

# 雷帕霉素对核苷类逆转录酶抑制剂 治疗人类免疫缺陷病毒感染 并发神经病理性痛的影响

武良玉 程灏

**【摘要】目的** 探讨雷帕霉素对核苷类逆转录酶抑制剂(NRTIs)类药物治疗人类免疫缺陷病毒(HIV)感染并发神经病理性痛的影响。**方法** 40只健康雄性昆明小鼠随机分为对照组、司他夫定组、雷帕霉素+司他夫定组和羧甲基纤维素钠(CMC-Na)组(每组各10只)。司他夫定组和雷帕霉素+司他夫定组小鼠每隔24 h灌胃给予相应剂量的药物,对照组和CMC-Na组分别给予同等剂量的生理盐水和0.5% CMC-Na。分别于给药后7、14、21、28、35和42 d测定小鼠机械缩足反应阈和热缩足潜伏期,应用Western blot蛋白印迹检测小鼠脊髓组织中哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的表达。**结果** 给予司他夫定后7、14、21、28、35和42 d小鼠的机械/热痛阈值均显著下降( $P < 0.01$ )。与司他夫定组小鼠相比,雷帕霉素+司他夫定组小鼠在给药后7、14、21、28、35和42 d机械/热痛阈值均显著增加( $P < 0.05$ ),其中给药后42 d,雷帕霉素缓解司他夫定所致小鼠机械痛敏[ $(8.41 \pm 0.17)$  vs.  $(7.40 \pm 0.13)$ ,  $t = 4.89$ ,  $P = 0.034$ ]和热痛敏[ $(6.25 \pm 0.16)$  vs.  $(4.43 \pm 0.21)$ ,  $t = 13.32$ ,  $P < 0.001$ ]的效应达到最大,差异有统计学意义。Western blot蛋白印迹结果显示,雷帕霉素+司他夫定组小鼠与司他夫定组小鼠相比,雷帕霉素可显著逆转司他夫定所致小鼠脊髓组织中磷酸化mTOR蛋白表达增加[ $(0.72 \pm 0.04)$  vs.  $(0.86 \pm 0.03)$ ,  $t = 4.24$ ,  $P = 0.045$ ]。**结论** 雷帕霉素可能通过抑制mTOR蛋白磷酸化而缓解NRTIs类药物治疗HIV感染并发的神经病理性痛。

**【关键词】** 雷帕霉素; 核苷类逆转录酶抑制剂; 人类免疫缺陷病毒; 神经病理性痛; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

**Effects of rapamycin on the neuropathic pain complicated with nucleoside reverse transcriptase inhibitors treatment of human immunodeficiency virus infection** Wu Liangyu, Cheng Hao. Department of Anesthesiology, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China  
Corresponding author: Cheng Hao, Email: chenghaoen@yahoo.com

**【Abstract】Objective** To investigate the effect of rapamycin on neuropathic pain complicated with nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) treatment of human immunodeficiency virus (HIV) infection. **Methods** Forty male mice were divided into control group, stavudine group, rapamycin + stavudine group and sodium carboxymethyl cellulose (CMC-Na) group ( $n = 10$ ), randomly. Mice in stavudine group and rapamycin + stavudine group were intragastrically administered corresponding dose of drug every 24 h, and equivalent dose of saline and 0.5% CMC-Na were given to mice of control and CMC-Na groups, respectively. Behavioral tests were conducted at 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days after drug administration, and the expression of mammalian target of rapamycin (mTOR) in spinal cord of mice was detected by Western blot. **Results** The mechanical sensitivity and dramatic thermal hyperalgesia to noxious plantar heat stimulation decreased significantly in mice at 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days after stavudine administration (all  $P < 0.01$ ). The mechanical threshold in mice was significantly increased and thermal hyperalgesia was reversed in rapamycin + stavudine group at 7, 14, 21, 28, 35, 42 days after stavudine administration compared with stavudine group (all  $P <$

0.05); among which, on the 42nd day after stavudine administration, the effect of rapamycin on mechanical allodynia [(8.41 ± 0.17) vs. (7.40 ± 0.13);  $t = 4.89$ ,  $P = 0.034$ ] and thermal hyperalgesia [(6.25 ± 0.16) vs. (4.43 ± 0.21);  $t = 13.32$ ,  $P < 0.001$ ] in mice were both at the maximum level, with significant differences. Western blot result showed that rapamycin significantly reversed the increased expression of phospho-mTOR in the spinal cord of mice caused by stavudine compared with stavudine group [0.72 ± 0.04] vs. (0.86 ± 0.03);  $t = 4.24$ ,  $P = 0.045$ ]. **Conclusion** Rapamycin could relieve the neuropathic pain associated with NRTIs treatment of HIV by inhibiting the phosphorylation of mTOR.

