

慢性术后痛小鼠痛行为时间动态特征及背根神经节关键物质筛选

赵 贝¹, 吕政仪², 季丁汝¹, 田书心¹, 吴雨欣¹, 李星震¹, 周 杰¹, 方剑乔¹, 梁 宜¹

¹浙江省针灸神经病学重点实验室, 浙江中医药大学第三临床医学院, 浙江 杭州 310053; ²浙江大学医学院附属邵逸夫医院针灸推拿科, 浙江 杭州 310016

摘要:目的 观察慢性术后疼痛(CPSP)小鼠疼痛行为学指标的时间动态特征,并从背根神经节(DRG)层面初步筛选介导CPSP的关键物质。方法 采用足底切口术(INC)联合足背注射前列腺素E2(PGE2)建立慢性术后疼痛小鼠(I/P)模型。根据手术方式与给药不同,将小鼠随机分为假手术+生理盐水组(SI/NS)、假手术+PGE2组(SI/PGE2)和手术+PGE2组(I/P),观察实验小鼠造模后不同时间点机械缩足阈(PWTs)、热缩足潜伏期(PWLs)和冷缩足反应时间(WDs)变化。根据给药和取材时间不同,将小鼠分为SI/NS组、模型第1天组、模型第8天组,利用RNA-Seq技术建立CPSP早期(PGE2诱导后第1天)和维持期(PGE2诱导后第8天)小鼠背根神经节基因表达谱,通过样本相关性分析、差异表达基因分析、富集分析筛选重要介导物质,采用RT-qPCR和ELISA检测目标物质基因及蛋白表达情况。根据手术方式与给药不同,将小鼠随机分为SI/P+Veh组、I/P+Veh组、I/P+药物组,通过鞘内注射CX3CL1中和抗体(Ab)或CX3CR1选择性拮抗剂(JMS-17-2)等药理学实验,探索下游相关受体的作用。结果 I/P小鼠足底切口疼痛在术后14 d内恢复,经PGE2二次诱发后PWTs持续降低至PGE2注射后第10天WDs持续延长至第12天;PWLs未发生持续性变化。生信分析显示,CPSP早期和维持期实验小鼠DRG差异表达基因为975、895个,共同参与介导的交集差异基因524个。富集分析表明“细胞膜”富集基因数目最多,涉102个基因;“质膜”富集显著性最大($P<0.001$);“CX3C趋化因子受体结合”等条目富集因子最大(Rich Factor=1)。与SI/NS组相比,CPSP早期趋化因子相关差异基因中表达差异最大为Cx3cl1($FC_{Cx3cl1}=2.08$),其次为Cxcl14($FC_{Cxcl14}=1.99$)。RT-qPCR和ELISA结果显示CPSP早期I/P小鼠患侧DRG中Cx3cl1、Cxcl14基因和相关蛋白表达较SI/NS组增加($P<0.05$),维持期小鼠则较早期组降低($P<0.05$)。PGE2诱导前鞘内注射CX3CL1中和抗体可阻止CPSP发生。单次鞘内注射CX3CR1拮抗剂可一定程度翻转CPSP维持期疼痛。结论 CPSP小鼠机械痛觉异常、冷痛觉异常持续至PGE2注射后第10天,热痛觉敏化不显著。背根神经节趋化因子尤其是CX3CL1可能介导慢性术后疼痛发生。

关键词:慢性术后疼痛;RNA-seq;趋化因子;CX3CL1;CXCL14

Temporal changes of chronic postsurgical pain in mice: the regulatory role of CX3CL1 in the dorsal root ganglion

ZHAO Bei¹, LÜ Zhengyi², JI Dingru¹, TIAN Shuxin¹, WU Yuxin¹, LI Xingzhen¹, ZHOU Jie¹, FANG Jianqiao¹, LIANG Yi¹

¹Zhejiang Provincial Key Laboratory of Acupuncture and Neurology, Third Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; ²Department of Acupuncture and Massage, Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310016, China

Abstract: Objective To observe temporal changes of pain-related behaviors in mice with chronic postsurgical pain (CPSP) and identify its key mediators in the dorsal root ganglion (DRG). **Methods** In mouse models of CPSP induced by plantar incision (INC) followed by a dorsal foot injection of prostaglandin E2 (PGE2) and sham-operated mice, mechanical paw withdrawal thresholds (PWTs), thermal paw withdrawal latencies (PWLs), and cold withdrawal durations (WDs) were measured at different time points after modeling. Gene expression profiling of the DRG with RNA sequencing was performed on day 1 and day 8 after PGE2 injection. Bioinformatics analyses were conducted to explore the key mediators in the DRG for regulating CPSP, and the candidate genes and proteins were validated using RT-qPCR and ELISA. The effects of intrathecal injection of a CX3CL1-neutralizing antibody or JMS-17-2 (a CX3CR1 antagonist) on CPSP were observed. **Results** In CPSP mouse models, incision-induced pain was resolved within 14 days, and PWTs and WDs decreased progressively till day 10 and day 12 after PGE2 injection, respectively, without significant changes in PWLs. RNA-Seq identified 975 differentially expressed genes (DEGs) on day 1 and 895 on day 8 following CPSP modeling, including 524 intersecting DEGs enriched in cell membrane, plasma membrane, and CX3C chemokine receptor binding. Cx3cl1 and Cxcl14 were the top two upregulated chemokine-related DEGs in early CPSP, whose mRNA and protein expression increased significantly in the ipsilateral DRG on day 1 but declined on day 8. Intrathecal injection of the CX3CL1-neutralizing antibody before PGE2 injection prevented CPSP development, while JMS-17-2 partially reversed CPSP during the maintenance phase. **Conclusion** This CPSP mouse model shows persistent mechanical and cold allodynia for at least 10 days after PGE2 injection without significant changes in heat hypersensitivity. CX3CL1 and related chemokine signaling in the DRG may contribute to the development of CPSP.

Keywords: chronic postsurgical pain; RNA-seq; chemokine; CX3CL1; CXCL14

收稿日期:2025-05-26

基金项目:国家自然科学基金(82174510);浙江省基础公益研究计划(LY23H270007)

Supported by National Natural Science Foundation of China (82174510).

作者简介:赵 贝,硕士,中医师,E-mail: 984722585@qq.com;吕政仪,博士,中医师,E-mail: aprilv_kuco@icloud.com。赵 贝、吕政仪共同为第一作者

通信作者:梁 宜,博士,研究员,E-mail: liangyiwww@126.com

世界卫生组织《国际疾病分类(ICD-11)》名录定义慢性术后疼痛(CPSP)是外科手术中出现或加剧并在伤口愈合过程后持续存在(至少3个月)的疼痛^[1]。多达20%~56%的患者在手术后经历慢性疼痛,术后12个月时中重度CPSP发生率达11.8%^[2,3],深切影响患者的术后康复和生活质量。术后持续性炎症以及术前疼痛、术中神经损伤、麻醉方案、遗传、心理等因素是CPSP的诱因^[4]。目前临床术后镇痛主要采用口服镇痛药物、使用患者自控式镇痛泵、神经阻滞等治疗手段来预防和治疗术后疼痛^[5]。这些治疗可控制手术恢复早期的急性中重度疼痛,但药物镇痛作用消退后或出院后的疼痛治疗仍存在明显的“镇痛空窗期”。由于CPSP的潜在机制尚不明确,尚未研发出治疗CPSP的特异性药物^[6],也限制了CPSP的治疗效果。因此CPSP的产生和维持的病理生理机制亟待探索。

足底切口动物模型是术后疼痛的经典实验模型,研究提示83.8%单纯足底切口可在术后第14天彻底恢复,但仍有16.2%实验动物在术后第14天痛阈异常下降或疼痛状态延长,呈现持续性痛觉过敏状态^[7,8]。常见的CPSP模型以一次造模刺激为主,存在慢性疼痛诱导率较低、急慢性疼痛分界不清的特点。有研究探索建立了前列腺素E₂(PGE₂)诱导CPSP小鼠模型^[9,10],以足底切口损伤作为第一造模刺激,PGE₂足背注射作为第二刺激,多用于研究切口诱导的急慢性痛转化的过程,可模拟临床切口手术愈合后因炎症诱发CPSP的现象^[11]。该模型现有研究主要集中在急性疼痛的慢性转化,表明BLA脑区的PKC ζ /PKM ζ 对雄性模型小鼠PGE₂诱导性疼痛的发展至关重要^[12];单次腹腔注射广谱蛋白酶抑制剂乌司他丁可抑制切口诱导的急性痛觉敏化及急性痛慢性化的启动和维持^[13]。然而CPSP慢性疼痛状态的神经分子机制仍不明确,其涉及外周和中枢神经系统的多个层面,是持续性外周敏化和中枢可塑性改变的综合结果^[14]。背根神经节(DRG)是机体外周神经系统对伤害性刺激做出适应性反应的第一站,也是慢性疼痛产生和维持的初始环节,而DRG中具体哪些物质发生改变及其如何参与CPSP尚不明确。以往有初步观察到PGE₂诱导第1~3天外周神经组织AMP活化蛋白激酶(AMPK)的激活及脊髓AMPA亚基谷氨酸受体1(GluA1)相关位点磷酸化可参与介导CPSP发生^[15],但关于CPSP相关疼痛行为学指标的时间动态特征及介导其疼痛持续状态的关键物质等尚不清楚,也未见相关报道。

