镜发现在 HaCaT 细胞 OGD/R 早期 (24 h 内) 线粒体出现明显萎缩, 线粒体嵴发生形态结构损伤, 采用 JC-1 荧光探针检测线粒体膜电位发现 OGD/R 组电

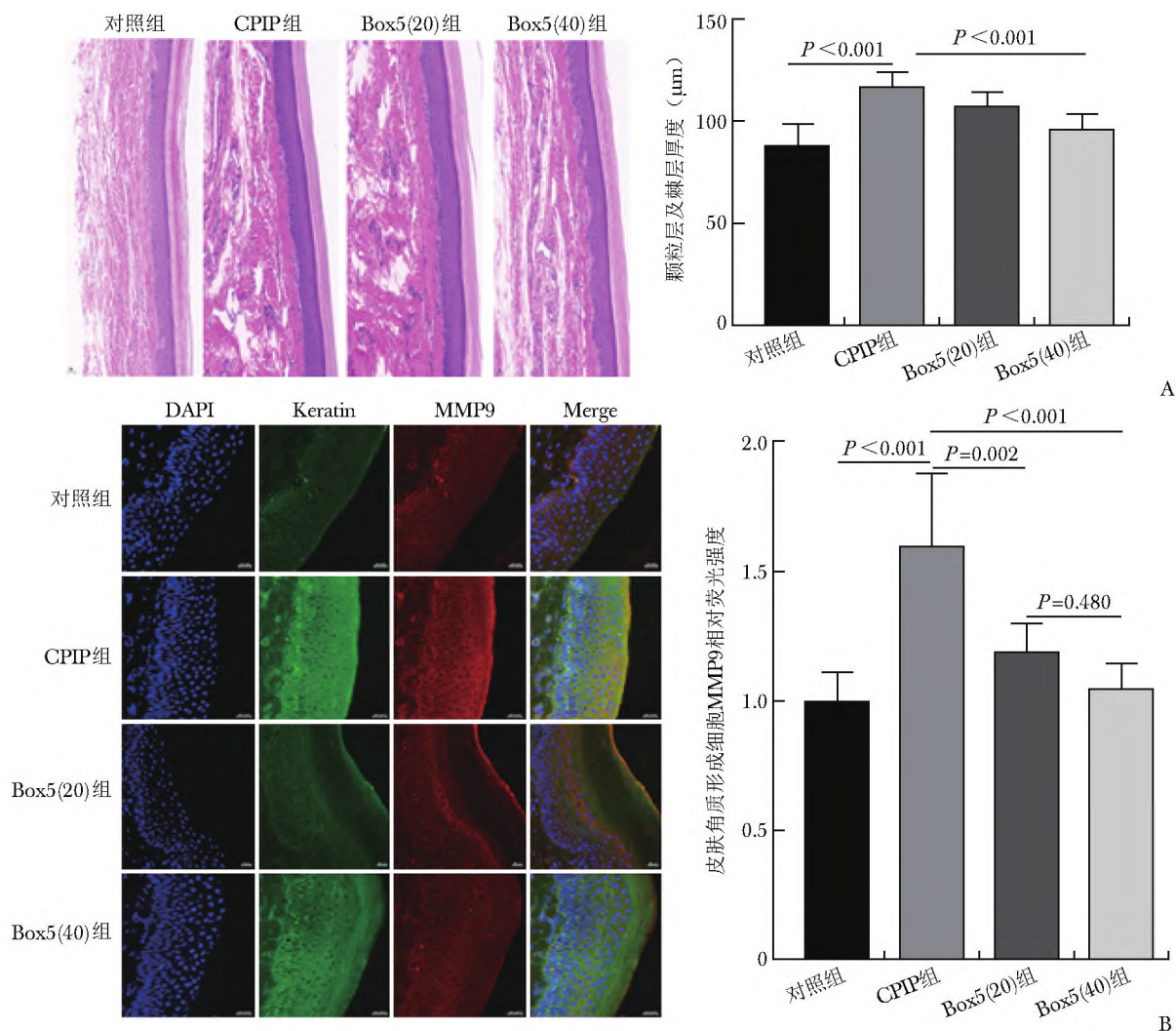


图 4 CPIP 后患足表皮 HE 染色及免疫荧光染色结果 (×20)

