



• 学术动态 •

高特异性 σ_2 R/TMEM97 配体 FEM-1689 可减轻神经病理性疼痛并抑制整合应激反应

摘要 在药理学界, σ_2 受体 (σ_2 R) 早在 30 多年前就被描述过, 但其分子特征仍模糊不清, 直到最近才被确认为跨膜蛋白 97 (TMEM97)。经研究证明 σ_2 R/TMEM97 配体可减轻小鼠神经病理性疼痛模型的机械超敏反应, 其最大抗痛作用的时间为给药后 24 h。该研究试图通过解决 2 个关键问题来了解其抗神经病理性疼痛效应: σ_2 R/TMEM97 化合物是否通过受体选择性地发挥作用, 以及它们对痛觉神经元的下游机制是什么? 该研究使用了一种 *Tmem97* 全身基因敲除小鼠, 发现 σ_2 R/TMEM97 结合化合物 FEM-1689, 需要该基因才能在小鼠神经损伤模型中产生抗痛作用。利用小鼠背根神经节原代神经元证明, FEM-1689 能抑制整合应激反应 (ISR), 并通过 σ_2 R/TMEM97 特异性作用促进神经元生长。随后, 该研究扩展了其临床转化价值, 证明 FEM-1689 可降低人类感觉神经元中的整合应激反应 (ISR) 和 p-eIF2 α 水平, 并可减轻甲基乙二醛对 ISR 的致病作用。同时, 研究还证明了 σ_2 R/TMEM97 在人类痛觉感受器和卫星胶质细胞中均有表达。这些结果证实了 σ_2 R/TMEM97 有望成为治疗神经病理性疼痛的靶点。

1. 重要意义

该研究表明, 用一种调节剂靶向 σ_2 R/TMEM97, 可以在小鼠模型中降低疼痛超敏性, 且具有精确的选择性。研究还发现整合应激反应 (ISR) 的抑制是一种潜在的作用机制, 它将受体与细胞信号事件联系在一起, 在临床前和临床上验证了这种机制对缓解疼痛的作用。该研究表明, σ_2 R/TMEM97 可以被特定的小分子选择性地结合, 从而在对神经病理性疼痛至关重要的细胞亚群中产生 ISR 抑制作用。因此, σ_2 R/TMEM97 靶向疗法有可能在非阿片受体的情况下有效地缓解疼痛。

2. 背景

神经病理性疼痛是由躯体感觉神经系统的损伤或疾病引起的, 影响的人数约占总人口的 10%, 是造成严重慢性疼痛的主要原因。神经病理性疼痛的治疗是一项重大的临床挑战, 因为现有药物不仅疗效有限, 而且还会产生严重的不良反应。目前急需能通过非阿片类药物和非成瘾机制缓解神经病理性疼痛并改善不良反应的新型药物。

2017 年, σ_2 受体 (σ_2 R) 被确认为跨膜蛋白 97 (TMEM97)。该研究发现, 几种选择性与 σ_2 R/TMEM97 结合的小分子能在小鼠体内产生强烈而持久的抗神经损伤引起的神经病理性疼痛效应, 这一发现被结构不同的分子独立复制。尽管 σ_2 R/TMEM97 的

生物功能尚不十分清楚, 但它是一种与内质网相关的跨膜蛋白, 在钙信号转导和胆固醇转运及稳态中发挥作用。20(S)-羟基胆固醇最近被确定为 σ_2 R/TMEM97 的内源配体。 σ_2 R/TMEM97 的作用主要集中于癌症, 但它也与包括阿尔茨海默病和帕金森病在内的神经退行性疾病有关。在许多神经退行性疾病模型中, 包括创伤性脑损伤、亨廷顿病和视网膜神经节细胞变性, 药物作用于 σ_2 R/TMEM97 靶点具有神经保护作用。

调节 σ_2 R/TMEM97 缓解神经病理性疼痛的机制尚不清楚。鉴于 σ_2 R/TMEM97 位于内质网, 该研究验证假设 σ_2 R/TMEM97 靶向是否可通过干扰包括内质网应激反应在内的 ISR 来缓解疼痛。ISR 是对细胞应激源的一种适应性反应, 如错误折叠蛋白的堆积、脂质和氧化应激、氨基酸和血红蛋白匮乏以及病毒感染。与 ISR 相关的一个典型信号事件是真核生物启动因子 2 α (eIF2 α) 在细胞应激反应中被磷酸化, 这种磷酸化由 4 种激酶传递: 蛋白激酶 R (PKR)、蛋白激酶 R 样内质网激酶、血红蛋白调节抑制因子 (HRI) 和蛋白 GCN2。eIF2 α 的磷酸化会抑制全局蛋白质合成, 并促进 mRNA 的翻译, 例如活化转录因子 4 (ATF4)。该研究表明, ISR 的诱导与创伤性神经损伤、代谢紊乱和自身免疫性疾病引起的神经病理性疼痛有关。



