



• 学术动态 •

炭疽毒素调节痛觉信号并运送分子物质到
ANTXR2⁺ 背根神经节感觉神经元

摘要 细菌产物可作用于神经元而改变其信号传导和功能。该研究发现背根神经节 (DRG) 感觉神经元富含 ANTXR2——一种炭疽毒素的高亲和力受体。炭疽毒素由可与 NATXR2 结合的保护性抗原 (PA)、以及水肿因子 (EF) 和致死因子 (LF) 组成。小鼠鞘内注射水肿毒素 (ET = PA + EF) 作用于 DRG 神经元而产生镇痛效应。ET 可抑制机械感觉和热感觉, 以及福尔马林、角叉菜胶或神经损伤诱发的痛敏, 其镇痛作用依赖于 Na_v1.8⁺ 或 Advillin⁺ 神经元上表达的 ANTXR2 受体。ET 可调控小鼠感觉神经元和人源多能干细胞感觉神经元内的蛋白激酶 A (PKA) 通路, 并减弱脊神经传导。炭疽毒素经进一步编辑, 使其可携带包括肉毒毒素等外源蛋白质物质进入 DRG 神经元而产生镇痛作用。该研究主要发现了细菌毒素和伤害感受器之间的相互作用, 有助于开发镇痛新技术。

一、主要研究背景

疼痛是一种不愉快的感觉, 起始于躯体感觉神经元对伤害性热、机械和化学等刺激的反应。寻找选择性靶向沉默伤害性神经元的新策略将有助于镇痛新疗法的研发。天然毒素是选择分子试剂的丰富来源, 能够靶向调节神经元的功能。近来研究发现, 细菌产物可作用于感觉神经元而调控感染诱发的疼痛和咳嗽。该研究的目的是识别细菌产物作用于 DRG 感觉神经元上的受体, 并研究相关细菌产物是否调节疼痛。通过转录组数据分析, 研究者发现 DRG 内 Na_v1.8⁺ 神经元上的 ANTXR2 分子, 是炭疽毒素的高亲和受体。炭疽毒素是炭疽杆菌的主要毒素, 包含 PA (保护性抗原)、LF (致命因子) 和 EF (水肿因子) 三种蛋白, 构成两种二分体毒素: 致命毒素 (LT = PA + LF) 和水肿毒素 (ET = PA + EF)。中毒时, PA 与炭疽毒素受体结合, 并在内吞小泡上打孔, LF 和 EF 通过其 N 端结构域与 PA 打的孔隙结合而进入细胞。LF 是锌指金属蛋白酶, 可剪切丝裂原激活蛋白 (MAP) 激酶、炎症小体感受器 Nlrp1 和磷酸肌醇-3 激酶的调节亚基 p85α 和 p85β。EF 是钙和钙调蛋白依赖的腺苷酸环化酶 (AC), 可将 ATP 转化为 cAMP。

PA 有两个结构同源受体: ANTXR1 (TEM8) 和 ANTXR2 (CMG2)。PA 与 ANTXR2 的亲和力比 ANTXR1 高很多, ANTXR2 缺失小鼠对炭疽毒素和炭疽杆菌感染具有抵抗力, 表明 ANTXR2 是炭疽毒素在体内的主要功能受体。

炭疽毒素除了作为病原菌, 还可用作运送系统而将功能性分子物质运送到靶细胞 (如癌细胞) 的胞质中。把外源分子连接到 LF 的 N 端结构域 (LF_N), 就能通过 PA 打的孔隙被传递到细胞内, 可以运送与蛋白结合的各种分子、非常规的多肽和核酸等。此功能支持把炭疽毒素系统作为靶向神经元技术。

该研究发现 ANTXR2 在神经系统中有着异乎寻常的表达模式: 在大部分 CNS 神经元中缺失, 而富集在 DRG 的 Na_v1.8⁺ 神经元中。在多个小鼠模型中, ET 鞘内注射靶向 DRG 神经元可以抑制热痛和机械痛, 镇痛作用依赖于 Na_v1.8⁺ 或 Advillin⁺ 神经元上的 ANTXR2 表达。ET 减弱了 DRG 神经元到脊髓背角的神经传递功能。炭疽毒素系统将多种非自身蛋白运送到感觉神经元, 具有作为输送镇痛蛋白质平台的潜力。

