

## 综述

# TRPV1: 一种同时参与慢性痛外周敏化和疼痛中枢调制的重要分子

张瑛<sup>1</sup>, 王韵<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>北京大学医学部基础医学院神经科学研究所, 神经生物学系, 教育部和卫生与计划生育委员会神经科学重点实验室, 北京 100083; <sup>2</sup>北京大学麦戈文脑科学研究所, 北京 100871

**摘要:** 慢性痛是困扰临床的一大顽疾, 关于慢性痛机制的研究和新型镇痛药物的研发具有重要意义。十多年来, 本课题组围绕慢性痛外周敏化形成的关键分子——瞬时受体电位香草酸亚型1 (transient receptor potential vanilloid type 1, TRPV1), 对其敏化和膜定位机制进行了系列研究, 揭示了蛋白激酶PKD1 (protein kinase D1)、Cdk5 (cyclin-dependent kinase 5)和LIMK (LIM-motif containing kinase)在炎症诱发热痛敏中的作用及其对TRPV1的功能调控, 并据此开发出了一系列具有镇痛作用的Tat穿膜肽。本综述还围绕课题组近期工作所揭示的参与痛感觉和痛情绪相互作用的关键脑区——前额叶皮质的前边缘皮质亚区, 对TRPV1在其中的可能作用进行了探讨。此外本综述也对课题组在改进TRPV1靶向药物, 提高其镇痛疗效, 降低副作用方面的工作进行了简要总结和回顾。

**关键词:** 疼痛; TRPV1; 磷酸化; Tat穿膜肽; 镇痛

**中图分类号:** R338.3; Q432

## TRPV1: an important molecule involved in the peripheral sensitization during chronic pain and central pain modulation

ZHANG Ying<sup>1</sup>, WANG Yun<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Neuroscience Research Institute and Department of Neurobiology, School of Basic Medical Sciences, Key Laboratory for Neuroscience, Ministry of Education/National Health and Family Planning Commission, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China; <sup>2</sup>PKU-IDG/McGovern Institute for Brain Research, Peking University, Beijing 100871, China

**Abstract:** As chronic pain is a severe problem in clinics, study of the mechanisms of chronic pain and development of novel analgesic agents is of significance. In the past decade, our lab completed a series of studies on the regulatory mechanisms of functional sensitization and membrane trafficking of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1), a key molecule involved in the development of peripheral sensitization. Our studies elucidated the important regulatory roles of several protein kinases, including PKD1 (protein kinase D1), Cdk5 (cyclin-dependent kinase 5) and LIMK (LIM-motif containing kinase), in inflammatory thermal hyperalgesia. Moreover, based on these findings, we constructed a series of transmembrane Tat-fusion peptides for pain relief. The potential role of central TRPV1 was discussed as well. Prelimbic subregion of prefrontal cortex was revealed to be a critical brain region involved in the interaction between pain sensation and pain emotions by our recent studies. In addition, our work attempted to improve the analgesic effects of the agents targeting TRPV1 and concurrently reduce their side effects. Herein we summarized the work of our lab in pain and pain modulation during the past decade.

**Key words:** pain; TRPV1; phosphorylation; Tat-transmembrane peptide; analgesia

Received 2017-05-17 Accepted 2017-07-20

Research from the corresponding author's laboratory was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 3153002, 30925015, 30830044, 31771295, and 31371143) and the National Basic Research Development Program of China (No. 2014CB542204).

\*Corresponding author. Tel: +86-10-82801119; E-mail: wangy66@bjmu.edu.cn

2016年, Amanda C de C Williams 和 Kenneth D Craig 两位学者提出了“疼痛”的新定义:疼痛是一种与现实或潜在的组织损伤相关的痛苦体验,包含了感觉、情绪、认知和社会四方面的成分<sup>[1]</sup>。根据其时程不同,疼痛可分为急性痛和慢性痛:前者发生于组织损伤即刻,对机体具有警示和保护作用;而后者是由神经损伤或神经活动异常引起的长时程病理变化所介导,是目前临床亟需解决的一大难题。据统计,全球约有五分之一的人口罹患慢性痛<sup>[2]</sup>,而其中约四分之三的病人在病程中伴发过焦虑、抑郁障碍等精神共病<sup>[3]</sup>,肉体与精神的双重折磨严重降低了病人的生存质量。但是,由于人们对慢性痛产生机制的认识还不充分,现有镇痛药物疗效欠佳或副作用显著,因此多数慢性痛病人得不到及时、有效的镇痛治疗。关于慢性痛机制的研究和新型镇痛药物的研发具有重要意义。

关于慢性痛机制的研究,主要围绕外周伤害性感受器(nociceptor)、脊髓和脑三个水平展开。既往在外周伤害性感受器和脊髓水平进行的研究,催生了大量参与慢性痛形成或维持的蛋白激酶、离子通道和受体等分子成为潜在的镇痛药物靶点,然而临床实践表明,仅靶向外周和/或脊髓水平且收效良好的镇痛药物寥寥无几<sup>[4-6]</sup>,而针对脑内神经活动的抗焦虑和抗抑郁药物却在临床上获得良好的镇痛效果<sup>[7]</sup>,这些现象提示痛相关的高级神经中枢可能在疼痛的慢性化进程中发挥着关键作用。因此,探讨慢性痛过程中发生在脑水平的可塑性变化,成为近年来疼痛研究的热点方向。