**【Key words】** Rapamycin; Nucleoside reverse transcriptase inhibitors; Human immunodeficiency virus; Neuropathic pain; Mammalian target of rapamycin

核苷类逆转录酶抑制剂 (nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NRTIs) 是临床应用最早且种类最多的抗人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 药物, 在高效抗病毒逆转录治疗 (highly active anti-retroviral therapy, HAART) 中发挥着重要作用<sup>[1-2]</sup>; 但NRTIs类药物可引起周围神经病理性痛, 这种疼痛与HIV本身嗜神经性所致缓慢进展的神经病理性痛不同, 主要表现为药物治疗约10周突然发生双足烧灼样疼痛并可延及双上肢, 可持续数周甚至数月, 停止该类药物治疗, 疼痛反而进一步加剧<sup>[3]</sup>。因此, 研究NRTIs类药物所致神经病理性痛的机制对于制定预防措施, 提高HIV感染者的生活质量和服药依从性具有重要意义。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 是进化上十分保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 广泛存在于各种生物细胞中<sup>[4-5]</sup>。雷帕霉素为mTOR特异性抑制剂, 能特异性结合和抑制mTOR活性, 因此雷帕霉素常作为研究mTOR的工具, 在多种疾病的病理生理机制研究中广泛应用<sup>[6]</sup>。近年研究表明, mTOR可从多个层面参与神经病理性痛的调节, 如在中枢参与突触可塑性, 在外周可能与组织损伤后的痛觉易化形成有关, 但其是否参与NRTIs类药物治疗HIV感染所并发的神经病理性痛鲜有报道<sup>[7]</sup>。

鉴于mTOR广泛参与神经病理性痛的调节, 笔者推测mTOR在NRTIs类药物所致神经病理性痛中同样起着重要作用, 故本研究将通过动物实验观察雷帕霉素干预后对司他夫定所致小鼠痛觉超敏的影响, 来探索mTOR在NRTIs类药物所引起的神经病理性痛发生中所起的作用, 寻找与NRTIs类药物所致神经病理性痛相关的分子靶点, 为临床预防或延迟HIV感染者使用NRTIs类药物过程中发生神经病理性痛提供一定的理论依据, 现报道如下。

## 材料与方法

### 一、实验动物

本研究入组SPF级4~6周龄雄性昆明小鼠40只, 体重20~22 g, 购于中国医学科学院动物研究所, 动物许可证号为: SCXK (京) 2017-0006。

### 二、主要试剂

雷帕霉素购自北京赛泰克生物科技有限公司 (货号: S1039); 司他夫定为首都医科大学附属北京地坛医院感染科提供 (北京双鹭药业股份有限公司, 批号: 110701); 溴酚蓝、丙烯酰胺、亚甲双丙烯酰胺、四甲基乙二胺 (tetramethylethylenediamine, TEMED) 及过硫酸铵均购自Sigma-Aldrich公司; 三(羟甲基)氨基甲烷 [tris (hydroxymethyl) methyl aminomethane, Tris base]、十二烷基磺酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 购自原平皓生物技术公司; 聚偏二氟乙烯膜 (孔径0.45 μm)、硝酸纤维膜 (孔径0.45 μm) 购自Millipore公司; 5× 上样缓冲液、非变性蛋白酶裂解液、蛋白磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂及SuperECL Plus超敏发光液均购自北京普利来基因技术有限公司; 蛋白分子量Marker购自北京全式金生物技术公司; mTOR (货号: ab32028)、磷酸化mTOR (phosphorylated mTOR, phospho-mTOR) (货号: ab109268) 抗体购自北京赛泰克生物科技有限公司; β-actin、辣根过氧化物酶标记的二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

### 三、实验方法

1. 分组及给药: 小鼠随机分为4组 (每组各10只): 对照组、司他夫定 (12 mg/kg) 组、雷帕霉素 (2 mg/kg) + 司他夫定 (12 mg/kg) 组和羧甲基纤维素钠 (sodium carboxymethyl cellulose, CMC-Na) 组。雷帕霉素和司他夫定用0.5% CMC-Na配制成混悬液, 并通过0.22 μm膜过滤器过滤除菌。

给药组小鼠每隔24 h灌胃给予相应剂量的药物, 对照组和CMC-Na组分别给予同等剂量的生理盐水和0.5% CMC-Na, 连续42 d, 其中雷帕霉素+司他夫定组给予雷帕霉素10 min后再给予司他夫定。常规观察各组小鼠的饮食、体质量、毛发、精神状态及活动情况等指标。

2. 机械痛敏检测: 应用2390 Electronic von-Frey Anesthesiometer机械痛阈测试仪, 测试各组小鼠右后肢的机械痛阈值, 即机械缩足反应阈值 (paw withdraw mechanical threshold, PWMT)。将小鼠置于底部为铁丝网的透明箱, 待小鼠适应环境并安静后开始测定机械痛阈值。取右后肢足掌正中作为探针测痛点, 采用电子测痛仪由下往上垂直刺激小鼠右后肢足底光滑皮肤, 逐渐加大刺激强度, 动作轻柔, 记录出现缩足反应 (如舔足、甩腿等) 时刺激强度为机械缩足反射阈值 (单位为g)。每只小鼠测定5次, 每次间隔5 min, 取平均值作为该小鼠该侧肢体的PWMT值。

