

• 学术动态 •

卵泡抑制素通过伤害性神经元中的 IGF1R 信号通路促进神经病理性疼痛

摘要 神经病理性疼痛是一种难治性慢性疾病。细胞因子和趋化因子介导的神经炎症在其发病机制中的作用已得到充分证明。卵泡抑制素 (follistatin, FST) 是一种分泌性糖蛋白, 既往的研究证明 FST 通过拮抗转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族中细胞因子的作用发挥生物学效应。但 FST 在神经病理性疼痛中的作用及机制尚不清楚。本研究采用小鼠脊神经结扎 (spinal nerve ligation, SNL) 模型对 FST 在神经病理性疼痛中的作用进行了研究。结果发现, SNL 诱导 FST 在背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 大直径 A β 神经元中大幅度上调。抑制或敲除 FST 减轻了 SNL 诱导的神经病理性疼痛, 并降低了伤害性神经元过度兴奋。相反, 鞘内或足底注射 FST 重组蛋白或在 DRG 神经元中过表达 FST, 诱导疼痛过敏反应。此外, FST 孵育增加了 DRG 神经元的兴奋性。分子互作研究显示 FST 与胰岛素样生长因子-1 受体 (insulin-like growth factor-1 receptor, IGF1R) 直接结合。抑制 IGF1R 降低了 FST 诱导的 DRG 神经元中 ERK 和 AKT 的激活以及神经元的过度兴奋。进一步结果证明, FST 的 N 末端对 IGF1R 表现出高亲和力, 而且靶向 FST 的 N 末端的短肽减弱了离子通道 Nav1.7 介导的神经元过度兴奋和 SNL 诱导的神经病理性疼痛。此外, FST 通过 IGF1R 增强了人 DRG 神经元的兴奋性。因此, 本研究揭示了 FST 在神经病理性疼痛中的作用以及一种新的作用机制, 即外周神经损伤诱导 FST 在 DRG 的大直径神经元表达增加并释放, 其通过与 IGF1R 结合激活 ERK 和 AKT 激酶, 进而增强 Nav1.7 介导的伤害性神经元的过度兴奋, 促进神经病理性疼痛。本研究提示 FST 有可能成为治疗神经病理性疼痛的潜在靶点。

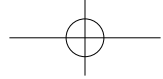
一、主要研究背景

卵泡抑制素 (follistatin, FST) 是一种分泌性糖蛋白, 最初从猪的卵泡液中分离出来, 能够抑制卵泡刺激素的分泌。后来的研究发现, FST 具有拮抗转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族成员的作用。例如, 它以高亲和力中和激活素 A (activin A) 的生物活性, 并以低 10 倍的亲和力结合其他 TGF- β 家族成员。激活素 A 是炎症的关键调节因子, 在急性和慢性炎症条件下, 血清和多种组织中的激活素 A 会增加。FST 通过抑制激活素 A 调节炎症细胞因子级联反应, 从而减轻炎症反应的严重程度。此外, FST 还可以通过拮抗肌肉生长抑制素而促进骨骼肌生长。FST 还参与骨代谢、葡萄糖耐受和成年期的神经发生。

神经损伤引起的神经病理性疼痛在临床上较常见, 但目前仍缺乏有效的治疗方法。TGF- β 超家族作为一类细胞因子, 在生理性疼痛和病理性疼痛中起着重要的调节作用。既往研究表明, 不同的 TGF- β 超家族成员在疼痛中起不同的作用。例如,

在佐剂诱导的炎症性疼痛模型中, 激活素 A 在皮肤表达增加, 而且将激活素 A 注射到足踝皮肤中会诱导小鼠痛觉过敏。激活素 A 还通过激活背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 神经元中的蛋白激酶 C ϵ 敏化辣椒素反应。相反, 激活素 C 降低甲醛或完全弗氏佐剂诱导的伤害性反应。有报道, FST 可迅速增加环磷酸胺处理的小鼠膀胱超敏反应, 提示 FST 在膀胱炎中具有促伤害作用。然而, FST 在神经病理性疼痛中的作用未见报道。

周围神经损伤引起初级感觉神经元中多种基因的表达改变。基因芯片和 RNA-seq 研究显示, 在小鼠周围神经损伤后, FST 是 DRG 中高度上调的基因之一。本文作者研究了上调的 FST 是否会影响神经损伤引起的神经病理性疼痛。结果表明, FST 促进 SNL 诱导的神经病理性疼痛的发展和维持: 该作用不依赖于拮抗 TGF- β 超家族, 而是 FST 与 IGF1R 直接相互作用, 增强 DRG 神经元中河豚毒素 (tetrodotoxin, TTX) 敏感的电压门控钠通道 (voltage-gated sodium channel, VGSC) 的功能, 从而