本课题组十多年来,从慢性痛的外周敏化机制研究开始,围绕伤害性信息整合分子——瞬时受体电位香草酸亚型1(transient receptor potential vanilloid type 1, TRPV1)展开了系列工作,并在此基础上开发了一些具有镇痛作用的短肽物质,近年来又应用现代神经科学技术如光遗传学、化学遗传学等,将研究工作拓展到痛情绪的脑机制研究上。此外,我们还在改善现有TRPV1靶点镇痛药物,降低其毒副作用等方面进行了相关研究。在《生理学报》创刊90周年之际,我们对本课题组十余年来围绕TRPV1完成的相关工作进行总结,以作献礼。

## 1 TRPV1的敏化和膜定位调控机制研究

外周伤害性感受器上分布着各种可以接受冷、

热、化学和机械等不同形式刺激的受体,这些受体构成了机体进行温度、化学或机械感受的物质基础。其中,有一种高表达在伤害性感受相关的中小直径初级感觉神经元中的受体——TRPV1备受关注。它不仅可以被热( $> 43\text{ }^{\circ}\text{C}$ )、酸( $\text{pH} < 5.9$ )、辣椒素(capsaicin, 辣椒中负责引起辛辣口感的成分)和内源性大麻素如N-花生四烯酸乙醇胺(anandamide, AEA)等多种形式的刺激所激活,在组织炎症或神经损伤的情况下,还可以在局部炎症介质如缓激肽、前列腺素 $\text{E}_2$ (prostaglandin  $\text{E}_2$ ,  $\text{PGE}_2$ )、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和ATP等刺激下发生功能敏化(sensitization),表现出激活阈值下降、通道电流增大和膜定位增多等现象<sup>[8]</sup>。基于TRPV1的上述功能特性即可以“整合”多种不同形式的刺激,它被称为外周伤害性信息整合分子。作为一种非选择性阳离子通道( $\text{P}_{\text{Ca}/\text{Na}} \approx 10$ ),TRPV1在激活之后可以引起 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 内流,从而促进神经元的兴奋及相关神经递质或神经肽的释放。

TRPV1之所以吸引人们的广泛关注,主要原因在于它在伤害性热感受和病理性热痛敏的形成过程中发挥着至关重要的作用。*Trpv1*基因敲除小鼠对伤害性热刺激的反应性显著降低,尤其是炎症痛模型鼠的热痛觉敏化行为显著减弱<sup>[9,10]</sup>。同一家族温度敏感的TRPV2虽然可以被 $>52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的热刺激激活,但*trpv2*基因敲除小鼠并未表现出热感受的异常<sup>[11]</sup>;TRPV3的温度激活阈值为 $33\sim 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,主要分布在皮肤角化细胞<sup>[12]</sup>,在维持皮肤和毛发的正常生理功能中发挥重要作用<sup>[13]</sup>;TRPV4的温度激活阈值为 $27\sim 34\text{ }^{\circ}\text{C}$ <sup>[14]</sup>,在角化细胞和初级感觉神经元等多种组织中有着广泛的表达,参与细胞的渗透压和机械感受<sup>[15]</sup>。随后的这些发现进一步巩固了TRPV1在伤害性热感受和热痛敏形成过程中的核心地位,因此TRPV1被广泛应用为背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)热感受神经元的分子标记物。近年来,虽然越来越多的热感受分子如TRPM3(transient receptor potential melastatin-3),钙激活氯通道(anoctamin-1, Ano1)和双孔钾通道(two-pore domain potassium channels, K2P)等被陆续发现<sup>[16-18]</sup>,但通过对TRPV1-DTR(diphtheria toxin receptor)小鼠注射白喉毒素,选择性损毁TRPV1阳性神经元的研究再次证实,这些神经元对小鼠 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上热刺激的伤害性回避行为以及伤害性热刺激信息从外周向脊髓背角的传递是必需的<sup>[19,20]</sup>。

敏化是 TRPV1 通道最显著的功能特征之一,也是热痛觉敏化形成的关键因素,其形成可归因于转录和转录后水平的调控,其中磷酸化修饰是 TRPV1 最为重要的一种转录后调控机制。有文献相继报道了蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)<sup>[21]</sup>、蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)<sup>[22]</sup>、磷脂酰肌醇-3 激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)<sup>[23]</sup> 和 Ca<sup>2+</sup>/钙调素依赖型蛋白激酶 II (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII)<sup>[24]</sup> 等对 TRPV1 的磷酸化及其在功能敏化中的作用。本研究组前期在稳定表达 TRPV1 的 CHO 细胞进行的免疫共沉淀研究显示, TRPV1 可以和 PKC $\mu$  即蛋白激酶 D1 (protein kinase D1, PKD1) 形成复合物,而未检测到 TRPV1 与其他 PKC 亚型直接的相互作用<sup>[25]</sup>。因此,本研究组最终将目标锁定在 PKD1 上。PKD1 最初被归为 PKC 家族,称为非典型 PKC 亚型。但由于其在激酶特性和蛋白结构上与 PKC 差异显著,而在底物特异上与 CaMK 家族保持较高的相似性,因此 PKD1 最终被归为 CaMK 家族<sup>[26]</sup>。我们的研究结果显示, PKD1 不仅可以与 TRPV1 氨基端发生结合,还可以直接对其 S116 进行磷酸化,并且这种磷酸化作用显著增加了 TRPV1 对辣椒素刺激的反应性<sup>[25]</sup>。该研究为当时尚处空白的 PKD1 生理功能研究提供了重要依据,也为我们今后探讨在体情况下, PKD1 对 TRPV1 的功能调控及其在炎症热痛敏中的可能作用奠定了基础。