基于此,本研究通过构建CPSP小鼠模型揭示其疼痛行为学指标的时间动态特征,并借助转录组测序技术(RNA-Seq)在DRG层面筛选介导CPSP的关键痛敏物质,以期临床有效防治CPSP提供新思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

清洁级健康雄性C57BL/6J小鼠,6~8周龄,体质量16~24 g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,饲养于浙江中医药大学实验动物中心屏障环境。本实验方案经浙江中医药大学动物伦理委员会批准(伦理批号:No.20240902-09),所有动物实验操作均严格遵循浙江中医药大学实验动物管理与使用委员会制定的实验动物伦理规范。

行为学检测实验中,将45只C57BL/6J小鼠随机分为对照组(SI/NS组)、假手术/PGE₂组(SI/PGE₂组)、手术/PGE₂组(I/P组),15只/组。SI/NS组对小鼠行假手术,固定、消毒流程与均INC小鼠一致但不行切口手术,在手术后第15天于左侧足背注射0.9%生理盐水(NS);SI/PGE₂组小鼠行假手术并在术后第15天于左足背注射PGE₂;I/P组行小鼠左侧足趾切口手术并在术后第15天于左足背注射PGE₂。

RNA-Seq实验中,将36只C57BL/6J小鼠随机分为SI/NS组、模型第1天组、模型第8天组,12只/组,独立样本数 $n=4$ 。SI/NS组在小鼠左侧足趾行假手术并在术后第15天于左侧足背注射0.9% NS;模型组行小鼠左侧足趾切口手术并在术后第15天于左足背注射PGE₂,分别在PGE₂诱导后第1天和第8天取材。为保证样品总RNA的量与纯度满足高通量测序质控要求,每样本含3只小鼠患侧L3~L5的DRGs,进行高通量基因测序并形成基因表达谱。

验证并检测靶物质基因、蛋白表达结果:RT-qPCR实验中,将30只小鼠随机分为SI/NS组、第1天组、第8天组,10只/组,独立样本数 $n=5$ 。造模方案同前,分别于PGE₂注射后第1天和第8天取材并行RT-qPCR检测,每样本含2只小鼠患侧DRGs。酶联免疫吸附试验(ELISA)中,将15只小鼠随机分为SI/NS组、第1天组、第8天组,5只/组,独立样本数 $n=5$ 。分别于PGE₂注射后第1天和第8天取材并行ELISA检测。

药理学实验:鞘内注射CX3CL1中和抗体并观测相关实验小鼠的痛行为:将15只小鼠分为SI/P+Veh组、I/P+Veh组、I/P+Ab组,5只/组,独立样本数 $n=5$ 。I/P+Ab组小鼠于PGE₂注射前10 min鞘内单次注射CX3CL1中和抗体,注射剂量为5 μ g/10 μ L。Veh组鞘内注射1 μ L/10 μ L的山羊IgG对照抗体,注射时间、剂量和频次与中和抗体组相同。鞘内注射CX3CR1选择性拮抗剂JMS-17-2并观测相关实验小鼠的痛行为:将15只小鼠分为SI/P+Veh组、I/P+Veh组、I/P+JMS组,5只/组,独立样本数 $N=5$ 。I/P+JMS组小鼠于PGE₂注射后第7天鞘内单次注射JMS-17-2,注射剂量为75 μ g/10 μ L。Veh组则鞘内注射等量的玉米油,注射时间、剂量和频

次与I/P+JMS组相同。

1.2 主要试剂及仪器

PGE2 (MedChemExpress); 丙酮 (国药集团); primerscriptTM RT reagent kit with gDNA Eraser (perfect real time)、TB GreenTM premix ex taqTM II 试剂盒 (Takara Bio); 引物合成 (生工生物); BCA 试剂盒 (碧云天); 小鼠 CX3CL1、CXCL14 ELISA 试剂盒 (金恒诺生物); 趋化因子 CX3CL1 中和抗体 (R&D Systems, AF472); CX3CR1 拮抗剂 JMS-17-2 (MedChemExpress, HY-123918)。呼吸麻醉机及小鼠测痛架 (瑞沃德); 纤毛机械刺激针 (Stoelting); 小鼠热痛架及热发射器 (Ugo Basile); 低温高速研磨仪 (赛维尔生物); 台式高速冷冻离心机 (ThermoFisher Scientific); 双模块梯度 PCR 仪 (Bio-Rad); 荧光定量 PCR 仪 (Roche)。

1.3 主要方法

1.3.1 慢性术后疼痛模型建立 足底切口参照文献^[16]的方法建立: 实验小鼠经 2.5% 异氟烷吸入麻醉后, 俯卧位固定。常规碘伏消毒小鼠左后肢足趾, 于足底沿肌腱走行方向作一长约 5 mm 的纵向切口, 避开足垫区域, 使用 20 G 平头针嘴钝性分离并挑牵足底肌腱 5 s。随后用 5-0 缝合线缝合切口, 创面均匀涂抹红霉素软膏预防感染。术后 48 h 拆除足部缝线。假手术组小鼠不进行足底切口操作, 其余处理与模型组相同。慢性术后疼痛模型 (I/P) 的建立参照文献^[6]建立的实验方法: 实验小鼠机械痛阈恢复至基线水平后, 于术后第 15 天在手术侧 (左侧) 足背注射 100 ng/25 μ L 生理盐水的 PGE2 溶液。对照组小鼠在相同部位注射等体积 (25 μ L) 的 0.9% NS。

1.3.2 痛行为检测 于造模前、切口术后第 1、2、4、8、10、14 天及 PGE2 注射后第 1 h、4 h, 第 1、2、4、8、10、12、14 天等时间点检测痛行为。参照文献^[17]的方案测量实验小鼠机械缩足阈 (PWTs), 评估机械痛觉敏化情况。将小鼠 (未麻醉) 放置在一个底部为网格地板的亚克力笼中, 适应环境 30 min (待小鼠安静不动) 后, 采用不同规格的 von Frey 丝 (0.02、0.04、0.07、0.16、0.4、0.6、1、1.4、2 g) 刺激实验小鼠左后足趾, 施加压力至 von Frey 丝轻微弯曲并持续 5 s 记录为“X”, 无缩足反应则记录为“O”, 采用 up and down 法连续刺激, 每次刺激间隔 30 s。参考 Hargreaves test^[18]测量实验小鼠热缩足潜伏期 (PWLs), 评估热痛觉敏化情况。正式实验开始前 3 d 对实验小鼠进行热辐射刺激的适应实验, 每天刺激 1 次, 使其习惯热痛抬腿行为。正式实验环境温度维持在 25 \pm 2 $^{\circ}$ C, 将小鼠放置于可传导热辐射的透明测痛板上自适应 20 min, 对实验小鼠左后爪的足底表面施加 42% 的热辐射刺激强度, 试验截止时间设定为 20 s, 以防足底组织损伤。每只小鼠重复测量 5 次, 去除最高和最低值后取平均值, 每次测量间隔 2~3 min。

采用丙酮试验^[19]测量实验小鼠冷缩足反应时间 (WDs), 评价足爪冷痛觉敏化情况。用平头弯曲针嘴的 1 mL 注射器吸取 20 μ L 丙酮, 距离足底 0.5 cm, 基于注射器推注速度估算喷速约 1 cm/s, 轻喷于小鼠左后足底, 并避免注射器碰到足爪。观测并记录小鼠抖动、缩足、舔咬足爪的总持续时间。每次观测时间上限为 60 s。重复测量 3 次, 测试间隔时间不低于 60 s, 去除极值后记缩足反应时长。

1.3.3 组织取材与 RNA 提取 PGE2 诱导后第 1 天和第 8 天进行小鼠 DRG 组织取材。异氟烷麻醉小鼠经心灌注 4 $^{\circ}$ C 预冷的 0.9% NS 约 200 mL, 直至小鼠肝脏变白。取患侧 DRGs 装入含有 1 mL Trizol 的 1.5 mL EP 管中, 加入无酶研磨珠 4 粒/管, 使用低温高速研磨仪研磨组织。加入氯仿 200 μ L/管, 手动剧烈震荡 15~30 s 后静置 3 min, 高速离心后 (4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 15 min)。小心吸取上层无色水相液至新标记的 1.5 mL EP 管, 加入等体积异丙醇轻轻混匀, 室温下静置 10 min, 高速离心后弃上清, 于管中加入 1 mL 70% 乙醇溶液 (无水乙醇和 DEPC 水配制), 洗涤沉淀。高速离心 2 min 后再加入 70% 乙醇溶液洗涤, 反复 3 次。弃去上清, 室温静置, 待管底沉淀干燥后, 加入 20 μ L DEPC 水溶解沉淀。