3. 热痛敏检测: 应用UGO BASILE 7370全自动热辐射刺激仪, 测试各组小鼠右后肢热痛阈值, 记录照射开始至小鼠出现抬腿回避时的热缩足潜伏期 (paw withdrawal thermal latency, PWTL)。设定温度为 $(55 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$ , 将小鼠逐一放入面板上的透明隔栏内, 待小鼠适应环境并安静后开始测定热痛阈值。将光源正对小鼠右后肢足底, 以白色十字线交叉处正对足底正中为位置正确。打开光源, 面板温度持续上升, 此时测痛仪计时器开始计时。当面板温度上升到一定程度, 小鼠被测足底感觉疼痛时, 后足出现特征性甩动、提足或舔舐, 红外线自动切断, 测痛仪停止记时, 此时所得数据即为该小鼠此次测得的热缩足潜伏期 (单位为s)。每只小鼠测定5次, 每次间隔5 min, 热刺激强度在整个实验过程中保持一致, 取平均值作为该小鼠该侧肢体的PWTL值。

4. 蛋白印迹 (Western blot) 检测小鼠脊髓组织中mTOR及磷酸化mTOR表达: 连续给药42 d后, 每组随机挑选5只小鼠断头处死, 迅速取出脊髓组织, 用PBS清洗组织样品2~3次, 将组织样品中所含有的血块洗掉, 称重后倒入玻璃匀浆器中, 加入非变性蛋白裂解液 (1 mg脊髓组织溶于10  $\mu\text{l}$ 裂解液), 在冰浴上充分匀浆, 匀浆液于冰浴裂解30 min, 裂解液于12 000 r/min,  $4 ^\circ\text{C}$ 离心20 min (离心半径 $r = 5 \text{ cm}$ ), 收集上清可溶性蛋白组

分, 保存于 $-80 ^\circ\text{C}$ 低温冰箱备用。二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法定蛋白, 用裂解液将蛋白调整至相同浓度, 1:4比例加入 $5\times$ 上样缓冲液后,  $97 ^\circ\text{C}$ 沸水浴5 min, 冷却后电泳上样。组装好灌胶装置, 灌制分离胶, 胶面上用100 ml ddH<sub>2</sub>O封闭。待胶聚合后, 滤纸吸干水层, 继续灌入积层胶, 插好梳子。灌制过程中注意勿使凝胶中产生气泡。凝胶完全聚合后小心拔去梳子, 勿破坏梳孔, 将凝胶转移置电泳装置中, 倒满 $1\times$ 电泳缓冲液。将调整好浓度的样品与 $5\times$ 上样缓冲液按4:1的体积比混合, 沸水煮5 min, 用加样器将标准分子量Marker及样品分别上样于梳孔内。

5. 电泳: 积层胶电压为80 V, 分离胶所用电压为120 V, 恒压电泳至溴酚蓝前沿距胶底1~2 cm时停止电泳。电转移完毕后, 将膜取出, 在5% TBST脱脂奶粉中封闭1 h, 加入一抗mTOR或磷酸化mTOR (5% TBST脱脂奶粉稀释),  $4 ^\circ\text{C}$ 过夜,  $1\times$  TBST液洗膜, 5 min、3次, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗 ( $1\times$  TBST液稀释), 室温摇床孵育3~4 h,  $1\times$  TBST液洗膜, 5 min、3次, 配制发光底物工作液, LAS300化学发光系统照相, 用Quantity One密度分析软件对图像中蛋白条带进行定量分析, 以 $\beta$ -actin蛋白条带作为对照进行蛋白条带密度的校准。

#### 四、统计学处理

采用SPSS 13.0统计学软件进行分析。各实验组小鼠机械痛敏和热痛敏以及小鼠脊髓组织中磷酸化mTOR蛋白的表达水平为呈正态分布的计量资料, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间整体比较采用方差分析, 组间两两比较采用LSD-*t*检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 结 果

一、雷帕霉素降低口服司他夫定所引起的小鼠痛觉敏感反应

为观察小鼠机械痛敏和热痛敏的变化, 在给药后7、14、21、28、35和42 d检测小鼠的PWMT值和PWTL值。不同时点各组小鼠检测结果显示, 给药前一天各组小鼠的PWMT和PWTL差异均无统计学意义 ( $P$ 均 $< 0.05$ ), 提示选取的小鼠来自于同一群体。

随着给药时间的延长, 司他夫定组和雷帕霉

素 + 司他夫定组小鼠与对照组小鼠相比, 在给药后7、14、21、28、35和42 d PWMT显著降低, 同时PWTL显著缩短, 并呈进行性下降, 至给药后42 d最低, 提示口服司他夫定形成神经病理性痛小鼠模型建立成功。

