

基于 μ 阿片受体羧基端³⁷⁵ STANT³⁷⁹ 磷酸化位点的多肽干预对吗啡介导的受体下游信号通路的影响

李笑妍^{1,2} 周筱慧¹ 董河¹ 董铭心²

(1 青岛大学附属医院麻醉科, 山东 青岛 266075; 2 青岛大学药学院)

[摘要] 目的 探讨基于 μ 阿片受体(MOR)羧基端³⁷⁵ STANT³⁷⁹ 磷酸化位点的多肽 TAT-Q368-T379 干预, 对 μ 阿片受体下游信号通路的影响。方法 将 HA-MOR 质粒与 pGloSensorTM-22F 质粒共转染的 HEK-293 细胞分为空白组(A组)、DAMGO组(B组)、吗啡组(C组)、 0.5×10^{-5} mol/L 多肽 TAT-Q368-T379 与吗啡联用组(D组)、 10^{-5} mol/L 多肽 TAT-Q368-T379 与吗啡联用组(E组)、 2×10^{-5} mol/L 多肽 TAT-Q368-T379 与吗啡联用组(F组), 通过 GloSensor cAMP 生物传感器测定各组细胞中的 cAMP 含量。将 MOR-C 端标记 Nanoluc 的质粒以及 β -arrestin2-N 端标记 EYFP 的质粒共转染完成的 HEK-293 细胞分为空白组(G组)、DAMGO组(H组)、吗啡组(I组)、 10^{-5} mol/L 多肽 TAT-Q368-T379 与吗啡联用组(J组)、 3×10^{-5} mol/L Cmpd101 与吗啡联用组(K组), 通过蛋白质相互作用分析法测定各组细胞 MOR 激动后对 β -arrestin2 的募集效应。将 HA-MOR 质粒转染完成的 HEK-293 细胞分为空白组(L组)、吗啡组(M组)、 10^{-5} mol/L 多肽 TAT-Q368-T379 与吗啡联用组(N组)以及 3×10^{-5} mol/L Cmpd101 与吗啡联用组(O组), 通过细胞免疫荧光染色法检测各组细胞的受体平均荧光强度。结果 GloSensor cAMP 生物传感器检测结果显示, C~F 组细胞 EC₅₀ 值差异有显著性($F=13.12, P<0.05$), 其中 D、E、F 组 EC₅₀ 值较 C 组均显著减小($P<0.05$)。蛋白质相互作用分析法分析显示, I~K 组细胞 E_{max} 值差异有显著性($F=185.95, P<0.05$), 其中 J、K 组 E_{max} 值较 I 组均显著减小($P<0.01$)。细胞免疫荧光染色法染色结果显示, L~O 组细胞表面受体荧光强度比较差异有显著性($F=17.46, P<0.05$), 其中与 M 组比较, N、O 组细胞表面受体荧光强度均显著增高($P<0.01$)。结论 基于 MOR 羧基端³⁷⁵ STANT³⁷⁹ 磷酸化位点设计的多肽 TAT-Q368-T379 可有效增强吗啡介导的 MOR 下游 G 蛋白信号通路的激活, 减少吗啡介导的 β -arrestin2 招募, 从而减少由吗啡介导的 MOR 的内吞。

[关键词] 受体, 阿片样, μ ; 磷酸化; 吗啡; 肽类; 信号传导; GTP 结合蛋白质类; β -抑制蛋白 2

[中图分类号] R971.2 **[文献标志码]** A

EFFECT OF PEPTIDE INTERVENTION BASED ON THE CARBOXYL-TERMINAL³⁷⁵ STANT³⁷⁹ PHOSPHORYLATION SITE OF μ OPIOID RECEPTOR ON THE MORPHINE-MEDIATED RECEPTOR DOWNSTREAM SIGNALING PATHWAY LI Xiaoyan, ZHOU Xiaohui, DONG He, DONG Mingxin (Department of Anesthesiology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266075, China)