A. 大鼠患足表皮 HE 染色; B. 大鼠患足表皮免疫荧光染色 (标尺 = 20 μm)

Fig. 4 HE staining and immunofluorescence staining results of the affected foot epidermis after CPIP (×20)

A. HE staining of the affected foot epidermis in rats; B. Immunofluorescence staining of rat foot epidermis (scale = 20 μm)

CPiP: 同图 3

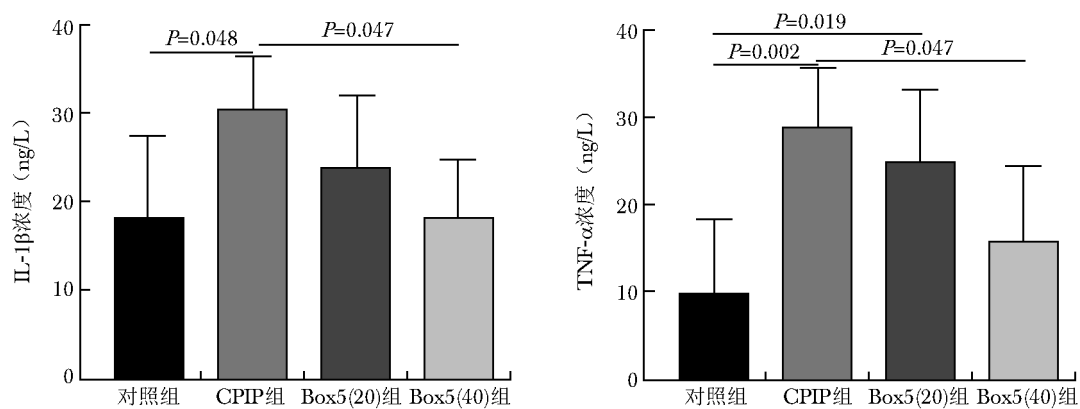


图 5 大鼠 CPIP 后 DRG 组织 IL-1β、TNF-α 水平改变

Fig. 5 Level of IL-1β and TNF-α for DRG in rats after CPIP

CPiP: 同图 3

压显著下降, 给予 40 $\mu\text{mol/L}$ Box5 能够抑制膜电位电压的下降, 可能与阻断 ROS 的过度积累有关。

3.2 Wnt5a 抑制剂逆转痛觉敏化

CRPS 临床主要表现为自主神经症状 (出汗、血管舒缩功能异常)、运动障碍和营养性改变 (皮肤、骨骼萎缩、毛发减少、关节挛缩) 等^[23-24]。慢性缺血后疼痛模型 CPIP 是目前国际上公认的 CRPS 动物模型, 通过延长缺血时间 (3 h), 能够完全模拟 CRPS-I 型患者病理生理过程^[25-26]。Lu 等^[7]研究发现, 降低小鼠体内 Wnt5a 水平能够显著抑制 SNI 小鼠的神经性疼痛和神经炎症, 缓解患足的机械超敏反应。本研究发现, CPIP 建模后各时间点 (D1, D2, D4, D10, D14) 机械痛阈值和热痛阈值均明显下降, 通过局部注射 Wnt5a 抑制剂能有效缓解大鼠的慢性疼痛。HE 染色显示, CPIP 组大鼠患足真皮层出现大量炎症细胞浸润, 建模早期大鼠患足出现明显肿胀, 后期表皮出现过度角化, 颗粒层及棘层厚度显著增加, 而 Box5 (40) 组角化程度较低。

