



他克莫司通过上调脊髓背角AMPA受体的突触表达诱发疼痛*

徐嘉钰, 李静, 李媛, 王康丽, 曾祥茹, 索占伟[△]

兰州大学药学院 分子药理研究所(兰州 730000)

【摘要】目的 研究长期使用他克莫司(tacrolimus, or FK506)对小鼠痛行为的影响,并通过检测FK506对小鼠脊髓背角 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, AMPA)突触表达和受体磷酸化的影响,探讨其诱发疼痛的机制。**方法** ①将24只小鼠随机平均分为两组,FK506组每天腹腔注射FK506构建疼痛模型,Saline组给予生理盐水,每天均注射1次,连续注射7 d。一部分小鼠(每组6只)连续9 d监测小鼠机械性缩足阈值(paw withdrawal threshold, PWT)、热痛觉潜伏期(paw withdrawal latency, PWL)以及自发性痛行为学的变化,检测模型是否构造成功。另一部分小鼠(每组6只)在注射第7天诱导出明显的疼痛症状后,急性分离脊髓背角,利用免疫印迹法检测AMPA受体亚基GluA1、GluA2的突触表达和磷酸化水平。②FK506+CaN组和FK506+Saline组小鼠,每组6只,在疼痛模型鼠造模完成后给予一次鞘内注射重组钙调蛋白依赖性磷酸酶(calcineurin, CaN)(33 U)或生理盐水,60 min后测定各小鼠的PWT和PWL值,以检测CaN在FK506诱发疼痛中的作用。③另选小鼠18只,将小鼠随机平均分为3组:Control组(腹腔注射Saline后,鞘内注射Saline)、FK506+Saline组(腹腔注射FK506后,鞘内注射Saline)、FK506+CaN组(腹腔注射FK506后,鞘内注射CaN),60 min后,分离脊髓进行免疫印迹实验,检测CaN在FK506调节AMPA受体中的作用。**结果** ①在腹腔连续注射FK506后,小鼠的PWT、PWL值均显著下降,在第7天分别降至对照组的22.3% \pm 0.05%、66.6% \pm 0.05%(P <0.01),并出现明显的自发性痛行为,表现为舔足时间显著增加(P <0.01),疼痛模型制造成功。免疫印迹显示,FK506组脊髓背角GluA1、GluA2亚基的总蛋白表达水平与Saline组差异无统计学意义,但可特异性诱导突触中GluA1的数量增加,GluA1的第845位和第831位丝氨酸的磷酸化水平均显著升高(P <0.05)。②与FK506+Saline组相比,FK506+CaN组小鼠的PWT值和PWL值均升高(P <0.05)。③与FK506+Saline组相比,FK506+CaN组小鼠的脊髓背角突触中GluA1的表达量减少(P <0.01),并且GluA1的第845位和第831位丝氨酸的磷酸化水平也降低(P <0.001)。**结论** FK506可通过抑制CaN的活性诱导脊髓背角GluA1的突触表达亢进和过磷酸化,最终诱发疼痛。

【关键词】 他克莫司 脊髓背角 AMPA受体 GluA1亚基 磷酸化 疼痛

Tacrolimus Induces Pain by Upregulating the Synaptic Expression of AMPA Receptors in the Spinal Cord Dorsal Horn XU Jiayu, LI Jing, LI Yuan, WANG Kangli, ZENG Xiangru, SUO Zhanwei[△]. Department of Molecular Pharmacology, School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

[△] Corresponding author, E-mail: suozhw@lzu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effects of long-term administration of tacrolimus (also known as FK506) on the pain-related behaviors in mice and to study the underlying mechanism of pain induced by FK506 via measuring the effect of FK506 on the synaptic expression and phosphorylation of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor in the spinal cord dorsal horn of mice. **Methods** 1) A total of 24 mice were evenly and randomly assigned to two groups, a FK506 group and a Saline group. The FK506 group was given daily intraperitoneal injection of FK506 and the Saline group received normal saline. Both groups received injection once a day for 7 days in a row. Some of the mice ($n=6$ in each group) were monitored for the changes in the paw withdrawal threshold (PWT), the paw withdrawal latency (PWL), and the spontaneous pain behaviors to establish the pain model. The other mice ($n=6$ in each group) of each group underwent isolation of the dorsal horn when obvious pain symptoms were induced on day 7 of injection. Then, immunoblotting was performed to determine the synaptic expression and phosphorylation levels of GluA1 and GluA2 subunits of AMPA receptors. 2) The mice were randomly divided into two groups, FK506+calcineurin (CaN) group and FK506+Saline group ($n=6$ in each group). After the pain model was constructed, the mice were given intrathecal injection of recombinant CaN (also know as 33 U) or normal saline. Then, 60 minutes later, the PWT and the PWL of the mice were measured to investigate the role of CaN in FK506-induced pain. 3) Another 18 mice were selected. The mice were randomly and evenly assigned to three groups, a control group (receiving intraperitoneal injection of normal saline followed by intrathecal injection of normal saline), FK506+Saline group

