



• 学术动态 •

脊髓小胶质细胞中释放 ATP 的 SWELL1 通道参与神经病理性疼痛

摘 要 外周神经损伤后, 细胞外三磷酸腺苷 (ATP) 介导的嘌呤能信号对脊髓小胶质细胞激活和神经病理性疼痛至关重要。然而, ATP 释放的机制仍然知之甚少。该研究发现体积调控阴离子通道 (volume-regulated anion channel, VRAC) 是一个 ATP 释放通道, 在小胶质细胞中被炎症介质鞘氨醇-1-磷酸 (sphingosine-1-phosphate, S1P) 激活。SWELL1 (也称为 *Lrrc8a*) 是 VRAC 必需的亚基, 小鼠小胶质细胞特异性敲除 *Swell1* 减少了由周围神经损伤引起的脊髓细胞外 ATP 增加。而且, 基因敲除小鼠还表现出脊髓小胶质细胞活化减少、背角神经元过度兴奋下降、诱发的和自发的神经病理性疼痛样行为下降。该研究通过高通量筛选确定了一个 FDA 批准的药物——双香豆素作为一种新型有效的 VRAC 抑制剂。鞘内给予双香豆素减轻了小鼠神经损伤引起的机械性触诱发痛。该研究证明脊髓中小胶质细胞释放 ATP 的 VRAC 是神经病理性疼痛的关键因素, 也是治疗这种疾病的潜在靶点。

一、研究背景

神经病理性疼痛是一种常见的、使人衰弱的慢性疼痛综合征, 脊髓小胶质细胞在神经病理性疼痛的发病机制中起着至关重要的作用。在周围神经损伤后, 脊髓小胶质细胞被激活, 并发生形态改变、增殖、信号分子 (包括多种嘌呤能受体如 P2X4R、P2X7R 和 P2Y12R) 上调。嘌呤能系统是调节小胶质细胞激活最重要的信号通路之一。当嘌呤能受体受到刺激时, 小胶质细胞释放的神经调质将导致突触传递和脊髓背角神经元活动的异常。这些病理改变会加剧脊髓伤害性信息传递, 并可能将非伤害性刺激转化为疼痛信号。阻断脊髓嘌呤能受体可逆转疼痛超敏反应, 表明神经病理性疼痛需要细胞 ATP 触发的嘌呤能信号。然而, 周围神经损伤后脊髓内 ATP 释放增加的机制尚不清楚。

体积调控阴离子通道 (volume-regulated anion channel, VRAC) 由渗透性细胞肿胀所激活, 介导氯离子和各种有机渗透物从细胞中释放, 从而利于水通过渗透外排, 导致调控性细胞体积下降。在肿胀细胞中检测到依赖 VRAC 的 ATP。然而, ATP 是通过 VRAC 本身直接释放还是通过间接机制释放尚不清楚。既往研究发现鞘内注射卡贝诺洛酮 (一种连接蛋白/泛连接蛋白半通道和 VRAC 的非特异性阻断剂) 可抑制啮齿动物的神经病理性疼痛, 提示 VRAC 可能参与神经病理性疼痛过程, 本研究对此进行了探讨。

二、主要研究结果

1. SWELL1 依赖性 VRAC 是一种 ATP 释放通道

为了确定 ATP 是否直接通过 VRAC 通道渗透, 该研究首先在表达 VRAC 的 HeLa 细胞中进行了实验, 用等摩尔 ATP 代替细胞内的 Cl^- 作为唯一的渗透阴离子和灌注低渗溶液来激活 VRAC 电流。全细胞膜片钳记录到大量的向内电流, 而在敲除 *Swell1* 的细胞中由 ATP 外排介导的内向电流被消除, 证明 SWELL1 通道对于 VRAC 的 ATP 通透是必要的, 逆转电位的变化同样表明 VRAC 通道对 ATP 具有高通透性。荧光素-荧光素酶实验也检测到低渗溶液处理后 HeLa 细胞外大量释放的 ATP。根据电生理数据和既往敲低实验的结果, 细胞肿胀可诱导野生型 (WT) 细胞中 ATP 外排明显增加, 而在 *Swell1* 敲除 (KO) 细胞中则无作用, 并且这种 ATP 释放可以被已知的 VRAC 阻滞剂 oxobutyric acid (DCPIB) 以剂量依赖的方式所抑制。