3.3 Wnt5a 调控 MMP9 参与 CRPS 外周敏化

目前, MMP9 被认为是参与神经炎症的关键因子, 在多种动物模型中证实其可以通过对细胞因子等的剪切活化, 触发下游信号通路的激活导致神经病理性疼痛的产生^[27-29]。本研究发现, 大鼠患足缺血再灌注损伤后角质形成细胞上 MMP9 表达显著上调, Wnt5a 抑制剂能够降低 MMP9 的表达同时逆转痛觉超敏反应, 但未发现降低程度存在剂量依赖性。MacLauchlan 等^[30]研究发现, 类风湿关节炎小鼠靶向敲除 Wnt5a 后, MMP2 和 MMP9 的表达显著降低, 炎症细胞浸润程度改善, 软骨破坏活动受到抑制。同样, Jang 等^[31]指出, 由脂多糖诱发人支气管上皮细胞 BEAS-2B 和人脐静脉内皮细胞 HUVEC 导致的炎症反应可被 Wnt 拮抗剂 DKK-1 和 LGK974 所抑制, 炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 及 MMP9 随之下降, 降低程度与 Wnt 抑制剂呈剂量依赖性。因此, 靶向抑制 Wnt5a/MMP9 信号通路的激活将有效抑制炎症的持续进展, 一定程度缓解 CRPS 患者的慢性疼痛。

本研究主要关注外周敏化在 CRPS 病理生理过程中发挥的重要作用, 其中 Wnt5a/MMP9 信号通路的激活及炎症反应发挥重要作用。此外, 本研究 ELISA 结果提示 CPIP 组大鼠 DRG 水平 IL-1 β 及 TNF- α 浓度显著升高, 局部外周注射高浓度 Wnt5a 抑制剂能够有效抑制炎症的持续进展。然而, MMP9 通过何种路径被 Wnt5a 激活, 其上行至中枢的具体机制尚需实验进一步探究。

综上, 通过体内体外双重实验, 本研究初步证实外周局部缺血导致皮肤角质细胞 MMP9 的过表达, 引发持续性外周敏化, 导致 CRPS-I 型的发生。局部应用 Wnt5a 抑制剂可逆转 MMP9 的过度表达及大鼠疼痛行为, 靶向抑制外周 Wnt5a/MMP9 可为临床治疗该慢性痛提供参考依据。

作者贡献: 朱贺负责实验设计、实验实施和论文撰写; 闻蓓负责图表制作及数据分析; 许力、黄宇光负责研究设计、论文修订与最终审核。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Shim H, Rose J, Halle S, et al. Complex regional pain syndrome: a narrative review for the practising clinician [J]. *Br J Anaesth*, 2019, 123 (2): e424-e433.
- [2] Louis M H, Meyer C, Legrain V, et al. Biological and psychological early prognostic factors in complex regional pain syndrome: a systematic review [J]. *Eur J Pain*, 2023, 27 (3): 338-352.
- [3] Smart K M, Ferraro M C, Wand B M, et al. Physiotherapy for pain and disability in adults with complex regional pain syndrome (CRPS) types I and II [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2022, 5 (5): CD010853.
- [4] Sobeeh M G, Hassan K A, Silva A G, et al. Impact of different CRPS phenotypes and diagnostic criteria on quantitative sensory testing outcomes: systematic review and meta-analysis [J/OL]. *Pain Med*: pna144. <https://doi.org/10.1093/pm/pna144>.
- [5] Xie Y K, Luo H, Zhang S X, et al. GPR177 in A-fiber sensory neurons drives diabetic neuropathic pain via WNT-mediated TRPV1 activation [J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14 (639): eabh2557.
- [6] Liu X, Bae C, Liu B L, et al. Development of opioid-induced hyperalgesia depends on reactive astrocytes controlled by Wnt5a signaling [J]. *Mol Psychiatry*, 2023, 28 (2): 767-779.
- [7] Lu Y T, Zhang J T, Zeng F N, et al. Human PMSCs-derived small extracellular vesicles alleviate neuropathic pain through miR-26a-5p/Wnt5a in SNI mice model [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19 (1): 221.
- [8] Li J, Ruan S R, Jia J H, et al. Hydrogen attenuates postoperative pain through Trx1/ASK1/MMP9 signaling pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20 (1): 22.
- [9] Deng W D, Ding Z B, Wang Y Y, et al. Dendrobine attenuates osteoclast differentiation through modulating ROS/