我们随后的研究工作表明,在足底注射完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 诱导的大鼠炎症痛模型中,通过鞘内注射使 DRG 神经元过表达 PKD1 能显著加重大鼠热痛敏行为,而过表达负显性突变的 PKD1 (dominant negative PKD1, D727A-PKD1) 或注射 PKD1 反义寡核苷酸则可以起到缓解热痛敏行为的作用,同时对机械痛敏没有影响。在炎症痛模型鼠的 DRG 神经元中,可以观察到 PKD1 膜定位的增多及其与 TRPV1 的共定位,同时生化检测可发现二者的相互结合。在急性分离的 DRG 神经元中的研究显示,当增强 PKD1 活性时, TRPV1 的膜表达增多,辣椒素诱发的电流幅度增大<sup>[27]</sup>。该研究首次揭示了在体情况下“PKD1-TRPV1”之间的相互作用及其促进炎症热痛敏行为产生的效应,也是首次在整体动物水平阐明 PKD1 在神经系统中的功能。随后,Amadesi 等人的研究进一步验证了 PKD1 和 TRPV1 在 DRG 神经元中的

共定位<sup>[28]</sup>。他们的研究显示, PKD1/2 在 DRG 小直径肽能和非肽能神经元以及中大直径神经元中有着广泛的分布,其中 PKD1/2 阳性神经元中约有 30%~40% 同时为 TRPV1 阳性,并且在组织损伤或炎症过程中,蛋白酶活化受体 2 (protease-activated receptor 2, PAR<sub>2</sub>) 激活可促进 PKD1/2 膜定位的增多。该研究为 PKD1/2 调控 TRPV1 功能并参与炎症热痛敏的形成提供了进一步的依据。

除 PKD1 外,我们还发现另外一种在神经系统高表达的蛋白激酶 Cdk5 (cyclin-dependent kinase 5) 参与炎症热痛觉敏化, TRPV1 是其作用靶点之一。与 Cdk 家族的其它成员不同, Cdk5 的激活不依赖于周期素 (cyclin), 而有其独特的激活子 p35 和 p39 (或其降解产物 p25 和 p29)。我们以及国外一研究组最先报道了 Cdk5 参与炎症热痛敏的作用<sup>[29,30]</sup>。在 CFA 诱导炎症痛模型鼠中,外周 DRG 和脊髓背角 Cdk5 有显著激活,经鞘内注射过表达 Cdk5 可明显加重炎症痛模型鼠热痛敏行为,而过表达负显性突变的 Cdk5 (dominant negative Cdk5, D144N-Cdk5) 或给予 Cdk5 的抑制剂 roscovitine 可减轻热痛敏行为。

在随后对 Cdk5 调控炎症热痛敏的靶点寻找上,国外研究组抢先报道了 Cdk5 对 TRPV1-T407 (此为小鼠序列,对应大鼠序列为 T406) 的磷酸化作用<sup>[31]</sup>。考虑到 TRPV1 作为一种膜受体发挥功能,而当时尚未见关于 TRPV1 膜转运机制的相关报道,我们转而研究 TRPV1 的膜转运机制及 Cdk5 在其中可能发挥的调控作用。我们的工作首次证明动力蛋白——驱动蛋白样蛋白 13B (kinesin-like protein 13B, KIF13B) 参与 TRPV1 膜转运,并且 Cdk5 可磷酸化 KIF13B 的 FHA 结构域 (forkhead-associated domain) T506, 促进 TRPV1 与 KIF13B 的结合以及 TRPV1 的膜表达<sup>[32]</sup>。在此基础上,我们还利用 Tat (trans-activating transcriptional activator) 技术构建了穿膜肽 Tat-KIF13B-T506。Tat 是人类 I 型免疫缺陷病毒的一种转录激活蛋白,它是一段富含碱性氨基酸 (主要为精氨酸和赖氨酸) 的短肽,长度为 9~11 个氨基酸残基不等。Tat 具有很强的细胞穿透性,温度适应性很广,能负载包括小分子物质、核酸、肽和蛋白质在内的各种形式及分子量的物质进入细胞内,并且不影响后者的功能。通过 Tat-KIF13B-T506 特异性干扰 KIF13B 在 T506 位点的磷酸化,可显著减少 TRPV1 的膜表达,降低细胞对辣椒素