* 国家自然科学基金项目(No. 82073822)资助

[△] 通信作者, E-mail: suozhw@lzu.edu.cn

出版日期: 2024-01-20

(receiving intraperitoneal injection of FK506 followed by intrathecal injection of normal saline) and FK506+CaN group (receiving intraperitoneal injection of FK506 followed by intrathecal injection of CaN). Then, 60 minutes later, the spinal cords were isolated and subjected to immunoblotting assay to determine the role of CaN in FK506-induced AMPA receptor modification. **Results** 1) After 7 consecutive days of intraperitoneal injection of FK506, the PWT and PWL of mice dropped significantly, reaching on day 7 as low as $22.3\% \pm 0.05\%$ and $66.6\% \pm 0.05\%$ of the control group, respectively ($P < 0.01$). The FK506-treated mice displayed evident spontaneous pain behavior, presenting significantly increased licking activities ($P < 0.01$). These results indicated that FK506-induced pain model was successfully established. Immunoblotting assay showed that the total expressions of GluA1 and GluA2 subunits in the spinal dorsal horn of the FK506 group remained unchanged in comparison with those of the Saline group. However, FK506 specifically induced an increase in the synaptic expression of GluA1. In addition, the phosphorylation levels of GluA1 at Ser845 and Ser831 in FK506-treated mice were significantly increased in comparison with those of the control group ($P < 0.05$). 2) Compared with those of the mice in the FK506+Saline group, the PWT and the PWL of mice in the FK506+CaN group were significantly increased ($P < 0.05$). 3) Compared with those of the FK506+Saline group, the synaptic expression of GluA1 were decreased in FK506+CaN group ($P < 0.01$) and the phosphorylation levels of GluA1 at Ser845 and Ser831 were significantly downregulated ($P < 0.001$). **Conclusion** The hyper-expression and hyperphosphorylation of GluA1 subunit in the spinal cord dorsal horn resulting from CaN inhibition contributes to the FK506-induced pain syndrome. FK506 induces the synaptic hyper-expression and hyperphosphorylation of GluA1 in the dorsal horn of the spinal cord through CaN inhibition, thereby inducing pain.

【Key words】 Tacrolimus Spinal cord dorsal horn AMPA receptor GluA1 subunit
Phosphorylation Pain

他克莫司(tacrolimus), 又名FK506, 是一种从链霉菌属(*streptomyces tsukubaensis*)分离提取的二十三元大环内酯类抗生素, 与早期研发的环孢素(cyclosporine, CsA)同属钙调蛋白依赖性磷酸酶(calcineurin, CaN)抑制剂^[1]。作为一种强大的免疫抑制剂, FK506可通过抑制白细胞介素-2(IL-2)的合成, 减少细胞毒性T淋巴细胞浸润, 广泛应用于器官和组织移植排斥反应的治疗^[2]。然而, 随着药物的使用, 接受FK506治疗的患者出现一种原因不明的异常疼痛及痛觉敏感化症状, 在临床上被称为CaN抑制剂诱导的疼痛综合征(CaN inhibitor-induced pain syndrome, CIPS)^[3-5]。然而, 对于FK506引起CIPS的确切机制尚未阐明, 揭示CIPS的发生机制将有助于CIPS患者的综合治疗和药物研究。

α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors, AMPARs)是分布于中枢神经系统的一类重要的离子型谷氨酸受体(ionotropic glutamate receptor, iGluR)。它们主要在突触后膜传递兴奋性信号, 参与调节多种生理、病理过程^[6]。在脊髓背角中, AMPA受体参与痛觉信息传递, 在痛觉敏感化的形成中扮演着重要角色^[7]。AMPA受体是由GluA1-A4组成的同源或异源的四聚体离子通道。其中, 包含有GluA1、不含GluA2亚基的AMPA受体由于对 Ca^{2+} 具有高度的通透性, 因此被称为钙通透性AMPA受体(Ca^{2+} permeable AMPA receptor, CP-AMPA), 其在痛觉突

触可塑性中尤为重要^[8]。大量研究显示, 在外周神经损伤或炎症发生后, 脊髓背角神经元兴奋性突触中的CP-AMPA的数量急剧增加, 而GluA1的基因敲除或化学性抑制, 则可显著缓解痛敏症状^[9-10]。GluA1受体的突触数量受到其C-末端氨基酸残基磷酸化的密切调控。其中, 第845位丝氨酸(Ser845)和第831位丝氨酸(Ser831)在受体的突触运输、突触定位及通道电导调控中尤为重要。值得注意的是, GluA1的磷酸化除了受到PKA、CaMKII、PKC等蛋白激酶的直接调控, 还受到PP1、PP2A、CaN等蛋白磷酸酶的调控^[11-12]。FK506作为一种CaN的抑制剂, 在长期用药后是否会影响GluA1的磷酸化, 进而改变GluA1的突触数量, 至目前尚未见报道。为探讨FK506的致痛作用及其与AMPA受体的关系, 本研究通过连续腹腔给予FK506, 观察其对痛行为学的影响, 并利用免疫印迹法探讨FK506对AMPA受体可能的调节作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

雄性成年昆明小鼠, 体质量18~22 g, 购自兰州大学实验动物中心, 生产许可证号: SCXK(甘)2018-0002。所有小鼠均饲养在经消毒的鼠笼中, 每笼饲养3~4只, 给予新鲜充足的水、饲料, 饲养环境保持12 h明暗交替、22~24 °C室温。适应性喂养3~5 d后进行实验。实验方案通