另一个关键问题是, σ_2 R/TMEM97 配体的抗神经病理性疼痛作用是否特异归因于它们与 σ_2 R/TMEM97 的结合, 因为这类化合物在 σ_1 受体上也能产生巨大活性, 并且该受体在动物模型中对抗疼痛具有促进作用。该研究使用 *Tmem97* 基因敲除 (KO) 小鼠和一种对 σ_2 R/TMEM97 有更好选择性的小分子 FEM-1689 来检验 σ_2 R/TMEM97 与小鼠神经病理性疼痛模型中的抗痛觉有因果关系这一假设。事实上, FEM-1689 在 SNI 模型中的抗疼痛作用在 TMEM97 敲除小鼠中完全消失。该研究还表明, FEM-1689 在小鼠和人类背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 神经元中以 σ_2 R/TMEM97 依赖性方式抑制 ISR。该研究提供了以 σ_2 R/TMEM97 为靶点作为基础治疗神经病理性疼痛方法的有力机制论证。

3. 结果

(1) TMEM97 mRNA 在人和小鼠 DRG 中表达: 为了评估 σ_2 R/TMEM97 是否在人类痛觉感受器中表达, 该研究使用从器官捐献者那里获得的人类 DRG 进行 RNAscope 原位杂交。发现 *TMEM97* 在人类所有类型的感觉神经元中均有表达, 包括 *SCN10A* (Nav.8) 阳性的痛觉感受器。约 70% 的人 DRG 神经元表达 *SCN10A* 转录物, 这与之前的观察结果一致, 所有接受评估的神经元均表达 *TMEM97* mRNA。表达 TMEM97 的神经元细胞大小分布矩阵 (平均 = 74 μ m) 显示, *TMEM97* mRNA 并不局限于一个亚群。进一步研究发现, *FABP7* 的阳性卫星胶质细胞也表达 *TMEM97*。利用既往发表的人类 DRG 空间 RNA 测序数据集鉴定并量化了人类 DRG 中表达 TMEM97 的神经元亚群。该研究验证了他们的发现, 即 *TMEM97* 在人 DRG 的所有神经元亚型中均有表达, 尤其是在脑啡肽原 (PENK) 阳性痛觉感受器和 A6 LTMRs 中表达量更高。小鼠 DRG 神经元和卫星胶质细胞表达 *Tmem97* mRNA, 其表达模式与人 DRG 几乎相同。此外, 之前发表的小鼠单细胞 RNA 测序数据显示, *Tmem97* 在所有 DRG 神经元亚型中均有表达, 尤其是在非肽能神经元、施万细胞和卫星胶质细胞中的表达量更高。最近开发的啮齿动物、非人灵长类动物和人类 DRG 的统一数据集显示, *TMEM97* 在所有感觉神经元类型中均有表达。

(2) 鉴定 FEM-1689 为强效 σ_2 R/TMEM97 结合配体: 甲苯并唑类药物和去苯唑类药物代表了生物活性配体的两种不同化学类型, 包括 UKH-1114、JVW-1034、SAS-0132 和 DKR-1677, 它们都能选择性地结合 σ_2 R/TMEM97。第一组包括 UKH-1114,

它能缓解小鼠神经病理性疼痛模型中的机械超敏反应, 并降低亨廷顿病模型中神经元的毒性。基于 UKH-1114 在神经病理性疼痛模型中的积极治疗效果, 该研究对其化学结构进行了修改, 以找到具有更好结合特性和理化性质的亲脂性更低的类似物, 合成了比 UKH-1114 少一个亚甲基的 FEM-1689, 发现它是一种具有高选择性和更好理化性质的化合物。除了 σ_1 R (10 倍) 和去甲肾上腺素转运体 (NET; 24 倍) 外, FEM-1689 对 σ_2 R/TMEM97 的选择性比 40 种中枢神经系统蛋白高 100 倍以上。