的反应性, 行为学上表现出缓解炎症热痛敏行为的效应。

对于 Cdk5 调控炎症热痛敏的机制, 除上述“Cdk5-KIF13B-TRPV1”通路之外, 我们还根据文献报道, 对 Cdk5 对 TRPV1 直接的磷酸化作用进行了相关研究。结果表明, Cdk5 对 TRPV1-T406 的磷酸化可促进 TRPV1 的膜定位, 针对该位点的磷酸化干扰肽 Tat-TRPV1-T406 可发挥与 Tat-KIF13B-T506 类似的效应——减少 TRPV1 的膜表达, 降低细胞对辣椒素的反应性, 缓解炎症痛大鼠热痛敏行为<sup>[33]</sup>。最近有文献对 Cdk5 通过磷酸化对 TRPV1 发挥的功能调控作用进行了详细研究<sup>[34]</sup>。结果表明, TRPV1 拟磷酸化突变体 TRPV1-T406D 与野生型相比, 通道激活动力学减慢, 但失敏现象被显著抑制, 并表现出使用依赖的激活特性 (use-dependent activation pattern), 即在初始状态, 突变体对低剂量激动剂的反应性显著减弱, 几近完全消失, 而当其被大剂量激动剂充分激活之后, 突变体对不同剂量激动剂的反应性显著升高。同时, 该研究还揭示 TRPV1-T406 的磷酸化状态与通道的门控特性有关。

上述参与 TRPV1 磷酸化调控的蛋白激酶需要稳定的细胞骨架结构帮助其锚定于胞膜或近胞膜区域, 以接近作用底物。因此, 我们注意到一种微丝动力学的调节分子——LIMK (LIM motif-containing protein kinase) 蛋白激酶。与其他蛋白激酶具有多样性的底物不同, LIMK 激酶目前只有唯一的作用底物——肌动蛋白解聚因子/丝切蛋白 cofilin。我们在 CFA 诱导大鼠炎症痛模型上, 对 LIMK 在炎症热痛敏过程及其对 TRPV1 可能发挥的调控作用进行了研究。结果显示, 随着炎症热痛敏的发生, DRG 组织中 LIMK 激酶活性显著升高, cofilin 磷酸化增强而活性降低, 肌动蛋白聚合为微丝的能力增强<sup>[35]</sup>。相反地, 如果抑制 LIMK 激酶活性或敲减其表达, 或通过磷酸化干扰肽 Tat-cofilin-S3 干扰其底物 cofilin 的磷酸化不仅可抑制微丝聚合, 还可以发挥对热痛敏行为的缓解作用。随着 LIMK 功能或 cofilin 磷酸化被抑制 (cofilin 活性增强→微丝聚合减弱→蛋白激酶锚定减少), TRPV1 通道对辣椒素刺激的反应性下降, 其丝氨酸磷酸化水平降低。综上所述, 如果说 Cdk5 促进 TRPV1 膜定位是通过一种主动的膜转运调控机制实现的, 那么 LIMK 增强 TRPV1 功能则是通过一种被动的促进受体或离子通道膜定位的机制来实现。

## 2 痛情绪的中枢机制研究及 TRPV1 在其中可能的作用探讨

慢性痛作为困扰临床的一大顽疾, 往往表现出迁延不愈、反复发作的特点, 而关于慢性痛和焦虑、抑郁共病 (comorbidity) 的现象受到越来越多的关注<sup>[36, 37]</sup>, 这也促使我们对慢性痛尤其是痛情绪的中枢机制展开探讨。

前额叶皮质 (prefrontal cortex) 是一个在决策、目标导向行为和工作记忆等高级神经活动中发挥重要作用的脑区, 同时又参与痛觉信息处理, 那么其是否可能参与慢性痛中痛感觉或痛情绪的调控呢? 我们在 CFA 诱导炎症痛模型上的研究显示, CFA 注射后 1 天, 大鼠即可产生焦虑样行为, 化学损毁对侧前边缘皮质可同时发挥缓解热痛敏和焦虑样行为的效应<sup>[38]</sup>。电生理学记录显示, 模型鼠对侧前边缘皮质 II/III 层锥体神经元活性明显下降, 如果应用光遗传学技术激活这些神经元, 可有效缓解模型鼠热痛敏和焦虑样行为, 相反地, 如果抑制这些神经元的活性, 能够在正常小鼠中诱导焦虑样行为, 而对其痛感受无明显影响。在分子机制上, 蛋白激酶 Cdk5 的激活介导了这些神经元内在兴奋性的下降。敲减对侧前额叶皮质 Cdk5 表达或注射其抑制剂能够翻转 CFA 诱导的神经元活性下降, 同时模型鼠的热痛敏和焦虑样行为得到缓解。该研究是继前扣带回 (anterior cingulate cortex) 被提出作为慢性痛和焦虑相互作用的重要脑区之后<sup>[39]</sup>, 首次提出前额叶皮质的前边缘皮质亚区在二者的相互作用中发挥关键作用。

与我们的研究结果相一致, Lee 等几乎在同期揭示, 光激活前边缘皮质神经元可缓解选择性神经损伤 (spared nerve injury, SNI) 模型大鼠机械诱发痛、热和冷痛敏行为, 同时对这些大鼠在糖水偏好和强迫游泳等实验中表现出的抑郁样行为具有显著缓解作用<sup>[40]</sup>。随着中枢 TRPV1 的功能被越来越多的研究所揭示, 这种在外周热痛觉敏化中发挥关键作用的分子是否也可能参与到疼痛的中枢调控, 尤其是在我们前述所关注的前额叶皮质部位? 在对痛感觉的影响方面, de Novellis 等报道, 脊神经结扎 (spinal nerve ligation, SNL) 术后 7 天大鼠前额叶皮质之前/下边缘皮质亚区 TRPV1 蛋白含量显著上调, 此时若向该部位注射 TRPV1 拮抗剂 I-RTX 可产生即刻 (< 40 min) 的镇痛效应, 大鼠机械抬足阈值升高约 50%, 触诱发痛 (allodynia) 现象减轻<sup>[41]</sup>。