过兰州大学药学院伦理委员会审查批准。

1.1.2 主要试剂

他克莫司(tacrolimus, FK506, 碧云天生物技术有限公司, 货号SC0182); 抗兔GluA1-pS845抗体(Cell Signaling Technology公司, 货号8084T); 抗兔GluA1-pS831抗体(Sigma公司, 货号 AB5847); 抗鼠GluA1抗体(Proteintech公司, 货号67642-1-Ig); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(Sabbiotech公司, 货号L3012); 抗兔GluA2抗体、抗兔 β -actin抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(Boster Biological Tech公司, 货号A02905、BM3873、BA1051)。

1.1.3 主要实验仪器

Von Frey毛刺纤维(规格: 2.36, 2.44, 2.83, 3.22, 3.61, 3.84, 4.08, 4.17, Stoelting Wood Dale); PL-200型热测痛仪(成都泰盟科技有限公司); 垂直电泳仪、转印电泳槽、电泳仪(北京六一仪器厂, 型号DYCZ-24DN、DYCZ-40D、DYY-7C); JA2003精密电子天平(上海良平仪器仪表有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备和实验分组

1.2.1.1 构建和检测FK506诱导的疼痛模型

将小鼠随机分为Saline组和FK506组, 每组小鼠各6只。将FK506加适量二甲亚砜(DMSO)制备成质量浓度为20 mg/mL的母液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。在腹腔注射前, 将FK506母液用生理盐水以1:100稀释至0.2 mg/mL。小鼠经称重后, FK506组小鼠按3 mg/kg的剂量, 每天一次腹腔注射FK506, 连续7 d。Saline组小鼠以同等给药方式注射同等体积的含1%DMSO的生理盐水。每天进行机械性缩足阈值(paw withdrawal threshold, PWT)和热缩足潜伏期(paw withdrawal latency, PWL)测定, 连续监测9 d, 并在第7天进行自发痛行为(spontaneous pain)测试。

1.2.1.2 检测FK506对AMPA受体亚基GluA1、GluA2的突触表达和磷酸化水平的影响

另取小鼠, 按1.2.1.1方法制备Saline组和FK506组小鼠, 每组各6只。连续注射7 d后, 分离脊髓背角, 制备富含PSD的突触后致密组分(P3)和全细胞裂解液, 免疫印迹检测GluA1、GluA2的突触表达和磷酸化水平。

1.2.1.3 检测CaN在FK506诱发疼痛中的作用

另取小鼠, 按1.2.1.1方法制备疼痛模型小鼠, 分为2组, 每组各6只。在完成最后一次FK506腹腔注射后, FK506+CaN组鞘内注射重组CaN(33U), FK506+Saline组鞘内注射同体积的Saline。CaN鞘内注射具体方法: 小鼠背部剃毛、消毒后, 沿L5-L6椎骨间隙, 将规格为30 G的微量注射器针头垂直刺入蛛网膜下腔, 以小鼠轻微摆尾作

为给药成功的标志, 缓慢推注5 μL CaN (33 U)。60 min后测定各小鼠的PWT和PWL值。

1.2.1.4 检测CaN在FK506调节AMPA受体中的作用

另取小鼠, 分为3组, 每组各6只。对照组(Control)每天腹腔注射Saline, 7 d后鞘内注射Saline; FK506+Saline组每天腹腔注射FK506, 7 d后鞘内注射Saline; FK506+CaN组每天腹腔注射FK506, 7 d后鞘内注射重组CaN。腹腔注射方法见1.2.1.1, CaN鞘内注射方法见1.2.1.3。在CaN或Saline作用60 min后, 立即分离脊髓背角, 制备P3和全细胞裂解液, 进行免疫印迹检测。

1.2.2 痛行为测定

1.2.2.1 PWT测定

将小鼠提前24 h置于行为测试房中进行适应性饲养。PWT测量采用Up-Down法^[13]。将小鼠置于底部有金属丝网的测试笼中, 适应30 min后, 用不同强度的von Frey细丝垂直作用于小鼠后足底表面, 使von Frey细丝弯曲, 并停留5 s, 记录舔足或抬足反应, 用以下公式计算机械性缩足阈值:

$$\text{PWT} = 10^{Xf + K\delta} / 10\ 000 \quad (1)$$

式中Xf为最后一个有效值所对应纤维的克数, K代表痛阈矫正系数, δ 代表相邻刺激之间的平均差异, 小鼠的 δ 为0.26。

1.2.2.2 PWL测定

将小鼠置于底部为透明有机玻璃的测试笼中, 使小鼠提前适应环境30 min。设置热刺激仪的刺激强度为30%, 刺激时间为10 s。测试时, 将激光束中心对准小鼠后足底部, 以传递热刺激。小鼠出现抬足或舔足反应时, 激光自动中断, 记录从开始刺激到中断的时间, 即为热缩足潜伏期。对每只小鼠间断性测试3次, 每次间隔5 min, 最后计算出3次的平均值。