[ABSTRACT] **Objective** To study the effect of peptide TAT-Q368-T379 intervention based on the carboxyl-terminal³⁷⁵ STANT³⁷⁹ phosphorylation site of μ opioid receptor (MOR) on the MOR downstream signaling pathway. **Methods** HEK-293 cells co-transfected with HA-MOR plasmids and pGloSensorTM-22F plasmids were divided into blank group (group A), DAMGO group (group B), morphine group (group C), 0.5×10^{-5} mol/L peptide TAT-Q368-T379 combined with morphine group (group D), 10^{-5} mol/L peptide TAT-Q368-T379 combined with morphine group (group E), and 2×10^{-5} mol/L peptide TAT-Q368-T379 combined with morphine group (group F). The GloSensor cAMP biosensor was used to measure cAMP content in each group. HEK-293 cells co-transfection with plasmids labeled with Nanoluc at the MOR-C terminal and plasmids labeled with EYFP at the β -arrestin2-N terminal were divided into blank group (group G), DAMGO group (group H), morphine group (group I), 10^{-5} mol/L peptide TAT-Q368-T379 combined with morphine group (group J), and 3×10^{-5} mol/L Cmpd101 combined with morphine group (group K). Protein interaction analysis assay was used to determine the recruitment of β -arrestin2 after MOR activation in each group. HEK-293 cells transfected with HA-MOR plasmids were divided into blank group (group L), morphine group (group M), 10^{-5} mol/L peptide TA-Q368-T379 combined with morphine group (group N), and 3×10^{-5} mol/L Cmpd101 combined with morphine group (group O). Live cell immunofluorescence staining assay was used to determine the mean fluorescence intensity of receptors in each group. **Results** The results of GloSensor cAMP biosensor showed that the median effective concentration (EC₅₀) values of groups C to F were significantly different ($F=13.12, P<0.05$), and the EC₅₀ values in groups D, E, and F were significantly decreased compared with group C ($P<0.05$). The results of protein interaction analysis assay showed that the

E_{max} values of groups I to K were significantly different ($F=185.95, P<0.05$), and the E_{max} values of groups J and K were significantly decreased compared with group I ($P<0.01$). The results of live cell immunofluorescence staining assay showed that the fluorescence in-

[收稿日期] 2023-04-15; **[修订日期]** 2023-06-27

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81873729)

[通讯作者] 董河, Email: donghe1987@163.com; 董铭心,

Email: mxdong@qdu.edu.cn

tensity of cell surface receptors in groups L to O was significantly different ($F=17.46, P<0.05$), and the fluorescence intensity of cell surface receptors in groups N and O was significantly increased compared with group M ($P<0.01$). **Conclusion** The peptide TAT-Q368-T379 designed based on the carboxyl-terminal ³⁷⁵STANT³⁷⁹ phosphorylation site of MOR can effectively enhance the activation of morphine-mediated MOR downstream G protein signaling pathway, reduce morphine-mediated β -arrestin2 recruitment, and thus reduce morphine-mediated MOR endocytosis.

[KEY WORDS] Receptors, opioid, mu; Phosphorylation; Morphine; Peptides; Signal transduction; GTP-binding proteins; Beta-arrestin 2