而另一方面, 对于前额叶皮质及其前边缘皮质亚区 TRPV1 激活参与焦虑情绪的产生也有相关报道<sup>[42-44]</sup>。这些工作虽然只是单方面地对痛感觉或焦虑情绪进行了研究, 并未对痛相关的焦虑情绪进行直接的研究, 但至少提示了前额叶皮质 TRPV1 可能参与痛情绪的产生。

上述过程中 TRPV1 的激活依赖于其内源性激动剂 anandamide 水平的升高。当 anandamide 含量较低时, 会优先作用于其高亲和力的大麻素受体 1 (cannabinoid receptor type 1, CB1), 抑制焦虑、恐惧等情绪的表达, 而当 anandamide 水平进一步升高时, 则可引起 TRPV1 的激活并促进焦虑情绪的表达<sup>[43]</sup>, 因此在中枢, 发挥兴奋性作用的 TRPV1 往往与具有抑制性作用的大麻素受体发挥着相反或拮抗的作用, 这也就提示中枢 TRPV1 的功能与内源性大麻素系统有着密切的关系。

### 3 镇痛药物相关研究

慢性痛是一种难治性疾病, 现有镇痛药物疗效有限, 或具有显著的毒副作用而限制其在临床上的广泛应用。因此, 改善现有镇痛药物, 减少其副作用, 比如增强 TRPV1 激动剂——辣椒素的镇痛效应, 减弱或消除烧灼痛的副作用, 也是疼痛研究领域的重要问题。

辣椒素用于镇痛治疗有着悠久的历史, 可用于复杂性区域疼痛综合征、疱疹后神经痛、痛性糖尿病外周神经病和慢性肌肉关节痛等多种疼痛的治疗<sup>[45]</sup>。其镇痛作用的主要机制为诱导 TRPV1 失敏, 而在用药初始即受体失敏之前出现的短暂激活现象, 可使病人产生强烈的烧灼痛, 从而妨碍病人的进一步用药。此时, 若将辣椒素受体拮抗剂与辣椒素合用, 拮抗剂可能通过短暂的受体封闭作用而缓解烧灼痛感, 同时不影响辣椒素诱导 TRPV1 失敏的效应。遗憾的是, 应用最为广泛的 TRPV1 受体拮抗剂——capsazepine 作用强度中等, 并且特异性较差, 除 TRPV1 外还可以作用于超极化激活环核苷酸门控通道 (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel, HCN)、上皮钠通道 (epithelial Na<sup>+</sup> channel, ENaC) 通道和 ATP 受体等<sup>[46-48]</sup>, 因此开发作用强、特异性高的 TRPV1 受体拮抗剂十分必要。

我们与美国的 Peter M Blumberg 实验室 (National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, USA) 合作, 通

过改变辣椒素及其类似物结构中的一些化学基团, 得到了两种高效、特异的 TRPV1 受体竞争性拮抗剂——KJM429 和 JYL1421<sup>[49]</sup>。其中, JYL1421 的效应更为强大, 在抑制辣椒素诱导钙内流方面的效应较 capsazepine 强 60 倍, 并且 JYL1421 可同时阻断辣椒素、热和低 pH 值三种不同刺激诱导的 TRPV1 激活, 而 capsazepine 对热和低 pH 诱导的 TRPV1 反应表现出较弱的拮抗作用。与此同时, JYL1421 避免了 capsazepine 所具有的对 ATP 诱导钙内流的非特异性抑制效应。因此, JYL1421 可能成为较 capsazepine 更为优化的 TRPV1 受体拮抗剂。

此外, 我们还发现两种 TRPV1 受体部分激动剂——JYL827 和 JYL1511<sup>[50]</sup>。这些部分激动剂在标准条件下仅表现出弱激动剂的特性, 容易被误认为拮抗剂, 而一旦 pH 值、温度、受体密度或 PKC 激活程度发生变化, 它们对 TRPV1 受体的激动程度也会随之发生改变, 甚至转变为完全激动剂。这一现象的发现, 一方面为今后 TRPV1 受体拮抗剂的药物筛选起到了警示作用, 即筛选过程中需严格控制筛选条件如 pH 值、温度和受体密度等; 另一方面也提示部分激动剂可能具有潜在的临床应用前景, 在炎症或某些病理情况下, 它们的激动作用可能随着组织环境的变化而增强, 而在正常组织中仍然保持弱的激动作用, 因此可能减少药物的毒副作用。该研究为靶向 TRPV1 受体的镇痛药物研发提供了新思路。