二、主要研究结果

1. ANTXR2 表达于 Na_v1.8⁺ DRG 神经元上

通过基于流式分选的小鼠 DRG 神经元的转录组数据分析, 发现 *Antxr2* 在 Na_v1.8 品系小鼠 (Scn10a^{Rosa26-TdTomato⁺}) 神经元富集, 且比在 parvalbumin 品系鼠 (Pvalb-cre^{Rosa26-TdTomato⁺}) 的本体感受神经元高 5 倍; 通过小鼠 DRG 神经元的单细胞 RNA 测序, 发现 *Antxr2* 在表达 *Scn10* (Na_v1.8)、*Tipv1*、*Calca* (CGRP)、*P2rx3* 和 *Ntrk1* (TrkA) 伤害感受器中表达最高。

RNAscope (RNA 原位杂交) 实验证实, 小鼠 DRG 中存在 *Antxr2* 转录本, 在中、小直径神经元



中表达最高,大多数 *Scn10a*⁺ 细胞表达 *Antxr2*, 只有小部分 *Pvalb*⁺ 细胞表达 *Antxr2*; *ANTXR2* 广泛表达在人躯体感觉神经元中,包括介导伤害感受的 *CALCA*⁺、*P2RX3*⁺ 和 *CALCA*⁺/*P2RX3*⁺ 神经元;*ANTXR2* 主要表达在中、小直径的 DRG 神经元中;人 *ANTXR2* RNA 在 DRG 的 RNA 中比脑组织 RNA 的表达水平高。以上分析表明 *Antxr2* 在人和小鼠躯体感觉神经元中都有表达,包括伤害性感受器。

2. LT 和 ET 诱发 DRG 细胞信号

LT 处理体外培养 DRG 细胞导致显著的 MEK3 分裂和 p38 磷酸化降低,而单独给予 LF 对 MEK3 分裂和 p38 磷酸化都没有影响,表明 PA 是 LF 进入细胞内所必需的;仅给予 ET 可使 cAMP 水平升高;联合给予特定浓度的 PA,EF 诱导 cAMP 增高的 EC₅₀ 在 46 pM。以上研究结果表明,炭疽毒素可以作用于培养的 DRG 细胞,以依赖于 PA 的方式干预细胞内信号。

3. ET 鞘内注射的镇痛作用

给药方法是单独给予 2 μg PA,或 2 μg PA + 2 μg LF 或 EF,注射体积为 5 μl。结果发现,ET 鞘内注射显著升高机械痛阈值和热痛潜伏期,可持续数小时;ET 作用是可重复的,在第 1 次注射 2 天后,再次鞘内注射 ET 同样可以升高机械痛阈值,而且第 2 次给药的镇痛作用更强,这可能是由于 ET 诱导了 *ANTXR2* 上调。

ET 鞘内注射 2 h 后(2 h 腹腔内注射),DRGs 中 cAMP 水平升高,24 h 后恢复到基线水平;在脊髓水平,ET 2 h 腹腔内注射使 cAMP 水平出现一个明显的小幅增加,可能是伤害感受器的 cAMP 升高,但只是占整个脊髓组织小部分;而 cAMP 的变化在后爪足底组织中没有被检测到。

ET 2 h 腹腔内注射实验鼠对伤害性热刺激和机械刺激(包括热板、冷板和针刺等)的反应减弱;*Randall-Selitto* 诱发反应也减弱,但在注射后 5 h 恢复正常;轻触觉也受到影响,可能由于 *ANTXR2* 在部分 Aβ 和 Aδ 低阈值机械感觉神经元中有表达;ET 鞘内注射对热痛阈和机械痛阈的影响无性别差异。

4. 感觉神经元 *ANTXR2* 介导 ET 的镇痛作用

在 *Na_v1.8*⁺ 伤害性感觉神经元中(*Scn10a*^{cre/+}/*Antxr2*^{fl/fl})条件敲除 *Antxr2*(经验证 DRG 中 *Antxr2* 全长转录本的表达减少),与同窝对照鼠比较,ET 的镇痛作用明显减弱;*Scn10a*^{cre/+}/*Antxr2*^{fl/fl} 鼠体外培养的 DRG 细胞给予 ET 后,cAMP 的合成也减少。*Na_v1.8*⁺ 神经元中 *ANTXR2* 的缺失不影响多数疼痛