雷帕霉素 + 司他夫定组小鼠与司他夫定组小鼠相比, 在给药后7、21、28、35和42 d PWMT显著升高, 同时在给药后7、14、21、28、35和42 d PWTL显著延长, 提示雷帕霉素可一定程度地降低司他夫定所引起的小鼠痛觉敏感反应, 见表1和图1。

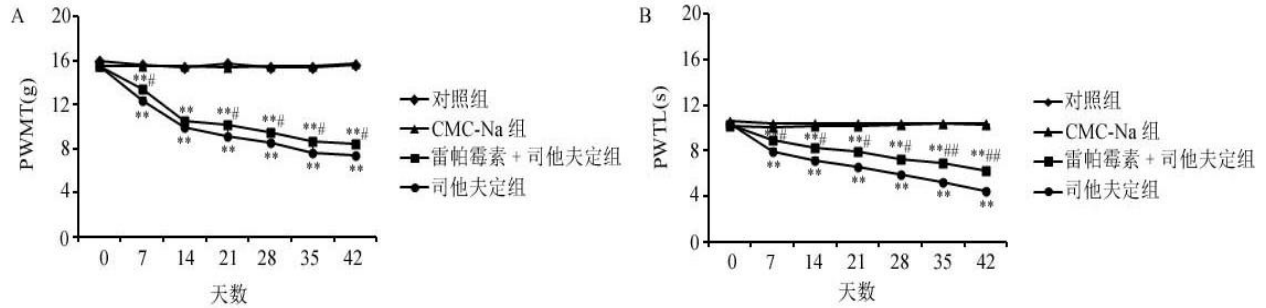
表1 雷帕霉素对小鼠机械痛敏和热痛敏的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	只数	给药前	给药后7 d	给药后14 d	给药后21 d	给药后28天	给药后35天	给药后42天
PWMT (g)								
对照组	10	15.93 ± 0.53	15.63 ± 0.52	15.37 ± 0.46	15.68 ± 0.39	15.42 ± 0.36	15.38 ± 0.42	15.62 ± 0.33
CMC-Na组	10	15.55 ± 0.29	15.44 ± 0.35	15.45 ± 0.34	15.36 ± 1.53	15.52 ± 0.35	15.50 ± 0.38	15.68 ± 0.34
雷帕霉素+司他夫定组	10	15.49 ± 0.40	13.44 ± 0.25	10.51 ± 0.27	10.12 ± 0.29	9.51 ± 0.20	8.69 ± 0.20	8.41 ± 0.17
司他夫定组	10	15.45 ± 0.30	12.35 ± 0.36	9.98 ± 0.50	9.16 ± 1.39	8.54 ± 0.22	7.64 ± 1.03	7.40 ± 0.13
<i>F</i> 值		1.45	20.63	34.68	35.76	22.56	18.96	29.18
<i>P</i> 值		0.180	0.008	0.004	0.003	0.007	0.008	0.005
<i>t</i> <sub>对照组 vs. CMC-Na组</sub>		0.48	1.21	0.56	0.89	0.79	1.16	1.23
<i>P</i> <sub>对照组 vs. CMC-Na组</sub>		0.640	0.28	0.59	0.42	0.56	0.31	0.23
<i>t</i> <sub>对照组 vs. 雷帕霉素+司他夫定组</sub>		0.85	17.16	24.61	32.16	37.18	30.12	19.21
<i>P</i> <sub>对照组 vs. 雷帕霉素+司他夫定组</sub>		0.490	0.009	0.007	0.004	0.003	0.005	0.008
<i>t</i> <sub>对照组 vs. 司他夫定组</sub>		1.12	28.17	34.24	25.12	38.12	22.23	35.17
<i>P</i> <sub>对照组 vs. 司他夫定组</sub>		0.380	0.006	0.004	0.007	0.003	0.007	0.003
<i>t</i> <sub>CMC-Na组 vs. 司他夫定组</sub>		1.25	32.23	33.17	17.73	29.16	37.69	38.69
<i>P</i> <sub>CMC-Na组 vs. 司他夫定组</sub>		0.210	0.004	0.004	0.009	0.005	0.003	0.002
<i>t</i> <sub>CMC-Na组 vs. 雷帕霉素+司他夫定组</sub>		0.63	21.12	27.16	36.21	31.16	18.61	23.14
<i>P</i> <sub>CMC-Na组 vs. 雷帕霉素+司他夫定组</sub>		0.580	0.008	0.006	0.003	0.005	0.009	0.007
<i>t</i> <sub>司他夫定组 vs. 雷帕霉素+司他夫定组</sub>		1.56	5.71	1.64	4.12	4.36	5.06	4.89
<i>P</i> <sub>司他夫定组 vs. 雷帕霉素+司他夫定组</sub>		0.190	0.026	0.12	0.046	0.042	0.031	0.034
PWTL (s)								
对照组	10	10.14 ± 0.17	10.28 ± 0.18	10.15 ± 0.23	10.18 ± 0.20	10.27 ± 0.20	10.21 ± 0.33	10.25 ± 0.21
CMC-Na组	10	10.59 ± 1.43	10.36 ± 0.14	10.43 ± 0.15	10.44 ± 0.20	10.39 ± 0.14	10.35 ± 0.24	10.39 ± 0.16
雷帕霉素 + 司他夫定组	10	10.31 ± 0.17	8.56 ± 0.23	8.29 ± 0.14	7.88 ± 0.19	7.27 ± 0.11	6.90 ± 0.14	6.25 ± 0.16
司他夫定组	10	10.39 ± 0.16	7.56 ± 0.35	7.12 ± 0.32	6.54 ± 0.20	5.89 ± 0.16	5.26 ± 0.23	4.43 ± 0.21
<i>F</i> 值		1.66	20.63	33.96	25.63	18.83	30.28	24.71
<i>P</i> 值		0.150	0.008	0.004	0.006	0.008	0.005	0.007
<i>t</i> <sub>对照组 vs. CMC-Na组</sub>		0.98	0.64	0.96	1.24	1.36	1.07	0.52
<i>P</i> <sub>对照组 vs. CMC-Na组</sub>		0.470	0.57	0.45	0.26	0.21	0.41	0.62
<i>t</i> <sub>对照组 vs. 雷帕霉素+司他夫定组</sub>		0.86	18.72	23.17	28.81	22.18	33.69	31.21
<i>P</i> <sub>对照组 vs. 雷帕霉素+司他夫定组</sub>		0.510	0.008	0.007	0.006	0.007	0.004	0.005
<i>t</i> <sub>对照组 vs. 司他夫定组</sub>		1.18	29.12	27.18	32.38	19.23	21.17	35.56
<i>P</i> <sub>对照组 vs. 司他夫定组</sub>		0.360	0.005	0.006	0.004	0.008	0.008	0.003
<i>t</i> <sub>CMC-Na组 vs. 司他夫定组</sub>		1.28	30.16	34.71	28.63	22.32	18.12	25.07
<i>P</i> <sub>CMC-Na组 vs. 司他夫定组</sub>		0.240	0.005	0.004	0.006	0.007	0.009	0.007
<i>t</i> <sub>CMC-Na组 vs. 雷帕霉素+司他夫定组</sub>		1.61	31.12	26.18	20.26	15.71	21.21	24.16
<i>P</i> <sub>CMC-Na组 vs. 雷帕霉素+司他夫定组</sub>		0.170	0.005	0.007	0.008	0.009	0.008	0.007
<i>t</i> <sub>司他夫定组 vs. 雷帕霉素+司他夫定组</sub>		0.81	4.57	5.92	6.23	6.68	15.79	16.68
<i>P</i> <sub>司他夫定组 vs. 雷帕霉素+司他夫定组</sub>		0.530	0.039	0.023	0.017	0.013	0.009	0.009