### 4 总结与展望

十余年来的, 我们围绕伤害性信息整合分子——TRPV1, 对其磷酸化调控和膜转运机制展开了系列研究工作, 开发出了 Tat-KIF13B-T506, Tat-TRPV1-T406 和 Tat-cofilin-S3 等具有镇痛作用的短肽物质; 在靶向 TRPV1 的镇痛药物研发方面, 得到了两种高效、特异的 TRPV1 受体竞争性拮抗剂——KJM429 和 JYL1421, 同时阐明了 TRPV1 受体部分激动剂——JYL827 和 JYL1511 的功能特性 (图 1)。近年来, 我们还在痛情绪的中枢机制研究方面取得了一定进展。我们预计, 未来慢性痛的外周和脊髓敏化机制以及靶向 TRPV1 的药物研究仍将是疼痛研究领域的重要问题, 而随着光遗传学、化学遗传学、活体小动物成像等新兴技术的广泛开展, 关于慢性痛的中枢机制也将得到越来越充分的认识。

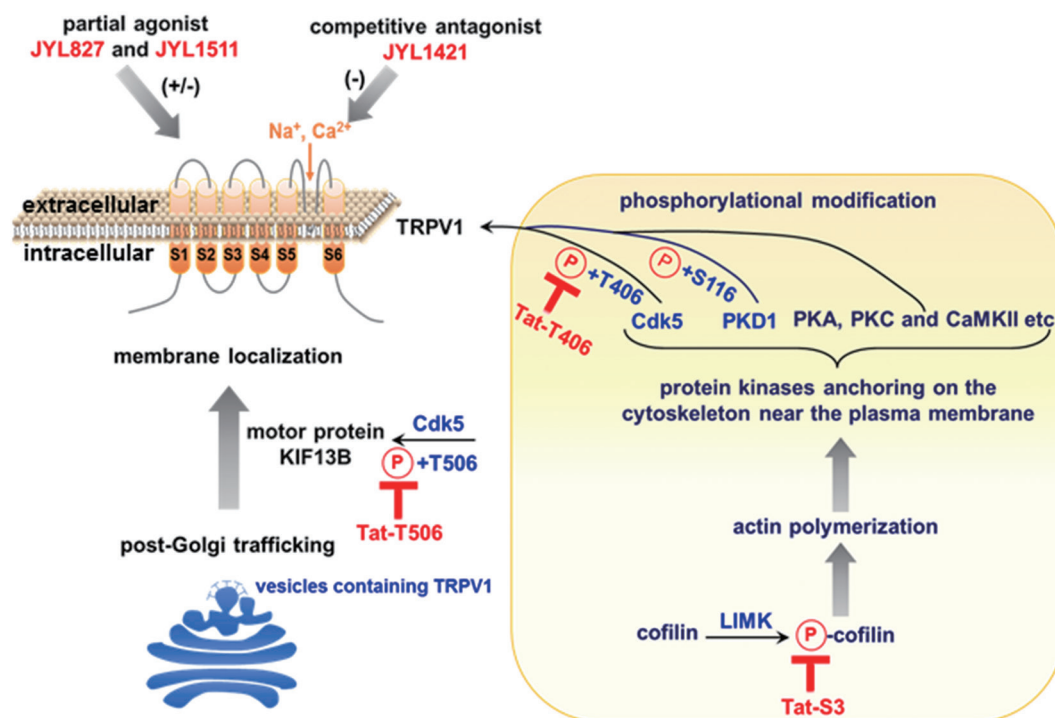


图 1. 本课题组关于TRPV1外周调控机制的工作总结图

Fig. 1. Summary of the studies on the regulatory mechanisms of peripheral TRPV1 in our lab. TRPV1 can be phosphorylated by protein kinases, including Cdk5 and PKD1, and the anchoring of these protein kinases on the cytoskeleton is modulated by LIMK. On the other hand, Cdk5 can phosphorylate the motor protein KIF13B and promotes the membrane trafficking of TRPV1. Application of the technique of Tat-transmembrane peptide can specifically disrupt the above phosphorylation process. In addition, our lab participated in the development of the partial agonists of TRPV1, JYL827 and JYL1511, and the competitive antagonist JYL1421. CaMKII, calcium-calmodulin dependent kinase II; Cdk5, cyclin-dependent kinase 5; KIF13B, kinesin-like protein 13B; LIMK, LIM-motif containing kinase; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; PKD1, protein kinase D1; Tat-T506, Tat-KIF13B-T506; Tat-T406, Tat-TRPV1-T406; Tat-S3, Tat-cofilin-S3.

### 参考文献

- Williams AC, Craig KD. Updating the definition of pain. *Pain* 2016; 157(11): 2420–2423.
- Goldberg DS, McGee SJ. Pain as a global public health priority. *BMC Public Health* 2011; 11: 770.
- Knaster P, Karlsson H, Estlander AM, Kalso E. Psychiatric disorders as assessed with SCID in chronic pain patients: the anxiety disorders precede the onset of pain. *Gen Hosp Psychiatry* 2012; 34(1): 46–52.
- Gold MS, Gebhart GF. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat Med* 2010; 16(11): 1248–1257.
- Kuner R. Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med* 2010; 16(11): 1258–1266.
- Rask-Andersen M, Zhang J, Fabbro D, Schioth HB. Advances in kinase targeting: current clinical use and clinical trials. *Trends Pharmacol Sci* 2014; 35(11): 604–620.
- Gilron I, Jensen TS, Dickenson AH. Combination pharmacotherapy for management of chronic pain: from bench to bedside. *Lancet Neurol* 2013; 12(11): 1084–1095.
- Julius D. TRP channels and pain. *Annual Rev Cell Dev Biol* 2013; 29: 355–384.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitl KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 2000; 288(5464): 306–313.
- Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 2000; 405(6783): 183–187.
- Park U, Vastani N, Guan Y, Raja SN, Koltzenburg M, Caterina MJ. TRP vanilloid 2 knock-out mice are susceptible to perinatal lethality but display normal thermal and mechanical