吗啡作为经典的阿片类镇痛药物在临床中应用广泛,具有强效镇痛作用^[1]。然而吗啡在发挥强大镇痛作用的同时,也会产生药物耐受、呼吸抑制、便秘、成瘾等副作用,极大地限制了其临床使用^[2-4]。因此,如何在使用吗啡镇痛时尽可能减少其副作用发生,成为目前学界研究的重点问题。既往研究发现吗啡主要通过激活 μ 阿片受体(MOR)发挥镇痛作用,但是此过程也导致了吗啡的副作用^[5]。MOR 羧基端包含了 11 个丝氨酸(Ser)或苏氨酸(Thr)的关键磷酸化位点,当阿片类药物激活受体时,这些位点可被 G 蛋白偶联受体激酶(GRKs)和蛋白激酶 C 磷酸化^[6],而羧基端多位点磷酸化是促进 MOR 脱敏和内吞的关键因素^[7]。本课题组前期基于 MOR 羧基端的³⁷⁵STANT³⁷⁹磷酸化位点设计并合成了多肽 TAT-Q368-T379^[8],本研究以该多肽作为研究工具,探讨 MOR 羧基端的³⁷⁵STANT³⁷⁹关键磷酸化位点对受体下游 G 蛋白信号通路以及 β -arrestin2 信号通路的影响,为开发能够与吗啡联用以增强镇痛作用的药物提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞与质粒 HEK-293 细胞购自北京中科质检生物技术有限公司, MOR 质粒来源于上海联慧脑智工程研究中心, pGloSensorTM-22F cAMP 质粒购买于美国 Promega 公司, MOR-C 端标记 Nanoluc 质粒、 β -arrestin2-N 端标记 EYFP 质粒由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.1.2 试剂与仪器 医用盐酸吗啡购买于东北制药集团沈阳第一制药有限公司, DAMGO 购买于美国 AbMole 公司, Forskolin 购买于上海阿拉丁生化科技股份有限公司, Cmpd101 购买于北京偶合科技有限公司, HA-Tag 抗体购买于美国 Cell Signaling technology 公司, Alexa Fluor 555 标记的驴抗小鼠抗体购买于上海碧云天生物技术有限公司, 正置双光子全光谱快速扫描共聚焦显微镜购买于日本 Nikon 公司。

1.2 HEK-293 细胞培养

将 HEK-293 细胞置于含体积分数 0.10 的胎牛血清和 100 kU/L 青霉素和链霉素(1:1)混合液的 DMEM 培养基中,置于 37 °C、含体积分数 0.05 的 CO₂ 培养箱培养,隔天传代一次,待 HEK-293 细胞传到第 8 代且细胞融合度约 90%时用于后续实验。

1.3 GloSensor cAMP 生物传感器测定 cAMP 的含量

将 HA-MOR 质粒与 pGloSensorTM-22F 质粒共转染至 HEK-293 细胞中,转染 24 h 后,在 96 孔板每孔接种 100 μ L 的细胞悬液,培养 24 h 后丢弃培养基,换成平衡培养基(不含酚红的 DMEM 培养基和 2%的 GloSensor cAMP 试剂原液)于 37 °C、含体积分数 0.05 的 CO₂ 培养箱中孵育 30 min,孵育完成后,将细胞分为 6 组并进行如下处理:①A 组:每孔加入 100 μ L 不含酚红 DMEM 培养基;②B 组:每孔加入 90 μ L 不含酚红的 DMEM 培养基,然后加入溶解有 10^{-5} mol/L DAMGO 的 10 μ L 不含酚红 DMEM 培养基;③C 组:每孔加入 90 μ L 不含酚红 DMEM 培养基后分为 7 个亚组,各亚组加入含浓度 10^{-11} 、 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L 吗啡(后文以浓度梯度 10^{-11} ~ 10^{-5} mol/L 吗啡代指)的 10 μ L 不含酚红 DMEM 培养基;④D 组:每孔加入 80 μ L 不含酚红的 DMEM 培养基,然后加入溶解有 0.5×10^{-5} mol/L 多肽 TAT-Q368-T379 的 10 μ L 不含酚红 DMEM 培养基后,下设 7 个亚组,各亚组分别加入含浓度 10^{-11} ~ 10^{-5} mol/L 吗啡的 10 μ L 不含酚红 DMEM 培养基;⑤E 组:每孔加入 80 μ L 不含酚红 DMEM 培养基,然后加入溶解有 10^{-5} mol/L 多肽 TAT-Q368-T379 的 10 μ L 不含酚红 DMEM 培养基后,下设 7 个亚组,各亚组分别加入含浓度 10^{-11} ~ 10^{-5} mol/L 吗啡的 10 μ L 不含酚红 DMEM 培养基;⑥F 组:每孔加入 80 μ L 不含酚红 DMEM 培养基,然后加入溶解有 2×10^{-5} mol/L 多肽 TAT-Q368-T379 的 10 μ L 不含酚红 DMEM 培养基后,下设 7 个亚组,各亚组分别加入含浓度 10^{-11} ~ 10^{-5} mol/L 吗啡的 10 μ L 无酚红 DMEM