为了进一步测试 VRAC 介导的 ATP 释放是否可以被周围细胞检测到, 该研究使用 sniffer patch 方法作为细胞外 ATP 的灵敏功能性生物测定法。以 HeLa 细胞为源细胞, 转染 P2X2R-黄色荧光蛋白 (yellow fluorescent protein, YFP) 的人胚胎肾 (human embryonic kidney, HEK) 293T 细胞为邻近的传感器细胞进行双全细胞膜片钳记录。结果显示高渗溶液激活了 WT 源细胞中的 VRAC 和传感器细胞中的 P2X2R, 并在邻近的传感器细胞中检测到依赖 VRAC



的 ATP 外排 (约占 P2X2R 完全激活的 5%)。在 *Swell1* KO 源细胞中, VRAC 电流被消除且 KO 细胞中也无 ATP 释放, 证明依赖 SWELL1 的 VRAC 通道传导和释放 ATP。

2. SWELL1 通道对小胶质细胞中 VRAC 活性和 ATP 释放至关重要

接下来该作者研究了小胶质细胞中 VRAC 活性是否需要 SWELL1。通过 Western blot 观察到 SWELL1 蛋白在小鼠 BV2 小胶质细胞中高表达。低渗溶液可引起小胶质细胞产生明显的 Cl^- 电流且具有 VRAC 特征, 即外向整流和 DCPIB 敏感性。除了细胞肿胀, VRAC 还可以被其他生理相关的刺激激活, 包括鞘氨醇-1-磷酸 (sphingosine-1-phosphate, S1P), 一种与神经病理性疼痛有关的炎症介质。S1P 在正常等渗缓冲液中诱导小胶质细胞产生 DCPIB 敏感、外向整流的 VRAC 电流, 该作用依赖于 S1P 受体和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生, 且 S1P 诱导小胶质细胞释放大量 ATP。为了检测 S1P 诱导的 ATP 释放是否依赖于 VRAC, 使用 CRISPR-Cas9 技术敲除 BV2 小胶质细胞中的 *Swell1*。S1P 处理后, VRAC 电流和 ATP 外排均被阻断, 说明 SWELL1 是 BV2 小胶质细胞中 VRAC 的重要亚基, 可能在炎症过程中介导 ATP 释放。

既往的研究显示, 周围神经损伤后, 脊髓细胞外 ATP 水平升高。为了研究这一现象是否由小胶质细胞 VRAC 通道介导, 该研究使用 *Cx3cr1-Cre* 小鼠和 *Swell1^{FF}* 小鼠杂交, 获得了小胶质细胞特异性 *Swell1* 敲除小鼠 (conditional knockout, cKO)。利用坐骨神经慢性压迫性损伤 (chronic constriction injury of the sciatic nerve, CCI) 模型, 发现 CCI 组中 *Swell1^{FF}* 对照组小鼠的腰段脊髓切片细胞外 ATP 的浓度显著高于假手术组, 并且 *Swell1* cKO 小鼠 CCI 后细胞外 ATP 的增加被抑制, 表明小胶质细胞 SWELL1 通道参与 CCI 后 ATP 释放增加过程。*Swell1* cKO 小鼠细胞外 ATP 水平的降低可能是由于直接通过小胶质细胞 *Swell1* 通道释放的 ATP 减少, 或小胶质细胞的激活被间接减少, 或者很可能是两者兼而有之。

3. CCI 诱导的神经病理性疼痛样行为在小胶质细胞特异性 *Swell1* cKO 小鼠中减少

接下来检测了小胶质细胞 SWELL1 的表达是否受周围神经损伤的调节。RNAscope 原位杂交显示小胶质细胞 *Swell1* 的表达在神经损伤的反应中有所增加。而且, 小胶质细胞 *Swell1* 的缺失不影响基础痛阈, 但 CCI 诱导的机械性触诱发痛和热痛觉过敏消失。此外, CCI 诱导的步态异常在小胶质细胞

