

·基础研究·

慢性吗啡诱导 HEK293 细胞 GIRK1 和 GIRK2 膜表达下调

刘冰柯¹, 崔宇¹, 韩雪², 肖力³

(1. 中山大学医学院生理教研室, 广东深圳 518107; 2. 广州医科大学附属第二医院疼痛科, 广东广州 510260;

3. 中山大学附属第一医院麻醉科, 广东广州 510080)

摘要:【目的】利用人胚胎肾细胞 293 (HEK293) 观察 G 蛋白门控内向整流钾离子通道 (GIRK) 亚单位 GIRK1 和 GIRK2 在吗啡耐受后的表达和分布变化。【方法】使用 HEK293 细胞转染慢病毒 pLV-CMV-GIRK1-T2A-GIRK2-P2A-MOR, 构建过表达 GIRK1、GIRK2 和 μ 阿片受体 (MOR) 的稳转 HEK293 细胞, 使用吗啡 (1 μ mol/L, 24 h) 处理该稳转细胞, 构建吗啡耐受 HEK293 细胞模型。细胞免疫荧光检测细胞模型中 MOR 与 GIRK1 和 GIRK2 的分布及共定位情况。ELISA 检测 cAMP 含量变化确定建立吗啡耐受 HEK293 细胞模型。细胞免疫荧光和免疫印迹法检测吗啡耐受后 GIRK1 和 GIRK2 的分布及蛋白水平变化。多功能酶标仪测量荧光强度检测吗啡耐受后细胞膜电位水平变化。【结果】在稳转 HEK293 细胞中, 免疫荧光化学显示 GIRK1 和 GIRK2 主要在胞膜上表达, 少量在胞浆中, GIRK1 和 GIRK2 与 MOR 共定位, 且 GIRK1 和 GIRK2 共定位。与对照组相比, 吗啡处理 1 h 组 cAMP 显著降低 (1.42 \pm 0.07 vs. 0.72 \pm 0.12, $P=0.001$), 吗啡处理 24 h 组 cAMP 出现显著升高 (0.72 \pm 0.12 vs. 1.98 \pm 0.17, $P=0.000$ 5)。荧光双染显示吗啡处理 24 h 后, 吗啡耐受组胞浆中 GIRK1 (13.76 \pm 7.67 vs. 63.72 \pm 16.02, $P<0.000$ 1) 和 GIRK2 (7.16 \pm 2.61 vs. 32.92 \pm 7.67, $P=0.002$ 9) 显著增加。免疫印迹法显示吗啡耐受后膜蛋白 GIRK1 (1.11 \pm 0.14 vs. 0.85 \pm 0.01, $P=0.004$ 5) 和 GIRK2 (1.32 \pm 0.02 vs. 0.86 \pm 0.08, $P=0.000$ 1) 的表达显著下调。膜电位检测显示, 吗啡耐受细胞的超极化反应显著减弱 (-15.53 \pm 0.12)% vs. (-8.17 \pm 0.11)%, $P<0.000$ 1。【结论】慢性吗啡处理能够诱导稳转 HEK293 细胞膜 GIRK1 和 GIRK2 表达下调。

关键词: 吗啡; 耐受; 人胚胎肾细胞 293; G 蛋白门控内向整流钾离子通道亚单位 1; G 蛋白门控内向整流钾离子通道亚单位 2

中图分类号: R338

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2026)02-0251-08

DOI: 10.11714/jsysu.med.YX20250191

Chronic Morphine Induces Downregulation of GIRK1 and GIRK2 Membrane Expression in HEK293 Cells

LIU Bingke¹, CUI Yu¹, HAN Xue², XIAO Li³

(1. School of Medicine, Sun Yat-sen University, Shenzhen 518107, China; 2. Department of Pain Medicine, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China; 3. Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: XIAO Li; E-mail: xiaol38@mail3.sysu.edu.cn

Abstract: 【Objective】 To investigate the expression and distribution changes of G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channel subunits GIRK1 and GIRK2 following morphine tolerance using human embryonic kidney 293 (HEK293) cells. 【Methods】 HEK293 cells were transfected with the lentiviral vector pLV-CMV-GIRK1-T2A-GIRK2-

收稿日期: 2025-12-14

录用日期: 2026-02-09

基金项目: 国家自然科学基金 (82101344, 82501738)

作者简介: 刘冰柯, 第一作者, 研究方向: 阿片类药物诱发的镇痛耐受机制, E-mail: liubk5@mail2.sysu.edu.cn; 肖力, 通信作者, 副主任医师, 研究方向: 阿片类药物诱发的痛觉过敏及镇痛耐受的发生机制, E-mail: xiaol38@mail3.sysu.edu.cn