1.3.4 高通量转录组测序 (RNA-seq) 由杭州联川生物技术股份有限公司对 DRG 样品进行质检、建库、高通量测序。使用 Illumina NovaSeqTM 6000 测序平台, 按照标准操作流程进行双端测序 (PE150 模式)。以每千个碱基的转录每百万映射读取的片段数作为基因表达量的衡量指标, 统计基因在不同样本中的表达量, 形成 CPSP 小鼠基因表达谱。

1.3.5 生物信息学分析 生物信息学分析借助 OmicStudio 工具和 R 软件 (4.1.3) 进行, 借助 ggplot2 包 (3.3.3)、GraphPad Prism 9.0、Origin 2022 进行绘图。通过相关性系数分析, 剔除 |Pearson 系数| < 0.95 的偏离样本。基于 $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 0.7$ 和 $P < 0.05$ 的标准进行差异基因筛选。

对交集差异基因进行基因本体 (GO) 功能显著性富集分析和京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 通路分析, 以 $P < 0.05$ 为显著性富集标准。观察一级分类下, 富集条目或通路的基因数目、富集因子及富集显著性, 分析主要介导作用的通路及条目, 以筛选靶基因。通过火山图及热图, 观察靶基因在 CPSP 不同时间点多作用和变化特点。

1.3.6 逆转录定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 按试剂盒说明书步骤, 利用逆转录酶将 mRNA 反转录成相应的 cDNA, 然后扩增 *Cx3cl1*、*Cxcl14*、*Ccr5*、*Il7* 基因。以 β -actin 作为内参, 引物由生工生物公司合成, 引物序列 (表 1), 采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算各目标基因的相对表达量。

表1 RT-qPCR引物序列

Tab.1 Primer sequences for RT-qPCR

Gene	Sequence (5'-3')
<i>Cx3cl1</i> forward	CAGAGGAGCAGGCAGGACAG
<i>Cx3cl1</i> reverse	CTTCAGAGCAGGAGAGACCCATC
<i>Cxcl14</i> forward	TCCGGTCAGCATGAGGCTCC
<i>Cxcl14</i> reverse	CACCCTATTCTTCGTAGACC
<i>Ccr5</i> forward	GTTGTTTTGGAGAACGCCCC
<i>Ccr5</i> reverse	CAACACTGCTCCGAAACTGC
<i>Il7</i> forward	CTAGCAACTGGCAAGGAGGAC
<i>Il7</i> reverse	CCTGTAAGTGGAAAGCATGGC
<i>β-actin</i> forward	ACTGGAACGGTGAAGGTGAC
<i>β-actin</i> reverse	AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT

1.3.7 酶联免疫吸附试验(ELISA) 将DRG组织高速低温研磨,3000 r/min离心 15 min后吸取上清液并移管。BCA法测定样本吸光度并计算样本蛋白浓度(mg/mL)。根据ELISA试剂盒说明书步骤要求检测上清液中CX3CL1、CXCL14表达。

1.3.8 统计学分析 采用SPSS 26.0统计软件进行数据分析。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;对于PWTs、PWLs及WDs等重复测量数据,则采用双因素重复测量方差分析。若满足方差齐性,多重比较采用Bonferroni法;若方差不齐则采用Dunnett's T₃检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同时间点I/P小鼠疼痛行为学指标变化

实验小鼠接受足底切口术引发的PWTs、PWLs和WDs均可在14 d内恢复。SI/P和I/P组小鼠在PGE2诱导后1 h时PWTs较SI/NS组明显下降(P<0.01),SI/P小鼠的PWTs于注射后4 h恢复,而I/P小鼠PWTs在4 h降低并持续至注射后第10天(P<0.01)。PGE2注射后1 h, I/P小鼠可观察到PWLs下降(P<0.05),但4 h及后续各观测时点组间差异无统计学意义。PGE2注射后1 h,SI/P和I/P小鼠WDs均升高(P<0.05),未接受足底切口术小鼠WDs在4 h已恢复,而I/P小鼠冷痛觉异常可持续至第12天(P<0.05,图1)。

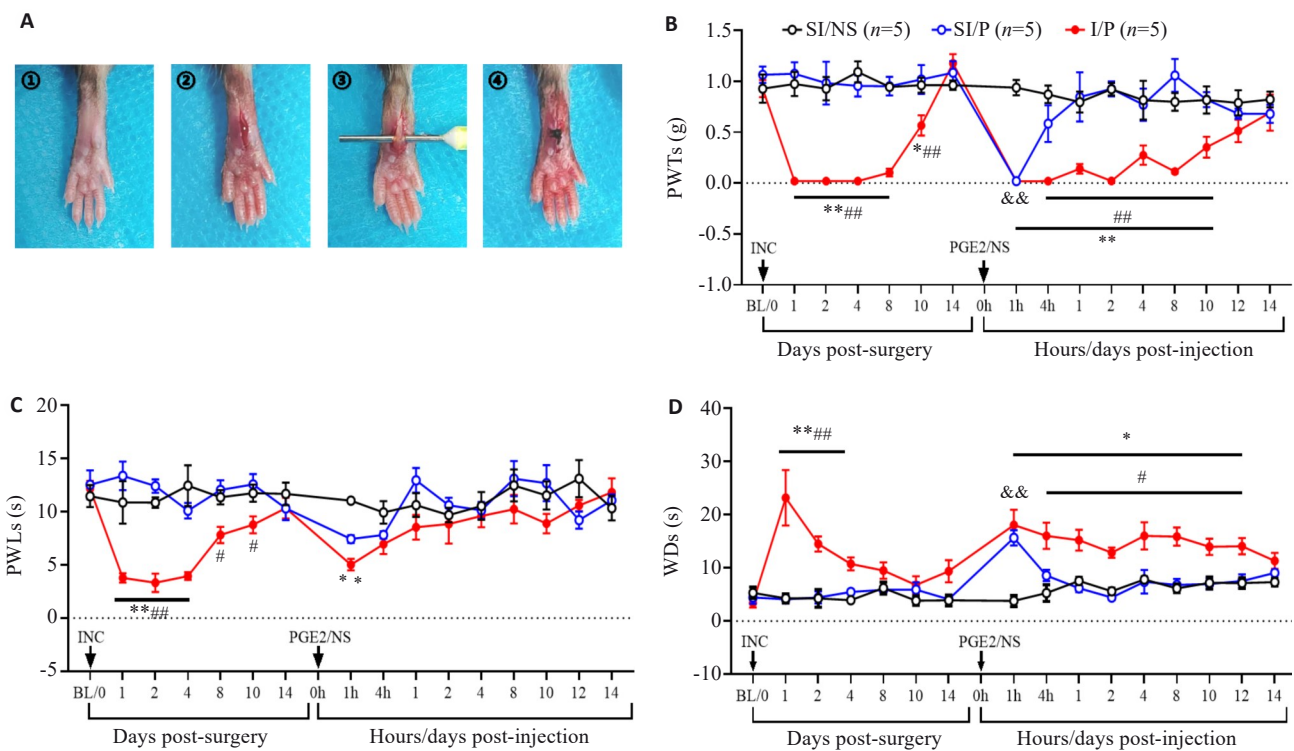


图1 CPSP模型的建立和小鼠疼痛行为学指标的变化

Fig.1 Temporal changes of pain-related behaviors in the mouse models of chronic postsurgical pain (CPSP). A: Schematic diagram of plantar incision for inducing CPSP in mice. B: Changes in mechanical paw withdrawal thresholds (PWTs) after plantar incision and after PGE2 injection in each group. C: Changes in thermal paw withdrawal latencies (PWLs) after plantar incision and after PGE2 injection in each group. D: Changes in cold withdrawal durations (WDs) of the mice after plantar incision and after PGE2 injection. INC: Incision. *P<0.05, **P<0.01 I/P vs SI/NS; †P<0.05, ††P<0.01 I/P vs SI/P; &&P<0.01 SI/P vs SI/NS.