(3) FEM-1689 对雄性和雌性小鼠的抗痛觉效应需要完整的 *Tmem97* 基因: 一个尚未解决的重要问题是 σ_2 R/TMEM97 配体是否会特异地降低疼痛超敏性通过作用于 σ_2 R/TMEM97。为了解决这个问题, 该研究使用了一种 TMEM97 全基因敲除小鼠。雄性和雌性 TMEM97 敲除小鼠与野生型小鼠具有相似的爪机械敏感性 (von Frey)、爪热敏感性 (热辐射实验) 和爪冷敏感性 (丙酮) 反应, 这表明 TMEM97 的缺失并没有改变它们的基线感觉。TMEM97 全身敲除小鼠在 SNI 之后是否会发展出增强或减弱的机械性神经病理性疼痛表型, 在神经损伤后第 7、10 和 14 天进行敏反应。在神经损伤后 30 天进行测试时, 小鼠仍对机械过敏。对雌雄野生型和 TMEM97 全身敲除小鼠进行单次静脉注射 FEM-1689 处理, 剂量为 10 mg/kg (该剂量根据既往对结构相似的 σ_2 R/TMEM97 配体 UKH-1114 的研究确定)。连续 7 天每日评估 TMEM97 全身敲除和野生型小鼠诱发的机械阈值, 发现两组的机械敏感性几乎没有变化。在用 20 mg/kg 的高剂量 FEM-1689 对小鼠进行第 2 次治疗之前, 先让小鼠恢复 2 周。研究发现, 这种较高剂量的 FEM-1689 一次给药可有效逆转雄性和雌性野生型小鼠的机械超敏反应, 持续时间约为 4 天。值得注意的是, FEM-1689 未能降低 TMEM97 全身敲除小鼠的机械超敏反应, 这表明 FEM-1689 的作用依赖于 σ_2 R/TMEM97。该研究也对雄性和雌性小鼠的 FEM-1689 作用大小进行了量化测量。

(4) FEM-1689 抑制 ISR 并促进神经元的生长, 依赖于 σ_2 R/TMEM97: 该研究旨在阐明 FEM-1689 通过与 σ_2 R/TMEM97 结合而作用于感觉神经元的机制。既往研究表明, σ_2 R/TMEM97 与胆固醇合成和运输、加工之间存在联系, 而胆固醇合成和运输过程受到 5' 单磷酸腺苷激活的蛋白激酶 (AMPK) 及其底物乙酰辅酶 A 羧化酶的严格调控。该研究用不同浓度 (10、100、1000 nM) FEM-1689 处理培养的小鼠 DRG 神经元, 与目标结合 ($K = 17 + 8$ nM)



一致, 处理时间为 16 h, 结果发现 p-ACC 水平没有变化, 而已知的 AMPK 激活剂 A769662 (100 μ M) 却能提高野生型和 TMEM97 全身敲除神经元的 p-ACC 水平。结果显示, FEM-1689 并不影响 AMPK-p-ACC 通路, 因此一定还存在另外一种抗镇痛通路。

随后, 检验了 FEM-1689 是否会抑制在 DRG 神经元中的 ISR 这一假说。多种证据支持这一假说: ① σ_2 R/TMEM97 和 ISR 转导因子, 如蛋白激酶 R 样内质网激酶 (PERK), 位于内质网膜上; ②最近一份关于 20(S)-羟基胆固醇对 σ_2 R/TMEM97 影响的报告涉及内质网-高尔基体网络; ③ ISR 参与 DRG 神经元的创伤诱导和糖尿病神经病理性疼痛。因此, 培养了野生型和 TMEM97 全身敲除小鼠 DRG 神经元, 用 FEM-1689 处理 16 h, 并用免疫细胞化学 (ICC) 方法测量 p-eIF2 α 水平的变化。ICC 测量显示, TMEM97 全身敲除神经元中 p-eIF2 α 的基础水平远低于野生型神经元。用 ISR 抑制剂 ISRIB (200 nM) 处理野生型神经元后, p-eIF2 α 水平的降低程度与载体和 ISRIB 处理的 TMEM97 全身敲除神经元中 p-eIF2 α 水平的降低程度相同。与药物处理的细胞相比, FEM-1689 降低了野生型小鼠 DRG 神经元的 p-eIF2 α 水平, 但没有降低 TMEM97 全身敲除小鼠 DRG 神经元的 p-eIF2 α 水平。该研究发现 FEM-1689 在 100 nM 时最大程度地抑制了 ISR, 抑制程度与 ISRIB 200 nM 相同。该研究计算出 FEM-1689 在野生型小鼠 DRG 神经元中的 p-eIF2 α IC₅₀ 为 30 nM, 这与 FEM-1689 与 TMEM97 的结合亲和力非常相似。

