



• 学术动态 •

神经元中 STING 通过诱导抗病毒干扰素刺激基因促进小鼠疼痛的消退

摘要 炎症和疼痛是损伤、感染或慢性疾病常见的病理反应。虽然急性炎症对疼痛缓解和阿片类镇痛至关重要，但其过程中发生的不良反应可能导致向慢性疼痛的转变。该研究发现，炎症激活了背根神经节伤害性感受器中干扰素 (interferon, IFN) 基因的胞质 DNA 感应蛋白刺激因子 (stimulator of interferon genes, STING)。STING 在神经元激活通过 TANK 结合激酶 1 (TANK binding kinase 1, TBK1) 促进信号传导，并触发 IFN-β 反应，介导疼痛消退。该研究还发现，在伤害感受器特异性获得性 STING 突变的小鼠表现出 IFN 基因特征，并通过 KChIP1-Kv4.3 降低伤害感受器的兴奋性和炎症性痛觉过敏。研究结果揭示了 IFN 调节基因和 STING 下游的 KChIP1 在炎症性疼痛消退中的作用。

一、主要研究背景

疼痛和炎症是机体损伤或感染期间的两种主要防御机制。炎症性疼痛具有适应性和保护性；即使在炎症消退后，疼痛也经常持续存在。最近的研究表明，急性炎症参与了疼痛由急性向慢性疼痛转变的过程。因此，了解炎症期间疼痛如何消退对于预防慢性疼痛的产生至关重要。

与免疫系统一样，伤害性感知系统也会在“危险信号”出现时向宿主发出警报，并且进化出一种机制，即通过靶向危险信号受体使感觉模式失能，如嗅觉、味觉，甚至疼痛。伤害感受器具有通过各种模式识别受体对病原相关和损伤相关分子模式做出反应的能力。既往研究证明，Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs)、NOD 样受体 (NOD-like receptors, NLRs)、RIG-I 样受体 (RIG-I like receptors, RLRs) 和胞质 DNA 传感器 (cytosolic DNA sensors, CDSs) 在背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 神经元中表达。

在这些受体中，干扰素基因刺激因子 (stimulator of interferon genes, STING) 是一种胞质 DNA 传感器，在识别细菌产生的自身 DNA、病毒 DNA 和环二核苷酸 (cyclic dinucleotides, CDNs) 中发挥作用。STING 激活导致 I 型干扰素 (interferon I, IFN-I) 的产生，例如 IFN-α 和 IFN-β 亚型。细菌和宿主来源的 CDN 诱导 STING 二聚化，从而激活 TANK 结合激酶 1 (TANK binding kinase 1, TBK1)。TBK1 磷酸化 IFN 调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3)，导致 IFN-I 和其他参与宿主反应的基因产生，从

而促进消除病原体和炎症时受损的宿主细胞。IFN-I 通过自分泌和旁分泌形式与 IFN-α/β 受体 (IFNAR) 结合，导致一系列 IFN 刺激基因 (interferon-stimulated genes, ISGs) 的转录调控，这些基因通常保护细胞免受感染。尽管 IFN 因其抗病毒特性而被发现，但它们目前被批准用于治疗多种疾病，包括肝炎、多发性硬化症和黑色素瘤。

最近研究表明，STING 是伤害性感受的调节因子：缺乏 STING 的小鼠出现机械性触诱发痛；STING 激动剂在神经病理性疼痛模型中产生抗伤害性作用。尽管观察到 STING 激动剂具有镇痛特性，但 STING 在神经病理性疼痛中的作用以及 STING 在炎症性疼痛中调节和重编程伤害感受器的机制仍不清楚。此外，已知 STING/IFN-I 通路在炎症期间被激活，其失调可导致慢性炎症。因此，探索该通路在炎症性疼痛消退中的作用机制可以为预防炎症性疾病向慢性疼痛的转变提供思路。

二、主要研究结果

1. 伤害性感受器中 STING 在炎症反应中上调

为了研究炎症性疼痛消退的机制，本文作者采用了完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 诱导的炎症性疼痛模型。注射 CFA 的小鼠在第 1 天出现热痛觉过敏和机械性触诱发痛，并在 2 周内恢复，表明疼痛传入通路具有高水平的可塑性，特别是在炎症期间发生显著的分子和功能变化的无髓鞘小直径伤害感受器。为了探索伤害性感受器如何对炎症环境做出反应，使用 *Nav1.8 Tg-TdTomato* 小鼠，该小鼠足底注射 CFA 后，通过流式分选出 CFA 同