2.2 不同时间点I/P小鼠DRG差异表达基因筛选

Pearson相关分析结果显示,D1_4与同组其他样本

相关性低(Pearson系数为-0.018~-0.013),存在明显异质性,故该样本不纳入后续分析。差异基因聚类热图展

示样本和差异基因的分层聚类情况,组间聚类层次显示实际分组情况一致。与SI/NS组相比,I/P小鼠患侧DRG于第1天出现975个差异基因,697个基因差异表达上调,278个基因下调;D8出现895个差异基因,151个基因上调,744个基因下调。在PGE2诱导后第1天和

第8天均发生差异表达的基因,即交集差异基因共524个,其中434个在第1天上调而第8天显示下调,87个基因在第1天下调第8天则上调,3个在第1天和第8天均下调(图2)。

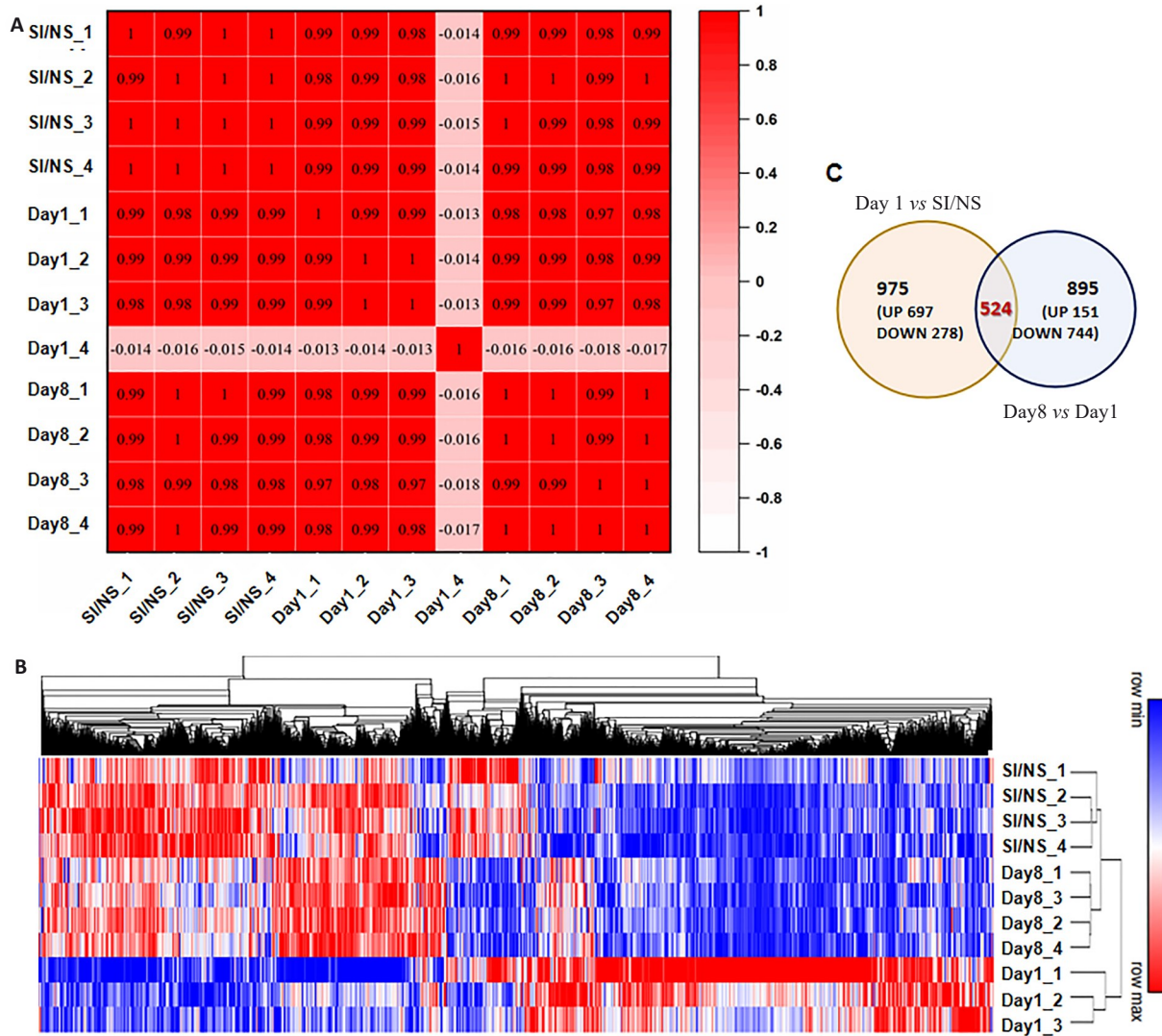


图2 不同时间点I/P小鼠DRGs基因表达情况

Fig.2 Gene expression profile in dorsal root ganglion (DRGs) of the mice with CPSP at different time points. A: Heat map of correlation coefficient of each sample (Numbers in the box are Pearson correlation coefficients between the corresponding two samples). B: Heat map and hierarchical clustering of differential gene expression in each sample ($P < 0.05$ and $|\log_2FC| > 0.3$ were the threshold criteria for differentially expressed genes). C: Venn diagram of DEGs between groups.

GO分析显示,BP生物过程分类中有480条显著性富集条目。“RNA聚合酶II转录的正向调节”、“DNA模板转录的调节”、“信号转导”富集条目最多,共涉及26、26、24个条目;“经典Wnt信号通路”、“血管生成”、“细胞间黏附”为富集显著性最强条目($P < 0.001$);“白细胞黏附激活”、“钙离子非依赖性细胞间黏附的正向调节”、“谷氨酸受体信号通路的负向调节”等富集因子最高,为1。CC细胞组分分类中有显著性富集条目62条。“细胞膜”相关条目富集最多,涉及102个基因;“质膜”、“细胞

外空间”、“细胞外区域”富集最显著($P < 0.001$);“II型胶原三聚体”、“胰岛素样生长因子结合蛋白复合体”、“DNA重组酶复合体”条目富集因子最高,为1。MF分子功能分类中有177条显著性富集条目。“蛋白质结合”、“金属离子结合”、“同型蛋白质结合”富集101、52、29个条目,为最多;“蛋白质结合”、“Wnt蛋白质结合”、“Wnt受体活性条目”富集最为显著($P < 0.001$);“CX3C趋化因子受体结合”、“CXCR1趋化因子受体结合”、“降钙素受体结合作用”条目富集因子最大,为1。以上条目

中,涉及最多的基因为趋化因子*Cx3cl1*,共8次。

KEGG分析显示,人类疾病分类中“癌症通路”、“人类乳头瘤病毒感染”、“基底细胞癌”通路共富集21、15、8个基因。细胞过程分类中“粘着斑”、“紧密连接”、“细胞衰老”通路富集较多,为11、5、5个基因。环境信息处理分类中“PI3K-Akt信号通路”、“Wnt信号通路”、“Hippo信号通路富集”较多,涉及10、9、8个基因。生物体系统

分类中,“黑色素生成”、“血管平滑肌收缩”、“Th1和Th2细胞的分化”通路富集,各涉及6、5、4个基因。新陈代谢分类中“谷胱甘肽代谢”、“脂肪酸合成过程”、“亚油酸代谢”通路富集基因较多,富集3、2、2个基因。遗传信息处理中“内质网中的蛋白质加工过程”富集较多,涉及3个基因(图3)。