驱动外周敏化。此外, FST 也通过 IGF1R 增加人类 DRG 神经元的兴奋性。

二、主要研究结果

1. SNL 增加了小鼠 DRG 大、中直径神经元中 FST 的表达

既往的研究发现, FST 是周围神经损伤后 DRG 中上调最高的基因之一。本研究采用 qRT-PCR 的结果显示, 雄性小鼠的 *Fst* mRNA 基础水平低于雌性小鼠。SNL 后, 无论在雄鼠还是雌鼠, *Fst* mRNA 从第 1 天到第 28 天均有所增加, 并在第 35 天恢复。此外, 在坐骨神经分支损伤 (spared nerve injury, SNI) 模型小鼠的 L₄₋₅ DRG 中, *Fst* mRNA 也显著上调, 但在化疗药 (奥沙利铂) 诱导的神经病理性疼痛小鼠的 L₄₋₅ DRG 中无显著变化。免疫荧光染色显示, FST 与大直径神经元标志物 NF200 具有高度共标 (67%±3.8%), 与非肽能标志物 IB4 具有中度共标 (17%±1.3%), 与肽能标记物 CGRP 共标最少 (9%±0.7%), 与卫星细胞标志物 GFAP 或巨噬细胞标志物 CD68 没有共标。此外, FST 与细胞/轴突损伤标志物 ATF3 的双重染色表明, FST 在受损 (ATF3⁺) 和非受损 (ATF3⁻) 神经元中均有表达。

2. FST 在神经病理性疼痛的发展和维持中起重要作用

为了研究 FST 在神经病理性疼痛中的作用, 本文作者繁育了 *Fst* 敲除小鼠。与之前的报告一致, *Fst*-KO 小鼠的纯合子在出生后没有存活; 因此, 使用 *Fst*^{+/-} 小鼠进行进一步研究。*Fst*^{+/-} 小鼠 DRG 中 NF200、IB4 和 CGRP 表达正常, 基础痛觉和运动功能也正常。然而, 在 *Fst*^{+/-} 小鼠中, SNL 诱导的机械性触诱发痛和热痛觉过敏显著减轻。同样, 将 *Fst* siRNA 注射至 L₄ 脊神经中也减轻了 SNL 诱导的痛觉过敏。此外, 在 SNL 后第 7 天或 28 天鞘内注射 FST 中和抗体均可缓解 FST 诱导的痛觉过敏。

为了进一步研究 FST 在 DRG 中的作用, 本文作者繁育了转基因小鼠 (*Fst*^{fl/fl})。在 SNL 前 4 周, 将 pAAV-CAG-MCS-mCherry-3FLAG (AAV-Con) 或 pAOV-CAG-mCherry-T2A-Cre (AAV-Cre) 病毒鞘内注射到 WT 或 *Fst*^{fl/fl} 小鼠体内。注射 AAV-Cre 后显著降低了 *Fst*^{fl/fl} 小鼠 DRG 中 FST 的表达, 而且减轻了 SNL 诱导的机械性触诱发痛和热痛觉过敏。这些数据表明, DRG 中的 FST 在神经病理性疼痛的发展和维持中起着关键作用。

3. FST 促进 SNL 诱导的 DRG 神经元过度兴奋

伤害性神经元过度兴奋与神经病理性疼痛密切相关。本文作者研究了 FST 是否参与 SNL 后伤害

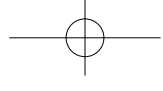
性神经元兴奋性的增加。为此, 记录了 WT 和 *Fst*^{+/-} 小鼠 DRG 中、小直径神经元 (< 25 μm) 的诱发动作电位 (action potential, AP)。在 100、200 和 300 pA 斜坡电流刺激下, WT 小鼠 SNL 后 AP 数量增加, 但 *Fst*^{+/-} 小鼠无显著变化。且鞘内注射 AAV-Cre 的 *Fst*^{fl/fl} 小鼠, SNL 诱导的 AP 数量显著下降。这些结果表明, FST 增强神经病理性疼痛中 DRG 神经元的兴奋性增加。