该研究进一步表征了 FEM-1689 降低 p-eIF2 α 水平的时间动态, 通过在 0.5、1、3、6、12 和 16 h, 用 100 nM FEM-1689 处理野生型小鼠 DRG 神经并量化 p-eIF2 α 的免疫反应, 由此进一步确定了 FEM-1689 降低 p-eIF2 α 水平的时间动态。通过这种方法, 计算出了 FEM-1689 在体外降低 p-eIF2 α 水平的半衰期为 5 h。用 FEM-1689 处理小鼠 DRG 神经元 16 h 后, ISR 的抑制作用达到最大。这一延长的时间与 FEM-1689 延迟和延长的镇痛效应一致。FEM-1689 没有降低野生型或 TMEM97 全身敲除小鼠神经元中 BiP (一种对内质网应激和 ISR 启动很重要的伴侣) 的水平。对培养的小鼠 DRG 神经元进行的 Sholl 分析表明, FEM-1689 能促进野生型神经元的神经元突起, 但不能促进 TMEM97 全身敲除神经元的神经元突起。值得注意的是, 经药物处理的 TMEM97 全身敲除神经元的神经元突起比经药物处理的野生型神经元更明显——这可能是由于 TMEM97 全身敲除细胞的 ISR 减少, 从而促进

了蛋白质的合成。这些数据表明, σ_2 R/TMEM97 是 FEM1689 减少 ISR 和促进神经元生长所必需的。

(5) 去甲苯并吗啡 σ_2 R/TMEM97 配体 SAS-0132 和 DKR-1677 可增强 ISR: 该研究探讨的下一个问题是, 与 σ_2 R/TMEM97 结合的其他化合物是否会抑制 ISR, 以及 ISR 抑制是否是 σ_2 R/TMEM97 调节剂所特有促进抗痛觉的作用。 σ_2 R/TMEM97 调节剂不同的生物学结果可能源于单个配体与蛋白结合位点结合、相互作用方式的差异。同源的哌嗪取代的去甲苯并吗啡 SAS-0132 和 DKR1677 代表了一种在结构上不同于芳基取代的去甲苯并吗啡 FEM-1689 的化学类型。对 SAS-0132 和 FEM-1689 进行计算对接研究, 结果表明这两种调节剂与 σ_2 R/TMEM97 扩展结合位点的相互作用不同。SAS-0132 具有神经保护作用, 但其本身没有抗痛觉作用, 之前的研究表明它能抑制 UKH-1114 的抗痛觉作用, 而 UKH-1114 是 FEM-1689 的同源物。这一观察结果与单个 σ_2 R/TMEM97 调节剂可能发挥不同的、有时是相反的生物效应的假设是一致的。事实上, 在用 10、30、100 和 300 nM 的 SAS-0132 或 DKR1677 处理野生型小鼠 DRG 神经元 16 h 后, 发现这两种化合物都能促进 eIF2 α 的磷酸化, 与 FEM-1689 的抑制作用形成鲜明对比。这些数据表明, σ_2 R/TMEM97 结合化合物的不同化学类型对 ISR 有不同的影响, 可能是通过它们与 σ_2 R/TMEM97 的相互作用方式介导的。

(6) FEM-1689 可抑制 HEK293T 细胞中的 ISR: 人类胚胎肾脏 (HEK) 293 T 细胞表达 σ_2 R/TMEM97 (人类蛋白图谱), 因此该研究者质疑 FEM-1689 是否会抑制该细胞系的 ISR。使用 ICC 和分光光度法发现, 在 FEM1689 处理 2 h 或 16 h 后, p-eIF2 α 免疫活性会出现浓度依赖性降低。测试了 FEM-1689 在从 0.1 nM 至 1000 nM 9 种浓度下的作用, 在 HEK 细胞中测得 FEM-1689 在 2 h 和 16 h 处理条件下的 p-eIF2 α IC₅₀, 分别为 5.9 nM 和 0.7 nM。发现 2 h 的 FEM-1689 培养期产生了一条具有 S 型函数特征的曲线。采用 Western 印迹法检测了 FEM-1689 处理对更多 ISR 相关蛋白的影响。用 FEM-1689 处理 HEK293T 细胞 16 h 后, 在 BiP 表达保持稳定的情况下, eIF2 α 、eIF2A 和 p-PERK 的磷酸化呈浓度依赖性减少。表明 FEM-1689 影响了 HEK293T 细胞中 ISR 的 PERK-eIF2 α 臂, HEK293T 细胞可作为用于开发针对 σ_2 R/TMEM97 的疼痛治疗药物筛选平台。

