



• 学术动态 •

脑内不受阿片耐受影响的胆碱能镇痛环路

摘要 慢性疼痛对病人自身和社会都是一种沉重的负担。尽管阿片类药物可以有效地缓解疼痛，但其显著的不良反应限制了临床应用。为寻找新的疼痛调控机制，该研究探讨了腹外侧导水管周围灰质 (ventrolateral periaqueductal gray, vIPAG) 中的胆碱能信号在下行疼痛调控中的作用。慢性疼痛状态下 vIPAG 中乙酰胆碱的释放减少。在阿片耐受的情况下，脑桥脚被盖核至 vIPAG 的胆碱能投射环路的激活仍可通过 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体 (nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs) 来缓解疼痛。激活 $\alpha 7$ nAChRs 或刺激内源性乙酰胆碱释放，能够通过 Ca^{2+} 以及过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α) 依赖的信号抑制 vIPAG 神经元的活动。在体双光子成像显示，慢性疼痛诱发 vIPAG 神经元集群的异常兴奋，且 $\alpha 7$ nAChRs 介导的神经元抑制在阿片耐受状态下仍具有镇痛作用。靶向该胆碱能环路机制缓解疼痛与阿片耐受、奖赏或戒断症状无关，从而凸显了其潜在的临床意义。

尽管吗啡以及芬太尼等阿片类药物能有效缓解慢性疼痛，但在其使用过程中伴随多种不良反应、滥用倾向、镇痛耐受以及戒断症状。药物获取的便利助推了阿片类物质使用障碍 (opioid use disorder, OUD) 以及阿片类药物过量致死事件发生率的升高。这些问题均凸显出探寻新型非阿片类靶点并应用于疼痛管理的迫切需求。

脑内下行痛觉调控通路是一种在进化上较保守的神经环路，该环路基于内部状态与外部刺激进行编码并调控疼痛相关的信号。腹外侧导水管周围灰质 (ventrolateral periaqueductal gray, vIPAG) 是该神经环路的关键调控区域，对该区域进行电学、药理学和化学遗传学调控会产生强效的镇痛作用。vIPAG 也是内啡肽介导镇痛效应的一个关键部位。将阿片类药物直接注入 vIPAG，通过抑制投射到延髓头端腹内侧的 GABA 能输出缓解疼痛。关于是否存在其他非阿片类神经调质通过改变 vIPAG 的活动来缓解疼痛的机制，目前鲜有报道。尽管在体电生理记录已经揭示了 vIPAG 不同神经元集群的反应特征，但不同神经元集群在急慢性疼痛状态下的活动模式尚有待研究。

乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) 是一种重要的神经调质，在多个脑区中影响细胞信号转导以及神经元兴奋性，从而调控行为。尽管乙酰胆碱酯酶抑制剂 (如多奈派齐) 以及烟碱型或毒蕈碱型 ACh 受体 (nAChRs 或 mAChRs) 的激动剂能够缓解疼痛，但内源性 ACh 调控疼痛的精确角色及细胞与环路机制仍不清楚。虽然解剖学研究显示脑内胆碱能投射

终止于 vIPAG 中，但他们的功能尚未明确。因此，理解内源性胆碱能神经环路如何调节 vIPAG 以及下行痛觉调控环路，或许能提供一种新型镇痛策略。

该研究首先通过使用新型 ACh 探针 GRAB_{ACh 3.0} 在各种疼痛状态下分析了 vIPAG 中 ACh 释放的动力学特征。通过解剖学以及光遗传学方法，研究者鉴定了 vIPAG 中 ACh 的来源，并研究了操控 ACh 释放的水平如何影响躯体与情感维度的疼痛。其次，通过对疼痛引起 vIPAG 神经可塑性的电生理学表征，阐明了该胆碱能投射环路产生镇痛效果的膜受体与胞内信号转导机制。该研究使用在体双光子成像，探索了慢性疼痛引起的 vIPAG 神经元的异常动力学特征，以及阿片类药物、阿片耐受和胆碱能调控如何改变这些神经元集群的动力学特征。该研究为阐明新型胆碱能镇痛环路及其受体机制 (尤其是在阿片耐受状态下) 提供了深刻的见解。