侧和对侧 L₄~L₆ 节段 DRG 中 Nav1.8 神经元。转录分析鉴定出同侧和对侧之间的 2 个差异表达基因：*STING* (*Tmem173* 基因) 和血管生成素样蛋白 2 (*Angptl2*)。CFA 诱导的炎症使同侧瞬时受体电位香草酸亚型 1 (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1) 神经元中 *STING* 表达增加，同时 DRG 中 *STING* 和 TRPV1-ecGFP 的免疫荧光信号共标，且同侧 TRPV1 神经元中 *STING* 蛋白水平增加。分析小鼠 DRG 神经元的单细胞测序结果，发现 *STING* 与肽能伤害感受器相关转录本共表达，例如 *Scn10a* (*Nav1.8*)、*Trpv1*、*Calca* (*CGRP*)、*Tac1* (P 物质) 和 GFRα3。因此，本文作者进行了免疫荧光染色以确定 DRG 神经元不同亚群中 *STING* 蛋白的水平。结果表明，与 IB4 非肽能神经元相比，*STING* 在 TRPV1 肽能神经元中富集。此外，还检测了 *STING* 在人类 DRGs 中的表达，发现 *STING* 和 *Nav1.8* 之间存在高度的共定位。表明 *STING* 在人类和小鼠伤害感受器中均有表达。

2. I 型 IFN 促进炎症性疼痛的消退

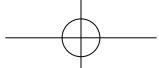
在培养的 DRG 原代神经元中，用 ADU-S100 (10 和 30 μg/ml) 激活 *STING* 导致 TBK1 的磷酸化，该现象发生于野生型 (WT) 神经元而非 *STING*^{-/-} 的神经元。此外，ADU-S100 (10 μg/ml) 刺激诱导 IFN-β 的产生，但不诱导 IFN-α 的产生，并且这种 IFN-I 反应依赖于 *STING* 的存在。为了研究 TRPV1 的神经元在所有 DRG 神经元中产生 IFN-β 的比例，在 ADU-S100 处理前用树脂毒素 (resiniferatoxin, RTX) (1 μM) 处理细胞以消融 TRPV1 神经元。RTX 预处理使 *STING* 激动剂刺激产生的 IFN-β 减少了 50%，表明大部分 IFN-I 源自 TRPV1 神经元。

为了研究 IFN-β 是否介导热痛觉过敏的消退，本文作者使用了抗 IFN-β 中和抗体。小鼠在 CFA 注射后的第 3 天和第 8 天鞘内注射 IFN-β 抗体 (30 ng/μl) 或等量 IgG。中和抗体 IFN-β 延迟了小鼠热痛觉过敏的消退。由于 IFN-I 与 IFNAR 结合能够导致一系列 ISGs 的转录调控，而这些基因通常保护细胞免受感染，因此本文作者评估了经典 ISGs，特别是 *Oasl2* 和 *Isg15* 在 CFA 模型小鼠中随时间的表达。结果显示，小鼠注射 CFA 后 3 天，同侧 DRG 中 *Oasl2* 和 *Isg15* 均增加，在第 12 天恢复到基线水平，表明 CFA 诱导的痛觉过敏的消退可能是由 IFN 诱导的。而且，与对照组相比，鞘内注射 IFN-β 中和抗体的 CFA 小鼠 *Oasl2* 基因的表达降低，但并未降低 *Isg15*，表明后者可能参与 *STING* 诱导的其他 I 型 IFNs。

3. IFN-I/IFNAR1 信号轴调节热痛觉过敏

为了研究神经元 IFN-I 在调节伤害性行为中的作用，本文作者将 *hSTING-N154S* 小鼠与 *TRPV1-Cre* 动物杂交，繁殖了 *TRPV1^{cre}-GOF* 的条件性敲入 (conditional knockin, cKI) 小鼠。来自 *TRPV1^{cre}-GOF* 小鼠的 DRG 神经元在没有 *STING* 刺激的情况下，表现出 I 型 IFN-α 和 IFN-β 水平升高。此外，与未经处理的神经元相比，ADU-S100 (1 μg/ml) 诱导的 IFN-β 增加 10 倍以上，并且 ADU 诱导的 IFN-α 和 IFN-β 增加在 cKI 小鼠中比同窝对照组高 6 倍。接下来研究了组成型 IFN-I 是否会影响感觉或疼痛样行为。对比同窝 WT 小鼠，*TRPV1^{cre}-GOF* 小鼠的机械痛阈值无变化，但热敏感降低。此外，*TRPV1^{cre}-GOF* 小鼠的刻板行为，如攀爬、饲养、进食、饮水、梳理、抓挠和移动距离等正常，表明 TRPV1 神经元产生的 IFN-I 主要调控热伤害性感受。