模式的基础阈值,但对福尔马林诱发的第二时相疼痛产生轻微的抑制作用,不影响角叉菜胶诱发的机械痛敏。表明 *ANTXR2* 不影响伤害性疼痛的基础阈值,但对 ET 的镇痛作用至关重要。

在 *Avil*^{creERT2}/*ANTXR2*^{fl/fl} 鼠,ET 的镇痛效应几乎被消除。与 *Scn10a*^{cre/+}/*Antxr2*^{fl/fl} 条件敲除鼠比较,*Avil*^{creERT2}/*Antxr2*^{fl/fl} 鼠表现出更显著的减弱,可能是因为少量的 *Antxr2*^{Na_v1.8} 神经元参与镇痛作用。在内皮细胞内条件敲除 *Antxr2* 的 *Cdh5*^{cre/+}/*Antxr2*^{fl/fl} 鼠和在髓系免疫细胞条件敲除 *Antxr2* 的 *Lyz2*^{cre}/*Antxr2*^{fl/fl} 鼠,ET 的镇痛作用没有受到显著的影响。表明神经元内的 *ANTXR2* 对 ET 镇痛作用至关重要,而内皮细胞和髓系免疫细胞几乎不参与 ET 的镇痛作用。

5. ET 诱导小鼠和人 iPSC(诱导多能干细胞)神经元中的 PKA 信号

通过研究 DRG 神经元中 PKA 的激活情况,发现 ET 稳步增加 DRG 神经元亚群的 PKA-II 活性,2 h 达饱和水平,其 EC₅₀ 在皮摩尔水平;而单独应用 EF 或 PA 则没有作用;单独应用 PA、LF 或 LT 都不影响 PKA-II 活性;通过鉴定对 ET 反应的 DRG 神经元亚群,发现在所有伤害性神经元和非伤害性神经元中均可检测到 PKA 活性,但程度不同;对 ET 的反应与 *CaMKIIα* 和 *Na_v1.8* 的表达正相关,与 *NF200* 表达不相关;同 *Fsk* 比较,ET 不增加非神经元细胞中的 pRII 水平。总之,ET 在数小时内可剂量依赖性的激活感觉神经元和伤害性感受器内的 PKA。

通过定量 DRG 冰冻切片上的神经元,揭示 ET 可在体诱导大量 DRG 神经元中的 PKA-II 激活;当基于小分子的分化方案将人类 iPSCs 分化为具有伤害感受器表型的感觉神经元后,以 EC₅₀ 在皮摩尔水平的 ET 进行刺激,即可升高 pRII,表明人感觉神经元可能是炭疽毒素的靶标。

6. ET 调节神经活性和镇痛的诱导

电生理研究发现,当注入小或中等电流时,给予 ET 的 DRG 神经元的兴奋性增强,而神经元的静息膜电位或输入电阻没有明显改变;在 ET 处理的神经元中记录到的电压激活钙电流,与对照组比较无显著性差异;在培养的 DRG 细胞中,给予 ET 也不影响 KCl 诱导的 CGRP 释放。

阿片受体拮抗剂纳曲酮和纳洛酮或 CB1 拮抗剂/反向激动剂 *Rimonabant* 对 ET 的镇痛作用没有显著的影响,化学交感神经切除鼠给予 ET 仍然表现出明显的镇痛作用。另一种可能是,细胞外分泌的 cAMP 转化成腺苷,作用于伤害性感受器上的腺



昔受体而产生镇痛作用,但系统性给予泛腺苷受体拮抗剂 CGS15943 并不影响 ET 升高的热痛阈。

7. ET 鞘内注射诱导 DRG 转录改变

ET 2 h 后对 DRG 的转录组检测分析发现转录组变化明显,包括 *Dusp1*、*Fosb* 和 *Btg2* 等上调和几种信号通路的改变(如磷酸化水平下调)。DUSP1 是一种可阻断与疼痛相关的 MAPK 通路的磷酸酶,用 DUSP1/DUSP6 拮抗剂 BCI 药理方法抑制 DUSP1 不影响 ET 的镇痛作用。虽然以上研究没有明确 DUSP1 的具体功能,但足以证明注射 ET 数小时内可诱发体内 DRG 的内在转录改变。

8. ET 减弱 DRG 中枢末梢的神经传递

辣椒素鞘内注射刺激初级传入的中枢分支,观察 pERK 磷酸化水平。结果发现鞘内注射后再注射辣椒素,可增加背角 pERK 阳性细胞数;而先注射 ET 再注射辣椒素可显著减少 pERK 阳性细胞数。