首先，该研究使用一种名为 GRAB_{ACh 3.0} 的 ACh 探针，观察到小鼠 vIPAG 在旷场行为过程中自发地释放 ACh，而急性伤害性刺激能短暂抑制 ACh 的释放。完全福氏佐剂 (CFA) 诱导的慢性炎症痛状态下，ACh 的瞬时释放减少。通过注射福尔马林到小鼠后足，证实了 ACh 水平与疼痛之间存在负相关，即较强疼痛行为与 vIPAG 中较低的 ACh 水平 (表现为较低的 GRAB_{ACh 3.0} 荧光强度) 相关，反之亦然。接着，在 ChAT-Cre 小鼠的 vIPAG 中注射逆行传输病毒，该病毒会在表达 Cre 的突触前神经元表达 tdTomato，并在所有逆行标记的神经元中表



达增强的黄色荧光蛋白 (enhanced yellow fluorescent protein, EYFP)。通过全脑成像分析, 在脚桥被盖核 (pedunculopontine tegmental nucleus, PPTg) 和背外侧被盖核 (laterodorsal tegmental nucleus, LDTg) 观察到大量逆行标记的胆碱能神经元。接下来, 在监测 vIPAG 中 ACh 变化的同时使用 ChrimsonR 光遗传激活 PPTg^{ChAT+} 末梢, 观察到 GRAB_{ACh 3.0} 荧光强度的增加, 提示该投射部位有 ACh 的释放。

鉴于 PPTg^{ChAT+} → vIPAG 之间存在密集的连接以及疼痛行为和 vIPAG 中 ACh 释放之间的负相关性, 该研究进一步验证激活该投射后对疼痛的缓解效果。在 ChAT-Cre 小鼠 PPTg^{ChAT+} 神经元中表达 ChR2 或 EYFP, 并在 vIPAG 中放置光纤以激活胆碱能神经末梢。结果显示, 这些胆碱能神经末梢的激活增加了辐射热诱导的小鼠缩足潜伏期, 而且激活 PPTg^{ChAT+} → vIPAG 的投射部分地逆转了 CFA 诱导的小鼠痛觉过敏和触诱发痛。此外, 光遗传学激活 PPTg^{ChAT+} → vIPAG 的投射并不明显改变小鼠的运动功能或焦虑水平。

阿片类药物的重复使用会降低镇痛效果, 从而导致阿片耐受。为探究表达 μ 阿片受体的 vIPAG 神经元 (vIPAG^{Oprm1+}) 在阿片耐受前后对疼痛的响应, 该研究在 Oprm1-Cre 小鼠 vIPAG^{Oprm1+} 神经元中表达基因编码的钙指示剂 GCaMP6 荧光蛋白。通过在体光纤记录发现, vIPAG^{Oprm1+} 神经元在疼痛过程中被激活。此外, CFA 诱导的慢性疼痛增加 vIPAG^{Oprm1+} 神经元的兴奋性, 而腹腔注射吗啡能够抑制 vIPAG^{Oprm1+} 神经元的兴奋性 (表现为平均荧光强度与瞬时振幅的降低)。在对照小鼠中能够抑制 vIPAG^{Oprm1+} 神经元的吗啡剂量, 对阿片耐受小鼠中的 vIPAG^{Oprm1+} 神经元缺乏抑制作用。该研究通过在 vIPAG^{Oprm1+} 神经元中表达抑制视蛋白 halorhodopsin (eNpHR 3.0), 并在 vIPAG 中进行光纤记录, 以探究阿片耐受状态下, 抑制 vIPAG^{Oprm1+} 神经元能否缓解疼痛。结果发现, 在未经阿片处理的小鼠中, 光遗传抑制 vIPAG^{Oprm1+} 神经元增加辐射热缩足潜伏期, 与吗啡的镇痛效果相一致。在阿片耐受小鼠中, 光遗传学抑制 vIPAG^{Oprm1+} 神经元仍然增加缩足潜伏期, 且不受纳洛酮的影响。最后, 研究者检测了激活 PPTg^{ChAT+} → vIPAG 投射能否重现这些现象并缓解阿片耐受小鼠的疼痛。结果显示阿片耐受后, 光遗传激活 PPTg^{ChAT+} → vIPAG 投射神经元延长缩足潜伏期 (疼痛缓解), 且不受纳洛酮的影响, 提示激活这一环路即使在阿片耐受情况下仍保留镇痛效果。

