

# $\alpha$ -芋螺毒素 TxID 异构体对人类乙酰胆碱受体的活性研究

长孙东亭, 朱晓鹏, 吴 勇, 胡远艳, 邢 晖, 罗素兰\*

(海南大学热带生物资源教育部重点实验室、海口市海洋药物重点实验室, 海口 570228)

**摘 要** 研究  $\alpha$ -芋螺毒素 TxID 3 个二硫键异构体对人类  $\alpha 3\beta 4$  与  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  乙酰胆碱受体的阻断活性。采用 Fmoc 固相合成法, 分别合成  $\alpha$ -芋螺毒素 TxID 的 3 个二硫键异构体的线性肽, 利用 2 步氧化法进行氧化折叠, 获得具有定点连接二硫键的异构体多肽。利用非洲爪蟾卵母细胞表达人类  $\alpha 3\beta 4$  与  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  乙酰胆碱受体亚型, 测定 3 个异构体对该乙酰胆碱受体的电流与洗脱速率的影响情况。 $\alpha$ -芋螺毒素 TxID 的 3 个二硫键异构体对人类  $\alpha 3\beta 4$  与  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  乙酰胆碱受体亚型的阻断活性差异很大, 阻断是可逆的, 洗脱速率较快。其中具有天然构象的球状异构体活性最强, 其半数阻断剂量 ( $IC_{50}$ ) 仅约为 9.3 nmol/L; 其次是带状异构体具有很微弱的抑制活性, 其  $IC_{50}$  大于 5  $\mu$ mol/L; 而珠子状异构体几乎没有阻断活性, 其  $IC_{50}$  大于 10  $\mu$ mol/L。成功合成了  $\alpha$ -芋螺毒素 TxID 的 3 个二硫键异构体, 并获知了 3 个二硫键异构体分别对人类  $\alpha 3\beta 4$  与  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  乙酰胆碱受体亚型的阻断活性, 为  $\alpha$ -芋螺毒素 TxID 后续海洋新药研发提供理论基础。

**关键词**  $\alpha$ -芋螺毒素 TxID; 二硫键异构体; 多肽人工合成; 人类  $\alpha 3\beta 4$  乙酰胆碱受体; 人类  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  乙酰胆碱受体

**中图分类号** R931 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2016)04-0483-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160416

**引用本文** 长孙东亭, 朱晓鹏, 吴勇, 等.  $\alpha$ -芋螺毒素 TxID 异构体对人类乙酰胆碱受体的活性研究[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(4): 483-490.

**Cite this article as:** ZHANGSUN Dongting, ZHU Xiaopeng, WU Yong, *et al.* Activities of  $\alpha$ -conotoxin TxID isomers on human nicotinic acetylcholine receptors[J]. *J China Pharm Univ*, 2016, 47(4):483-490.

## Activities of $\alpha$ -conotoxin TxID isomers on human nicotinic acetylcholine receptors

ZHANGSUN Dongting, ZHU Xiaopeng, WU Yong, HU Yuanyan, BING Hui, LUO Sulan\*

Key Laboratory of Tropical Biological Resources, Ministry of Education; Key Laboratory for Marine Drugs of Haikou, Hainan University, Haikou 570228, China

**Abstract** To investigate activities of three isomers of  $\alpha$ -conotoxin TxID on human  $\alpha 3\beta 4$  and  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). The three isomers of  $\alpha$ -conotoxin TxID were synthesized using solid phase Fmoc chemistry and fully folded by two-step oxidations. Human  $\alpha 3\beta 4$  and  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChRs were expressed in oocytes of *Xenopus laevis*, which were used for bioassay of the three isomers, including inhibition and washout reversibility. There were obvious differences between the inhibition potency of each isomers at human  $\alpha 3\beta 4$  and  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChRs. The blocking was reversible and washout rapidly. The most potent isomer is the globular form with an  $IC_{50}$  of 9.3 nmol/L on human  $\alpha 3\beta 4$  and  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChRs respectively. The 2nd potent isomer was the ribbon form with much less potency, which had an  $IC_{50}$  of >5  $\mu$ mol/L. The bead isomer had little or no block on human  $\alpha 3\beta 4$  and  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChRs with an  $IC_{50}$  of >10  $\mu$ mol/L. The three isomers of  $\alpha$ -conotoxin TxID were synthesized successfully with two pairs of desired disulfide bond. Inhibition activities of the 3 isomers on human  $\alpha 3\beta 4$  and  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChRs were obtained respectively, which would be basis for new marine drug development of  $\alpha$ -conotoxin TxID.