P2A-MOR to establish a stable cell line overexpressing GIRK1, GIRK2, and the μ -opioid receptor (MOR). Morphine (1 μ mol/L, 24 h) was applied to these stable cells to construct a morphine-tolerant HEK293 cell model. Cellular immunofluorescence was used to examine the distribution and co-localization of MOR with GIRK1 and GIRK2. ELISA was performed to measure cAMP levels to confirm the establishment of the morphine-tolerant model. Cellular immunofluorescence and Western blot were employed to analyze the distribution and protein expression changes of GIRK1 and GIRK2 after morphine tolerance. A multimode microplate reader was used to measure fluorescence intensity for detecting changes in cellular membrane potential following morphine tolerance. **[Results]** In the stable HEK293 cells, immunohistochemistry showed that GIRK1 and GIRK2 were primarily expressed on the plasma membrane, with minimal presence in the cytoplasm. Both GIRK1 and GIRK2 co-localized with MOR and with each other. Compared with the control group, cAMP levels significantly decreased after 1 h of morphine treatment (1.42 ± 0.07 vs. 0.72 ± 0.12 , $P=0.001$), while they significantly increased after 24 h of treatment (0.72 ± 0.12 vs. 1.98 ± 0.17 , $P=0.000$). Fluorescence double staining revealed that after 24 h of morphine treatment, the morphine-tolerant group showed a significant increase in cytoplasmic GIRK1 (13.76 ± 7.67 vs. 63.72 ± 16.02 , $P<0.000$) and GIRK2 (7.16 ± 2.61 vs. 32.92 ± 7.67 , $P=0.002$). Western blot analysis indicated that the expression of membrane proteins GIRK1 (1.11 ± 0.14 vs. 0.85 ± 0.01 , $P=0.004$) and GIRK2 (1.32 ± 0.02 vs. 0.86 ± 0.08 , $P=0.000$) was significantly downregulated after morphine tolerance. Membrane potential measurements showed that the hyperpolarization response in morphine-tolerant cells was significantly attenuated (-15.53 ± 0.12 % vs. -8.17 ± 0.11 % , $P<0.000$). **[Conclusion]** Chronic morphine treatment can induce downregulation of GIRK1 and GIRK2 expression on the plasma membrane in stable HEK293 cells.

Key words: morphine; tolerance; HEK293 cells; GIRK1; GIRK2

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2026, 47(2): 251-258]

吗啡是临床治疗中重度疼痛的一线阿片类镇痛药物,然而长期使用导致镇痛效果下降即吗啡耐受严重限制了其临床疗效^[1]。大量证据表明,痛觉传递神经元兴奋性增加是导致耐受形成的重要原因^[2-3],但机制不清。G蛋白门控内向整流钾通道(G protein-gated inwardly-rectifying potassium, GIRK)是G蛋白偶联受体下游的关键效应器,被激活的GIRK通道通过介导钾离子外流引起细胞膜超极化,在神经元膜电位稳态中发挥重要作用^[4-5]。GIRK通道通常由GIRK1-4亚基组成同源或异源四聚体,形成功能完整的通道^[5-7]。在神经系统中,GIRK1和GIRK2组成的异源四聚体是最常见的组合形式^[5, 8]。值得注意的是,GIRK通道下调导致的痛觉传递神经元兴奋性增加被认为在神经病理性疼痛形成中发挥了关键作用^[9]。然而,GIRK通道作为介导吗啡镇痛效应的关键下游效应器^[10-13],GIRK通道下调是否参与吗啡耐受相关的膜电位升高目前未见报道。本研究拟通过构建共表达 μ 阿片受体(MOR)、GIRK1和GIRK2亚基的HEK293细胞模型,观察慢性吗啡处理对GIRK通道表达和定位的影响,探索吗啡诱导神经元兴奋性增加的机制,为防治吗啡耐受形成提供潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 实验用细胞株及载体

人胚胎肾293细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司;pLV-CMV-HA-Kcnj3-T2A-Kcnj6-3xFLAG-P2A-Oprm1-Puro载体(由基因Kcnj3、Kcnj6和Oprm1 3个基因片段拼接而成,T2A和P2A连接肽实现3基因共表达,产生3个独立蛋白)购自睿博生物。

1.2 实验材料及主要试剂

大肠埃希菌DH5 α 感受态购自诺唯赞生物;Polybrene(C0351)、嘌呤霉素(ST551)、LiPofectamine 8000(C0533)购自碧云天公司;PEI转染试剂/阳离子聚合物转染/(MW 40,000)购自Polysciences公司;Forskolin(S1612)购自碧云天公司;人环磷酸腺苷(cAMP)ELISA试剂盒(JRXW107096)购自睿信生物公司。吗啡购自宜昌人福公司;ML297(Abcam, ab14564,英国);荧光探针DiBAC4(3)(HY-101892)购自MCE。胎牛血清(A5256701)、DMEM培养基(C11995500BT)、胰蛋白酶-EDTA(质量分数0.25%),含酚红

(25200072)、青霉素-链霉素(100×)购自Gibco公司。主要抗体:兔抗GIRK1(Alomone Labs, APC-005,以色列);兔抗GIRK2(Alomone Labs, APC-006,以色列);豚鼠抗MOR(Merck, AB5509,德国);兔抗 Na^+/k^+ -ATPase(Abcam, ab58475,英国);鼠抗 β -Tubulin(TransGen Biotech, M10615,中国);Alexa Fluor488羊抗鼠(Thermo, 2309139,美国);Alexa Fluor488羊抗兔(Thermo, 2289872,美国);Alexa Fluor488羊抗豚鼠(Thermo, 2409039,美国);Alexa Fluor546羊抗鼠(Thermo, 2306765,美国);Alexa Fluor546羊抗兔(Thermo, 2273718,美国)。鼠源抗GAPDH单克隆抗体购自TransGen Biotech公司;HRP-Goat Anti-Mouse IgG(H+L) Conjugate、HRP-Goat Anti-Rat IgG(H+L) Conjugate、HRP-Goat Anti-Rabbit IgG(H+L) Conjugate均购自Jackson ImmunoResearch公司。