培养基。除 A 组外, B~F 组每组分别加入含浓度 10^{-5} mol/L Forskolin 的 $1 \mu\text{L}$ 不含酚红 DMEM 培养基, 孵育 15 min, 最后用多功能酶标仪测定 A~F 组细胞全波长化学发光强度(LI)。通过计算药物作用以后的 cAMP 抑制率以反映药物对于 MOR 下游 G 蛋白依赖性信号通路的激活的程度, cAMP 抑制率 = $[(LI_{\text{Forskolin组}} - LI_{\text{空白组}}) - (LI_{\text{药物处理组}} - LI_{\text{空白组}})] / (LI_{\text{Forskolin组}} - LI_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。每组分别设置 3 个复孔, 实验需重复 3 次, 结果取均值。多肽 TAT-Q368-T379 由本课题组前期构建^[8]。

1.4 蛋白质相互作用分析法测定吗啡激动 MOR 后对 β -arrestin2 的募集效应

将 MOR-C 端标记 Nanoluc 的质粒和 β -arrestin2-N 端标记 EYFP 的质粒共转染至 HEK-293 细胞中。转染 24 h 后, 在 96 孔板每孔中接种 $100 \mu\text{L}$ 的细胞悬液, 于 37°C 、含体积分数 0.05 的 CO_2 培养箱中孵育过夜。24 h 后丢弃培养基, 将细胞分为 5 组并进行如下处理: ①G 组: 每孔加入 $90 \mu\text{L}$ 不含酚红的 DMEM 培养基; ②H 组: 每孔加入 $80 \mu\text{L}$ 不含酚红 DMEM 培养基, 然后加入溶解有 10^{-5} mol/L DAMGO 的 $10 \mu\text{L}$ 不含酚红 DMEM 培养基; ③I 组: 每孔加入 $80 \mu\text{L}$ 不含酚红 DMEM 培养基以后, 下设 8 个亚组, 各个亚组分别加入含浓度 $10^{-11} \sim 10^{-4}$ mol/L 吗啡的 $10 \mu\text{L}$ 不含酚红 DMEM 培养基; ④J 组: 每孔加入 $70 \mu\text{L}$ 不含酚红的 DMEM 培养基, 再加入溶解有 10^{-5} mol/L 多肽 TAT-Q368-T379 的 $10 \mu\text{L}$ 不含酚红 DMEM 培养基后, 下设 8 个亚组, 各亚组分别加入含浓度 $10^{-11} \sim 10^{-4}$ mol/L 吗啡的 $10 \mu\text{L}$ 不含酚红 DMEM 培养基; ⑤K 组: 每孔加入 $70 \mu\text{L}$ 不含酚红的 DMEM 培养基, 再加入溶解有 3×10^{-5} mol/L Cmpd101 的 $10 \mu\text{L}$ 不含酚红 DMEM 培养基后, 下设 8 个亚组, 各亚组分别加入含浓度 $10^{-11} \sim 10^{-4}$ mol/L 吗啡的 $10 \mu\text{L}$ 不含酚红 DMEM 培养基。G~K 组每孔加入溶解有 Nluc 底物(1:1 000)的 $10 \mu\text{L}$ 不含酚红 DMEM 培养基孵育 3 min, 然后使用多功能酶标仪测定 G~K 组在波长 460 nm 处的 LI 以及 540 nm 处的荧光强度(FI)。计算每孔的净 BRET 值以反映药物对 MOR 下游 β -arrestin2 信号通路的激活的程度, 净 BRET 值 = $FI_{\text{药物处理组}} / LI_{\text{药物处理组}} - FI_{\text{空白组}} / LI_{\text{空白组}}$ 。每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次, 结果取均值。