同时检测了 CFA 后 *TRPV1^{cre}-GOF* 小鼠的热痛觉过敏。尽管与同窝对照组相比，*TRPV1^{cre}-GOF* 小鼠同侧足部炎症高峰期的水肿稍显明显，但几乎未出现热痛觉过敏。然而，CFA 术后机械性触诱发痛未受影响，而且这种镇痛效果不是由于炎症反应的差异，因为在 *TRPV1^{cre}-GOF* 和 *GOF* 小鼠的炎症足部，促炎和抗炎细胞因子水平相似。此外，CFA 后两组小鼠均未出现明显的全身炎症。为了评估 IFNAR1 是否介导了镇痛作用，使用了抑制 IFNAR1 表达的抗体 (MAR1)。*TRPV1^{cre}-GOF* 小鼠在 CFA 注射前和注射后 3 天鞘内注射 MAR1 抗体 (100 ng/μl) 或 IgG。MAR1 抗体恢复了 CFA 诱导的 *TRPV1^{cre}-GOF* 小鼠的热痛觉过敏。由于 IFNAR1 在 DRG 的神经元和非神经元细胞中均表达，因此通过敲除神经元中的 *Ifnar1* 来评估 IFNAR1 在 TRPV1 纤维中的作用。*TRPV1^{cre}-GOF* 新生鼠 (P5) 腹腔注射表达 Cre 诱导型 *IFNAR1-shRNA* 的腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 或对照病毒 (Scr)。在 6 周时，*TRPV1^{cre}-GOF* cKI 小鼠感染病毒成功，并且 RNAscope 验证了 *Ifnar1* 的下调。*TRPV1^{cre}-GOF* 小鼠神经元中 *Ifnar1* 的敲除恢复了正常的热敏感。与 CFA 后的 *IFNAR1-Scr* 小鼠相比，用 *IFNAR1-shRNA* 处理的小鼠表现出热痛觉过敏。由于在发育期间 TRPV1 在广泛神经元群体中表达，因此他们在成年 *TRPV1^{cre}-GOF* 小鼠中递送 AAV。与注射的幼鼠一样，注射 *IFNAR1-shRNA* 的成年 *TRPV1^{cre}-GOF* 小鼠的热敏反应得到恢复。这些结果表明，神经元 *STING* 的激活可能促进炎症后疼痛的缓解，至少部分是通过自分泌 IFN-I/IFNAR1 信号传导。



4. ISGs 降低了伤害感受器的内在兴奋性

为了评估 IFN-I 信号通路对疼痛的影响，对 *TRPV1^{cre}-GOF* 小鼠的 DRG 进行了大规模 RNA-Seq 分析。转录组分析显示，与 WT 组相比，DRG 中存在明显的 IFN 标志物，包括 12 个下调和 100 多个上调的 ISGs。在上调基因中，发现了一些已知的经典 ISGs (*Oasl*、*Ifitm3*、*Isg15*、*Ccl5* 和 *Usp18 mRNA*)，它们可触发对抗病原体或肿瘤的保护性防御机制。这些发现表明，激活的 STING 有效促进了 TRPV1 痛觉感受器中 ISGs 的表达，从而验证了 *TRPV1^{cre}-GOF* cKI 模型可用于研究这些神经元中的 IFN 基因响应。虽然 ISGs 的功能能够使宿主防御，并允许细胞恢复到正常功能，但这些基因中只有少数被详细研究过，而且均没有在神经元可塑性的背景下进行研究。有趣的是，在 *TRPV1^{cre}-GOF* 小鼠 DRGs 中，特异性疼痛感受器离子通道（包括 *Trpv1*、*Ttpa1* 和 *Trpc3*）的表达降低，而已知能抑制兴奋性的 A 型 Kv 通道调节蛋白 (*Kchip1*) 的表达上调。通过 qPCR 进行基因表达定量证实，*TRPV1^{cre}-GOF* 神经元中 *Oasl2*、*Isg15* 和 *Kcnip1* (*KChIP1*) mRNA 增加，*Trpv1* mRNA 显著减少，这与 *TRPV1^{cre}-GOF* 小鼠中 TRPV1 神经元的减少相吻合。为了研究 ISGs 对疼痛感受器的功能影响，对 TdTomato⁺ *TRPV1^{cre}-GOF* 神经元进行了电生理记录。与对照组相比，*TRPV1^{cre}-GOF* 神经元基强度和输入电阻增加。相比之下，*TRPV1^{cre}-GOF* 小鼠和对照小鼠的非肽能 IB4 神经元的基强度无差异，表明 IFN 诱导的低兴奋性是 *TRPV1^{cre}-GOF* 小鼠 TRPV1 神经元特异性的。同样，*TRPV1^{cre}-GOF* 神经元与同窝对照神经元相比，去极化电流引起的 AP 数量较少。而且 *TRPV1^{cre}-GOF* 小鼠的 AP 持续时间较短，表明其超极化 K 电流较大。鉴于 *TRPV1^{cre}-GOF* DRG 中 *Trpv1* 基因表达降低，本文作者检测了分离的 DRG 神经元中辣椒素 (100 nM) 诱发的电流，发现 TRPV1 电流密度明显降低。与通过测序观察到的 *Kchip1* 上调一致，KChIP1 蛋白水平在 *TRPV1^{cre}-GOF* DRG 中也显著上调。由于 KChIP1 是 Kv4 通道的特异性 β 亚基，分析了 *TRPV1^{cre}-GOF* 神经元中 A 型 K 电流的电生理特性。值得注意的是，Kv4 介导的 A 型电流在 *TRPV1^{cre}-GOF* 神经元中更大，支持 KChIP1 上调诱导的 Kv4 通道开放或表面运输的增加。因此，在 *TRPV1^{cre}-GOF* 神经元，A 型 Kv4 通道的稳态激活转移到更超极化的电位，而稳态失活则延迟，表明 KChIP1 对 Kv4 通道门控的调节。上述结果表明，ISGs 调节离子通道和通道相互作用蛋白的表达，以增强伤害感受器