1.2.2.3 自发性痛行为测定

将长、宽、高分别为27 cm、16.5 cm、12 cm的透明测试笼置于铁架上。调整摄像机位置, 使其可以从测试笼底部获取到小鼠的全部活动。测试前, 将小鼠由饲养笼转移至测试笼, 使其自由活动30 min以适应环境。适应环境后, 连续录制30 min小鼠的活动以做分析。利用SuperMaze(上海欣软)软件记录小鼠的舔足时间和运动距离。期间避免周围环境产生噪声, 测试房温度控制在 $22\sim 24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.3 免疫印迹检测突触组分中GluA蛋白的表达

1.2.3.1 组织分离及突触组分提取

提前30 min配制高糖人工脑脊髓液溶液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF), 将其冻至冰水混合状态。小

鼠经腹腔给予戊巴比妥钠(100 mg/kg)以深度麻醉。剃除背部鼠毛后,行椎板分离术,分离出小鼠L4-L5段脊髓。将脊髓快速转移至充体积分数95%O₂、体积分数5%CO₂的ACSF中,在显微镜下剥离硬、软脊膜。获取的脊髓段用4℃的裂解液(10.0 mmol/L Tris-HCl, pH7.6, 320 mmol/L Sucrose, 1.0 mmol/L EDTA, 1.0 mmol/L EGTA, 1.0 mmol/L Na₃VO₄, 5.0 mmol/L NaF, 1%PMSF)进行匀浆。吸取30 μL匀浆上清作为全细胞匀浆液样品(homogenates, H)。剩余的上清液经1000×g离心10 min后,取上清液在10000×g条件下离心15 min,得到沉淀为富含突触小体组分(P2)。将P2在EBT溶液(10.0 mmol/L Tris-HCl, pH7.6, 320 mmol/L Sucrose, 1.0 mmol/L EDTA, 1.0 mmol/L EGTA, 1.0 mmol/L Na₃VO₄, 5.0 mmol/L NaF, 0.5% TritonX-100, 1%PMSF)中裂解30 min后,以32000×g离心20 min,得到的沉淀物即为富含PSD的突触后致密组分(P3)^[14]。

1.2.3.2 免疫印迹

分别在得到的H和P3组分中加入SDS上样缓冲液,100℃煮3 min后,进行凝胶电泳。得到的H和P3组分的蛋白样品用8%SDS-PAGE凝胶分离后,电转至PVDF膜上。室温下将PVDF膜用5%的脱脂牛奶封闭30 min,随后加入相应的一抗在4℃孵育过夜。第二天用PBST溶液洗涤3次后,加入相应二抗室温孵育1 h。二抗结合完毕后,再用PBST洗3次,随后用ECL显色液进行显色、拍片。本实验中所用到的抗体的浓度分别为:抗兔GluA1-pS845抗体(1:500)、抗兔GluA1-pS831抗体(1:500)、抗鼠GluA1抗体(1:500)、抗兔GluA2抗体(1:500)、内参照抗β-actin抗体(1:1000)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗(1:5000)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠二抗(1:5000)。用Image J图像分析软件对免疫印迹条带进行分析处理,计算每个条带的光密度值,以目标条带和内参条带光密度值的比值作为目的蛋白的相对表达量,并将对照组的相对表达量的平均值标准化为100%。

将分离的脊髓用RIPA裂解液进行全细胞匀浆,在4℃条件下裂解40 min。以14000×g离心10 min,收集上清,加入SDS上样缓冲液。经SDS-PAGE、转膜后,加入相应的GluA1的磷酸化特异性抗体,进行免疫印迹,得到磷酸化印迹条带。随后用Strip液对PVDF膜进行洗脱处理,以除去膜上已结合到蛋白的一抗-二抗复合物。封闭30 min后,重新加入GluA1抗体(1:500)抗体孵育,免疫印迹得到内参蛋白条带。用Image J图像分析软件计算每个条带的光密度值,以磷酸化蛋白条带和总蛋白条带光密度值的比值作为磷酸化相对量,再将对照组的磷酸化相对量的平均值标准化为100%,计算各组相对对照组的表达量。

1.2.4 统计学方法

所有数据均表示为 $\bar{x} \pm s$ 。利用SPSS 23软件进行统计分析,其中行为学数据采用双因素方差分析,免疫印迹条带的光密度值采用单因素方法分析和事后多重比较进行显著性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FK506对小鼠痛行为的影响

在连续给药的第3天,与Saline组相比,FK506组小鼠的PWT值、PWL值(图1A)均显著降低,说明小鼠出现明显的机械性痛觉超敏和热痛觉超敏。随着连续给药天数