## 二、雷帕霉素抑制小鼠脊髓组织中磷酸化mTOR蛋白的表达

本研究中雷帕霉素对司他夫定所致神经病理性痛的影响通过使用针对mTOR蛋白磷酸化位点的抗体进行蛋白印迹分析来评估。结果显示，司他夫定组与对照组比较，磷酸化mTOR的表达显著升

高，同时雷帕霉素 + 司他夫定组与司他夫定组相比，磷酸化mTOR的表达显著降低，差异有统计学意义 ( $P$ 均  $< 0.05$ )。提示司他夫定可能通过激活mTOR引起神经病理性痛，雷帕霉素抑制了mTOR的活化，降低磷酸化mTOR的表达，进而缓解司他夫定所引起的神经病理性痛。见表2和图2。

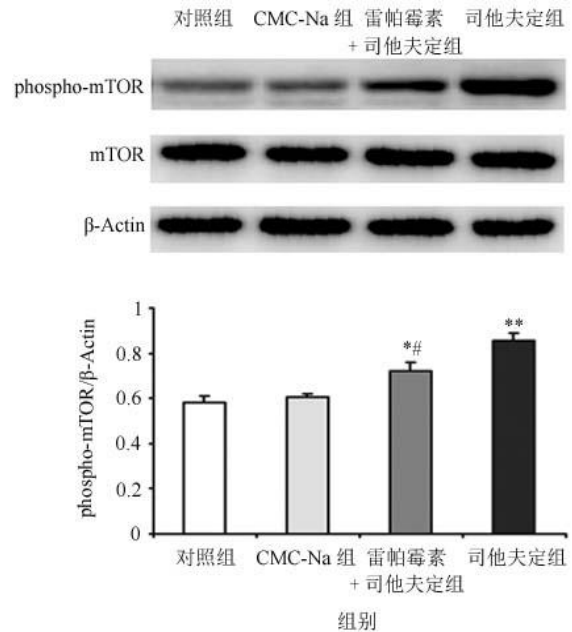


注：A：机械缩足反应阈值；B：热缩足潜伏期；\*：雷帕霉素 + 司他夫定组和司他夫定组与对照组相比差异具有统计学意义， $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ ；#：代表雷帕霉素 + 司他夫定组与司他夫定组相比差异具有统计学意义， $#P < 0.05$ 、 $##P < 0.01$