1.3 构建稳转细胞株

将HEK293细胞接种于含质量分数10%胎牛血清、1×青霉素-链霉素的DMEM/高糖培养基中,在37℃下持续通入体积分数5%CO₂和95%空气进行培养。第二天用5 μg/mL的Polybrene的培养基替换原培养基,根据感染复数MOI(Multiplicity of infection)分别加入适量慢病毒病毒悬液(pLV-CMV-HA-Kcnj3-T2A-Kcnj6-3xFLAG-P2A-Oprm1-Puro)和对照病毒(pLV-CMV-MCS-Puro),37℃孵育48 h,更换新鲜培养基,加入4 μg/mL工作浓度的嘌呤霉素(Puromycin),37℃培养48 h,去除Puromycin,筛选出稳定表达GIRK1、GIRK2和MOR的细胞株:293-CMV-GIRK1-GIRK2-MOR,对照细胞:293-CMV-CON。

1.4 构建吗啡耐受细胞模型

将293-CMV-GIRK1-GIRK2-MOR细胞分别种在12孔板中,当密度长至70%左右时,用培养基稀释药物滴入细胞中混匀,使吗啡终浓度为1 μmol/L,在37℃培养箱分别处理1 h、6 h、12 h、24 h。实验分为对照组(con)、吗啡处理组(1 h、6 h、12 h、24 h)。弃去原培养基,PBS润洗细胞去除药物残留,换上10 μmol/L的Forskolin在37℃孵育30 min,用RIPA裂解液充分裂解细胞,用ELISA试剂盒检测cAMP水平,操作按照试剂盒说明书进行。以cAMP含量增加检验模型构建是否成功。

1.5 免疫荧光化学

将细胞接种至提前包被好爬片的孔板中,用1 μmol/L吗啡或盐水处理细胞适当时间后,弃掉培养基用1×PBS润洗1~2次,用40 g/L多聚甲醛固定10 min,再次1×PBS润洗3次,加入质量分数5%血清封闭1 h,加入用质量分数3%血清稀释的一抗在4℃孵育过夜,次日,回收一抗,1×PBS润洗3次,加入质量分数3%血清稀释的二抗室温避光孵育1 h,1×PBS润洗3次,最后加入含DAPI的荧光抗猝灭剂封片,晾干后用于共聚焦成像。

1.6 蛋白免疫印迹

用预冷的PBS洗涤细胞1~2次后,向每个细胞培养孔中加入适量含有蛋白酶抑制剂的RIPA细胞裂解液,冰上反应20 min,收集裂解产物至EP管中,在14 000 ×g的转速下4℃离心30 min,将蛋白上清液转移至新的EP管,弃去沉淀。用去离子水提前配置好适当体积的1×电泳液、1×转膜液、1×TBST和1×TBST配置的质量分数5%脱脂奶粉。Bradford法测定蛋白浓度后,将蛋白上样缓冲液(5×)按比例与蛋白样品混匀,于100℃干浴锅中煮10 min变性,置于冰上冷却后将样品加入上样孔。蛋白样品经质量分数10%SDS-PAGE凝胶先恒压电泳30 min,后采用100 V恒压完成跑胶。转膜装置在冰浴条件下,调恒流350 mA,转膜45~60 min,分子量大的蛋白质适当增加转膜时间。转膜完成后用质量分数5%脱脂牛奶封闭1 h;将NC膜放入按照适当比例稀释过的一抗中,GAPDH(1:10 000), Na^+/k^+ -ATPase(1:10 000), β -Tubulin(1:5 000),GIRK1(1:10 000),GIRK2(1:10 000),置于摇床4℃孵育过夜。次日,1×TBST缓冲液洗膜5次,用1×TBST按照1:5 000稀释二抗,将NC膜放入稀释过的二抗中,置于摇床室温孵育1 h。按照试剂盒说明书配制ECL显色液,化学发光成像系统显色后保存条带图像,用Image J软件进行灰度分析。

1.7 膜电位检测

将293-CMV-GIRK1-GIRK2-MOR细胞种在24孔板中,细胞用生理盐水或1 μmol/L吗啡预处理24 h以诱导耐受。洗涤后,用电压敏感染料DiBAC₄(3)(0.5 μmol/L,30 min)负载细胞。使用多功能酶标仪监测荧光强度变化(激发光490 nm,发射光516 nm),在箭头所示时间点($t=2$ min)加入ML297(终浓度5 μmol/L)。荧光变化表示为 $\Delta F/F_0(\%)$,

其中 F_0 为加入 ML297 前 2 min 基线记录的平均荧光值。数据为 6 次独立实验的平均值 \pm 标准误。

1.8 统计学分析

采用 GraPhPad Prism 9.0 软件进行统计分析。数据包含 3 次独立的重复实验,符合正态分布及方差齐的资料以平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示,两组间比较使用 t 检验,多组比较采用单/双因素方差分析 (one/two-way ANOVA), * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ 提示差异具有统计学意义。ns 代表 $P > 0.05$, 差异无统计学意义。