1.5 细胞免疫荧光染色法测定吗啡激动 MOR 后受体内吞水平的变化

将瞬时转染表达 HA-MOR 的 HEK-293 细胞

接种在放置于 24 孔板中的多聚赖氨酸包被的玻片上生长过夜。24 h 后丢弃培养基, 将识别 MOR 氨基端 HA 标签的一抗(1:100)稀释于 DMEM 培养基中并在 37°C 下培养细胞 1 h, 随后将细胞分为 4 组并进行如下处理: ①L 组: 每孔加入 2 mL DMEM 培养基; ②M 组: 每孔加入 1.9 mL DMEM 培养基, 再加入含 10^{-5} mol/L 吗啡的 $100 \mu\text{L}$ DMEM 培养基; ③N 组: 每孔加入 1.8 mL DMEM 培养基, 然后加入溶解有 10^{-5} mol/L 多肽 TAT-Q368-T379 的 $100 \mu\text{L}$ DMEM 培养基, 再加入含 10^{-5} mol/L 吗啡的 $100 \mu\text{L}$ DMEM 培养基; ④O 组: 每孔之中加入 1.8 mL 的 DMEM 培养基, 然后再加入溶解有 3×10^{-5} mol/L Cmpd101 的 $100 \mu\text{L}$ DMEM 培养基, 再加入含 10^{-5} mol/L 吗啡的 $100 \mu\text{L}$ DMEM 培养基。完成药物处理后用 40 g/L 多聚甲醛固定 L~O 组细胞, 将 Alexa Fluor 555 标记的驴抗小鼠二抗(1:500)稀释于 DMEM 培养基中, 然后孵育 L~O 组细胞 1 h。通过荧光在共聚焦显微镜下对 L~O 组 MOR 进行细胞定位, 检测细胞的平均荧光强度, 以细胞表面受体荧光强度表示吗啡激动 MOR 后受体内吞水平的变化。每组选用 45~50 个细胞, 每组实验重复 3 次。

1.6 统计学分析

使用 GraphPad Prism 软件处理数据, 得到量效关系曲线并拟合出各分组中吗啡的效价参数半数最大有效浓度(EC_{50})和效能参数最大效应(E_{max})。使用 SPSS 软件进行统计学分析, 各组间 EC_{50} 值、 E_{max} 值及半定量分析指标差异比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 多肽 TAT-Q368-T379 对吗啡激活 MOR 下游 G 蛋白依赖性 cAMP 信号通路的影响

通过 C~F 组及其 7 个亚组的 cAMP 抑制率拟合量效关系曲线得出, C~F 组细胞 EC_{50} 值分别为 2.33 ± 0.73 、 1.34 ± 0.45 、 0.49 ± 0.08 、 0.38 ± 0.07 , 组间比较差异有显著性($F = 13.12$, $P < 0.05$); 与 C 组比较, D、E、F 组细胞的 EC_{50} 值均显著减小($P < 0.05$)。

2.2 多肽 TAT-Q368-T379 和 Cmpd101 对吗啡激活 MOR 下游 β -arrestin2 信号通路的影响

通过 I~K 组及其 8 个亚组的净 BRET 值拟合量效关系曲线得出, I~K 组细胞的 E_{max} 值为 $0.23 \pm$

0.00、 0.17 ± 0.01 、 0.12 ± 0.00 ，组间比较差异具有显著性($F=185.95, P<0.05$)，与 I 组比较，J、K 组细胞的 E_{\max} 值均显著减小($P<0.01$)。

2.3 多肽 TAT-Q368-T379 对吗啡诱导的 MOR 内吞的影响

共聚焦成像结果显示，与 L 组相比，M 组细胞可观察到 MOR 发生明显内吞，而 N、O 组细胞内吞

的 MOR 明显比 M 组减少(图 1)。L~O 组细胞的表面受体荧光强度分别为 100.00 ± 13.11 、 81.28 ± 10.56 、 92.58 ± 12.86 、 93.72 ± 13.30 ，组间比较差异有显著性($F=17.46, P<0.05$)；与 L 组比较，M 组细胞表面受体荧光强度显著减小($P<0.01$)，与 M 组进行比较，N、O 组细胞表面受体荧光强度均显著增高($P<0.01$)。