(7) FEM-1689 逆转甲基乙二醛诱导的机械超敏反应: 甲基乙二醛 (MGO) 是糖酵解的代谢副产



物,与糖尿病神经病理性疼痛和其他疼痛性神经退行性疾病有关。该研究试图确定 FEM1689 降低 p-eIF2 α 水平的作用是否能减轻 MGO 引起的 ISR 依赖性机械超敏反应。给野生型小鼠足底注射 1 次 MGO (20 ng),使其产生持续 6 天的机械超敏反应。一组小鼠在注射 MGO 24 h 后接受 FEM-1689 (20 mg/kg,静脉注射)或 ISRIB (2.5 mg/kg,腹腔注射)治疗。在实验的剩余时间内,FEM-1689 完全逆转了 MGO 诱导的机械过敏性,而 ISRIB 的作用则是短暂的。数据显示 FEM-1689 可完全逆转 MGO 引起的 ISR 依赖性痛觉过敏。这证明了开发用于糖尿病神经病理性疼痛的 σ_2 R/TMEM97 调节剂的实用性。

(8) FEM-1689 在人类感觉神经元中降低 p-eIF2 α 并逆转 MGO 诱导的 ISR 活性:为了将对啮齿类动物 DRG 的研究结果推广到人类,该研究用 FEM-1689 对器官捐献者培养的人 DRG 神经元进行了 16 h 的处理。与小鼠的数据一致,发现 FEM-1689 在浓度为 10 nM 和 100 nM 时能显著降低人类神经元中 p-eIF2 α 的水平。然后评估了 FEM-1689 是否能逆转人 DRG 神经元中病理 ISR 的激活。为了在体外诱导 ISR,用 1 μ M 的 MGO 处理人神经元,这一浓度存在于糖尿病神经病理性疼痛病人的血浆中。MGO 处理会增加人 DRG 神经元中 p-eIF2 α 的水平,而 FEM-1689 (100 nM) 的协同处理会阻止这种增加。这些发现表明与造成神经病理性疼痛刺激有关的 ISR 激活可以被 σ_2 R/TMEM97 调节剂阻断。

4. 讨论

该研究表明, σ_2 R/TMEM97 配体对小鼠的抗痛觉作用需要 σ_2 R/TMEM97 的直接调节,而不是 σ_1 R 或任何其他蛋白或受体。调节 σ_2 R/TMEM97 可抑制小鼠和人类 DRG 神经元的 ISR。由于 ISR 的减少与疼痛缓解有关,FEM-1689 以及 σ_2 R/TMEM97 抗痛觉作用的细胞机理可能与 ISR 的减少有关。最后,发现人类痛觉感受器表达 TMEM97 基因,而在培养的人 DRG 神经元中,FEM-1689 可减少 eIF2 α 磷酸化,而且使用 FEM-1689 可预先抑制人神经元中 MGO 诱导 ISR。这些结果表明,在疼痛病人中靶向 σ_2 R/TMEM97 可以通过抑制 ISR 来降低机械超敏反应,在小鼠中也观察到了类似的机制。这些发现可将 σ_2 R/TMEM97 作为开发有效治疗神经病理性疼痛的真正靶点。

σ_2 R/TMEM97 调节剂在小鼠神经病理性疼痛模型中的作用时间过程不同于其他许多起效迅速

的抗痛觉化合物。在本研究之前,有两个不同的研究小组使用不同类别的 σ_2 R/TMEM97 配体在小鼠 SNI 模型中独立观察到了这种缓慢起效的抗痛觉效应。该研究证明了这种效应是由 σ_2 R/TMEM97 特异介导的,因为雄性和雌性 TMEM97 全身敲除小鼠完全丧失了抗痛觉活性。这些观察结果表明, σ_2 R/TMEM97 的信号传递动力学可能是延迟反应的主要根本原因。ISR 通过影响激活转录因子 4 (ATF4) 和 C/EBP 同源蛋白 (CHOP) 等关键损伤诱导转录因子的翻译来控制基因表达的持久变化。ISR 介导的变化涉及多种转录和翻译后修饰,启动和进展都需要时间。与配体和 σ_2 R/TMEM97 结合的药代动力学相比,FEM-1689 的起效时间要晚一些,可能就是在这个时间过程造成的。 σ_2 R/TMEM97 调节下游的分子信号传导途径还需要进一步研究。