4. FST 诱导疼痛过敏反应及神经元兴奋性提高

为了评估 FST 是否足以诱导疼痛, 本文作者在 Naïve 小鼠鞘内注射了 FST 重组蛋白。行为学实验表明, FST 诱导了雄性或雌性小鼠的机械性触诱发痛和热痛觉过敏, 该作用持续 4 天以上。随后, 将对照病毒 [pAAV-CMV-MCS-EGFP-3FLAG (AAV-EGFP)] 和 FST 过表达病毒 [pAAV-CMV-*Fst*-P2A-EGFP-3FLAG (AAV-*Fst*-EGFP)] 分别注射到小鼠的 L₄ DRG 中。AAV-*Fst*-EGFP 注射 3 周后, 显著增加了 DRG 中 FST 的表达, 并降低了小鼠机械刺激缩足反射阈值和热缩足潜伏期。此外, 小鼠足底注射 FST 重组蛋白也诱导了持续约 30 min 的舔爪和缩爪行为。这些结果表明, FST 诱导了小鼠痛觉过敏。接着, 研究了 FST 对 DRG 中小型神经元兴奋性的影响。FST 孵育 DRG 神经元 30 min 后, 显著增加了自发放电的神经元比例和动作电位的发放频率。此外, FST 降低了 DRG 神经元的基强度、动作电位阈值和 mAHP (medium afterhyperpolarization)。同时, FST 也增加了大直径 DRG (> 35 μm) 中 AP 的数量, 表明 DRG 大、中、小直径神经元均对 FST 有反应。

5. FST 激活 DRG 神经元中的 ERK 和 AKT 信号通路

MAPKs (有丝分裂原激活的蛋白激酶, 包括 ERK、JNK、p38) 和 AKT/mTOR 是 TGF-β 超家族的下游胞内信号通路, 在慢性疼痛中起重要作用。为了研究 FST 激活的信号通路, 本文作者首先用 FST 孵育 DRG 神经元细胞系 ND7/23 细胞, 检测 MAPKs 家族成员和 AKT 信号通路的激活情况。Western Blot 分析显示, FST 以剂量和时间依赖性地增加了 pERK 和 pAKT 水平。此外, FST 也使 pp38、pJNK 的表达显著升高。这些结果提示 FST 在体外快速激活神经元中的 MAPKs 和 AKT 信号通路。此外, 还检测了 FST 是否激活体内 ERK 和 AKT 信号通路。鞘内注射 FST 后 3 h 和 48 h 均增加 DRG 的 pERK 和 pAKT 水平。足底注射 FST 后 30 min, 也激活了 DRG 中的 ERK 和 AKT。免疫荧光进一步证实, FST 可增



加 pERK⁺ 和 pAKT⁺ 神经元的百分比。值得注意的是,足底注射 FST 增加了足底皮肤的神经纤维中 pERK 表达。此外,鞘内注射 MEK 抑制剂 PD98059 和 AKT 抑制剂 IV 显著减轻了 FST 诱导的机械性触诱发痛,同时分别降低了 DRG 中的 pERK 和 pAKT 水平。Western Blot 分析进一步表明,SNL 诱导 WT 小鼠而非 *Fst*^{+/−} 小鼠 DRG 中 pERK 和 pAKT 的上调。这些结果表明,FST 促进 SNL 后 DRG 神经元中 ERK 和 AKT 的激活。

6. FST 与 IGF1R 相互作用诱导 ERK/AKT 激活

由于 FST 的致痛作用与激活素 A 的作用相似,提示 FST 不是通过拮抗激活素 A 发挥作用。为了找出 FST 直接作用的膜蛋白,本文作者通过免疫共沉淀和质谱分析对 FST 结合的膜蛋白进行了分析,发现其中有 6 段短肽与 IGF1Rs 氨基酸序列匹配。为了明确 FST 与 IGF1R 的相互作用,采用了多种实验方法进行检测。首先,生物膜干涉 (bio-layer interferometry, BLI) 实验表明,FST 与 IGF1R 的结合亲和力比 IGF-1 与 IGF1R 的亲和力还要强。其次,用 GFP 标记的 IGF1R 质粒转染 ND7/23 细胞,再用 FST 或 IGF-1 孵育。发现 FST 和 IGF-1 一样,均能使细胞膜上的 IGF1R-GFP 内化到细胞质中。第三,免疫共沉淀实验显示,FST-Fc 同时富集 IGF1R 前体和成熟的 IGF1R。此外,FST 也能被 IGF1R-Fc 富集。第四,IGF1R 拮抗剂 BMS-536924 降低了 FST 诱导的 ND7/23 细胞中 pERK 和 pAKT 的表达。这些结果表明,FST 直接与 IGF1R 相互作用诱导 ERK/AKT 在体外激活。