该研究进一步采用电生理实验观察 ET 刺激背根是否可引起脊髓背角 I 层神经元兴奋性突触后电流 (EPSCs) 的变化。给予 ET 可缓慢减少 C 纤维介导的 EPSCs 达 $37\% \pm 4\%$,而配对脉冲比没有显著变化;在给予或不给予 $1 \mu\text{M}$ 河豚毒素的情况下记录微小 EPSCs (mEPSCs),应用 ET 前后每个细胞 mEPSCs 的频率和振幅的中位数无显著性差异;由于多数 mEPSCs 似乎来源于脊髓中间神经元,对初级传入神经囊泡释放的贡献很小,相对于 ET 导致 EPSCs 大量减少,对 mEPSCs 的影响却很小,这与前面的实验结果相一致,即 ET 作用于初级传入神经元的 ANTXR2 而发挥作用。以上研究结果表明 ET 抑制了从 C 纤维到脊髓背角 I 层神经元的突触传递,并抑制了 I 层神经元的激活。

9. ET 鞘内注射抑制神经病理性痛和炎性痛

小鼠 SNI 神经病理性痛模型中,ET 鞘内注射阻断机械痛敏,但单独给予 PA、EF 或 LT 没有作用;ET 可使同侧和对侧机械痛阈值都升高,也升高同侧和对侧 DRG 内 cAMP 水平;ET 还减轻了福尔马林诱发的第一时相和第二时相疼痛;在角叉菜

胶诱发的小鼠炎性痛模型中,鞘内注射 ET 阻断了机械痛敏,此镇痛作用依赖于 $\text{Na}_v1.8^+$ 神经元上的 ANTXR2 表达;此外,在福尔马林和角叉菜胶模型中,ET 的镇痛作用在性别上无差异。

10. 编辑炭疽毒素将分子物质运送到 DRG 神经元使用 LF_N -DTA 试剂,利用其白喉毒素 A 链 (DTA) 抑制哺乳动物细胞中的蛋白质翻译,PA + LF_N -DTA 的 EC_{50} 在皮摩尔级可阻断培养的 DRG 细胞的翻译,并使细胞死亡,单独使用 LF_N -DTA 无以上作用,表明 LF_N -DTA 需通过 PA 才能特异性进入细胞;进一步编辑把 LF_N 连接到 EF 的 C 端催化结构域 (EF_C),形成嵌合体 LF_N - EF_C ,PA + LF_N - EF_C 在 DRG 细胞中使 cAMP 水平剧烈升高。

11. 炭疽毒素运送 BoNT/A LC 可阻断疼痛

体内实验研究 PA + LF_N 系统运送肉毒神经毒素 LC 是否缓解疼痛时,发现 SNI 小鼠每天 3 次鞘内注射 PA + LF_N -LC/A^{C699S},可显著缓解疼痛,而不影响体重和运动功能;利用离体小鼠膈神经半横膈 (mPNHD) 实验进一步研究 PA + LF_N -LC/A^{C699S} 对运动神经元的潜在脱靶效应,结果发现相对于 BoNT/A 呈浓度依赖性降低肌肉收缩力,单独给予同等浓度的 PA + LF_N -LC/A^{C699S} 和 LF_N -LC/A^{C699S} 则不影响肌肉收缩力。以上结果表明应用 PA + LF_N 炭疽毒素系统在体内能特异性靶向感觉功能和痛觉。

综上所述,该研究证明 ANTXR2 是一个富含于伤害性感觉神经元中的 ET 受体,与 ET 结合可调控神经信号传导和疼痛。ET 诱导 DRG 神经元中的 Camp/PKA 信号,阻断小鼠的神经传导并发挥镇痛作用,并优先作用于小直径伤害性感觉神经元;除天然炭疽毒素外,PA + LF_N 系统还将三种不同的酶体运送到 DRG 神经元,体现了此输送平台的灵活性和可调节性。

(Yang NJ, Isensee J, Neel DV, *et al.* Anthrax toxins regulate pain signaling and can deliver molecular cargoes into ANTXR2⁺ DRG sensory neurons. Nat Neurosci, 2022, 25(2):168-179. 汕头大学医学院,陈浩浩 译,刘兴君 校)