图1 雷帕霉素对小鼠机械痛敏和热痛敏的影响

表2 雷帕霉素对小鼠脊髓组织中磷酸化 mTOR 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	phospho-mTOR/ $\beta$ -actin
对照组	10	0.58 $\pm$ 0.03
CMC-Na组	10	0.61 $\pm$ 0.01
雷帕霉素 + 司他夫定组	10	0.72 $\pm$ 0.04
司他夫定组	10	0.86 $\pm$ 0.03
$F$ 值		6.19
$P$ 值		0.018
$t$ 对照组 vs. CMC-Na组		1.75
$P$ 对照组 vs. CMC-Na组		0.120
$t$ 对照组 vs. 雷帕霉素 + 司他夫定组		6.05
$P$ 对照组 vs. 雷帕霉素 + 司他夫定组		0.021
$t$ 对照组 vs. 司他夫定组		12.13
$P$ 对照组 vs. 司他夫定组		0.008
$t$ CMC-Na组 vs. 司他夫定组		13.25
$P$ CMC-Na组 vs. 司他夫定组		0.006
$t$ CMC-Na组 vs. 雷帕霉素 + 司他夫定组		7.12
$P$ CMC-Na组 vs. 雷帕霉素 + 司他夫定组		0.018
$t$ 司他夫定组 vs. 雷帕霉素 + 司他夫定组		4.24
$P$ 司他夫定组 vs. 雷帕霉素 + 司他夫定组		0.045



注：phospho-mTOR：磷酸化mTOR；\*：雷帕霉素 + 司他夫定组和司他夫定组与对照组相比差异具有统计学意义， $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ ；#：雷帕霉素 + 司他夫定组与司他夫定组差异有统计学意义， $#P < 0.05$ 、 $##P < 0.01$

图2 雷帕霉素对小鼠脊髓组织中磷酸化mTOR蛋白表达的影响

## 讨 论

目前全世界约有3 800万HIV感染者,且每天新增病例4 000余人,HIV相关的疼痛具有普遍性和多因素性,疼痛的主要原因是神经病理性痛<sup>[8-9]</sup>。随着高效抗逆转录病毒药物在HIV治疗中的使用,患者生存率显著提高,但与之相关的神经病理性痛的发生率亦显著升高。临床研究发现,HIV相关的神经病理变化与HIV本身的嗜神经性和NRTIs类药物的使用密切相关且相互作用<sup>[10]</sup>。近年研究发现,NRTIs类药物具有潜在的神经毒性<sup>[11-12]</sup>。使用NRTIs类药物治疗的HIV感染者中神经病理性痛的发生率达20%~50%,其症状主要表现为轴突型、长度依赖性多发神经性改变,累及双下肢的神经末梢,呈“袜套样”感觉异常<sup>[13]</sup>。有表明,与HIV嗜神经性相关的神经病理性痛的发生较为隐匿,但与NRTIs类药物治疗密切相关的神经病理性痛的发生突然且进展迅速<sup>[14]</sup>。因HIV直接感染神经元的发生率很低,由此可推测与NRTIs类药物治疗相关的神经病理性痛可能与其神经毒性有关。mTOR可整合细胞内外信号,具有调节轴突再生、参与树突分枝可塑性变化、参与神经细胞发育和调节神经细胞凋亡等功能,广泛参与了炎性痛、神经病理性痛和癌痛模型中神经突触可塑性的形成以及疼痛信号的转导过程,但其是否参与NRTIs类药物所引起的神经病理性痛鲜有报道<sup>[15]</sup>。mTOR特异性抑制剂雷帕霉素,作为一种大环内酯类抗菌药物和免疫抑制剂,主要应用于肿瘤和免疫性疾病等发病机制的研究<sup>[16]</sup>。有研究表明,雷帕霉素在疼痛的机制研究与治疗方面具有广泛的应用前景<sup>[17]</sup>。虽然司他夫定不是目前临床上最常使用的NRTIs类药物,但NRTIs类药物治疗HIV感染并发神经病理性痛的现象仍然存在,且司他夫定作为此类药物的代表药物之一,与其他NRTIs类药物所致神经病理性痛具有相同的作用机制,同时口服司他夫定更易建立神经病理性痛模型。因此,本研究通过口服司他夫定形成神经病理性痛小鼠模型,研究雷帕霉素对NRTIs类药物治疗HIV感染所致神经病理性痛的影响。研究发现,雷帕霉素可缓解司他夫定所引起的小鼠机械痛敏和热痛敏,并可降低小鼠脊髓组织中磷酸化mTOR的表达。