为了进一步研究 FST 和 IGF1R 在 DRG 中的相互作用,本文作者进行了原位邻近连接试验 (proximity ligation assay, PLA)。与假手术小鼠相比,在 SNL 第 10 天小鼠 DRG 中,PLA 阳性点 (代表 FST 和 IGF1R 的物理接近) 增加。行为学实验表明,鞘内注射 BMS-536924 可以减轻 FST 诱导的痛觉过敏,并减少 FST 引发的 ERK 和 AKT 的激活。电生理记录显示,单独使用 BMS-536924 不会影响电流诱发的 AP 数量,但会减少 FST 诱导的 AP 增加。此外,用 AAV-Cre 处理的 *Igflr*^{fl/fl} 小鼠中,FST 诱导的 AP 明显少于用 AAV-Con 处理的小鼠,表明 FST 通过 IGF1R 诱导 ERK/AKT 激活、神经元过度兴奋和疼痛过敏反应。

7. DRG 中的 IGF1R 参与 SNL 诱导的神经病理性疼痛

虽然有研究显示 IGF1R 与组织损伤或炎症诱导的慢性疼痛有关,但其在神经病理性疼痛中的作

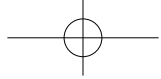
用尚不清楚。QPCR 和原位杂交显示,SNL 后 *Igflr* mRNA 水平无显著变化。此外,*Igflr* mRNA 与神经元标记物 TuJ1 大量共定位,与 GFAP 共定位较少,与 IBA-1 无共定位。在 DRG 神经元内,*Igflr* mRNA 与感觉神经元标记物 NF200、CGRP 和 IB4 共定位,表明在大、中、小直径神经元中均有表达。免疫荧光显示,在假手术小鼠,IGF1R 蛋白主要分布于 DRG 神经元胞膜上,但在 SNL 造模小鼠,IGF1R 在神经元细胞质内增加。Western Blot 也证明,SNL 后 10 天,细胞膜上的 IGF1R 减少,而细胞质中 IGF1R 增加。

为了评估 IGF1R 在神经病理性疼痛中的作用,本文作者首先在 SNL 第 10 天鞘内注射 BMS-536924,观察到其在 6 h 缓解了神经病理性疼痛。其次,将 *Igflr* siRNA 注射到 L₄ 脊神经中,不仅减轻了 SNL 诱导的痛觉过敏,同时降低了 DRG 中的 *Igflr* mRNA 水平。第三,鞘内注射 AAV-Cre 的 *Igflr*^{fl/fl} 小鼠中,SNL 诱导的疼痛超敏反应持续减弱。第四,在 *Igflr*^{fl/fl}/Advillin^{cre} 小鼠特异性敲除 DRG 神经元中的 *Igflr*,SNL 诱导的机械性触诱发痛和热痛觉过敏也得到持续缓解。这些发现充分证明了 DRG 中的 IGF1R 在神经病理性疼痛中的关键作用。

8. FST 的 N 端结合 IGF1R

为了确定 FST 在 IGF1R 上的特异性结合位点,本文作者使用 ClusPro 服务器进行了蛋白-蛋白对接建模。对接和分子动力学模拟结果显示,FST 的 U 型结构与 IGF1R 的环状结构紧密吻合,形成了稳定的二聚体结构。为了确定与 IGF1R 结合的结构域,合成了一系列 FST 的 C 端截断 (F1-F7) 蛋白,即依次从 C 端去除一个结构域。这些被截断的蛋白分别在含有 IGF1R 的 HEK293 细胞中表达。与 Fc 对照相比,FST 的所有截断衍生物均表现出与 IGF1R 结合的能力,而且随着结构域的去除,结合逐渐增强,直至剩下 ND 结构域,这表明 FST 的 ND 可能是与 IGF1Rs 结合的主要结构域。接下来,继续对 ND 进行截断:F8 (1 至 76)、F9 (1 至 61) 和 F10 (1 至 46)。3 个被截断的 NDs 与 IGF1Rs 的结合能力降低,表明 FST 的 76~91 残基在与 IGF1Rs 的结合中发挥了关键作用。

基于上述结果,本文作者合成了 4 个靶向 FST 的阻断肽 (PEP1 至 PEP4)。微量热泳动结果显示,PEP1 和 PEP2 不与 IGF1Rs 结合,PEP3 表现出较低的结合亲和力 (K_d = 47 μM),而 PEP4 与 IGF1Rs 表现出较高的结合亲和力 (K_d = 5 nM)。鞘内注射 PEP1-PEP3 没有改变 FST 诱导的痛觉过敏。相反,



PEP4 有效地减轻了 FST 诱导的机械性异位痛和热痛觉过敏,并减少了 FST 诱导的 AP 数量的增加。同时,PEP4 也缓解了 SNL 诱导的痛觉过敏,并降低了 DRG 中的 pAKT 水平。重要的是,鞘内注射 PEP4 没有引起不良反应。这些结果表明,短肽 PEP4 具有安全性,且可能通过阻断 FST 和 IGF1R 之间的相互作用来缓解神经病理性疼痛。