为阐明上述现象的机制, 该研究进一步探究其中涉及的相关受体机制。通过原位荧光杂交技

术, 观察到 *Chrna7* 以及 *Chrm2* 的 mRNA 表达水平较高, 而 *Chrm4* 的 mRNA 表达水平较低。在激活 PPTg^{ChAT+} → vIPAG 投射之前施加受体拮抗剂, 发现系统性给予 $\alpha 7$ nAChR 拮抗剂 (MLA) 阻断了激活该投射产生的镇痛效果。有趣的是, 尽管阿托品与 M2 mAChR 拮抗剂 (AFDX-116) 降低小鼠缩足潜伏期的基础值, 但不影响激活该环路引起的镇痛效果。鉴于受体拮抗剂对神经系统其他区域的非特异性作用, 在 vIPAG 区域局部注射 MLA, 结果发现 MLA 阻断了激活 PPTg^{ChAT+} → vIPAG 投射引起的镇痛作用。为探究 $\alpha 7$ nAChRs 是否也介导 PPTg^{ChAT+} 与 vIPAG 神经元之间的突触传递, 在 PPTg^{ChAT+} 神经末梢表达 ChR2 并对神经支配密集区域的 vIPAG 神经元进行记录。在 71% 记录的神经元中, PPTg^{ChAT+} 末梢的激活诱发快速的内向电流 (即光诱发兴奋性突触后电流 [oEPSCs])。这些 oEPSCs 可被 MLA 阻断并在洗脱后恢复。另外, 这些 oEPSCs 可被 α 银环蛇毒素不可逆转地阻断, 但不受 6-氰基-7-硝基喹啉-2,3-二酮 (CNQX) 的影响。结果表明, 在进化上保守的不同脑结构之间, $\alpha 7$ nAChRs 介导的功能性胆碱能突触传递与下行痛觉调控系统密切相关。

接下来, 该研究进一步探究疼痛引起的 vIPAG^{Chrna7+} 神经元活性的改变。采用光纤记录监测 GCaMP6 和 *Chrna7*-Cre 小鼠品系中表达 $\alpha 7$ nAChR (vIPAG^{Chrna7+}) 的神经元。vIPAG^{Chrna7+} 神经元可被不同的伤害性刺激激活, 包括热水 (55℃)、冷水 (2℃)、von Frey 纤维丝 (1.4 g)、辐射热、伤害性针刺以及丙酮, 并诱发小鼠疼痛行为。CFA 诱导的慢性疼痛增加辐射热诱发的瞬时振幅以及平均荧光强度, 提示 vIPAG^{Chrna7+} 神经元的活性提高 (相较于对照组)。为明确这种神经可塑性的细胞基础, 研究者记录了荧光标记的 vIPAG^{Chrna7+} 神经元。尽管 CFA 组与对照组之间在神经元内在兴奋性与抑制性输入上差别很小, 但在注射 CFA 的小鼠中观察到一种驱动这些 vIPAG^{Chrna7+} 神经元的强效兴奋性突触。为探究抑制 vIPAG^{Chrna7+} 神经元对疼痛的调控作用, 使用光遗传学抑制这些神经元的活性增加小鼠急性热痛敏测试的缩足潜伏期。在 CFA 诱导的慢性疼痛状态下, 抑制 vIPAG^{Chrna7+} 神经元增加辐射热缩足潜伏期和 von Frey 机械缩足阈值。即使在阿片耐受小鼠中, 抑制这类神经元仍具有镇痛作用。

该研究接着探究了光遗传激活这些神经元的内源性胆碱能输入的作用。在 *ChAT-Cre::Chrna7-Cre* 品系小鼠 PPTg^{ChAT+} 神经元中表达 ChrimsonR, 在 vIPAG^{Chrna7+} 神经元中表达 GCaMP6, 并同时进行光遗传学与光



纤记录实验。激活 vIPAG 中的 PPTg^{ChAT+} 末梢增加小鼠缩足潜伏期, 并与 vIPAG^{Chrna7+} 神经元被抑制相关(表现为荧光强度的降低)。在 vIPAG^{Chrna7+} 神经元活动最弱期间观察到小鼠缩足潜伏期的最大增幅。既然刺激胆碱能输入可抑制 vIPAG^{Chrna7+} 神经元的活动并引起镇痛作用, 研究者接下来检测了 $\alpha 7$ nAChR 激动剂 EVP-6124 的镇痛效果。在辐射热实验中, 预先给予 EVP-6124 增加小鼠缩足潜伏期。在 EVP-6124 注射后 25~45 min 达到镇痛作用的峰值, 并持续数小时。通过在体光纤记录, 该研究证实具有镇痛作用的 EVP-6124 剂量可瞬时激活 vIPAG^{Chrna7+} 神经元并伴随着持续性的抑制。为探究这种神经元活性的降低对 EVP-6124 发挥镇痛效果是否必需, 在 vIPAG^{Chrna7+} 神经元中表达 ChrimsonR 和 GCaMP6 以调控这些神经元的活性。注射 EVP-6124 后, 光遗传学激活 vIPAG^{Chrna7+} 神经元阻断该激动剂的镇痛效果, 且具有刺激频率依赖性。因此, 这些结果揭示 vIPAG^{Chrna7+} 神经元活性的降低是激活 $\alpha 7$ nAChR 产生镇痛效果所必需的。