2 结果

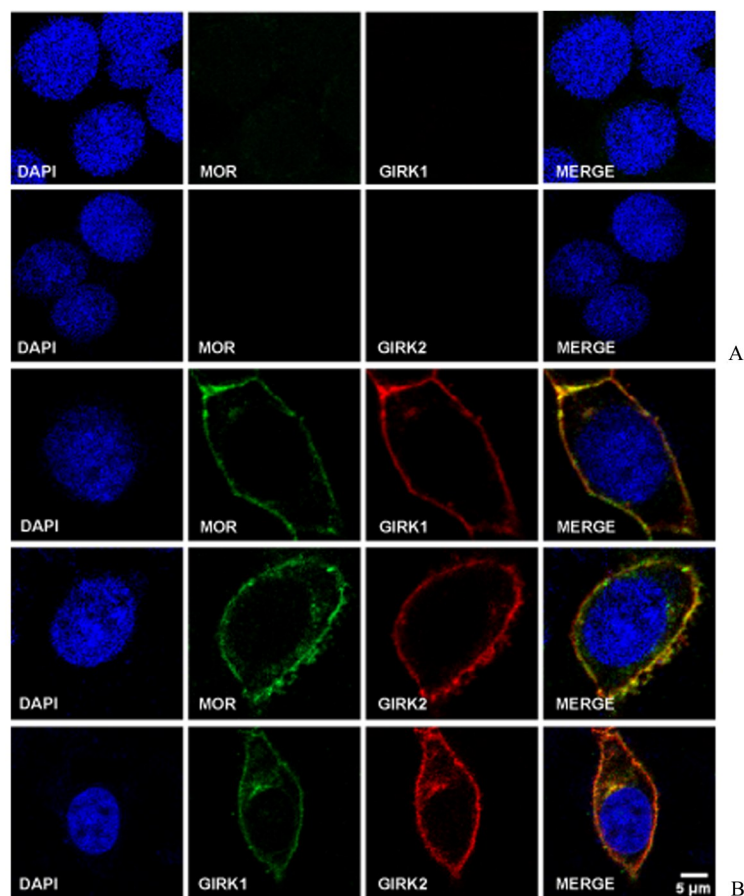
2.1 细胞模型中 MOR 与 GIRK1 和 GIRK2 的分布与共定位

构建稳转细胞株,为了明确细胞模型构建成

功,细胞免疫荧光结果显示,建模前 HEK293 细胞中无 GIRK1 和 GIRK2 表达(图 1A),而稳定过表达 GIRK1 和 GIRK2 后,GIRK1 和 GIRK2 蛋白主要在 HEK293 细胞的胞膜上表达,少量在胞浆中(图 1B)。为明确细胞模型中 GIRK1 和 GIRK2 与 MOR 的关系,我们采用了免疫双染法检测了 GIRK1 和 GIRK2 在细胞中与 MOR 的分布关系,GIRK1 和 GIRK2 与 MOR 在细胞中存在共定位且 GIRK1 和 GIRK2 在细胞膜上共定位(图 1B)。

2.2 吗啡耐受 HEK293 细胞模型的构建

建立吗啡耐受细胞模型,以 $1 \mu\text{mol/L}$ 吗啡处理稳转 HEK293 细胞 1 h、6 h、12 h、24 h 后测量细胞内 cAMP 含量。经单因素重复测量方差分析,不同处理时间点间 cAMP 含量差异具有统计学意义 ($F = 49.28, P < 0.0001$)。采用 Bonferroni 校正法进行事后两两比较发现:处理 1 h 组 (0.72 ± 0.12) nmol/mg

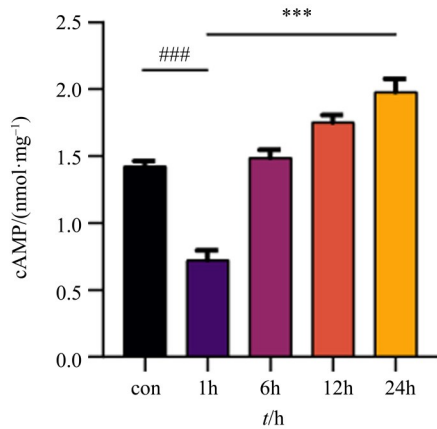


A shows no expression of GIRK1 and GIRK2 in HEK293 cells before modeling. B shows the expression of MOR, GIRK1, and GIRK2 on the membrane of HEK293 cells after modeling, as well as the co-localization of GIRK1 and GIRK2. Scale bar=5 μm .

图1 MOR 与 GIRK1 和 GIRK2 在 HEK293 细胞中的表达与共定位

Fig. 1 Expression and Co-localization of MOR with GIRK1 and GIRK2 in HEK293 Cell

明显低于对照组(1.42 ± 0.07)nmol/mg, 差异具统计学意义($P=0.0010$)。处理 24 h 组(1.98 ± 0.09)nmol/mg 明显高于 1 h 组(0.72 ± 0.12)nmol/mg, 差异具统计学意义($P=0.0005$)。以上数据表明在吗啡处理 24 h 后, 逆转了啡抑制细胞中 cAMP 的能力, 啡耐受细胞模型构建成功(图 2)。



ELISA shows the changes in cAMP content induced by morphine at 1 h, 6, 12 h, and 24 h after modeling. $n=3$, $F=49.28$, $P<0.0001$. ### $P<0.001$ compared with the control group, *** $P<0.001$ compared with the 1 h group.