神经病理性痛是指外周或中枢神经系统的损伤或功能紊乱,包括损伤或者疾病侵袭到中枢神经

系统或躯体感觉系统所导致的疼痛,主要症状为痛觉过敏(对疼痛刺激的敏感度增加)、异常性疼痛(对无害刺激感知为疼痛)、感觉改变和自发性疼痛<sup>[18]</sup>。外周神经受损后将引发一系列病理生理改变,如神经兴奋过度、神经稳态的变化、基因表达的改变和强烈的免疫应答<sup>[19]</sup>。目前,对神经病理性痛的机制研究主要集中在外周机制和中枢机制。中枢机制表现在脊髓背角突触可塑性的变化,即中枢敏化<sup>[20]</sup>。脊髓背角是外周感觉传入神经纤维和大脑皮质及脑干的下行投射神经纤维的汇聚位点,是伤害性信息传递和整合的初级中枢<sup>[21]</sup>。近年来研究发现,mTOR通过信使RNA(messenger ribonucleic acid, mRNA)翻译调控蛋白质合成,介导中枢与外周敏化,参与慢性疼痛状态的维持<sup>[22]</sup>。对疼痛而言,痛阈及行为学的改变是神经元可塑性的表达,是导致疼痛持续存在的原因,由mTOR介导的脊髓水平mRNA翻译是神经元高度兴奋和行为学疼痛过敏形成的关键。雷帕霉素是mTOR特异性抑制剂,能特异性结合和抑制mTOR的活性<sup>[23]</sup>。相关研究表明,雷帕霉素可有效降低慢性炎性疼痛模型大鼠的机械痛觉敏感性。在慢性炎性痛或神经病理性痛动物模型中,mTOR激活并大量表达于脊髓背角浅层,雷帕霉素可缓解其热痛敏和机械痛敏,且具有剂量依赖性<sup>[24-25]</sup>。另有研究显示,在有髓纤维伤害性感受器上有mTOR及其下游翻译元件的表达,且局部使用雷帕霉素可减轻大鼠神经病理性痛模型的机械痛敏,表明外周感觉神经纤维的敏感性与mTOR有关<sup>[26]</sup>。以上研究说明mTOR通过调节基因转录和蛋白质翻译、转运等过程参与蛋白质合成依赖性突触可塑性的形成,进而维持伤害性感受器的痛觉敏感性。本研究主要探讨mTOR在NRTIs类药物治疗HIV感染所致神经病理性痛的中枢机制,观察雷帕霉素干预后,小鼠机械痛敏和热痛敏的变化及脊髓水平mTOR蛋白及其活化形式的表达;结果显示,给予雷帕霉素后,小鼠机械痛敏和热痛敏均较司他夫定组降低,但仍高于对照组,说明雷帕霉素可部分缓解司他夫定所引起的小鼠痛觉超敏。同时,小鼠脊髓组织中磷酸化mTOR的表达较司他夫定组下降,这种变化与司他夫定所致小鼠机械痛敏和热痛敏的升高呈负相关,说明雷帕霉素可能通过抑制脊髓中mTOR的活化,降低磷酸化mTOR的表达而缓解NRTIs类药物治疗HIV感染所引起的神经病理性痛。

综上所述,雷帕霉素可部分缓解NRTIs类药物治疗HIV感染所引起的异常性疼痛和痛觉过敏,其作用机制可能与其抑制脊髓中mTOR蛋白的活化有关。这些结果证明雷帕霉素具有减轻NRTIs类药物所致神经病理性痛的功效,为临床预防或延迟HIV感染者在使用NRTIs类药物过程中发生神经病理性痛提供了一定的理论依据,且值得进一步深入研究雷帕霉素治疗HIV相关疼痛的临床有效性。