为阐明 $\alpha 7$ nAChR 激活引起神经元活性降低的机制, 研究者接下来探究潜在的细胞信号转导机制。 $\alpha 7$ nAChRs 的激活使 Ca^{2+} 透过电压门控 Ca^{2+} 通道和 $\alpha 7$ 通道进入细胞, 导致胞内 Ca^{2+} 浓度升高。增加的胞浆 Ca^{2+} 能招募 N-酰基磷脂酰-乙醇胺特异性磷脂酶 D (NAPE-PLD) 依赖的信号转导。有趣的是, NAPE-PLD 的水平受疼痛状态动态地调节。一般来说, 慢性疼痛会降低 NAPE-PLD 水平。通过注射 EVP-6124 并进行福尔马林实验, 探究 $\alpha 7$ nAChR 的激活是否会改变 vIPAG 区域的 NAPE-PLD 水平, 结果发现 vIPAG 中 NAPE-PLD 水平显著上调。NAPE-PLD 招募内源性大麻素信号通路, 靶向核受体过氧化物酶体增殖激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α), 与脂肪酸酰胺水解酶 (fatty acid amide hydrolase, FAAH) 共同参与痛觉过敏的发生。该研究接着探索 PPAR α 信号是否是激活 $\alpha 7$ nAChR 引起神经元活性降低所必需的。结果发现 EVP-6124 灌注降低神经元自发放电的频率, 预孵育 PPAR α 拮抗剂 GW6471 可阻断 EVP-6124 介导的神经元放电频率降低, 且不影响神经元基础活性或 $\alpha 7$ nAChR 的功能。尽管 PPAR α 作为激活 $\alpha 7$ nAChR 后引起的延迟抑制作用的一种解释, 但其调控膜兴奋性的机制仍然未知。PPAR α 激活剂可以磷酸化 Kv2.1 的关键调控酶 AMPK, AMPK 和 Kv2.1 均与痛觉、阿片类药物使用以及神经元兴奋性的调控有关。基于此, 研究者探究了 AMPK 磷酸

化与 Kv2.1 磷酸化(磷酸化位点 S563 和 S603)的改变。注射 EVP-6124 后, pAMPK (Thr172) 水平升高, pKv2.1 (S603) 水平降低。pKv2.1 (S603) 的水平降低可增加 K^{+} 电导, 从而降低神经元的兴奋性。EVP-6124 处理减少福尔马林诱导的疼痛行为以及降低 pKv2.1 (S603) 的水平。这些结果揭示了由 Ca^{2+} 依赖的信号级联介导 $\alpha 7$ nAChRs 和 K^{+} 通道之间的关系。

基于上述结果, 该研究想验证阻断 PPAR α 是否降低 $\alpha 7$ nAChR 激动剂的镇痛效果。结果发现在福尔马林实验的第二时相, 预先注射 PPAR α 抑制剂 GW6471 可减弱 EVP-6124 的镇痛作用。由于内源性大麻素信号与 PPAR 激活相关, 并可能涉及大麻素 I 型受体 (CB1R), 研究者接下来探究 CB1R 拮抗剂 NESS-0327 能否阻断激活 $\alpha 7$ nAChR 引起的镇痛效应。结果显示, NESS-0327 并不影响 EVP-6124 的镇痛效果, 提示 $\alpha 7$ nAChRs 激动剂通过一种 PPAR α 依赖的信号通路抑制 vIPAG^{Chrna7+} 神经元活性, 从而发挥镇痛作用。