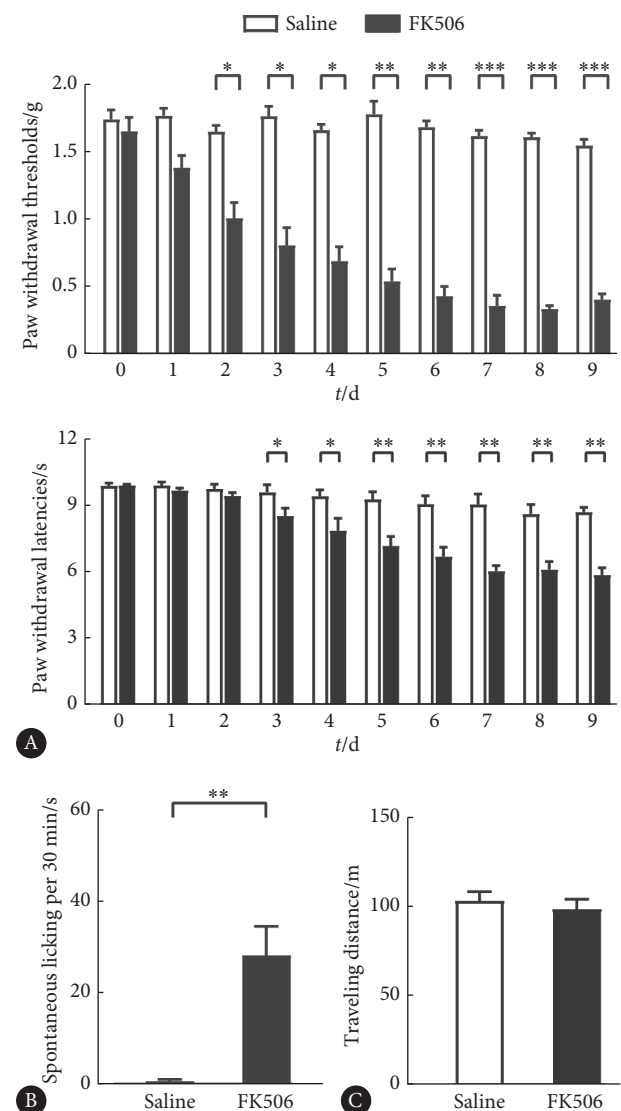


图1 FK506对小鼠痛行为的影响

Fig 1 Effect of FK506 on pain behaviors in mice

A, The effects of FK506 on the paw withdrawal thresholds and the paw withdrawal latencies of mice. B, Spontaneous licking activities within 30 minutes in mice injected with FK506 or normal saline for 7 consecutive days. C, Traveling distance of mice within 30 minutes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, vs. that of the normal saline group. $n = 6$ mice/group.

的增加, PWT值和PWL值进一步降低, 在第7天分别降至对照组的 $22.3\% \pm 0.05\%$ 、 $66.6\% \pm 0.05\%$ ($P < 0.01$), 并趋于稳定。第7天, 小鼠在30 min内的自发性痛行为分析结果显示, 与Saline组相比, FK506组小鼠的自发性舔足行为时间显著增加(图1B), 而小鼠的运动距离无明显改变(图1C), 表明FK506对小鼠的运动机能并未产生影响。以上结果说明, 在FK506腹腔给药后的第7天, 小鼠疼痛模型制造成功。

2.2 FK506对小鼠脊髓背角AMPA受体的突触表达及其磷酸化的影响

见图2。免疫印迹结果显示, 小鼠连续腹腔注射

FK506 7 d后, 与注射生理盐水的对照组相比, 脊髓背角中AMPA受体GluA1亚基和GluA2亚基的总蛋白表达均并未发生改变。然而, 对富含PSD的P3检测结果显示, FK506组小鼠的GluA1亚基的突触表达水平高于对照组 ($P < 0.01$), 而GluA2亚基的突触表达水平保持不变。提示FK506虽不影响脊髓背角GluA1、GluA2亚基的总蛋白表达水平, 但可特异性诱导突触中GluA1的数量增加。磷酸化检测结果显示, 脊髓背角中GluA1的第845位(Ser845)和第831位(Ser831)的丝氨酸残基的磷酸化水平均升高, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$), 表明FK506可诱发小鼠GluA1亚基的过磷酸化。