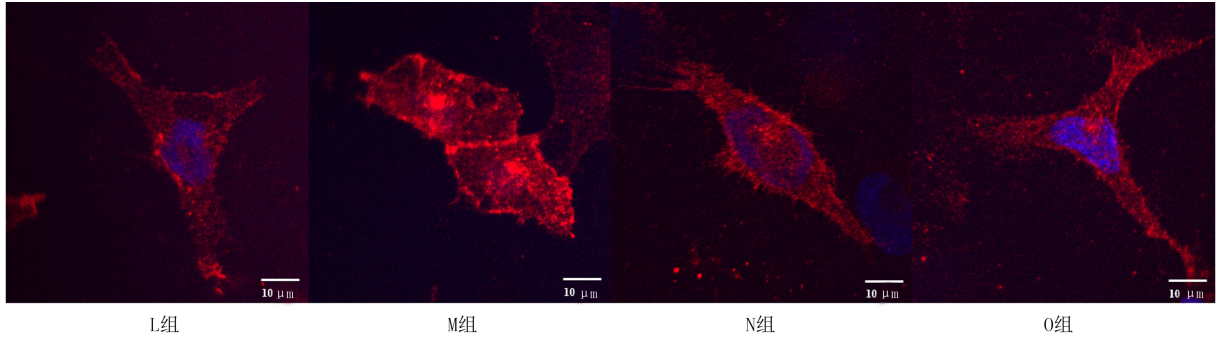


图 1 各组 HEK-293 细胞中 MOR 内吞水平的比较

3 讨论

MOR 是一种 $G_{i/o}$ 亚型的 G 蛋白偶联受体。当 MOR 与其激动剂在细胞内结合后，活化的 MOR 通过 G_{α} 蛋白发出信号，抑制腺苷酸环化酶活性并减少 cAMP 积累，通过 G 蛋白的 $\beta\gamma$ 亚单位激活内向整流 K^+ 通道和抑制电压门控 Ca^{2+} 通道，从而产生镇痛作用^[9-10]，细胞内活化的 MOR 也被 GRKs 磷酸化，导致 β -arrestin2 募集，从而启动 MOR 脱敏、内吞和再循环过程^[6]。研究发现， β -arrestin2 敲除小鼠表现为阿片类药物诱导的镇痛作用增强，药物耐受、呼吸抑制和便秘均得到改善^[11-13]。后续关于 β -arrestin2 敲除小鼠的研究再次证实了 MOR 下游 β -arrestin2 信号通路对阿片类药物的镇痛作用及药物耐受至关重要^[14-15]，但是对呼吸抑制、便秘的作用具有一定争议^[7]。

MOR 羧基端具有多个 Ser、Thr 关键磷酸化位点，受体下游信号通路传导的效率能够受到多位点的调节^[16]。通过定量质谱以及细胞生物学分析发现，³⁷⁵STANT³⁷⁹ 基序是阿片类药物介导 MOR 磷酸化的关键位点^[17]。有研究通过 Western blot 实验检测 MOR 激动剂诱导的 Thr370 和 Ser375 位点磷酸化证实了上述观点^[18]。阿片类药物活化 MOR 后介导的受体羧基端位点磷酸化是分层次进行的，首先是 Ser375 位点发生快速并且显著的磷酸化，随后则依次是 Thr370、Thr379 及 Thr376 位点的磷酸化^[19-21]。最近有研究发现，HEK-293 细胞中 GRK2

以及 GRK3 能够明显促进包括³⁷⁵STANT³⁷⁹ 位点在内的 MOR 多位点磷酸化以及 MOR 内吞^[20-22]，并且 Thr370、³⁷⁵STANT³⁷⁹ 位点对于 MOR 脱敏、内吞以及 β -arrestin2 募集均是必要的^[21]。