缺失 *Swell1* 的情况下也有降低。以上结果证明小胶质细胞中的 SWELL1 通道在神经病理性疼痛样行为的发病机制中起关键作用。

小胶质细胞的性别二态性及其在神经病理性疼痛中的作用已经得到证实。为了检测特异性 *Swell1* cKO 的小胶质细胞是否也存在这种性别差异, 该研究在周围神经损伤后的雌性小鼠中也进行了一系列相同的行为测试。结果显示小胶质细胞 SWELL1 在调节疼痛样行为方面具有性别二态性, 在雄性小鼠中比在雌性小鼠中发挥更突出的作用。这种性别差异与最近一些关于小胶质细胞在雄性小鼠而非雌性小鼠疼痛中的独特重要作用的文献一致, 其潜在的机制值得进一步研究。

4. CCI 诱导的脊髓小胶质细胞增生和背角神经元过度兴奋在小胶质细胞特异性 *Swell1* cKO 小鼠中减少

脊髓小胶质细胞在周围神经损伤的反应中会发生显著的增殖和形态变化, 这种变化对神经病理性疼痛的发展至关重要。*Iba1* 免疫染色观察到, 生理条件下 *Swell1* 的缺失不会导致小胶质细胞异常激活, 但 CCI 引起的脊髓小胶质细胞的活化降低, 说明 SWELL1 对于 CCI 诱导的小胶质细胞改变是必需的。已知活化的脊髓小胶质细胞分泌各种信号分子, 包括白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β), 可诱导背角神经元兴奋性增加和神经病理性疼痛。与小胶质细胞活化降低一致, CCI 后 *Swell1* cKO 小鼠脊髓 IL-1 β 浓度与 WT 相比显著降低, 提示 SWELL1 是周围神经损伤后脊髓小胶质细胞激活和促炎变化的重要调节因子。

VRAC 介导的 Cl^- 外排已被认为是炎症小体 NLRP3 (NOD, LRR 和含 pyrin 结构域蛋白 3) 激活的重要步骤, 并促进巨噬细胞分泌 IL-1 β 。该研究通过全细胞膜片钳记录 *Swell1* cKO 小鼠的骨髓源性巨噬细胞 (BMDMs) VRAC 电流, 发现 SWELL1 对于 NLRP3 的激活是非必需的, 并且 VRAC 可能通过间接机制调节脊髓中的 IL-1 β 水平, 包括小胶质细胞的激活。

SWELL1 对小胶质细胞-神经元相互作用在调节神经病理性疼痛又有何作用? 该研究通过免疫荧光染色发现, CCI 后小鼠脊髓背角内的 c-Fos⁺ 神经元数量增加, 部分原因可能是周围神经损伤后自发性神经元活动和神经元激活增加; 相比之下, *Swell1* cKO 小鼠 CCI 后脊髓背角 c-Fos⁺ 神经元的数量明显减少。II 层背角神经元在处理伤害性信息中至关重要, 既往的研究表明, 周围神经损伤增加



II 层背角神经元突触传递和兴奋性。该研究使用全细胞膜片钳记录 II 层背角神经元的自发性兴奋性突触后电流 (sEPSCs) 的振幅和频率, 发现小胶质细胞 *Swell1* 敲除小鼠, CCI 诱导兴奋性突触传递增强受到抑制。这些结果说明小胶质细胞 SWELL1 通道参与 CCI 引起的背角神经元兴奋性增强和兴奋性突触传递增强。

5. FDA 批准的药物文库筛选并确定双香豆素是一种有效的 VRAC 抑制剂

为了进一步支持遗传学研究结果, 该研究通过药理抑制剂研究 VRAC 在神经病理性疼痛中的功能作用。目前可用的 VRAC 小分子阻滞剂往往缺乏有效性和特异性。该研究通过高通量 YFP 猝灭实验和电生理筛选并鉴定出两种新的 VRAC 阻滞剂: 双香豆素 (dicumarol), 一种维生素 K 环氧化还原酶的竞争性抑制剂; 安可米 (zafirlukast), 一种半胱氨酸白三烯受体 1 拮抗剂。它们可剂量依赖性快速完全抑制低渗透压诱导的 VRAC 电流产生。与安可米相比, 双香豆素的效力略强, 且最大血清浓度 (C_{max}) 远远超过它的 IC_{50} , 而安可米的 C_{max} 为亚微摩尔浓度, 远低于 IC_{50} 值。因此, 对双香豆素做了进一步研究。双香豆素对 HEK293T 细胞中 VRAC 通道和 Ca^{2+} 激活的 Cl^- 通道 (CaCC/TMEM16A) 无显著的抑制作用, 但可以剂量依赖性阻断低渗透压诱导的 ATP 释放并抑制 VRAC 电流, 表明双香豆素是一种强选择性的 VRAC 抑制剂。