其他有关 ISR 抑制剂的研究与该研究对 FEM-1689 的研究结果之间存在一个重要的差异。该研究注意到 ISR 抑制剂 ISRIB 和 4-PBA 在体内缓解机械过敏反应的疗效持续时间 (小时) 相对短于 FEM-1689 (天)。ISRIB 和 FEM-1689 在药效持续时间上的差异可能是由于它们在 ISR 通路上游的作用机制以及每种化合物的药代动力学上的差异造成的。ISRIB 与 eIF2B 异源结合并促进其催化活性,eIF2B 是鸟嘌呤核苷酸交换因子,是回收非磷酸化 eIF2 复合物所必需的。在 ISR 激活时间长、范围广的情况下,ISRIB 的作用会被削弱。FEM-1689 不可能与 ISRIB 具有相同的 ISR 抑制机制。因此,这些结果表明,FEM-1689 可能提供了一种独特的、比既往观察到的 ISRIB 更长期调节 ISR 的方法。

在研究与 σ_2 R/TMEM97 结合的化合物的过程中,该研究发现了几种在多种动物模型中表现出有益效果的化学类型。其中一组包括了芳基取代的甲烷苯并氮杂环丁烷 (如 UKH-1114 和 W-1034)。UKH-1114 可减轻神经损伤后的机械超敏反应,并可降低亨廷顿病模型中突变亨廷顿蛋白诱导的神经元毒性。甲苯并唑啉 JVW-1034 不仅能减少两种啮齿类动物酒精依赖模型中的戒断行为,还能缓解小鼠因长期接触酒精而导致的疼痛敏感性升高。UKH-1114 的近似物 FEM-1689 也能减轻神经损伤后的机械超敏反应以及对 MGO 治疗的反应。另一类 σ_2 R/TMEM97 调节剂包括哌嗪取代的苯并吗啡类化合物 (如 SAS-0132 和 DKR-1677)。值得注意的是,SAS-0132 还能阻断 UKH-1114 的抗痛觉活性,这表明不同的 σ_2 R/TMEM97 结合化合物可能对痛觉有不同的影响。DKR-1677 是 SAS-0132 的同源物,



在两种不同的创伤性脑损伤模型中具有保护作用。它能减少轴突变性,并在创伤性脑损伤的爆炸损伤模型中提供剂量依赖性的认知能力增强,同时还能在控制性皮层撞击模型中保护少突胶质细胞和皮质神经元。DKR-1677 还能保护视网膜神经节细胞免受缺血/再灌注损伤。该研究证明了 SAS-0132 和 DKR1677 增加小鼠 DRG 神经元中 p-eIF2 α 的表达,而 FEM-1689 则降低了 p-eIF2 α 的表达,表明这些化合物对 ISR 有不同的影响。这些研究结果为开发针对 σ_2 R/TMEM97 有效疼痛治疗药物的药物筛选框架奠定了基础。

要了解 σ_2 R/TMEM97 调节剂如何影响 ISR 还需要进一步研究,文献中已有各种直接和间接影响 ISR 的线索。首先, σ_2 R/TMEM97 定位于内质网膜可能会通过内质网应激将其与 ISR 联系起来,特别是通过影响激酶 PERK 对 eIF2 α 的磷酸化。事实上,在 FEM-1689 处理 HEK 细胞后, P-PERK 在 p-eIF2 α 和 eIF2A 最大程度降低的浓度下减少,这表明 σ_2 R/TMEM97 与 PERK 途径之可能存在联系。其次, σ_2 R/TMEM97 很可能参与了生物活性脂质(如羟基胆固醇)在细胞间的转运,也许是通过像尼曼病 C1 (NPC1) 蛋白那样的转运活性。过多的脂质摄入和增加脂质合成的需求会促进 ER 的脂质应激,已知这种应激会激活 ISR 的 PERK-eIF2 α 分支并损害线粒体功能。最后, σ_2 R/TMEM97 通过影响贮存操作的钙离子进入调节细胞 Ca²⁺ 动态。ER 是细胞中最大的 Ca²⁺ 储存库,对引起 ER 应激和 ISR 诱导的 Ca²⁺ 水平波动非常敏感。目前还不清楚 FEM-1689 的抗痛觉作用是否需要一种或多种与抑制 ISR 有关的机制。然而,这种与 ISR 抑制的联系有助于进一步探索 σ_2 R/TMEM97 调节剂在 DRG 神经元中的下游机制作用。