### 参 考 文 献

- [1] Ganta KK, Chaubey B, Ganta KK, et al. Mitochondrial dysfunctions in HIV infection and antiviral drug treatment[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*,2019,15(12):1043-1052.
- [2] Udeze A, Odebisi-Omokanye M, Ajileye T. Cytomegalovirus infection among human immunodeficiency virus (HIV) infected individuals on highly active anti-retroviral therapy in north-central nigeria[J]. *Afr Health Sci*,2018,18(4):1057-1065.
- [3] Masocha W, Thomas A. Indomethacin plus minocycline coadministration relieves chemotherapy and antiretroviral drug-induced neuropathic pain in a cannabinoid receptors-dependent manner[J]. *J Pharmacol Sci*,2019,139(4):325-332.
- [4] Wang Y, Xu W, Yan Z, et al. Metformin induces autophagy and G0/G1 phase cell cycle arrest in myeloma by targeting the AMPK/mTORC1 and mTORC2 pathways[J]. *J Exp Clin Cancer Res*,2018,37(1):63.
- [5] Lawrence J, Nho R. The Role of the Mammalian target of rapamycin (mTOR) in pulmonary fibrosis[J]. *Int J Mol Sci*,2018,19(3):778.
- [6] Schreiber KH, Arriola Apelo SI, Yu D, et al. A novel rapamycin analog is highly selective for mTORC1 in vivo[J]. *Nat Commun*,2019,10(1):3194.
- [7] Liu Y, Qin X, Lu X, et al. Effects of inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway on the pain of sciatic endometriosis in a rat model[J]. *Can J Physiol Pharmacol*,2019,97(10):963-970.
- [8] Pillay P, Wadley AL, Cherry CL, et al. Psychological factors associated with painful versus non-painful HIV-associated sensory neuropathy[J]. *AIDS Behav*,2018,22(5):1584-1595.
- [9] Amaniti A, Sardeli C, Fyntanidou V, et al. Pharmacologic and non-pharmacologic interventions for HIV-neuropathy pain. A systematic review and a Meta-analysis[J]. *Medicina (Kaunas)*,2019,55(12):762.
- [10] Scott W, Garcia Calderon Mendoza Del Solar M, Kemp H, et al. A qualitative study of the experience and impact of neuropathic pain in people living with HIV[J]. *Pain*,2020,161(5):970-978.
- [11] Aly E, Khajah MA, Masocha W.  $\beta$ -Caryophyllene, a CB2-receptor-selective phytocannabinoid, suppresses mechanical allodynia in a mouse model of antiretroviral-induced neuropathic pain[J]. *Molecules*,2019,25(1):106.
- [12] Yang Y, Liu X, Wu T, et al. Quercetin attenuates AZT-induced neuroinflammation in the CNS[J]. *Sci Rep*,2018,8(1):6194.
- [13] Octaviana F, Safri AY, Setiawan DD, et al. Neuropathic pain in HIV patients receiving ART without stavudine in an indonesia referral hospital[J]. *J Neurol Sci*,2019,397(2):146-149.
- [14] Chen H, Hu Y, Xie K, et al. Effect of Autophagy on allodynia, hyperalgesia and astrocyte activation in a rat model of neuropathic pain[J]. *Int J Mol Med*,2018,42(4):2009-2019.
- [15] Chen L, Yang G, Dong H, et al. Everolimus reverses palbociclib resistance in ER+ human breast cancer cells by inhibiting phosphatidylinositol 3-Kinase(PI3K)/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway[J]. *Med Sci Monit*,2019,25:77-86.
- [16] Hill EE, Kim JK, Jung Y, et al. Integrin alpha V beta 3 targeted dendrimer-rapamycin conjugate reduces fibroblast-mediated prostate tumor progression and metastasis[J]. *J Cell Biochem*, 2018,119(10):8074-8083.
- [17] Li S, Guan S, Wang Y, et al. Nicotine inhibits rapamycin-induced pain through activating mTORC1/S6K/IRS-1-related feedback inhibition loop[J]. *Brain Res Bull*,2019,149(7):75-85.
- [18] Maccone A, Otis JAD. Neuropathic pain[J]. *Semin Neurol*,2018,38(6):644-653.
- [19] Malcangio M. Role of the immune system in neuropathic pain[J]. *Scand J Pain*,2019,20(1):33-37.
- [20] Fernandes V, Sharma D, Vaidya S, et al. Cellular and molecular mechanisms driving neuropathic pain: recent advancements and challenges[J]. *Expert Opin Ther Targets*,2018,22(2):131-142.
- [21] Liu Y, Latremoliere A, Li X, et al. Touch and tactile neuropathic pain sensitivity are set by corticospinal projections[J]. *Nature*,2018,561(7724):547-550.
- [22] Cho C, Michailidis V, Martin LJ. Revealing brain mechanisms of mTOR-mediated translational regulation: implications for chronic pain[J]. *Neurobiol Pain*,2018,4:27-34.
- [23] Nguyen LS, Vautier M, Allenbach Y, et al. Sirolimus and mTOR inhibitors: A review of side effects and specific management in solid organ transplantation[J]. *Drug Saf*,2019,42(7):813-825.
- [24] Zhang X, Jiang N, Li J, et al. Rapamycin alleviates proinflammatory cytokines and nociceptive behavior induced by chemotherapeutic Paclitaxel[J]. *Neurol Res*,2019,41(1):52-59.
- [25] Kondo D, Saegusa H, Tanabe T. Involvement of phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/mammalian target of rapamycin/peroxisome proliferator-activated Receptor  $\gamma$  pathway for induction and maintenance of neuropathic pain[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2018,499(2):253-259.
- [26] Zhang J, Wang Y, Qi X. Systemic Rapamycin attenuates morphine-induced analgesic tolerance and hyperalgesia in mice[J]. *Neurochem Res*,2019,44(2):465-471.

(收稿日期: 2020-09-27)

(本文编辑: 孙荣华)

武良玉, 程灏. 雷帕霉素对核苷类逆转录酶抑制剂治疗人类免疫缺陷病毒感染并发神经病理性痛的影响[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2021,15(4):250-256.