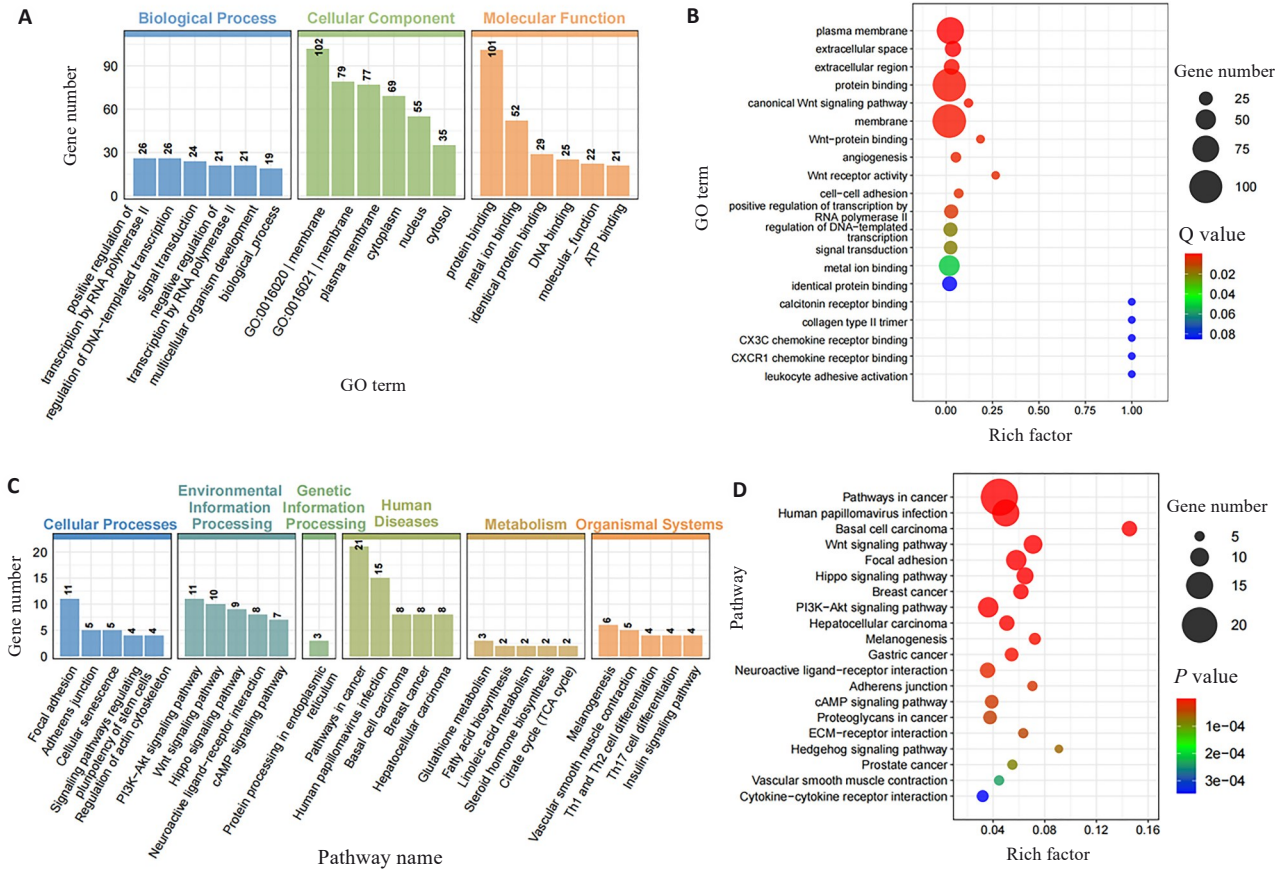


图3 I/P小鼠DRGs交集差异基因GO和KEGG富集分析

Fig.3 GO and KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes at the intersection DEGs in CPSP mice. A: GO enrichment bar chart of the intersection DEGs between Day1 vs. SI/NS and Day8 vs. Day1 (Ranked by the number of significantly enriched genes). B: GO enrichment scatter plot of intersection DEGs. C: KEGG enrichment bar chart of intersection DEGs. D: KEGG enrichment scatter plot of intersection DEGs.

2.3 CPSP小鼠DRGs中趋化因子相关差异表达基因表达情况

根据GO条目筛选差异基因中趋化因子相关基因,第1天有5个趋化因子参与介导,第8天有8个趋化因子参与;共同参与调控的趋化因子共4个,为*Cx3cl1*、*Cxcl14*、*Ccr5*、*Il7*。与SI/NS组相比,CPSP早期趋化因子相关差异基因中表达差异最大为*Cx3cl1*($FC_{Cx3cl1}=2.08, P<0.01$),其次为*Cxcl14*($FC_{Cxcl14}=1.99, P<0.05$)和*Ccr5*($FC_{Ccr5}=1.77, P<0.05$);在第8天时*Cx3cl1*、*Cxcl14*和*Ccr5*表达均较第1天下降($P<0.05$)。 *Il7*在第1天时较SI/NS表达下调($FC_{Il7}=0.6, P<0.01$),在第8天时较第

1天上调($FC_{Il7}=1.62, P<0.01$,图4)。

2.4 各组实验小鼠CPSP不同时期患侧DRGs关键物质基因表达情况

PGE2诱导后第1天时I/P小鼠患侧DRGs中*Cx3cl1*、*Cxcl14*基因表达水平较SI/NS组上调($P<0.01$);第8天时I/P小鼠的*Cx3cl1*、*Cxcl14*基因表达水平较第1天组下调($P<0.05$),较SI/NS组差异无统计学意义($P>0.05$)。该结果和测序数据相一致,具有可重复性。3组间实验小鼠患侧DRGs中*Ccr5*、*Il7*基因表达水平的差异无统计学意义($P>0.05$),故选用CX3CL1、CXCL14作为目标物质进行进一步验证(图5)。

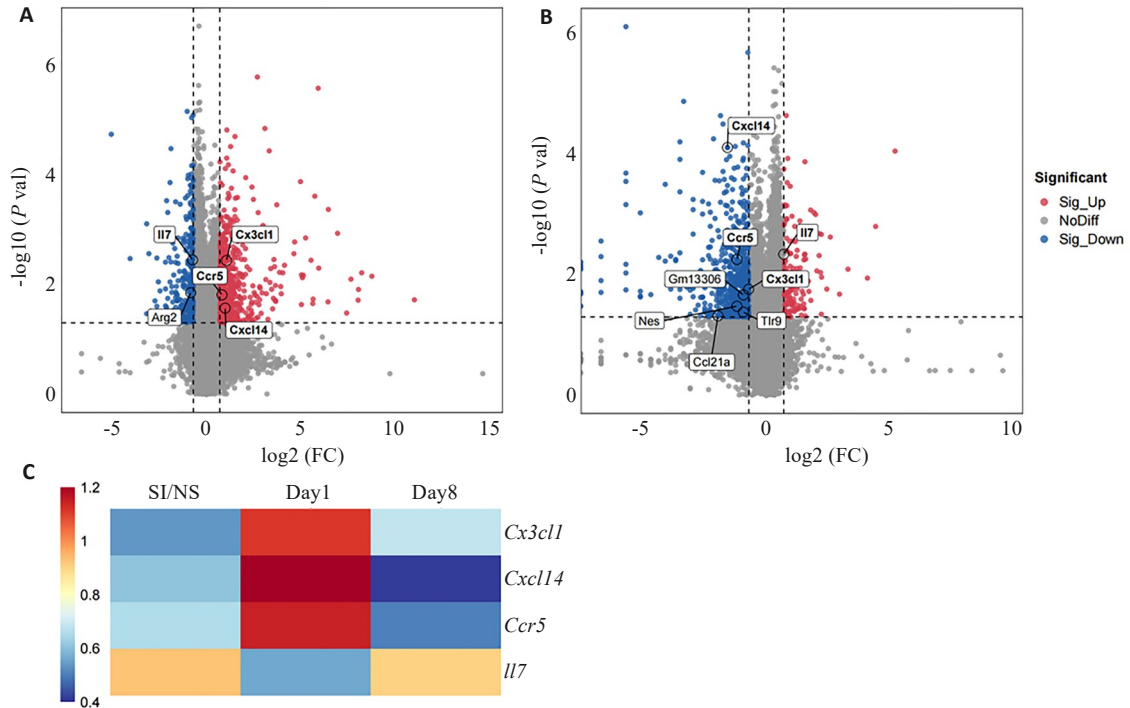


图4 不同时间点CPSP小鼠DRGs趋化因子相关基因表达情况

Fig. 4 Expression of chemokine-related genes in DRGs of mice with CPSP at different time points. A: Volcano plot of differentially expressed genes in day 1 and SI/NS groups (Chemokine-related genes are marked). B: Volcano plot of differentially expressed genes in day 8 and day 1 groups. C: Table of differential genes associated with chemokines between the groups. All chemokine-related genes are extracted using GO terms.

2.5 ELISA 检测各组实验小鼠 CPSP 不同时期患侧 DRGs 关键物质基因蛋白情况

PGE2 诱导后第 1 天时 I/P 小鼠患侧 DRGs 中 CX3CL1、CXCL14 蛋白表达增加 ($P < 0.01$)；第 8 天时 I/P 小鼠 CX3CL1、CXCL14 蛋白表达较第 1 天组减少 ($P < 0.05$)，与 SI/NS 组相比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$ ，图 5)。

2.6 鞘内注射 CX3CL1 中和抗体对 CPSP 小鼠痛行为的影响

足跖切口术后小鼠出现机械痛阈下降，至第 14 天完全恢复。PGE2 注射后 1 h，SI/P 和 I/P 组小鼠均出现痛阈显著降低；PGE2 注射后 4 h，SI/P 小鼠痛阈回升，I/P 小鼠则产生至少 8 天的持续性痛觉敏化。

I/P+Ab 组在 PGE2 诱导后 1 h 至第 2 天的痛阈较 I/P 组上升 ($P < 0.05$)。第 2 天至第 8 天，I/P+Ab 组痛阈较 SI/P+Veh 组痛阈有差异 ($P < 0.05$ ，图 6)。

2.7 鞘内注射 CX3CR1 拮抗剂对 CPSP 小鼠痛行为的影响

足跖切口术后小鼠产生术后急性疼痛 ($P < 0.05$)，并在第 14 天完全恢复。PGE2 注射后第 1 天和第 14 天，I/P+Veh 组较 SI/P+Veh 组显示痛阈显著降低 ($P < 0.05$)，术后痛慢性化模型建立。在第 7 天鞘内注射 JMS17-2，与 I/P+Veh 组比较 I/P+JMS 组 1 h 后可检测到痛阈显著性上