9. FST 通过 IGF1R 增强 Nav1.7 介导的内向电流
神经损伤或组织损伤引起的神经元过度兴奋性与电压门控钠通道 (voltage-gated sodium channels, VGSCs) 密切相关。为了研究 VGSCs 是否参与了 FST 介导的神经元高兴奋性,本文作者记录了 DRG 神经元总 Na^+ 电流,然后用 TTX 来分离 TTX 不敏感 (TTX-R) 和 TTX 敏感 (TTX-S) Na^+ 电流。结果表明, FST 增加了总钠电流和 TTX-S Na^+ 电流的电流密度,而对 TTX-R Na^+ 电流没有影响。

Nav1.7 是中、小直径 DRG 神经元中 TTX-S Na^+ 电流的主要亚型。本研究表明,在中、小直径 DRG 神经元中, FST 孵育后 Nav1.7 电流密度增加,但不影响电压依赖性激活曲线。PEP4 预孵育能显著降低 FST 对 Nav1.7 电流密度的增强。此外, IGF1R 和 Nav1.7 共转染的 CHO-K1 细胞中, FST 也增加了 Na^+ 电流密度,并且 PEP4、PD98059 以及 AKT inhibitor IV 预处理都能够降低 FST 引起的 Na^+ 电流密度增加。相比之下, PEP4 并不能抑制 IGF-1 诱导的电流密度的增加,表明 FST 和 IGF-1 与 IGF1Rs 的结合位点不同。而且,在 CHO-K1 细胞, FST 不增加 Nav1.6、Nav1.8、Nav1.9 介导的电流,但能增加 Nav1.1 介导的电流。由于 Nav1.1 表达于大直径 DRG 神经元,提示 FST 可能通过调节 Nav1.1 电流提高大直径神经元的兴奋性。

10. FST 通过 IGF1R 增加人 DRG 神经元的兴奋性

为了检测 FST-IGF1R 是否在人类 DRG (hDRG) 神经元中发挥作用,本文作者首先使用 sensoryomics.com

的公开数据集分析了 FST 和 IGF1R 在 hDRG 中的表达。由 SRplot 绘制的气泡图显示, hDRG 的各类神经元亚型中均有较高水平的 IGF1R 表达,但 FST 的表达较低。然后,对从健康供体获得的 hDRG 神经元进行了电生理研究, FST (50 ng/ml) 孵育 30 min,显著增加了小直径神经元 ($< 60 \mu\text{m}$, 可能是伤害感受器) 的动作电位放电频率和衰减斜率,表明 FST 可以直接增加 hDRG 神经元的兴奋性。而且 BMS-536924 的预孵育阻断了 FST 诱导的 hDRG 神经元的兴奋性,表明 IGF1R 参与调节 FST 引起的 hDRG 过度兴奋。

三、讨论

本研究揭示了 FST 调节神经病理性疼痛的新机制,该机制不依赖于拮抗 TGF- β 超家族成员的作用。概括而言,神经损伤使 FST 在雄性和雌性小鼠 DRG 中表达均增加,且主要表达于大直径 $\text{A}\beta$ 神经元,释放后的 FST 以旁分泌的方式作用于伤害性 (中、小直径) 神经元上的 IGF1R,激活 ERK/AKT 信号通路。这种激活导致 Nav1.7 的磷酸化,从而促进神经元兴奋性的增加;由于 IGF1R 在大直径神经元中也有表达, FST 也可能通过自分泌方式调节 Nav1.1 的功能,从而提高大直径神经元的兴奋性。FST 除了调节钠离子通道的功能,也可能调节钾离子通道和钙离子通道的功能。另外,源自 FST 的阻断短肽对神经病理性疼痛具有显著的镇痛作用。鉴于 FST 和 IGF1R 在人类 DRG 神经元和人类三叉神经神经元中广泛表达,并且 FST 增强人的 DRG 神经元的兴奋性, FST 可能是治疗临床神经病理性疼痛的潜在靶点。然而,考虑到 FST 在不同组织中的广泛表达,在选择给药途径时应谨慎。

(Jiang BC, Ling YJ, Xu ML, *et al.* Follistatin drives neuropathic pain in mice through IGF1R signaling in nociceptive neurons. *Sci Transl Med*, 2024, 16(769):eadi1564. 南通大学疼痛医学研究院/特种医学研究院, 凌月娟 朱冰 译, 高永静 校)