接着, 该研究进一步探究 vIPAG^{Chrna7+} 神经元在下行投射中的角色。通过原位杂交技术发现大部分 vIPAG^{Chrna7+} 神经元上表达 GABA 能神经元的标记物囊泡 GABA 转运体 (vGAT; Slc32a1)。vIPAG^{Chrna7+} 神经元还共表达其他神经调质及受体, 包括大麻素受体 I (Cnr1)、前强啡肽原 (Pdyn) 以及 μ -阿片受体 (Oprm1)。通过光遗传学及脑片电生理记录, 检测 vIPAG^{Chrna7+} 神经元是否作为局部中间神经元发挥作用。光遗传学激活 vIPAG^{Chrna7+} 神经元诱发邻近细胞的外向电流 (oIPSCs), 且这些 oIPSCs 可被预处理 GABA-A 受体拮抗剂荷包牡丹碱所阻断。在体激活 vIPAG^{Chrna7+} 神经元会抑制脑内 vIPAG $\rightarrow$ RVM 投射的活动。这些结果表明, vIPAG^{Chrna7+} 神经元是调控 vIPAG $\rightarrow$ RVM 投射的局部抑制性中间神经元。因此, 该研究检测激活 $\alpha 7$ nAChR 是否通过对下行 vIPAG $\rightarrow$ RVM 投射的去抑制从而缓解疼痛。研究者观察到施加 EVP-6124 降低逆行标记的 vIPAG $\rightarrow$ RVM 投射神经元的自发 IPSCs 频率。仅 6% 的 vIPAG^{Chrna7+} 神经元投射至 RVM, 且激活 vIPAG^{Chrna7+} $\rightarrow$ RVM 神经元并没有改变疼痛行为。注射 EVP-6124 可降低 vIPAG 内的 GABA 水平, 这与吗啡的效果类似。结果表明, 激活 $\alpha 7$ nAChR 通过抑制 vIPAG^{Chrna7+} 神经元, 产生对下行痛觉通路去抑制, 这与阿片类药物的作用机理相类似。

基于 $\alpha 7$ nAChR 以及 μ -阿片受体激动剂的生理与行为学效应的相似性, 研究者接下来探索 vIPAG 中相关受体表达的共定位情况, 结果显示 $\alpha 7$ nAChR



及 μ -阿片受体共标的神经元达71%~74%。在阿片耐受状态下,探究EVP-6124是否有效靶向对阿片敏感、编码疼痛的vIPAG的神经元集群以缓解疼痛。使用在体双光子成像的方法,监测慢性疼痛及阿片耐受过程中神经元集群的动态活动,并在vIPAG神经元中表达GCaMP6,以对神经元进行成像分析。结果显示,大部分监测的vIPAG神经元可被引起疼痛反应的伤害性刺激所激活,且这些vIPAG神经元的自发活动以及疼痛引起的活动均被吗啡所减弱。慢性疼痛状态下,先前对伤害性刺激无反应的神经元被招募进入疼痛应答神经元集群,吗啡仍可抑制疼痛应答神经元集群(包括新招募的疼痛应答神经元)。然而,阿片耐受削弱吗啡对神经元活动的抑制,随后施加EVP-6124有效地抑制疼痛应答神经元集群,并延长小鼠缩足潜伏期。结果表明,慢性疼痛扩大了对疼痛敏感的vIPAG神经元集群。

该研究还探究了 $\alpha 7$ nAChR激动剂处理能否缓解福尔马林引起的炎症痛。EVP-6124降低了福尔马林测试的第二时相中疼痛行为的持续时间。而且不同的 $\alpha 7$ nAChR激动剂(PHA-543613)和一种正向别构调制剂(PNV-120596)产生了与EVP-6124类似的镇痛作用。鉴于正向别构调制剂需要内源性ACh激活其受体才产生镇痛作用,这些数据对既往的结

果是有力的补充。为探究 $\alpha 7$ nAChR激动剂能否增加低剂量吗啡的镇痛效果,共注射EVP-6124及低剂量吗啡降低了福尔马林诱导的疼痛反应,其效果与高剂量吗啡的效果相似。即使在纳洛酮处理后,EVP-6124也能减轻福尔马林引起的阿片耐受小鼠的疼痛行为。结果表明, $\alpha 7$ nAChR激动剂与内源性胆碱能神经环路共同作用来缓解疼痛,且没有不良反应或成瘾性倾向。

综上所述,该研究发现PPTg^{ChAT+}→vIPAG投射可缓解疼痛,并明确了 $\alpha 7$ nAChRs通过抑制vIPAG^{GABA+}神经元,抑制疼痛引起的vIPAG的神经元集群的超兴奋性,从而产生镇痛作用。在阿片耐受情况下,下行痛觉调控环路的镇痛作用是保守的。ACh可调控vIPAG的兴奋性,并改变疼痛的感觉和情感体验。vIPAG中的神经元集群汇集了内源性胆碱能、阿片和大麻素系统以共同调控疼痛行为,这一领域还有待深入的探索。总之,该研究深化了对痛觉调控环路的理解,为探索非阿片类药物镇痛的分子与细胞靶点指明了方向。

(Sullere S, Kunczt A, McGehee DS. A cholinergic circuit that relieves pain despite opioid tolerance. *Neuron*, 2023, 111(21):3414-3434.e15. 南通大学特种医学研究院, 陆屹, 孙世宇, 周国坤 译, 刘通 校)

• 消 息 •

2024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