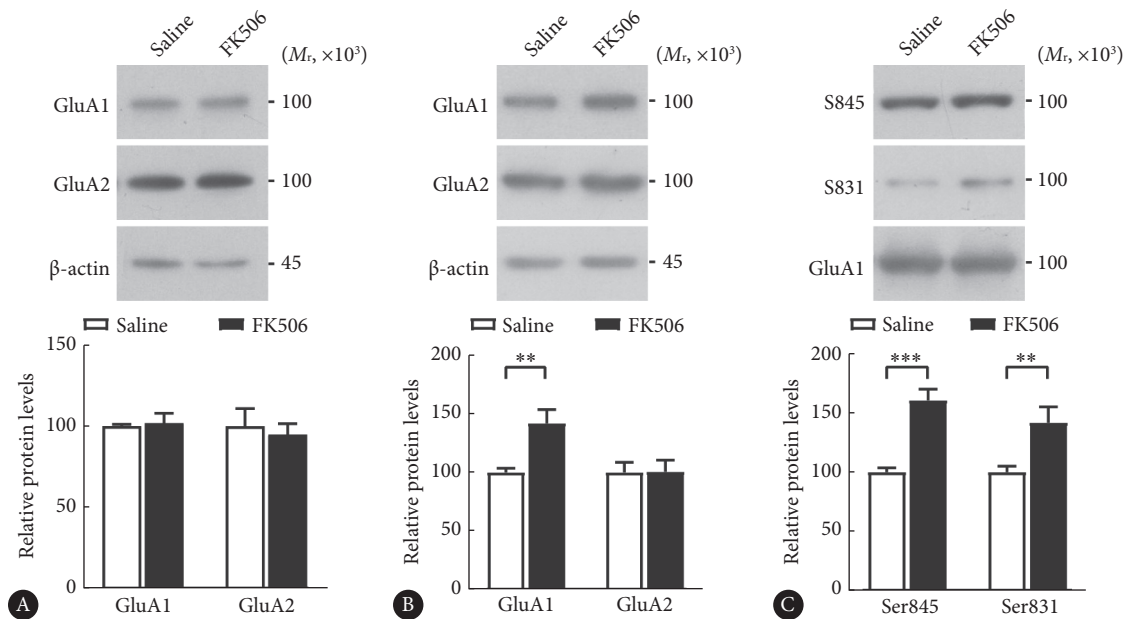


图2 FK506对小鼠脊髓背角AMPA受体表达及其磷酸化的影响

Fig 2 Effects of FK506 on the synaptic expression and the phosphorylation of AMPA receptors in the spinal cord dorsal horn of mice

A, The total protein expression levels of GluA1 and GluA2. B, The protein levels of GluA1 and GluA2 at PSD-enriched fractions (P3). C, The phosphorylation levels of pGluA1-Ser845 and pGluA1-Ser831. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, vs. that of the normal saline group. $n = 6$ mice per group.

2.3 鞘内补充CaN对FK506诱发疼痛小鼠PWT、PWL的影响

见图3。与FK506+Saline组相比, FK506+CaN组小鼠的PWT值和PWL值均升高 ($P < 0.05$), 提示补充CaN可逆转FK506的致痛作用。

2.4 鞘内补充CaN对FK506诱发疼痛小鼠脊髓背角GluA1亚基突触表达及磷酸化的影响

见图4。小鼠脊髓背角GluA1亚基的突触表达水平, FK506+Saline组较对照组升高 ($P < 0.001$), FK506+CaN组较FK506+Saline组降低 ($P < 0.01$), 表明CaN可有效逆转FK506所诱发的GluA1的突触表达增多。然而, CaN对GluA2亚基的突触表达并未产生影响, 3组间差异无统计学意义。小鼠脊髓背角GluA1的第845位(Ser845)和第831位的丝氨酸残基(Ser831)的磷酸化水平, FK506+

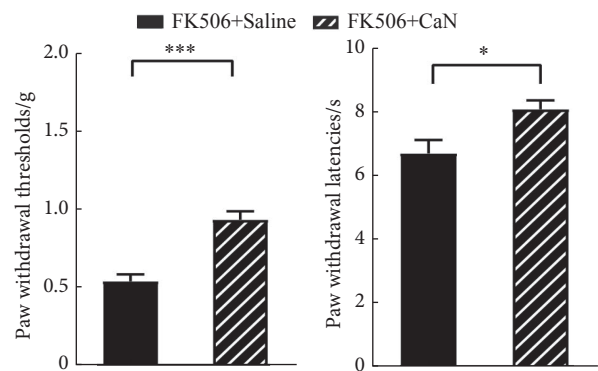


图3 鞘内补充CaN对FK506诱发的疼痛小鼠PWT、PWL值的影响

Fig 3 Effect of intrathecal injection of CaN on the paw withdrawal thresholds and the paw withdrawal latencies in mice with pain induced by FK506

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. $n = 6$ mice per group.

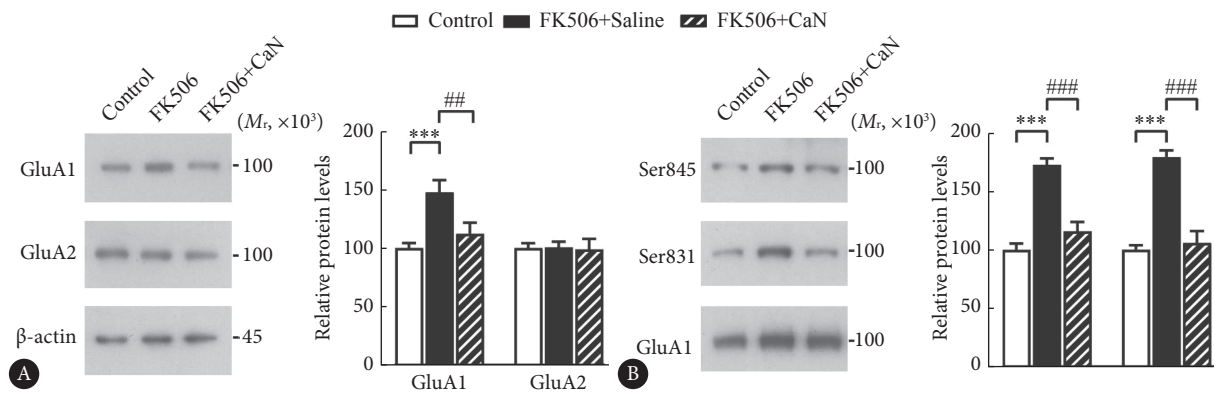


图 4 鞘内补充CaN对FK506诱导疼痛小鼠脊髓背角GluA1亚基突触表达及磷酸化的影响

Fig 4 Effect of intrathecal injection of CaN on the synaptic expression and phosphorylation of GluA1 in the spinal cord dorsal horn of mice with pain induced by FK506

A, The protein levels of GluA1 and GluA2 at PSD-enriched fractions (P3). B, The phosphorylation levels of pGluA1-Ser845 and pGluA1-Ser831. *** $P < 0.001$, vs. control group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, vs. the FK506+normal saline group. $n = 6$ mice per group.