神经元生长能力可用于评估药物的神经调节、神经保护和神经再生作用。该研究结果表明, FEM-1689 可通过 Sholl 分析测量,以 σ_2 R/TMEM97 依赖性方式促进神经元的生长和复杂性。与未接受任何药物治疗的野生型神经元相比,缺乏 σ_2 R/TMEM97 的神经元也显示出更强的神经元生长能力。这是因为 ISR 水平降低, TMEM97 全身敲除神经元的蛋白质合成在基础水平上未受抑制。轴突生长是一个需要蛋白质合成的过程,因此在这些条件下抑制 ISR 与蛋白质合成的增强效应是一致的。鉴于发现的对轴突生长的影响,评估 σ_2 R/TMEM97 配体是否能在体

内产生这种效应,以及是否能导致神经感受器对皮肤的适当再神经支配,避免与神经病理性疼痛相关的触觉小体的异常靶向,将是非常重要的。

该研究结果解释了有关用小分子调节 σ_2 R/TMEM97 可产生抗痛觉效应的机理起源的解读。但仍有一些问题尚未解决。首先,必须确定 ISR 激活与 FEM-1689 体内抗痛觉作用之间的明确联系。一种方法是评估 *Eif2s1-KO* 小鼠的神经病理性疼痛。这种实验较复杂,因为 *Eif21* 编码的 eIF2 α 缺失或通过点突变完全阻止 eIF2 α 磷酸化是致死的。此外,尚未发现 eIF2 α 的特异性拮抗剂。目前广泛使用的抑制 ISR 化合物有化学物质、ISR 激酶抑制剂和 eIF2B 稳定剂(如 ISRIB),它们非特异性作用于 eIF2 α ,因此不是解决这一问题的最佳工具。其次,目前还不清楚为什么 TMEM97 全身敲除神经元在基线时的 p-eIF2 α 比 WT 神经元少。这就出现了一个悖论: σ_2 R/TMEM97(即 TMEM97 全身敲除)的永久“拮抗”和 FEM-1689 对 σ_2 R/TMEM97 的调节都会导致 p-eIF2 α 水平的降低。此外, σ_2 R/TMEM97 结合化合物的信号作用可能取决于所测量的途径。第三, FEM-1689 可能具有某些多药理作用,因为它能明显结合 σ_1 受体 ($K_i = 167 \pm 54$ nM) 和 NET ($K_i = 405 \pm 227$ nM),尽管其效力分别比 σ_2 R/TMEM97 低 10 倍和 24 倍 ($K_i = 17 \pm 8$ nM)。由于 FEM-1689 对 TMEM97 全身敲除小鼠的抗神经中枢兴奋作用被完全抑制,该研究得出结论, FEM-1689 在体内的作用是由 σ_2 R/TMEM97 而非 σ_1 受体、NET 或其他受体介导的。此外, σ_1 受体拮抗剂和 NET 抑制剂可分别在急性期(数小时)或亚急性期(数天至数周)内减轻痛觉过敏反应,这两者都不符合对 FEM-1689 的观察结果。然而现阶段还不能排除多药理学的可能性。第四,必须确定 FEM-1689 的活性是外周还是中枢部位的作用。虽然他们的药代动力学实验显示该化合物很容易进入大脑,但研究结果也显示 FEM-1689 在体外抑制了小鼠和人类 DRG 的 ISR。未来的实验将使用一种正在开发的痛觉感受器特异性 TMEM97 敲除小鼠来解决这一重要问题。

(Yousuf MS, Sahn JJ, Yang H, *et al.* Highly specific σ_2 R/TMEM97 ligand FEM-1689 alleviates neuropathic pain and inhibits the integrated stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(52):e2306090120. 复旦大学脑科学研究院, 龙沙沙译, 韩清见校)