升，并持续至少 7 h ($P < 0.01$)。24 h 后 I/P+JMS 组痛阈与 SI/P+Veh 组相比下降 ($P < 0.05$ ，图 7)。

3 讨论

CPSP 是临床常见且未妥善解决的问题。本研究表明 CPSP 模型小鼠的痛行为主要表现为机械痛觉异常、冷痛觉异常持续至 PGE2 注射后 10 d，而热痛觉敏化不显著。背根神经节 CX3CL1、CXCL14 在 I/P 小鼠 PGE2 注射后第 1 天表达增加，提示其参与 CPSP 早期；疼痛的维持可能与 CX3CL1 相关受体 CX3CR1 有关。

有效缓解术后疼痛对手术患者的康复及预后至关重要。目前术后疼痛的管理提倡“围术期目标导向全程镇痛”^[20]，然而患者出院后，院外疼痛管理跟进困难，居家镇痛处理常被忽视，患者对药物副作用的担忧，也减少了院外镇痛药物的实际使用。此外，由于 CPSP 潜在机制尚不明确，特异性镇痛药缺乏，导致手术后患者院外镇痛效果欠佳，这更增加了术后疼痛演变为慢性疼痛的机率。因此，进一步研究明确 CPSP 的演变特征及其介导疼痛慢性化的关键物质具有重要临床价值。CPSP 的发生与人口生物学特征、术前因素、术中因素等密切相关，包括人口学特征：年轻女性、BMI 高、有吸烟史的患者更易发生 CPSP；术前焦虑、抑郁、手术灾难化等不良情绪；手术术式，尤其是截肢、胸科、乳腺、大关节置换

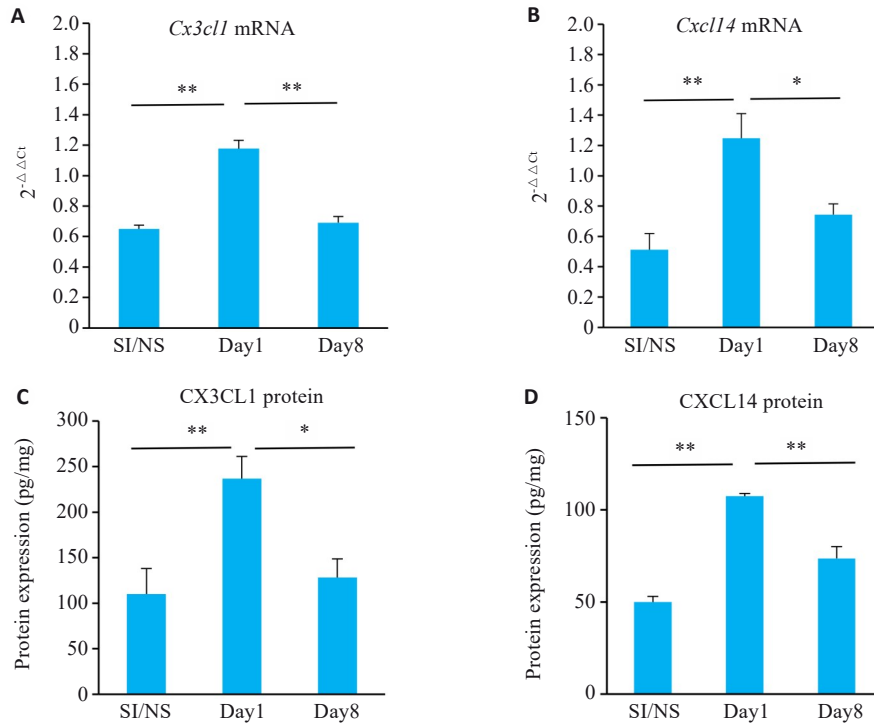


图5 各组小鼠CPSP不同时期靶物质基因表达情况

Fig.5 Gene and protein expression of Cx3c11 and Cxcl14 in different stages of CPSP. **A:** *Cx3c11* mRNA expression levels in ipsilateral DRGs of the mice at each time point. **B:** *Cxcl14* mRNA expression levels in ipsilateral DRGs of the mice at each time point. **C:** CX3CL1 protein expression in ipsilateral DRGs of the mice at each time point. **D:** CXCL14 protein expression in ipsilateral DRGs of the mice at each time point. **P*<0.05, ***P*<0.01.

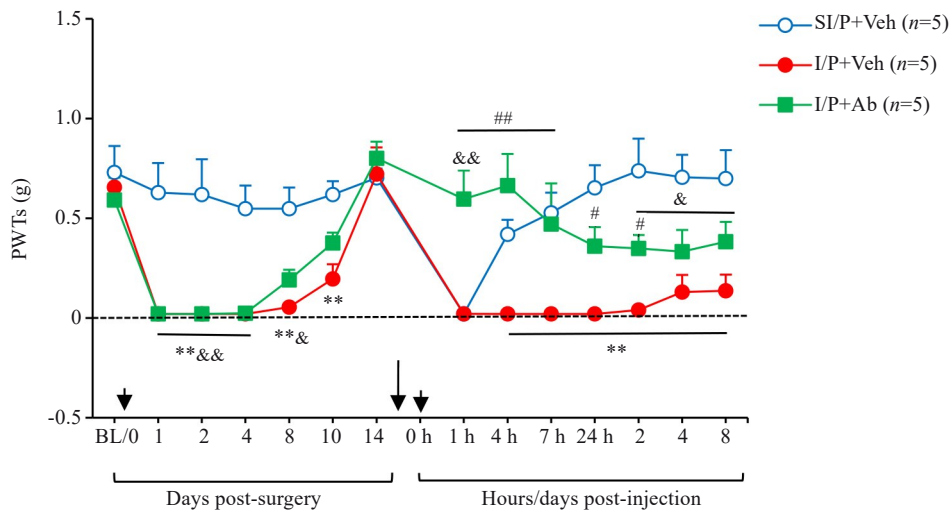


图6 各组实验小鼠鞘内注射CX3CL1中和抗体的镇痛效应

Fig.6 Intrathecal injection of CX3CL1 neutralizing antibody (5 μg/10 μL) 10 min prior to PGE2 injection significantly modulates mechanical PWTs in INC/PGE2 mice. ***P*<0.01 I/P+Veh vs SI/P+Veh group; **P*<0.05, ***P*<0.01 I/P+Ab vs I/P+Veh group; &*P*<0.05, &&*P*<0.01 I/P+Ab vs SI/P+Veh group. Ab: CX3CL1-neutralizing antibody; Veh: Vehicle, goat IgG control (1 μL/10 μL).

等对神经损伤风险较高的手术;不同的麻醉方式及麻醉药物选择^[4]。术后持续性炎症在慢性疼痛的发生和维持中也起着关键作用。一般情况下局部炎症会随伤口愈合而消退,但在某些情况下手术创伤后神经炎症持续存在,导致神经元可塑性改变并诱发术后疼痛的慢性

化。因此,为模拟临床实际情况,本研究采用二次刺激的CPSP模型开展研究。在Brennan经典足底切口小鼠模型^[21]和Levine“痛觉过敏启动”模型^[22]基础上,2012年有研究建立了PGE2诱导型CPSP小鼠模型^[9,10],采用足底切口损伤作为第一干预刺激,PGE2作为第二干预刺

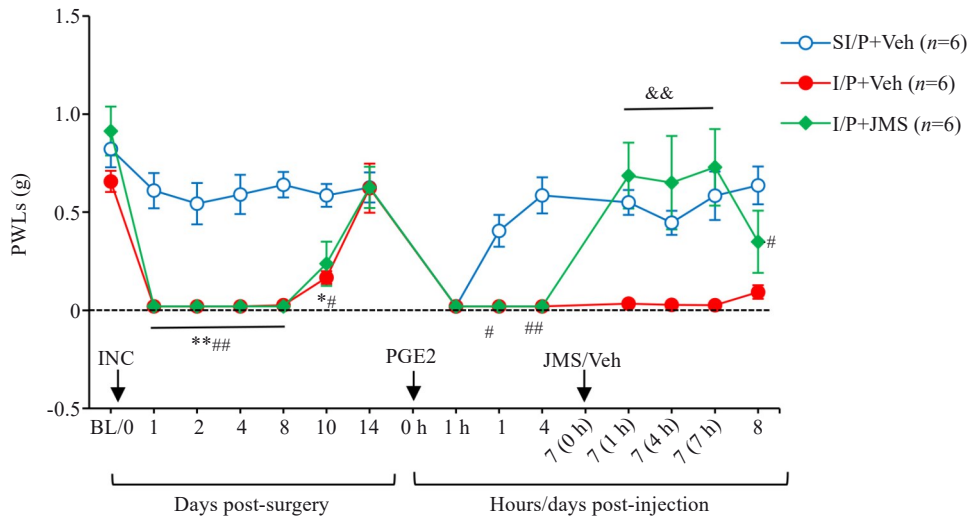


图7 选择性拮抗CX3CR1对实验小鼠痛行为的影响

Fig. 7 Effects of intrathecal injection of JMS17-2 (75 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$), a selective CX3CR1 antagonist, on Day 7 post-PGE2 injection, on PWTs in CPSP mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ I/P+Veh vs SI/P+Veh; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ I/P+JMS vs SI/P+Veh; && $P < 0.01$ I/P+JMS vs I/P+Veh. I/P: INC/PGE2; SI/P: Sham INC/PGE2; JMS: CX3CR1-selective antagonist JMS17-2; Veh: Corn oil vehicle.