图2 不同时间点吗啡诱导 cAMP 含量的变化

Fig. 2 Changes in cAMP content induced by morphine at different time points

2.3 啡耐受细胞中 GIRK1 和 GIRK2 蛋白内化及膜蛋白下调

为了进一步明确啡耐受细胞中 GIRK1 和 GIRK2 蛋白的表达变化, 本研究连续啡或生理盐水处理稳转 HEK293 细胞 24 h 后, 通过细胞免疫荧光检测胞浆中 GIRK1 和 GIRK2 荧光强度, 结果显示正常条件下 GIRK1 和 GIRK2 蛋白局限在胞膜上, 而啡耐受后 GIRK1 和 GIRK2 蛋白在胞质中呈点状聚集, t 检验显示, 啡耐受组胞内荧光强度 GIRK1 (63.72 ± 16.02) 明显强于对照组 GIRK1 (13.76 ± 7.67), $t=5.82$, $P<0.0001$, 差异有统计学意义。啡耐受组胞内荧光强度 GIRK2 (32.92 ± 7.67) 同样明显强于对照组 GIRK2 (7.16 ± 2.61), $t=6.23$, $P=0.0029$, 差异有统计学意义(图 3A)。免疫印迹结果显示, 膜蛋白 GIRK1 (1.11 ± 0.14 vs. 0.85 ± 0.01 , $t=3.21$, $P=0.0045$) 和 GIRK2 (1.32 ± 0.02 vs. 0.86 ± 0.08 , $t=8.40$, $P=0.0001$) 显著下调(图 3B), 浆蛋白 GIRK1 (0.65 ± 0.05 vs. 1.08 ± 0.20 , $t=3.68$, $P=0.0042$) 和

GIRK2 (0.72 ± 0.12 vs. 0.99 ± 0.11 , $t=5.24$, $P=0.0404$) 显著上调(图 3C)。以上数据表明啡耐受稳转 HEK293 细胞膜上 GIRK1 和 GIRK2 表达下调。