Saline组较对照组升高 ($P < 0.001$), FK506+CaN组较FK506+Saline组降低 ($P < 0.001$), 表明CaN可有效逆转FK506所诱发的GluA1的过磷酸化。

3 讨论

本研究通过von Frey测试和哈格里夫斯实验研究了CaN抑制剂FK506对小鼠的致痛作用, 发现从连续腹腔给予FK506后的第3天开始, 实验组小鼠的PWT和PWL值均逐渐降低, 说明FK506可诱发动物的机械性痛觉超敏和热痛觉过敏, 并且痛敏症状在第7天后趋于稳定, 此结果与之前的文献报道基本一致^[15]。在FK506所致疼痛小鼠的鞘内补充重组CaN可有效逆转FK506的致痛作用, 提示了FK506的作用与抑制CaN的活性密切相关。除了诱发机械性痛觉超敏和热痛觉过敏症状, 本研究发现FK506还能诱导明显的自发痛行为, 此结果在此前尚未见报道。大量研究表明^[16], AMPA受体在痛觉敏感化和自发性疼痛中发挥着重要作用。本研究通过免疫印迹发现, FK506所致疼痛动物脊髓背角中AMPA受体亚基GluA1的突触表达显著升高, 而鞘内补充CaN则能有效逆转FK506的作用, 提示了AMPA受体在FK506诱导疼痛中发挥了重要作用。调控GluA1受体的突触运输及功能可作为改善CIPS症状的重要策略。

AMPA受体的亚基组成和突触数量决定着受体的突触功能。AMPA受体的组装和运输受体到磷酸化、棕榈酰化等翻译后修饰的调节, 其中磷酸化修饰尤为关键。GluA1亚基的第845位丝氨酸(Ser845)的磷酸化, 可迅速增强GluA1的突触输送和突触定位, 从而增加GluA1亚基的突触数量, 而第831位丝氨酸(GluA1-Ser831)的磷酸化可增强通道的活性^[17]。在外周神经损伤或炎症条件下,

脊髓背角及相关脑区兴奋性神经元中包含GluA1、缺乏GluA2亚基的CP-AMPA受体数量急剧增加, 构成了痛觉敏感化的主要因素^[10]。研究显示, 蛋白激酶PKA对GluA1-Ser845的催化作用是GluA1-Ser845磷酸化水平增高和受体突触数量的主要原因^[18]。另一方面, 蛋白磷酸酶CaN催化GluA1-Ser845的去磷酸化对受体的突触输送起着抑制性调控作用^[19]。在炎性疼痛和神经病理性疼痛中, 脊髓背角神经元中CaN的活性减弱, 导致GluA1-Ser845的过磷酸化^[20]。本研究免疫印迹发现, 连续给予FK506可显著提高GluA1-Ser845的磷酸化, 提示了CaN的抑制可直接诱导GluA1-Ser845的过磷酸化, 造成CP-AMPA受体的突触聚集, 导致痛觉敏化。除了GluA1-Ser845的磷酸化水平的升高, 本研究结果显示, FK506所致疼痛动物的GluA1-Ser831的磷酸化水平也显著升高。这可能是由于FK506通过激活N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDAR)导致大量 Ca^{2+} 离子内流^[21], 进而激活PKC和CaMKII, 最终导致GluA1-Ser831发生过磷酸化。综上, FK506可通过抑制脊髓背角神经元中CaN的活性, 诱发GluA1亚基的过磷酸化和受体的功能亢进, 最终引发疼痛。本研究只是利用免疫印迹法证实了长期施用FK506对AMPA受体的突触分布产生影响。然而, 长期施用FK506是否也改变脊髓背角浅层兴奋性神经元内AMPA受体的电生理特征, 尚需利用膜片钳技术开展进一步深入研究。

* * *

作者贡献声明 徐嘉钰负责数据审编、正式分析、调查研究、研究方法、初稿写作和审读与编辑写作, 李静负责调查研究、研究方法和验证, 李媛、王康丽和曾祥茹负责调查研究和验证, 索占伟负责论文构思、经费获取、研究项目管理、提供资源、监督指导和审读与编辑写作。所有

作者已经同意将文章提交给本刊,且对将要发表的版本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。

Author Contribution XU Jiayu is responsible for data curation, formal analysis, investigation, methodology, writing--original draft, and writing--review and editing. LI Jing is responsible for investigation, methodology, and validation. LI Yuan, WANG Kangli, and ZENG Xiangru are responsible for investigation and validation. SUO Zhanwei is responsible for conceptualization, funding acquisition, project administration, resources, supervision, and writing--review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Declaration of Conflicting Interests All authors declare no competing interests.