- NFATc1/MMP9 pathway and prevents inflammatory bone destruction [J]. *Phytomedicine*, 2022, 96: 153838.
- [10] Genovese T, Cordaro M, Siracusa R, et al. Molecular and biochemical mechanism of cannabidiol in the management of the inflammatory and oxidative processes associated with endometriosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (10): 5427.
- [11] Martin L J, Smith S B, Khoutorsky A, et al. Epregrin and EGFR interactions are involved in pain processing [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127 (9): 3353-3366.
- [12] Zhu H, Wen B, Xu L, et al. Identification of potential Inflammation-Related genes and key pathways associated with complex regional pain syndrome [J]. *Biomolecules*, 2023, 13 (5): 772.
- [13] Rodriguez-Trillo A, Mosquera N, Pena C, et al. Non-canonical WNT5A signaling through RYK contributes to aggressive phenotype of the rheumatoid fibroblast-like synoviocytes [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 555245.
- [14] Jenei V, Sherwood V, Howlin J, et al. A t-butyloxy-carbonyl-modified Wnt5a-derived hexapeptide functions as a potent antagonist of Wnt5a-dependent melanoma cell invasion [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106 (46): 19473-19478.
- [15] Modi A D, Parekh A, Pancholi Y N. Evaluating pain behaviours: widely used mechanical and thermal methods in rodents [J]. *Behav Brain Res*, 2023, 446: 114417.
- [16] Zhu A, Shen L, Xu L, et al. Wnt5a mediates chronic post-thoracotomy pain by regulating non-canonical pathways, nerve regeneration, and inflammation in rats [J]. *Cell Signal*, 2018, 44: 51-61.
- [17] Simonetti M, Kuner R. Spinal Wnt5a plays a key role in spinal dendritic spine remodeling in neuropathic and inflammatory pain models and in the proalgesic effects of peripheral Wnt3a [J]. *J Neurosci*, 2020, 40 (35): 6664-6677.
- [18] Ji R R, Xu Z Z, Wang X Y, et al. Matrix metalloproteinase regulation of neuropathic pain [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2009, 30 (7): 336-340.
- [19] Pan C L, Wang C Y, Zhang L, et al. Procyanidins attenuate neuropathic pain by suppressing matrix metalloproteinase-9/2 [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15 (1): 187.
- [20] Shan Y L, Tan S, Lin Y Y, et al. The glucagon-like peptide-1 receptor agonist reduces inflammation and blood-brain barrier breakdown in an astrocyte-dependent manner in experimental stroke [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16 (1): 242.
- [21] Harrington J S, Ryter S W, Plataki M, et al. Mitochondria in health, disease, and aging [J]. *Physiol Rev*, 2023, 103 (4): 2349-2422.
- [22] Zeng X, Zhang Y D, Ma R Y, et al. Activated Drp1 regulates p62-mediated autophagic flux and aggravates inflammation in cerebral ischemia-reperfusion via the ROS-RIP1/RIP3-exosome axis [J]. *Mil Med Res*, 2022, 9 (1): 25.
- [23] Smart K M, Wand B M, O'Connell N E. Physiotherapy for pain and disability in adults with complex regional pain syndrome (CRPS) types I and II [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, 2 (2): CD010853.
- [24] Lloyd E C O, Dempsey B, Romero L. Complex regional pain syndrome [J]. *Am Fam Physician*, 2021, 104 (1): 49-55.
- [25] Wang J, Yin C Y, Pan Y S, et al. CXCL13 contributes to chronic pain of a mouse model of CRPS- I via CXCR5-mediated NF- κ B activation and pro-inflammatory cytokine production in spinal cord dorsal horn [J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20 (1): 109.
- [26] Palandi J, Mack J M, De Araújo I L, et al. Animal models of complex regional pain syndrome: a scoping review [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2023, 152: 105324.
- [27] Huntley G W. Synaptic circuit remodelling by matrix metalloproteinases in health and disease [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2012, 13 (11): 743-757.
- [28] Page-McCaw A, Ewald A J, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8 (3): 221-233.
- [29] Wells J M, Gaggari A, Blalock J E. MMP generated matrix metalloproteinases [J]. *Matrix Biol*, 2015, 44/46: 122-129.
- [30] MacLauchlan S, Zuriaga M A, Fuster J J, et al. Genetic deficiency of Wnt5a diminishes disease severity in a murine model of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, 19 (1): 166.
- [31] Jang J, Jung Y, Kim Y, et al. LPS-induced inflammatory response is suppressed by Wnt inhibitors, Dickkopf-1 and LGK974 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 41612.

(收稿: 2023-11-20 录用: 2023-12-07 在线: 2023-12-19)

(本文编辑: 李娜)