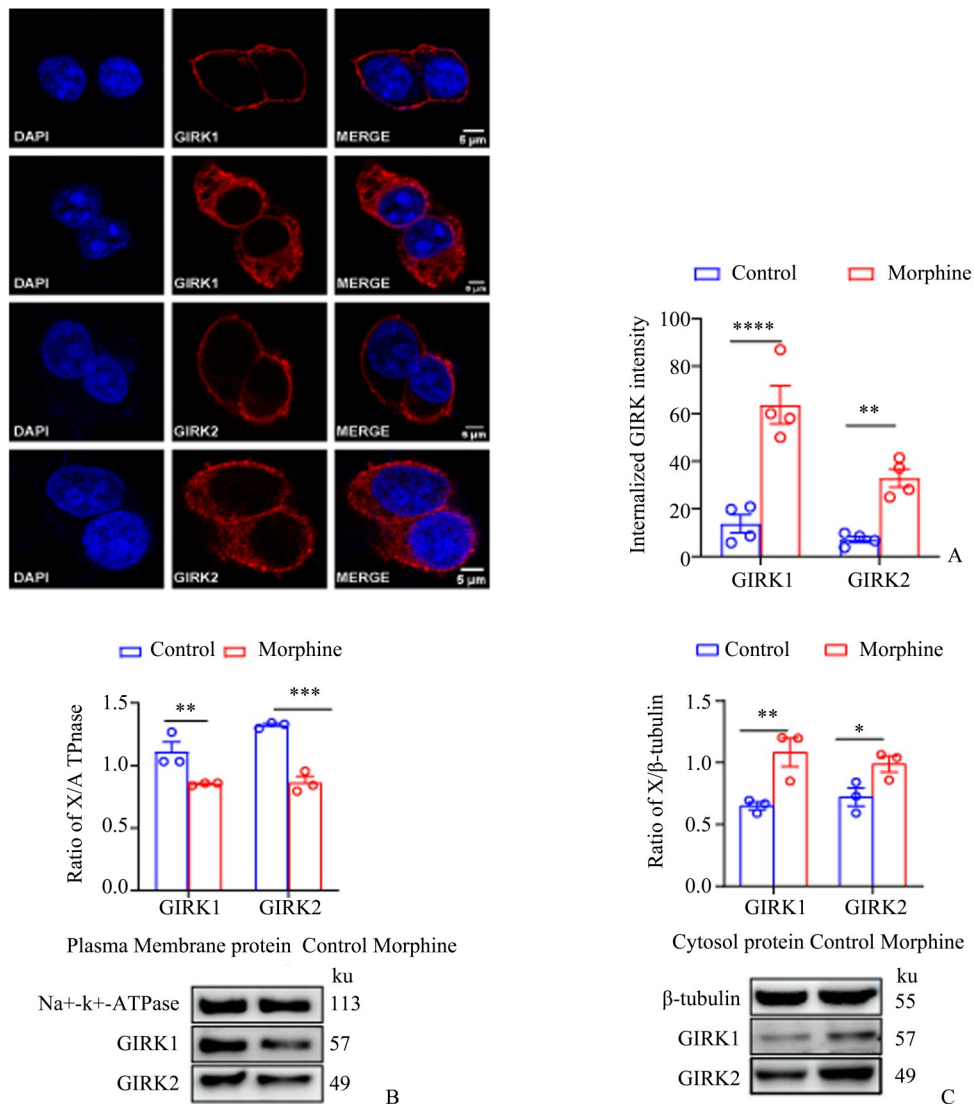
2.4 啡耐受细胞 GIRK 通道相关的超级化程度减弱

为评估啡耐受对 GIRK 通道电位的影响, 我们使用荧光染料 DiBAC₄(3) 对稳转 HEK293 细胞进行膜电位监测。在加入 ML297 ($5\ \mu\text{mol/L}$) 激活后, 耐受细胞的超极化程度减弱。采用双因素重复测量方差分析进行统计, 对照组响应: ML297 处理后快速达到平台期, 最大 $\Delta F/F_0$ 约为 -15.7% ; 啡耐受组响应: 显著减弱, 最大 $\Delta F/F_0$ 约为 -8.2% ; 平台期差异: 在第 6~8 min, 两组差异稳定且高度显著 ($-15.53\pm 0.12\%$ vs. $-8.17\pm 0.11\%$, $t=42.73$, $P<0.0001$, 相对减弱约 52.7%)。这些数据表明, 啡耐受导致稳转 HEK293 细胞 GIRK 通道相关的超级化程度减弱。

3 讨论

本研究中, 我们首次成功构建了共表达 MOR、GIRK1 和 GIRK2 通道的稳转 HEK293 细胞, 通过检测不同时长啡孵育所引起的 cAMP 浓度变化, 我们证明长时间 (24 h) 啡孵育可引起细胞耐受。此外, 我们还发现啡耐受的细胞 GIRK1 和 GIRK2 通道内化及膜蛋白水平下降, 且伴随 GIRK 相关的膜电位变化幅度降低。这些结果提示, GIRK 通道膜蛋白水平下调及其相关的细胞电位改变可能是啡耐受形成的关键因素。

GIRK 通道是 MOR 重要的下游效应器之一, 阿片类药物与 MOR 结合后通过耦联 Gi/o 蛋白释放 $G\beta\gamma$ 亚基激活 GIRK 通道, 引起钾离子外流与细胞膜超极化, 从而降低痛觉传递神经元兴奋性, 是阿片类药物产生镇痛作用的重要分子机制之一^[4,12-16]。我们前期动物实验发现, 连续鞘内注射啡可诱导大鼠镇痛耐受, 并伴随脊髓背角 GIRK1 和 GIRK2 免疫荧光信号减弱^[17], 提示 GIRK 通道可能参与啡耐受, 然而, 其具体分子机制尚不清楚。因此, 本研究从体外模型中系统探索了慢性啡对 GIRK 离子通道表达和功能的影响。HEK293 细胞背景干净、转染效率高, 便于精确操控外源基因表达^[15,18], 故



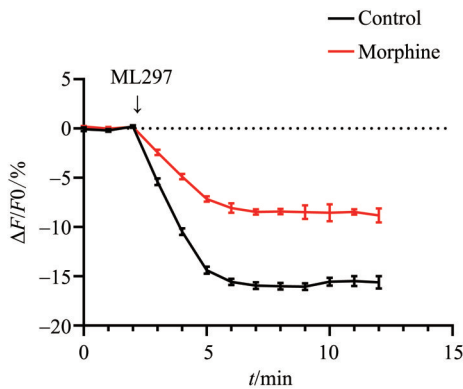
A: Changes in fluorescence after 24 h of morphine treatment. B, C: Changes in membrane and cytoplasmic proteins after 24 h of morphine treatment. A shows the internalization of GIRK1 and GIRK2 proteins in the cell model after morphine tolerance, $n=4$. Scale bar=5 μm . B shows the downregulation of GIRK1 and GIRK2 membrane proteins in the HEK293 cell model after morphine tolerance. C shows the increase in cytoplasmic GIRK1 and GIRK2 proteins in the HEK293 cell model after morphine tolerance. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, compared with the control group, $n=3$.