激,明确急性疼痛慢性转化节点,可模拟临床切口手术愈合后因炎症诱发持续性痛觉敏化的现象^[11, 23]。本研究采用该模型,CPSP诱导成功率可达90%以上,能实现急性术后疼痛和慢性术后疼痛的清晰分界,有助于针对CPSP及疼痛持续状态开展针对性研究。

本研究首次延长CPSP模型小鼠痛行为观察至29 d,揭示相关痛行为时效表征;并进行DRG层面相关生物信息学分析,锁定了趋化因子相关靶点并行验证。以往I/P模型相关实验主要围绕PGE2诱导疼痛的早期开展:有研究观察到在PGE2诱导后3 h、24 h,雌雄模型小鼠均出现明显的机械痛觉敏化,且未显示明显的性别二态性^[12]。也有研究观测了PGE2诱导后72 h内多时点雄性小鼠机械痛行为情况,结果显示PGE2可诱导痛觉过敏且在3 d时恢复正常^[23, 24];提示PGE2诱导型痛觉过敏的持续时长可能与足底切口造模方式有关;其对小鼠足趾进行包括趾肌组织的纵向切割,而未施加垂直于肌丝的机械牵拉等刺激,进一步显示了手术损伤对慢性疼痛的潜在影响。Anesthesiology一项研究将I/P动物模型痛行为观测时点延长到术后21 d,研究结果显示PGE2可诱导INC小鼠出现长时间的机械超敏反应并持续至注射后7 d^[25]。本研究将观测时间延长至术后29 d,结果显示PGE2诱导慢性疼痛可持续约10 d,进一步展现了I/P小鼠诱发CPSP的疼痛行为学指标时间动态特征。此外,本研究还探索了模型小鼠在各时间点其他痛行为范式特征,完善了I/P小鼠模型多维痛行为表征情况。目前术后PGE2诱导型热痛、冷痛的相关研究鲜少,一项关于慢性角叉菜胶/PGE2急性痛慢性转化大鼠模型的研究显示,强度40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下大鼠足背注射PGE2

后4~24 h热缩足潜伏期有所缩短^[26],然而更长时间的PGE2诱导型热痛证据尚且缺少,其提示PGE2诱导型机械痛和热痛改变规律可能不同。本研究不仅延长了疼痛行为学指标时间动态特征观察窗,还揭示了CPSP小鼠在PGE2诱导后足趾具有持续性冷痛觉敏化、热痛觉无持续性异常的特点,推测可能是由于冷痛、热痛相关受体介导作用的不同导致的。

本研究将重点着眼于检测CPSP不同时期外周DRG内物质变化,以期探索介导CPSP维持的关键物质,为临床有效防治CPSP提供治疗靶点。采用RNA-Seq技术建立了PGE2诱导后第1天和第8天小鼠背根神经节基因表达谱,并通过生物信息学及相关验证结果可知,趋化因子尤其CX3CL1相关条目具有较大介导作用。趋化因子是一类与G蛋白偶联受体结合的小分泌蛋白家族,可触发细胞内信号通路,并在稳态和病理状态下直接指导细胞迁移、增殖、生存和炎症^[27]。趋化因子能介导持续性的炎性痛及神经病理性疼痛的发生及维持^[27],但其成员在CPSP过程中的作用尚且不明。CX3CL1又称Fractalkine,是趋化因子CX3C亚群的唯一成员,在周围神经系统中主要由神经元和血管内皮细胞分泌。CX3CL1参与白细胞特别是巨噬细胞和淋巴细胞的游走和活化;介导细胞间粘附,亦能介导免疫损伤等^[28]。PGE2注射后第8天时CX3CL1蛋白表达下降但痛行为持续,推测可能与下游相关受体的持续活化有关。CX3CR1是CX3CL1的唯一受体,已有研究表明CX3CL1通过CX3CR1激活胶质细胞导致各类疼痛。CX3CL1/CX3CR1可在背根神经节层面^[29]或通过脊髓神经元-小胶质细胞相互作用参与神经病理性疼痛^[30]。

也有研究亦证实抑制背根神经节卫星胶质细胞中的CX3CL1/CX3CR1信号通路可控制炎性疼痛:外周炎症时CX3CL1在DRG神经元中释放,并与卫星胶质细胞表达的CX3CR1结合,导致卫星胶质细胞活化产生TNF- α 、IL- β 和PGE₂,最终导致炎性痛^[31]。CPSP属于混合复杂型疼痛,本研究初步证实DRG中CX3CL1参与介导CPSP早期,第8天相关结果显示CX3CL1表达下降但痛行为仍存在;在维持期拮抗CX3CR1可翻转CPSP维持期疼痛,提示CPSP的维持可能与其受体CX3CR1结合及相关巨噬细胞进一步激活有关。

本研究提示DRG中趋化因子CXCL14、CCR5、IL-7也可能参与CPSP的发生与发展。CXCL14也称为乳腺和肾脏表达的趋化因子(BRAK),与感染性和炎症性疾病、血管生成和癌症有关^[32,33]。单核细胞对CXCL14和PGE₂具有特异性;在无PGE₂的情况下,与CXCL14相关的单核细胞迁移较弱。以往研究表明脊髓背角CXCL14参与神经病理性疼痛:紫杉醇诱导的神经病理性疼痛与脊髓背角NFATc2-CXCL14轴的表现遗传调控机制密切相关,模型大鼠脊髓背角CXCL14在mRNA和蛋白水平均显著上调^[34]。现有研究中,趋化因子CXCL14的经典高亲和力受体至今尚未被明确鉴定和公认:G蛋白偶联受体85(GPR85)被证明可与CXCL14结合,并可使细胞外信号调节蛋白激酶1/2和Akt信号的激活^[35];CXCL12受体CXCR4亦被证实可与CXCL14结合^[36];CXCL14也可能通过与清道夫受体ACKR2、整合素(如 α 11 β 1)等分子结合,发挥免疫和非免疫调节功能^[37,38]。在组织微环境中,CXCL14负责将天然的免疫监视细胞(如巨噬细胞、树突细胞)基础性地招募和定位到组织中;而当机体发生损伤或炎症,CX3CL1/CX3CR1轴则被迅速激活,强力招募更多的效应免疫细胞(如细胞毒性淋巴细胞)到炎症部位以执行清除任务。我们推测两者可能在机体中起协同作用,控制炎症并促进组织修复,有待后续研究进一步证实。CCR5是细胞内 β 趋化因子的受体,具有调控T细胞和单核细胞/巨噬细胞系的迁移、增殖与免疫的功能,参与内脏疼痛、紫杉醇诱导的周围神经性疼痛^[39,40]。除CX3CL1和CXCL14外,可推测CCR5可能是疼痛慢性化的早期促痛因子,可能促进神经元-胶质细胞相互作用、免疫细胞募集(如CCR5⁺巨噬细胞)或神经元持续敏化,导致术后急性疼痛向慢性疼痛转化。白介素IL-7是T细胞和B细胞发育所必须的细胞因子,有助于人类免疫系统的正常发育和维持;血浆中较高水平的IL-7与肌肉骨骼疼痛显著相关^[41]。PGE₂诱导后第8天白介素IL-7的表达上调提示免疫细胞的激活与分泌,可能参与慢性疼痛的免疫调节。

本研究从纵向时间发展维度丰富了I/P小鼠模型内

涵,明确CPSP较长时段中疼痛行为学指标的时间动态特征。通过对比分析CPSP模型小鼠不同时间维度的生物信息学情况,筛选并揭示CPSP早期及维持期的外周神经节物质变化特点,且初步展示了术后慢性疼痛早期,DRG层面或由促炎趋化因子(如CX3CL1)主导,驱动疼痛慢性转化;继而募集和激活下游CX3CR1⁺等免疫细胞,可能引起神经元-胶质细胞互作从而介导CPSP维持。同时研究尚存在不足之处,如对其它差异表达的趋化因子(CCR5、IL7)的作用仅限于生信分析和初步基因表达检测,未进行蛋白水平、细胞定位或功能阻断等实验证实;CXCL14且尚无公认的高特异性受体,暂未进行相关研究;缺失脊髓层面的机制探讨,未能构建外周DRG变化与中枢敏化的联系等。后续将进一步采用药理学及多种检测手段,进一步研究靶物质及相关免疫细胞在CPSP中的功能联系及协同作用。