6. 双香豆素阻断 VRAC 通道可减轻 CCI 引起的机械超敏反应

双香豆素在小胶质细胞中以剂量依赖的方式抑制了低渗透压诱导的 VRAC 电流, 其 IC_{50} ($4.1 \mu M$) 与 HEK293T 细胞相似, 可有效阻断 SIP 诱导的 VRAC 电流和小胶质细胞中 ATP 的释放。双香豆素显著抑制了 CCI 诱导的脊髓背角 II 层神经元 sEPSC 的幅度和频率增加。在雄性小鼠鞘内注射双香豆素短暂缓解了 CCI 诱导的机械性触诱发痛, 表明其潜在的临床应用价值。

三、讨论

尽管各种细胞类型的渗透性肿胀导致依赖 VRAC 的细胞外 ATP 浓度增加, 但缺乏 VRAC 是 ATP 渗透通道的直接证据, 并且 VRAC 介导的 ATP 释放在生理和疾病状况中的功能意义尚不清楚。该研究提供了 SWELL1 介导 VRAC 直接传导和释放 ATP 的电生理学证据。功能上, 小胶质细胞 SWELL1 通道参与神经损伤诱导的脊髓细胞外 ATP 含量的增加, 激活脊髓小胶质细胞, 并诱发背角神

经元过度兴奋和神经病理性疼痛样行为。由 FDA 批准的药物——双香豆素可作为新型有效的 VRAC 抑制剂, 通过鞘内给药可减轻 CCI 后小鼠机械性触诱发痛, 为用双香豆素治疗神经病理性疼痛提供了可靠的理论依据。

除了脊髓中的小胶质细胞, 该研究中使用的 *Cx3cr1-Cre* 品系小鼠也会使脑中的小胶质细胞和外周巨噬细胞中 Cre 依赖的基因缺失, 这两种细胞也与神经病理性疼痛有关。虽然不能排除这些细胞中 VRAC 缺失对 *Swell1* cKO 表型的可能贡献, 但该研究的药理学数据证明, 双香豆素处理脊髓薄片后抑制了 CCI 诱导的脊髓背角神经元突触传递增强, 鞘内给予双香豆素缓解了 CCI 诱导的机械超敏反应, 表明脊髓小胶质细胞中的 SWELL1 通道对神经病理性疼痛的发病机制至关重要。

脊髓小胶质细胞中的 VRAC 如何调节神经病理性疼痛呢? 由于小胶质细胞对周围神经损伤反应迅速, 推测小胶质细胞中的 SWELL1 通道被包括 SIP 在内的各种炎症信号选择性激活, SWELL1 介导的 ATP 释放进一步激活小胶质和神经元的 P2X 和 P2Y 受体。这种自分泌-旁分泌嘌呤能信号驱动小胶质细胞激活, 引起神经活性因子 (如 IL-1 β) 的分泌和背角神经元的异常活动。未来的研究应使用基因表达谱和活细胞成像来揭示 SWELL1 通道介导的小胶质细胞激活的详细机制。值得注意的是, 最近的一项研究使用了类似的 cKO 小鼠模型, 报道了缺血性脑卒中损伤后, *Swell1* 的丢失并不影响中枢小胶质细胞的形态学变化。有研究表明 SWELL1 对于脑局灶性激光损伤后的小胶质细胞迁移和趋化过程是非必要的。因此, SWELL1 对小胶质细胞激活的调节可能取决于损伤类型、位置和特定的病理生理背景。

鉴于嘌呤能信号在疼痛中的重要性, 其他几种 ATP 释放机制也可能与神经病理性疼痛有关。遗传学和药理学研究均表明, 另外两个大孔通道连接蛋白-43 (connexin-43) 和泛连接蛋白-1 (pannexin-1) 促进神经病理性疼痛产生, 尽管尚不确定它们是否调节脊髓细胞外 ATP 浓度。脊髓背角神经元中胞外分泌的含有 ATP 的囊泡对神经损伤后细胞外 ATP 含量增加和疼痛超敏反应至关重要, 这种机制似乎不涉及小胶质细胞的激活, 因为缺乏囊泡核苷酸转运蛋白的小鼠表现出与 WT 对照组相似的形态变化和脊髓小胶质细胞的增殖。也有报道称, *Cx3cr1-Cre* 品系小鼠可能使神经元中靶基因缺失, 尽管部分原因可能是由于报告基因泄漏导致的。然而, 该研究并不能排除神经元中的 SWELL1 通道也参与 ATP