图3 吗啡诱导GIRK1和GIRK2表达变化

Fig. 3 Morphine induces changes in GIRK1 and GIRK2 expression

本研究选用该体系探究吗啡对GIRK通道的影响。研究中我们率先使用免疫荧光筛查,证实未转染的HEK293细胞内源MOR、GIRK1和GIRK2均为阴性,随后以分子克隆建立三基因稳定共表达细胞株^[19],通过免疫荧光验证外源MOR、GIRK1与GIRK2共定位于细胞膜,成功构建了干净的MOR-GIRK信号轴模型。为了进一步验证稳转HEK293细胞上MOR的功能状态,我们检测了MOR经典下游分子cAMP的浓度,结果发现吗啡孵育1 h后

cAMP的浓度显著降低。生理状态下,吗啡与MOR结合抑制腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC)的活性导致cAMP浓度降低^[20],因此结果证实该细胞株的MOR信号通路处于正常状态。以往大量研究证明,长时间激动MOR后可引起AC活性异常增加从而导致cAMP浓度反向升高^[21],研究发现在吗啡耐受小鼠模型中DRG中cAMP浓度升高^[22]。与以往研究一致,我们发现长时间孵育吗啡后cAMP浓度反向升高,证明细胞处于吗啡耐受状态。



After incubation with fluorescent dye, the baseline fluorescence intensity (F_0) of cells in the control group and the morphine tolerance group was measured using a multifunctional microplate reader for the first two minutes. Following the addition of ML297 (5 $\mu\text{mol/L}$), continuous detection was performed for 10 minutes. $n=6$, $F=108.3$, $P<0.0001$.

图4 GIRK通道膜电位变化时程曲线

Fig. 4 GIRK Channel Membrane Potential Change Time Course Curve

GIRK通道广泛分布于心肌与神经元,是调控细胞兴奋性的关键开关^[14]。细胞膜表面功能性GIRK数量随神经活动动态变化,以维持和稳定神经元兴奋性。以往研究表明,GIRK膜表达水平失调或功能异常与药物成瘾、唐氏综合征、阿尔兹海默症、癫痫等多种神经病理有关^[23-25]。本研究中发现,持续吗啡孵育引起GIRK1和GIRK2的膜蛋白水平降低,该结果与我们前期动物实验中观察到吗啡耐受大鼠脊髓背角GIRK1和GIRK2表达降低一致。我们的结果表明,与其他神经病理性疾病一样,吗啡耐受的形成与GIRK1和GIRK2膜表达水平失调密切相关。本研究选择GIRK1与GIRK2作为靶点,主要基于其在脊髓、大脑神经元中的丰富表达,且与镇痛回路密切相关^[8,17]。然而,不同脑区GIRK亚型组合存在细胞类型特异性且功能不同,例如有研究发现参与吗啡成瘾的并非是VTA中GABA能神经元的GIRK1/GIRK2通道,而是多巴胺能神经元的GIRK2/GIRK3通道^[11]。因此,本文结论并不能泛化到所有GIRK亚型与脑区,特定神经区域的不同亚型组合在吗啡耐受中的具体贡献,需要未来动物研究进一步阐明。同时,我们通过共聚焦显微镜清晰观察到吗啡耐受细胞存在GIRK1

和GIRK2内化现象,该现象直接解释了吗啡导致GIRK通道膜蛋白水平降低的原因。该现象的机制可能是持续的吗啡刺激通过招募 β -arrestin介导MOR内化^[26],间接破坏维持GIRK膜定位所需的受体信号微环境。另一方面,被激活的蛋白激酶C (protein kinase C, PKC)可直接磷酸化GIRK通道,改变其门控特性、膜稳定性或与支架蛋白(如RGS7、SNX27)的相互作用,从而促进其内吞^[9,25,27]。特别值得注意的是,PKC ϵ 亚型已被证明在阿片信号中扮演特殊角色,其磷酸化可能构成GIRK通道功能调节的关键节点^[9]。以上结果提示,GIRK通道的下调与功能抑制,是细胞水平吗啡耐受的一个重要因素。

以往大量研究已证明,慢性吗啡可引起伤害性感觉神经元等细胞神经兴奋性增加^[27],但具体分子机制并未明确。我们研究发现,吗啡耐受细胞GIRK通道膜电位变化程度降低,间接提示超级化程度减弱。由于吗啡耐受细胞GIRK1和GIRK2内化且膜蛋白水平降低,因此我们推测吗啡可能通过下调细胞膜GIRK通道数量,使得钾离子外流减少从而导致细胞超级化程度减弱,进而引起细胞去极化倾向增强,使得神经元兴奋性升高。值得注意的是,近年来开发的高选择性GIRK激活剂VU0466551^[10]在急性与持续性痛模型中均表现出良好镇痛效应,且与吗啡联用可协同增强镇痛、减少吗啡用量,进一步支持“增强GIRK功能可对抗耐受”这一策略的可行性。然而,由于条件所限,本研究并未通过电生理实验直接检测GIRK通道功能,因此尚无法排除吗啡对单通道开放概率或动力学参数的额外影响;后续工作应结合电生理与药理学激活综合评估GIRK功能变化,以全面阐明其在吗啡耐受中的因果关系。

综上所述,本研究在细胞水平证明了长时间使用吗啡可导致GIRK1和GIRK2内化以及膜蛋白水平降低,同时伴随GIRK相关的电位变化程度降低。这些结果强烈提示GIRK离子通道参与吗啡耐受的形成,且其机制可能与膜电位改变相关。本研究不仅深化了对吗啡耐受分子机制的理解,也为开发基于GIRK通道调控的新型耐受干预策略提供了理论依据。