大部分研究通过使用转基因小鼠间接证明了 MOR 羧基端³⁷⁵STANT³⁷⁹ 位点磷酸化在受体下游细胞信号通路中的作用，但这种情况下不能排除参与 MOR 调节的其他信号蛋白的磷酸化。本课题组前期根据 MOR 羧基端的³⁷⁵STANT³⁷⁹ 磷酸化位点设计合成了多肽 TAT-Q368-T379，实验结果显示，多肽 TAT-Q368-T379 与吗啡联合使用时，能够明显增强吗啡的镇痛作用，说明³⁷⁵STANT³⁷⁹ 磷酸化位点与吗啡的镇痛相关^[8]。为探究多肽 TAT-Q368-T379 发挥作用的分子机制，本文研究了该多肽对吗啡介导的 MOR 下游细胞信号通路的影响。

在本研究中，通过 GloSensor cAMP 生物传感器检测发现，多肽 TAT-Q368-T379 与吗啡联用能够使吗啡的 cAMP 抑制率明显增高，即多肽增强了 MOR 下游 G 蛋白信号通路的激活。说明多肽在一定程度上可以防止吗啡脱敏的发生。这一结论也与本课题组前期的体内实验结果相一致^[8]。蛋白质相互作用分析法和细胞免疫荧光染色法分析显示，在 HEK-293 细胞中 GRK2/3 抑制剂 Cmpd101 能够明显减少吗啡诱导的 β -arrestin2 募集和 MOR 内吞，这也与既往研究的观点一致^[16,23]。同时，本研究显示，基于 MOR 羧基端³⁷⁵STANT³⁷⁹ 磷酸化位点设计的多肽 TAT-Q368-T379 可以起到与 Cmpd101 类

似的作用,因此推测 HEK-293 细胞中多肽可能通过竞争性抑制³⁷⁵ STANT³⁷⁹位点的磷酸化,从而阻止 β -arrestin2 募集和 MOR 内吞。此机制可通过进一步的蛋白免疫印迹实验进行验证。关于在动物体内 β -arrestin2 招募与阿片类药物副作用的关系,包括药物耐受、便秘和呼吸抑制等,也可进一步将多肽与吗啡联合应用于相关的动物模型中进行验证。

综上所述,基于本课题组前期所设计的多肽 TAT-Q368-T379,本研究证实了该多肽干预能够在 MOR 下游 G 蛋白信号通路和 β -arrestin2 信号通路中发挥重要作用,此为增强阿片类药物镇痛作用及改善药物副作用提供了新思路。