综上,本研究揭示CPSP模型小鼠的痛行为时效表征,主要表现为机械痛觉异常、冷痛觉异常,热痛觉敏化并不明显。趋化因子参与介导CPSP早期及维持期,其中背根神经节CX3CL1、CXCL14可能是I/P小鼠早期CPSP的潜在靶点。本研究为日后进一步的机制探索打下基础,有助于开发更具针对性的CPSP预防和治疗策略。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] 冯 艺,许建军,林夏清,等.慢性术后或创伤后疼痛[J].中国疼痛医学杂志,2021,27(4):241-5.
- [2] Fletcher D, Stamer UM, Pogatzki-Zahn E, et al. Chronic postsurgical pain in Europe: an observational study[J]. Eur J Anaesthesiol, 2015, 32(10): 725-34.
- [3] 金菊英,彭丽桦,杜洵松,等.手术后慢性疼痛的流行病学调查和危险因素分析[J].中国疼痛医学杂志,2015,21(7):505-12.
- [4] 韩琦,冯 艺.术后急、慢性疼痛危险因素研究进展[J].中国疼痛医学杂志,2020,26(11):849-53.
- [5] Richebé P, Capdevila X, Rivat C. Persistent postsurgical pain: pathophysiology and preventative pharmacologic considerations [J]. Anesthesiology, 2018, 129(3): 590-607.
- [6] Inyang KE, Burton MD, Szabo-Pardi T, et al. Indirect AMP-activated protein kinase activators prevent incision-induced hyperalgesia and block hyperalgesic priming, whereas positive allosteric modulators block only priming in mice[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2019, 371(1): 138-50.
- [7] Pogatzki EM, Raja SN. A mouse model of incisional pain[J]. Anesthesiology, 2003, 99(4): 1023-7.
- [8] Xu JJ, Gao P, Wu Y, et al. G protein-coupled estrogen receptor in the rostral ventromedial medulla contributes to the chronification of postoperative pain[J]. CNS Neurosci Ther, 2021, 27(11): 1313-26.
- [9] Kehlet H, Jensen TS, Woolf CJ. Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention[J]. Lancet, 2006, 367(9522): 1618-25.
- [10] Tillu DV, Melemedjian OK, Asiedu MN, et al. Resveratrol engages

- AMPK to attenuate ERK and mTOR signaling in sensory neurons and inhibits incision-induced acute and chronic pain[J]. *Mol Pain*, 2012, 8: 5.
- [11] 甄思佳, 赵贝, 郑博习, 等. 背根神经节嘌呤受体亚型P2X3R介导小鼠术后急—慢痛转化[J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(7): 1282-8.
- [12] Baptista-de-Souza D, Tavares-Ferreira D, Megat S, et al. Sex differences in the role of atypical PKC within the basolateral nucleus of the amygdala in a mouse hyperalgesic priming model[J]. *Neurobiol Pain*, 2020, 8: 100049.
- [13] Guo ZB, Tang L, Wang LP, et al. The analgesic effects of ulinastatin either as a single agent or in combination with sufentanil: a novel therapeutic potential for postoperative pain[J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 907: 174267.
- [14] Pak DJ, Yong RJ, Kaye AD, et al. Chronification of pain: mechanisms, current understanding, and clinical implications[J]. *Curr Pain Headache Rep*, 2018, 22(2): 9.
- [15] Li CS, Yang Y, Liu SF, et al. Stress induces pain transition by potentiation of AMPA receptor phosphorylation[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(41): 13737-46.
- [16] Banik RK, Woo YC, Park SS, et al. Strain and sex influence on pain sensitivity after plantar incision in the mouse[J]. *Anesthesiology*, 2006, 105(6): 1246-53.
- [17] 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.
- [18] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia[J]. *Pain*, 1988, 32(1): 77-88.
- [19] Yoon C, Wook YY, Sik NH, et al. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain[J]. *Pain*, 1994, 59(3): 369-76.
- [20] 张晓光, 郗文斌, 屠伟峰, 等. 围术期目标导向全程镇痛管理中国专家共识(2021版)[J]. *中华疼痛学杂志*, 2021, 17(2): 119-25.
- [21] Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain[J]. *Pain*, 1996, 64(3): 493-502.
- [22] Reichling DB, Levine JD. Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain[J]. *Trends Neurosci*, 2009, 32(12): 611-8.
- [23] Sun Y, Sahbaie P, Liang DY, et al. Epigenetic regulation of spinal CXCR2 signaling in incisional hypersensitivity in mice[J]. *Anesthesiology*, 2013, 119(5): 1198-208.
- [24] Sahbaie P, Sun Y, Liang DY, et al. Curcumin treatment attenuates pain and enhances functional recovery after incision[J]. *Anesth Analg*, 2014, 118(6): 1336-44.
- [25] Matsuda M, Oh-Hashi K, Yokota I, et al. Acquired exchange protein directly activated by cyclic adenosine monophosphate activity induced by p38 mitogen-activated protein kinase in primary afferent neurons contributes to sustaining postincisional nociception[J]. *Anesthesiology*, 2017, 126(1): 150-62.
- [26] 胡海宇, 丁家威, 吴叶琪, 等. 电针对痛觉敏化大鼠背根神经节蛋白酶激活受体2的影响[J]. *针刺研究*, 2018, 43(1): 14-9.
- [27] Jiang BC, Liu T, Gao YJ. Chemokines in chronic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential[J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 212: 107581.
- [28] Subbarayan MS, Joly-Amado A, Bickford PC, et al. CX3CL1/CX3CR1 signaling targets for the treatment of neurodegenerative diseases[J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 231: 107989.
- [29] Holmes FE, Arnott N, Vanderplank P, et al. Intra-neural administration of fractalkine attenuates neuropathic pain-related behaviour[J]. *J Neurochem*, 2008, 106(2): 640-9.
- [30] Bian C, Wang ZC, Yang JL, et al. Up-regulation of interleukin-23 induces persistent allodynia via CX3CL1 and interleukin-18 signaling in the rat spinal cord after tetanic sciatic stimulation[J]. *Brain Behav Immun*, 2014, 37: 220-30.
- [31] Souza GR, Talbot J, Lotufo CM, et al. Fractalkine mediates inflammatory pain through activation of satellite glial cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(27): 11193-8.
- [32] Gowhari Shabgah A, Haleem Al-Qaim Z, Markov A, et al. Chemokine CXCL14; a double-edged sword in cancer development[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 97: 107681.
- [33] Westrich JA, Vermeer DW, Colbert PL, et al. The multifarious roles of the chemokine CXCL14 in cancer progression and immune responses[J]. *Mol Carcinog*, 2020, 59(7): 794-806.
- [34] Liu M, Zhang SB, Luo YX, et al. NFATc2-dependent epigenetic upregulation of CXCL14 is involved in the development of neuropathic pain induced by paclitaxel[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 310.
- [35] Wang YY, Weng XL, Wang LY, et al. HIC1 deletion promotes breast cancer progression by activating tumor cell/fibroblast crosstalk[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(12): 5235-50.
- [36] Witte A, Rohlfing AK, Dannenmann B, et al. The chemokine CXCL14 mediates platelet function and migration via direct interaction with CXCR4[J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(3): 903-17.
- [37] Chang TM, Chiang YC, Lee CW, et al. CXCL14 promotes metastasis of non-small cell lung cancer through ACKR2-dependent signaling pathway[J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(5): 1455-70.
- [38] Xu YY, Deng CZ, Chen HM, et al. Osteosarcoma cells secrete CXCL14 that activates integrin $\alpha 1 \beta 1$ on fibroblasts to form a lung metastatic niche[J]. *Cancer Res*, 2024, 84(7): 994-1012.
- [39] Lu Y, Jiang BC, Cao DL, et al. Chemokine CCL8 and its receptor CCR5 in the spinal cord are involved in visceral pain induced by experimental colitis in mice[J]. *Brain Res Bull*, 2017, 135: 170-8.
- [40] Zhong SS, Liu FX, Giniatullin R, et al. Blockade of CCR5 suppresses paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain caused by increased deoxycholic acid[J]. *Cell Rep*, 2023, 42(11): 113386.
- [41] Jonsjö MA, Olsson GL, Wicksell RK, et al. The role of low-grade inflammation in ME/CFS (Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome)-associations with symptoms[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2020, 113: 104578.

(编辑:郎朗)