参考文献

- [1] Mestdagh F, Steyaert A, Lavand'homme P. Cancer pain management: a narrative review of current concepts, strategies, and techniques[J]. *Curr Oncol*, 2023, 30(7): 6838-6858.
- [2] Chu LF, Angst MS, Clark D. Opioid-induced hyperalgesia in humans: molecular mechanisms and clinical considerations [J]. *Clin J Pain*, 2008, 24(6): 479-496.
- [3] Roeckel LA, Le Coz GM, Gavériaux-Ruff C, et al. Opioid-induced hyperalgesia: cellular and molecular mechanisms [J]. *Neuroscience*, 2016, 338: 160-182.
- [4] Mitrovic I, Margeta-Mitrovic M, Bader S, et al. Contribution of GIRK2-mediated postsynaptic signaling to opiate and alpha 2-adrenergic analgesia and analgesic sex differences [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(1): 271-276.
- [5] Nguyen H, Glaaser IW, Slesinger PA. Direct modulation of G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels [J]. *Front Physiol*, 2024, 15: 1386645.
- [6] Martín-Belmonte A, Aguado C, Alfaro-Ruiz R, et al. G protein-gated inwardly rectifying K (+) (GIRK/K (ir) 3) channels: molecular, cellular, and subcellular diversity [J]. *Histol Histopathol*, 2025, 40(5): 597-620.
- [7] Martín-Belmonte A, Aguado C, Alfaro-Ruiz R, et al. G protein-gated inwardly rectifying K+ (GIRK/Kir3) channels: Molecular, cellular, and subcellular diversity [J]. *Histol Histopathol*, 2024: 18822.
- [8] Liao YJ, Jan YN, Jan LY. Heteromultimerization of G-protein-gated inwardly rectifying K+ channel proteins GIRK1 and GIRK2 and their altered expression in weaver brain [J]. *J Neurosci*, 1996, 16(22): 7137-7150.
- [9] Lyu C, Mulder J, Barde S, et al. G protein-gated inwardly rectifying potassium channel subunits 1 and 2 are down-regulated in rat dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy [J]. *Mol Pain*, 2015, 11: 44.
- [10] Abney KK, Bubser M, Du Y, et al. Analgesic effects of the GIRK activator, VU0466551, alone and in combination with morphine in acute and persistent pain models [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(3): 1294-1299.
- [11] Kotecki L, Hearing M, Mccall NM, et al. GIRK channels modulate opioid-induced motor activity in a cell type- and subunit-dependent manner [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(18): 7131-7142.
- [12] Blake AD, Bot G, Freeman JC, et al. Differential opioid agonist regulation of the mouse mu opioid receptor [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(2): 782-790.
- [13] Alasbahi RH, Melzig MF. Forskolin and derivatives as tools for studying the role of cAMP [J]. *Pharmazie*, 2012, 67(1): 5-13.
- [14] Lüscher C, Slesinger PA. Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11(5): 301-315.
- [15] Whorton MR, Mackinnon R. Crystal structure of the mammalian GIRK2 K+ channel and gating regulation by G proteins, PIP2, and sodium [J]. *Cell*, 2011, 147(1): 199-208.
- [16] 韩雅洁, 王健, 宋宗斌. 中枢神经系统区域特异性突触可塑性参与吗啡耐受的研究进展 [J]. *实用医学杂志*, 2025, 41(13): 2100-2104.
- Han YJ, Wang J, Song ZB. Research progress on region-specific synaptic plasticity in the central nervous system involved in morphine tolerance [J]. *J Pract Med*, 2025, 41(13): 2100-2104.
- [17] 杨翹睿, 王晓娥, 崔宇, 等. 吗啡诱导大鼠镇痛耐受和脊髓 GIRK1-2 表达减少 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2024, 45(5): 701-708.
- Yang QR, Wang XE, Cui Y, et al. Morphine induces antinociceptive tolerance and downregulation of GIRK1-2 expression in rats [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2024, 45(5): 701-708.
- [18] Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2005, 51(3): 187-200.
- [19] Bodhinathan K, Slesinger PA. Molecular mechanism underlying ethanol activation of G-protein-gated inwardly rectifying potassium channels [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(45): 18309-18314.
- [20] Law PY, Wong YH, Loh HH. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2000, 40: 389-430.
- [21] Avidor-Reiss T, Nevo I, Levy R, et al. Chronic opioid treatment induces adenylyl cyclase V superactivation. Involvement of Gbetagamma [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(35): 21309-21315.
- [22] Han X, Pinto LG, Vilar B, et al. Opioid-induced hyperalgesia and tolerance are driven by HCN ion channels [J]. *J Neurosci*, 2024, 44(6): e1368232023.
- [23] Zhao Y, Gameiro-Ros I, Glaaser IW, et al. Advances in targeting GIRK channels in disease [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2021, 42(3): 203-215.
- [24] Kleschevnikov A. GIRK2 channels in down syndrome and Alzheimer's disease [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2022, 19(12): 819-829.
- [25] Rifkin RA, Moss SJ, Slesinger PA. G protein-gated potassium channels: a link to drug addiction [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2017, 38(4): 378-392.
- [26] Whistler JL, Von Zastrow M. Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by beta-arrestin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(17): 9914-9919.
- [27] Corder G, Tawfik VL, Wang D, et al. Loss of mu opioid receptor signaling in nociceptors, but not microglia, abrogates morphine tolerance without disrupting analgesia [J]. *Nat Med*, 2017, 23(2): 164-173.