激活的阈值并降低伤害感受神经元的兴奋性。

5. IFNAR1 耗竭使离子通道表达和电生理特性正常化

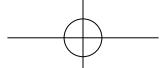
为了研究 *TRPV1^{cre}-GOF* 神经元电生理表型是否由 IFN-I/IFNAR1 信号通路介导，*TRPV1^{cre}-GOF* 新生鼠 (P5) 腹腔注射表达 *IFNAR1-shRNA* 或对照病毒的 Cre 诱导型 AAV-GFP。*TRPV1^{cre}-GOF* 神经元 *Ifnar1* 的耗竭恢复了 *Kchip1* 的正常表达。电生理记录显示，与未感染或 *IFNAR1-Scr* 感染的神经元相比，*IFNAR1-shRNA* 感染的 *TRPV1^{cre}-GOF* 神经元的基强度要更低。这与在 *IFNAR1-shRNA* 感染的细胞中观察到的诱发 AP 放电的增加一致。此外，*Ifnar1* 耗竭恢复了 TRPV1 电流密度并降低 IFN-I 诱导的 Kv4 介导的 A 型电流。

6. KChIP1/Kv4 相互作用促进了 ISG 的抗伤害作用

Kcnip1 (*KChIP1*) 是响应伤害感受器 STING 激活的关键 IFN 调节基因。由于观察到 A 型 K 电流的增加，并且 KChIP1 是天然 Kv4 通道复合物的组成部分，为了研究 Kv4-KChIP1 亚基复合物是否有助于 ISGs 的抗伤害作用，本文作者首先测试了 AmmTx3，一种特定的 Kv4 通道阻滞剂的作用。在 *TRPV1^{cre}-GOF* 神经元中，AmmTx3 (1 μM) 降低了基强度，延长了 AP 持续时间，并降低了 A 型 Kv 电流密度，表明由 KChIP1 和 Kv4 之间的相互作用诱导的 A 型 K 电流的 IFN-I 依赖性上调。

为了验证这一假设，使用 TAT 偶联的 KChIP1 干扰肽来破坏 KChIP1-Kv4.3 或 KChIP1-Kv4.1 亚基复合物。在 *TRPV1^{cre}-GOF* 神经元中加入 KChIP1 肽 (20 nM)，随着时间的推移，高基强度逐渐降低。KChIP1 肽在 20 分钟后作用显著，在 45 分钟后达到饱和。此外，向 CFA 造模的 *TRPV1^{cre}-GOF* 小鼠鞘内注射 5 μg 和 10 μg KChIP1 肽，在注射后 3 小时小鼠的热痛觉过敏缓解。这些结果明确了 KChIP1-Kv4 相互作用介导了 IFN-I 诱导的神经元中 STING 的抗伤害性感受。