- nociception. *J Neurosci* 2011; 31(32):11425–11436.
- 12 Peier AM1, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, Story GM, Colley S, Hogenesch JB, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A. A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* 2002; 296(5575): 2046–2049.
  - 13 Cheng X, Jin J, Hu L, Shen D, Dong XP, Samie MA, Knoff J, Eisinger B, Liu ML, Huang SM, Caterina MJ, Dempsey P, Michael LE, Dlugosz AA, Andrews NC, Clapham DE, Xu H. TRP channel regulates EGFR signaling in hair morphogenesis and skin barrier formation. *Cell* 2010; 141(2): 331–343.
  - 14 Guler AD, Lee H, Iida T, Shimizu I, Tominaga M, Caterina M. Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci* 2002; 22(15): 6408–6414.
  - 15 Liedtke W, Friedman JM. Abnormal osmotic regulation in *trpv4*<sup>-/-</sup> mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(23): 13698–13703.
  - 16 Cho H, Yang YD, Lee J, Lee B, Kim T, Jang Y, Back SK, Na HS, Harfe BD, Wang F, Raouf R, Wood JN, Oh U. The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons. *Nat Neurosci* 2012; 15(7): 1015–1021.
  - 17 Noël J, Zimmermann K, Busserolles J, Deval E, Alloui A, Diochot S, Guy N, Borsotto M, Reeh P, Eschalier A, Lazdunski M. The mechano-activated K<sup>+</sup> channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J* 2009; 28(9):1308–1318.
  - 18 Vriens J, Owsianik G, Hofmann T, Philipp SE, Stab J, Chen X, Benoit M, Xue F, Janssens A, Kerselaers S, Oberwinkler J, Vennekens R, Gudermann T, Nilius B, Voets T. TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron* 2011; 70(3): 482–494.
  - 19 Pogorzala LA, Mishra SK, Hoon MA. The cellular code for mammalian thermosensation. *J Neurosci* 2013; 33(13): 5533–5541.
  - 20 Ran C, Hoon MA, Chen X. The coding of cutaneous temperature in the spinal cord. *Nat Neurosci* 2016; 19(9): 1201–1209.
  - 21 Bhave G, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RW 4th. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron* 2002; 35(4): 721–731.
  - 22 Premkumar LS, Ahern GP. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* 2000; 408(6815): 985–990.
  - 23 Bonnington JK, McNaughton PA. Signalling pathways involved in the sensitisation of mouse nociceptive neurones by nerve growth factor. *J Physiol* 2003; 551(Pt 2): 433–446.
  - 24 Jung J, Shin JS, Lee SY, Hwang SW, Koo J, Cho H, Oh U. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J Biol Chem* 2004; 279(8): 7048–7054.
  - 25 Wang Y, Kedei N, Wang M, Wang QJ, Huppler AR, Toth A, Tran R, Blumberg PM. Interaction between protein kinase C $\alpha$  and the vanilloid receptor type 1. *J Biol Chem* 2004; 279(51): 53674–53682.
  - 26 Sundram V, Chauhan SC, Jaggi M. Emerging roles of protein kinase D1 in cancer. *Mol Cancer Res* 2011; 9(8): 985–996.
  - 27 Zhu H, Yang Y, Zhang H, Han Y, Li Y, Zhang Y, Yin D, He Q, Zhao Z, Blumberg PM, Han J, Wang Y. Interaction between protein kinase D1 and transient receptor potential V1 in primary sensory neurons is involved in heat hypersensitivity. *Pain* 2008; 137(3): 574–588.
  - 28 Amadesi S, Grant AD, Cottrell GS, Vaksman N, Poole DP, Rozengurt E, Bunnett NW. Protein kinase D isoforms are expressed in rat and mouse primary sensory neurons and are activated by agonists of protease-activated receptor 2. *J Comp Neurol* 2009; 516(2): 141–156.
  - 29 Pareek TK, Keller J, Kesavapany S, Pant HC, Iadarola MJ, Brady RO, Kulkarni AB. Cyclin-dependent kinase 5 activity regulates pain signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(3): 791–796.
  - 30 Yang YR, He Y, Zhang Y, Li Y, Li Y, Han Y, Zhu H, Wang Y. Activation of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) in primary sensory and dorsal horn neurons by peripheral inflammation contributes to heat hyperalgesia. *Pain* 2007; 127(1–2): 109–120.
  - 31 Pareek TK, Keller J, Kesavapany S, Agarwal N, Kuner R, Pant HC, Iadarola MJ, Brady RO, Kulkarni AB. Cyclin-dependent kinase 5 modulates nociceptive signaling through direct phosphorylation of transient receptor potential vanilloid 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(2): 660–665.
  - 32 Xing BM, Yang YR, Du JX, Chen HJ, Qi C, Huang ZH, Zhang Y, Wang Y. Cyclin-dependent kinase 5 controls TRPV1 membrane trafficking and the heat sensitivity of nociceptors through KIF13B. *J Neurosci* 2012; 32(42): 14709–14721.
  - 33 Liu J, Du J, Yang Y, Wang Y. Phosphorylation of TRPV1 by cyclin-dependent kinase 5 promotes TRPV1 surface localization, leading to inflammatory thermal hyperalgesia. *Exp Neurol* 2015; 273: 253–262.
  - 34 Jendryke T, Prochazkova M, Hall BE, Nordmann GC, Schladt M, Milenkovic VM, Kulkarni AB, Wetzel CH. TRPV1 function is modulated by Cdk5-mediated phosphorylation: insights into the molecular mechanism of nociception. *Sci Rep* 2016; 6: 22007.
  - 35 Li Y, Hu F, Chen HJ, Du YJ, Xie ZY, Zhang Y, Wang J, Wang Y. LIMK-dependent actin polymerization in primary