参 考 文 献

- [1] POSHEKHONTSEVA V Y, FOKINA V V, TARLACHKOV S V, *et al.* Streptomyces tsukubensis VKM Ac-2618D-an effective producer of tacrolimus. *Appl Biochem Microbiol*, 2021, 57(9): 939-948. doi: 10.1134/S0003683821090064.
- [2] WHITEHOUSE G, GRAY E, MASTORIDIS S, *et al.* IL-2 therapy restores regulatory T-cell dysfunction induced by calcineurin inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(27): 7083-7088. doi: 10.1073/pnas.1620835114.
- [3] ILONZE O J, GIOVANNINI M, JONES M A, *et al.* Calcineurin-inhibitor induced pain syndrome in a heart transplant patient. *Transplant Proc*, 2021, 53(8): 2630-2635. doi: 10.1016/j.transproceed.2021.08.014.
- [4] CHADHA Y, BRAHME S K, HUANG B K, *et al.* Calcineurin-inhibitor induced pain syndrome - Magnetic resonance imaging and scintigraphic findings illustrated through two cases. *Clin Imaging*, 2019, 53: 174-178. doi: 10.1016/j.clinimag.2018.10.022.
- [5] ULLAH A, ALY A, ALI T, *et al.* Calcineurin inhibitor-induced pain syndrome: an uncommon but a debilitating complication of calcineurin inhibitors use. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 2021, 32(6): 1795-1799. doi: 10.4103/1319-2442.352443.
- [6] GE Y, WANG Y T. GluA1-homomeric AMPA receptor in synaptic plasticity and neurological diseases. *Neuropharmacology*, 2021, 197: 108708. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108708.
- [7] KOPACH O, VOITENKO N. Spinal AMPA receptors: amenable players in central sensitization for chronic pain therapy? *Channels (Austin)*, 2021, 15(1): 284-297. doi: 10.1080/19336950.2021.1885836.
- [8] ROYO M, ESCOLANO B A, MADRIGAL M P, *et al.* AMPA receptor function in hypothalamic synapses. *Front Synaptic Neurosci*, 2022, 14: 833449. doi: 10.3389/fnsyn.2022.833449.
- [9] GUO C, MA Y Y. Calcium permeable-AMPA receptors and excitotoxicity in neurological disorders. *Front Neural Circuits*, 2021, 15: 711564. doi: 10.3389/fncir.2021.711564.
- [10] KOPACH O, DOBROPOLSKA Y, BELAN P, *et al.* Ca²⁺-permeable AMPA receptors contribute to changed dorsal horn neuronal firing and inflammatory pain. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2341. doi: 10.3390/ijms24032341.
- [11] HUANG Y, CHEN S R, PAN H L. Calcineurin regulates synaptic plasticity and nociceptive transmission at the spinal cord level. *Neuroscientist*, 2022, 28(6): 628-638. doi: 10.1177/10738584211046888.
- [12] GAN Q, SALUSSOLIA C L, WOLLMUTH L P. Assembly of AMPA receptors: mechanisms and regulation. *J Physiol*, 2015, 593(1): 39-48. doi: 10.1113/jphysiol.2014.273755.
- [13] CHAPLAN S R, BACH F W, POGREL J W, *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55-63. doi: 10.1016/0165-0270(94)90144-9.
- [14] LI Y, BAI X, GAO M, *et al.* AKAP150 and its palmitoylation contributed to pain hypersensitivity via facilitating synaptic incorporation of GluA1-containing AMPA receptor in spinal dorsal horn. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(12): 6505-6519. doi: 10.1007/s12035-021-02570-z.
- [15] HUANG Y, CHEN S R, CHEN H, *et al.* Calcineurin inhibition causes α 2 δ -1-mediated tonic activation of synaptic NMDA receptors and pain hypersensitivity. *J Neurosci*, 2020, 40(9): 3707-3719. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0282-20.2020.
- [16] WANG Y, WU J, WU Z, *et al.* Regulation of AMPA receptors in spinal nociception. *Mol Pain*, 2010, 6: 5. doi: 10.1186/1744-8069-6-5.
- [17] DIERING G H, HEO S, HUSSAIN N K, *et al.* Extensive phosphorylation of AMPA receptors in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(33): E4920-E4927. doi: 10.1073/pnas.1610631113.
- [18] ZHAO L X, GE Y H, LI J B, *et al.* M1 muscarinic receptors regulate the phosphorylation of AMPA receptor subunit GluA1 via a signaling pathway linking cAMP-PKA and PI3K-Akt. *FASEB J*, 2019, 33(5): 6622-6631. doi: 10.1096/fj.201802351R.
- [19] HELL J W. How Ca²⁺-permeable AMPA receptors, the kinase PKA, and the phosphatase PP2B are intertwined in synaptic LTP and LTD. *Sci Signal*, 2016, 9(425): e2. doi: 10.1126/scisignal.aaf7067.
- [20] BAI X, GAO M, LI Y, *et al.* Upregulation of RCAN1.4 in spinal dorsal horn is involved in inflammatory pain hypersensitivity. *Neurosci Lett*, 2022, 775: 136538. doi: 10.1016/j.neulet.2022.136538.
- [21] HU Y M, CHEN S R, CHEN H, *et al.* Casein kinase II inhibition reverses pain hypersensitivity and potentiated spinal N-methyl-D-aspartate receptor activity caused by calcineurin inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014, 349(2): 239-247. doi: 10.1124/jpet.113.212563.

(2023-08-22收稿, 2023-12-30修回)

编辑 吕 熙



开放获取
Open Access

© 2024 《四川大学学报(医学版)》编辑部 版权所有
Editorial Office of Journal of Sichuan University (Medical Science)