作者声明:董河、董铭心、李笑妍参与了研究设计;董铭心、李笑妍、周筱慧参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] VOLKOW N, COLLINS F. The role of science in addressing the opioid crisis[J]. *N Engl J Med*, 2017,377:391-394.
- [2] BATEMAN J T, SAUNDERS S E, LEVITT E S. Understanding and countering opioid-induced respiratory depression [J]. *Br J Pharmacol*, 2023,180(7):813-828.
- [3] MORGAN M M, CHRISTIE M J. Analysis of opioid efficacy, tolerance, addiction and dependence from cell culture to human [J]. *Br J Pharmacol*, 2011,164(4):1322-1334.
- [4] CONNOR M, OSBORNE P B, CHRISTIE M J. Mu-opioid receptor desensitization: Is morphine different? [J]. *Br J Pharmacol*, 2004,143(6):685-696.
- [5] MATTHES H W, MALDONADO R, SIMONIN F, et al. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene [J]. *Nature*, 1996,383(6603):819-823.
- [6] WILLIAMS J T, INGRAM S L, HENDERSON G, et al. Regulation of μ -opioid receptors: Desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance [J]. *Pharmacol Rev*, 2013,65(1):223-254.
- [7] KLIEWER A, SCHMIEDEL F, SIANATI S, et al. Phosphorylation-deficient G-protein-biased μ -opioid receptors improve analgesia and diminish tolerance but worsen opioid side effects [J]. *Nat Commun*, 2019,10(1):367.
- [8] 周筱慧,李笑妍,褚海辰,等. μ 阿片受体羧基⁽³⁷⁵⁾ STANT⁽³⁷⁹⁾位点磷酸化对吗啡镇痛效果的影响[J]. *精准医学杂志*, 2022,37(3):262-266.
- [9] HEINKE B, GINGL E, SANDKÜHLER J. Multiple targets of μ -opioid receptor-mediated presynaptic inhibition at primary afferent A δ - and C-fibers[J]. *J Neurosci*, 2011,31(4):1313-1322.
- [10] NOCKEMANN D, ROUAULT M, LABUZ D, et al. The K (+) channel GIRK2 is both necessary and sufficient for peripheral opioid-mediated analgesia[J]. *EMBO Mol Med*, 2013, 5(8):1263-1277.
- [11] BOHN L M, GAINETDINOV R R, LIN F T, et al. Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence[J]. *Nature*, 2000,408 (6813):720-723.
- [12] BOHN L M, LEFKOWITZ R J, GAINETDINOV R R, et al. Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2 [J]. *Science*, 1999,286(5449):2495-2498.
- [13] RAEHAL K M, WALKER J K, BOHN L M. Morphine side effects in beta-arrestin 2 knockout mice[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005,314(3):1195-1201.
- [14] BULL F A, BAPTISTA-HON D T, SNEDDON C, et al. Src kinase inhibition attenuates morphine tolerance without affecting reinforcement or psychomotor stimulation[J]. *Anesthesiology*, 2017,127(5):878-889.
- [15] BULL F A, BAPTISTA-HON D T, LAMBERT J J, et al. Morphine activation of mu opioid receptors causes disinhibition of neurons in the ventral tegmental area mediated by β -arrestin2 and c-Src[J]. *Sci Rep*, 2017,7(1):9969.
- [16] ALLOUCHE S, NOBLE F, MARIE N. Opioid receptor desensitization: Mechanisms and its link to tolerance[J]. *Front Pharmacol*, 2014,5:280.
- [17] LAU E K, TRESTER-ZEDLITZ M, TRINIDAD J C, et al. Quantitative encoding of the effect of a partial agonist on individual opioid receptors by multisite phosphorylation and threshold detection[J]. *Sci Signal*, 2011,4(185):ra52.
- [18] DOLL C, KONIETZKO J, PÖLL F, et al. Agonist-selective patterns of μ -opioid receptor phosphorylation revealed by phosphosite-specific antibodies[J]. *Br J Pharmacol*, 2011,164(2):298-307.
- [19] KOUHEN R E, BURD A L, ERICKSON-HERBRANDSON L J, et al. Phosphorylation of Ser363, Thr370, and Ser375 residues within the carboxyl tail differentially regulates mu-opioid receptor internalization[J]. *J Biol Chem*, 2001,276 (16):12774-12780.
- [20] SCHULZ S, MAYER D, PFEIFFER M, et al. Morphine induces terminal micro-opioid receptor desensitization by sustained phosphorylation of serine-375 [J]. *EMBO J*, 2004,23 (16):3282-3289.
- [21] JUST S, ILLING S, TRESTER-ZEDLITZ M, et al. Differentiation of opioid drug effects by hierarchical multi-site phosphorylation[J]. *Mol Pharmacol*, 2013,83(3):633-639.
- [22] DOLL C, PÖLL F, PEUKER K, et al. Deciphering μ -opioid receptor phosphorylation and dephosphorylation in HEK293 cells[J]. *Br J Pharmacol*, 2012,167(6):1259-1270.
- [23] LOWE J D, SANDERSON H S, COOKE A E, et al. Role of G protein-coupled receptor kinases 2 and 3 in μ -opioid receptor desensitization and internalization[J]. *Mol Pharmacol*, 2015, 88(2):347-356.