- sensory neurons promotes the development of inflammatory heat hyperalgesia in rats. *Sci Signal* 2014; 7(331): ra61.
- 36 Bandelow B. Generalized anxiety disorder and pain. *Mod Trends Pharmacopsychiatry* 2015; 30: 153–165.
- 37 Li JX. Pain and depression comorbidity: a preclinical perspective. *Behav Brain Res* 2015; 276: 92–98.
- 38 Wang GQ, Cen C, Li C, Cao S, Wang N, Zhou Z, Liu XM, Xu Y, Tian NX, Zhang Y, Wang J, Wang LP, Wang Y. Deactivation of excitatory neurons in the prelimbic cortex via Cdk5 promotes pain sensation and anxiety. *Nat Commun* 2015; 6: 7660.
- 39 Koga K, Descalzi G, Chen T, Ko HG, Lu J, Li S, Son J, Kim T, Kwak C, Haganir RL, Zhao MG, Kaang BK, Collingridge GL, Zhuo M. Coexistence of two forms of LTP in ACC provides a synaptic mechanism for the interactions between anxiety and chronic pain. *Neuron* 2015; 85(2): 377–389.
- 40 Lee M, Manders TR, Eberle SE, Su C, D'amour J, Yang R, Lin HY, Deisseroth K, Froemke RC, Wang J. Activation of corticostriatal circuitry relieves chronic neuropathic pain. *J Neurosci* 2015; 35(13): 5247–5259.
- 41 de Novellis V, Vita D, Gatta L, Luongo L, Bellini G, De Chiaro M, Marabese I, Siniscalco D, Boccella S, Piscitelli F, Di Marzo V, Palazzo E, Rossi F, Maione S. The blockade of the transient receptor potential vanilloid type 1 and fatty acid amide hydrolase decreases symptoms and central sequelae in the medial prefrontal cortex of neuropathic rats. *Mol Pain* 2011; 7: 7.
- 42 Aguiar DC, Terzian AL, Guimarães FS, Moreira FA. Anxiolytic-like effects induced by blockade of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels in the medial prefrontal cortex of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2009; 205(2): 217–225.
- 43 Fogaça MV, Aguiar DC, Moreira FA, Guimarães FS. The endocannabinoid and endovanilloid systems interact in the rat prelimbic medial prefrontal cortex to control anxiety-like behavior. *Neuropharmacology* 2012; 63(2): 202–210.
- 44 Rubino T, Realini N, Castiglioni C, Guidali C, Viganó D, Marras E, Petrosino S, Perletti G, Maccarrone M, Di Marzo V, Parolaro D. Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 2008; 18(6): 1292–1301.
- 45 Fattori V, Hohmann MS, Rossaneis AC, Pinho-Ribeiro FA, Verri WA. Capsaicin: Current understanding of its mechanisms and therapy of pain and other pre-clinical and clinical uses. *Molecules* 2016; 21(7): pii: E844.
- 46 Gill CH, Randall A, Bates SA, Hill K, Owen D, Larkman PM, Cairns W, Yusuf SP, Murdock PR, Stribos PJ, Powell AJ, Benham CD, Davies CH. Characterization of the human HCN1 channel and its inhibition by capsazepine. *Br J Pharmacol* 2004; 143(3): 411–421.
- 47 Yamamura H, Ugawa S, Ueda T, Nagao M, Shimada S. Capsazepine is a novel activator of the delta subunit of the human epithelial Na<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* 2004; 279(43): 44483–44489.
- 48 Zuo GF, Li MH, Zhang JX, Li B, Wang ZM, Wang Q, Xiao H, Chen SL. Capsazepine concentration dependently inhibits currents in HEK 293 cells mediated by human hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated 2 and 4 channels. *Exp Biol Med* 2013; 238(9): 1055–1061.
- 49 Wang Y, Szabo T, Welter JD, Toth A, Tran R, Lee J, Kang SU, Suh YG, Blumberg PM, Lee J. High affinity antagonists of the vanilloid receptor. *Mol Pharmacol* 2002; 62(4): 947–956.
- 50 Wang Y, Toth A, Tran R, Szabo T, Welter JD, Blumberg PM, Lee J, Kang SU, Lim JO, Lee J. High-affinity partial agonists of the vanilloid receptor. *Mol Pharmacol* 2003; 64(2): 325–333.