综上所述，该研究描述了伤害感受器特异性、抗病毒且缓解疼痛的 ISGs 反应，它改变了离子通道相关蛋白 *Kchip1* 和伤害感受离子通道（如 *Trpv1*）的表达。这种 STING 介导的反应有助于抵消炎症性过度兴奋，并在炎症后恢复伤害感受器阈值。这种调节可能通过 PKR/eIF2α 通路发生，该通路既往已被证实用于控制伤害感受器中的蛋白稳态。虽然最近的研究已经探索了 STING 在神经病理性疼痛中的作用，但该研究的结果表明，炎症导致伤害感受器中 STING 的上调，且这种上调与促进炎症性疼



痛消退的 IFN-I 密切相关。该研究为炎症背景下与 STING 激活相关的离子通道和基因表达变化提供了重要的机制见解。但介导伤害感受器中 IFN-I 作用的下游信号通路和转录变化还需要进一步研究。此外, 研究 IFN-I/IFNAR1 信号转导在其他类型的感觉神经元(如非肽能伤害感受器)和不同疼痛模型中的作用对于理解该信号通路在疼痛缓解中的作用至关重要。

通过将 STING-ISGs 确定为一种关键的疼痛缓解的反应, 该反应会降低炎症性疼痛条件下的伤害

感受器兴奋性, 该研究在模式识别受体的核心成员中增加了一个重要的先天免疫分子, 该受体调节初级传入神经元中疼痛信号的整合。利用 IFN-I 和 ISGs 来缓解伤害感受器的过度兴奋, 可以为治疗炎症性疼痛提供一种独特的治疗手段。

(Defaye M, Bradaia A, Abdullah NS, et al. Induction of antiviral interferon-stimulated genes by neuronal STING promotes the resolution of pain in mice. *J Clin Invest*, 2024, 134(9):e176474. 南通大学疼痛医学研究院/特种医学研究院, 凌月娟译, 高永静校)

• 国际译文 •

注意力缺陷多动障碍与疼痛共病的机制-下行抑制性去甲肾上腺素系统功能障碍

注意力缺陷多动障碍 (attention-deficit hyperactivity disorder, ADHD) 是一种较为常见的精神-神经系统疾病, 病人往往有注意力缺陷、多动和冲动等方面的行为问题。ADHD 常与疼痛共病, 但其机制不清。既往的研究表明, 去甲肾上腺素 (noradrenaline, NE) 系统功能障碍, 均参与 ADHD 以及慢性疼痛的发病机制。NE 再摄取抑制剂和 α_2 肾上腺素能受体激动剂, 均用于 ADHD 以及慢性疼痛的治疗。该研究从下行抑制性 NE 系统的角度, 探讨 ADHD 与疼痛共病的机制。主要方法: (1) 构建 ADHD 样行为的大鼠模型。前期报道, 自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rats, SHR) 表现出 ADHD 样行为。研究者对 SHR 进行旷场和 Y 迷宫等测试, 进一步验证 SHR 表现出 ADHD 样行为, 即注意力缺陷、多动和冲动等。(2) 采用伤害性刺激诱导镇痛 (noxious stimuli-induced analgesia, NSIA) 评价内源性镇痛作用。前足底注射辣椒素后 30 min 至 90 min, 可以提高大鼠后足的缩足阈值。主要结果: (1) SHR 表现出 NSIA 阈值降低, 提示内源性镇痛系统损伤。(2) SHR 脊髓背角中 NE 合成酶和重摄取转运体表达量增加, 但目标受体 α_2a 肾上腺素受体下调, 导致 NE- α_2a -AR 介导的镇痛作用减弱。(3) 蓝斑核 (locus coeruleus, LC) 在 SHR 中对伤害性刺激的反应性增强, 但同时其脊髓 NE 浓度并未升高, 提示 NE 释放过程可能存在功能障碍。(4) ADHD 标准治疗药物阿托莫西汀 (Atomoxetine) 可恢复 SHR 的 NSIA 功能, 缩短术后痛觉超敏持续时间。结论: 该研究验证了 SHR 模型作为 ADHD 动物模型的可靠性, 并证明下行抑制性 NE 系统功能障碍介导 ADHD 与疼痛共病。

(Suto T, Kato D, Koibuchi I, et al. Rat model of attention-deficit hyperactivity disorder exhibits delayed recovery from acute incisional pain due to impaired descending noradrenergic inhibition. *Scientific Reports*, 2023, 13(1):5526. 北京大学神经科学研究所, 郭怀瑾译, 刘风雨校)