释放和疼痛超敏反应的可能性。未来的工作需要揭示不同的 ATP 释放机制和细胞类型如何共同调节脊髓细胞外 ATP 水平,从而诱导神经病理性疼痛。

VRAC 是一种普遍表达的离子通道,其电流也存在于其他胶质细胞,包括星形胶质细胞。然而,单独敲除小胶质细胞中的 *Swell1* 和消除 VRAC 活性可显著减少 CCI 诱导的雄性小鼠神经病理性疼痛样行为,这突出了小胶质细胞和神经元-小胶质细胞相互作用在神经病理性疼痛中的重要性。值得注意的是,中枢星形胶质细胞中的 SWELL1 通道介导谷氨酸释放,通过兴奋毒性加重缺血性脑损伤。因此,双香豆素治疗对机械痛敏反应的缓解可能不是通过单独抑制小胶质细胞 VRAC 和嘌呤能信号来发挥作用的。未来的研究还应包括选择性地敲除脊髓星形胶质细胞中的 *Swell1*,来揭示神经元-星形胶质细胞相互作用和谷氨酸在神经病理性疼痛的发生和维持中的作用。

目前可用的大多数 VRAC 抑制剂效力低,选择性差。虽然 DCPIB 是一种相对有效且广泛使用的

VRAC 抑制剂,但它对细胞具有非特异性和毒性,可抑制或激活六种其他离子通道和转运体。该研究发现双香豆素和安可米是有效的选择性的 VRAC 阻滞剂,为探索 SWELL1 通道的功能及评估其治疗潜力提供了急需的药理学工具。双香豆素可达到的血浆水平显著高于其抑制 VRAC 活性的 IC_{50} 值,这为将双香豆素用作治疗神经病理性疼痛的新方法创造了广阔的治疗窗口。该研究表明,鞘内给药双香豆素可缓解 CCI 引起的机械性触诱发痛。未来的工作将使用不同的药物治疗方案、检测更多指标(如自发性和持续性疼痛)和更多的疼痛模型,进一步确定药物的镇痛情况。这将为更好地靶向 *Swell1* 治疗神经病理性疼痛和其他与 VRAC 活动异常相关的疾病(如缺血性中风)提供可靠的实验依据。

(Chu J, Yang J, Zhou Y, *et al.* ATP-releasing SWELL1 channel in spinal microglia contributes to neuropathic pain. *Science Advances*, 2023, 9(13):eade9931. 南通大学特种医学研究院/疼痛医学研究院,杨亚如译,高永静校)

• 消 息 •

2023 年《中国疼痛医学杂志》征稿与征订

《中国疼痛医学杂志》是由中华人民共和国教育部主管,北京大学和中华医学会疼痛学分会共同主办的专业性学术期刊。报道有关疼痛基础研究和临床诊疗的综合性学术刊物。现已被中文核心期刊(北京大学图书馆)、中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊、世界期刊影响力指数(WJCI)报告(2022 科技版)等国内权威的文献检索系统收录。《中国疼痛医学杂志》诚邀您投稿、订阅。

投稿: 来稿可在杂志官网在线投稿 <http://casp.ijournals.cn>, 请署真实姓名、工作单位、职称,附单位介绍信(信中须注明未“一稿两投”、署名无争议、对文章内容的真实性负责、无泄密内容)。投稿时请注明通信作者、提供伦理审查批号及证明、基金资助信息,以及详细的通信地址、邮编、联系电话、E-mail 等。衷心希望《中国疼痛医学杂志》成为您了解疼痛医学发展和发表科研成果的平台之一。

订购: 邮发代号: 82-832, 本刊为月刊, 大 16 开本, 80 页, 每册定价 32.00 元, 全年 12 期, 共 384.00 元。欢迎在当地邮局订阅或直接联系编辑部订阅。

编辑部地址: 北京市海淀区学院路 38 号, 北京大学医学部《中国疼痛医学杂志》编辑部

杂志官网: <http://casp.ijournals.cn>

联系电话: 010-82801712; 010-82801705

电子邮箱: pain1712@126.com

联系人: 赵 磊