**收稿日期** 2015-12-02 **\*通信作者** Tel:0898-66289538 E-mail:luosulan2003@163.com

**基金项目** 国家自然科学基金重点国际合作项目资助(No. 81420108028); 国家自然科学基金资助项目(No. 41366002); 海口市重点科技计划项目资助(No. 2013-16); 长江学者和创新团队发展计划资助项目(No. IRT-15R15)

**Key words**  $\alpha$ -conotoxin TxID; disulfide bond isomers; peptide synthesis; human  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs; human  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChRs

This work was supported by the Major International Joint Research Project of National Natural Science Foundation of China (No. 81420108028); the National Natural Science Foundation of China (No. 41366002); the Key Project of Haikou Science & Technology Program (No. 2013-16); and the Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University Grant (No. IRT\_15R15)

烟碱型乙酰胆碱受体 (nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs) 是动物界普遍存在的具有重要生理作用和临床研究意义的细胞膜蛋白, 是人类最早发现的一类受体。nAChRs 是细胞膜上的变构膜蛋白, 介导众多中枢和外周神经系统的生理功能, 包括学习、记忆、成瘾、应答、镇痛和运动控制等。nAChRs 激活多巴胺、去甲肾上腺素、五羟色胺、 $\gamma$ -氨基丁酸等多种神经递质的释放<sup>[1]</sup>。已证实 nAChRs 是筛选诊断和治疗一大类重要疾病药物的关键靶点, 这些疾病包括疼痛、烟酒和毒品成瘾、智障、痴呆、精神分裂症、中枢神经紊乱、癫痫症、帕金森病、精神病、神经肌肉阻滞、重症肌无力、抑郁症、高血压、心率不齐、哮喘、肌肉松弛、卒中、乳腺癌和肺癌等<sup>[2-5]</sup>。由于缺乏能区分 nAChRs 各个亚型的分子探针, 因而, 对 nAChRs 各种亚型的精细结构和功能还知之甚少。来自热带海洋肉食性软体动物芋螺毒液中的  $\alpha$ -芋螺毒素 (conotoxin, CTx), 是目前发现的选择性最好的 nAChRs 各种亚型的特异阻断剂<sup>[6-7]</sup>。因此,  $\alpha$ -芋螺毒素及其作用靶点在多种疾病机制的研究, 以及在研发治疗上述相关疾病的新药方面具有极其重要的应用价值<sup>[8]</sup>。

$\alpha$ -芋螺毒素 TxID 是从海南产织锦芋螺中发现的大鼠  $\alpha 3\beta 4$  nAChR 亚型的选择性强阻断剂, 对大鼠  $\alpha 3\beta 4$  nAChR 的半数阻断剂量 ( $IC_{50}$ ) 仅为 12.5 nmol/L<sup>[9]</sup>。目前国际上只发现了 2 个  $\alpha 3\beta 4$  nAChR 的特异阻断剂, 即  $\alpha$ -CTx TxID 和 AuIB, 本课题组发现的 TxID 的活性比 AuIB 要强 60 倍, 且首次解析出  $\alpha$ -CTx TxID 的 2 个构象异构体的立体结构, 并对其结构表面特征和受体选择性的机制进行了深入研究<sup>[9]</sup>。 $\alpha$ -CTx TxID 对大鼠  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChR 亚型也有较强的阻断活性, 其  $IC_{50}$  为 94.1 nmol/L, 对大鼠的其他 nAChRs 亚型没有阻断活性或活性非常微弱<sup>[9]</sup>。大鼠和人类相同亚型的 nAChRs 不尽相同, 导致某些芋螺毒素对大鼠和人类相同亚型的 nAChR 的阻断活性不同,

甚至有的相差高达几百倍, 如  $\alpha$ -CTxVc1.1 和 RgIA 对大鼠的  $\alpha 9\alpha 10$  nAChR 的阻断活性比对人类  $\alpha 9\alpha 10$  nAChR 的阻断活性分别要高约 30 和 300 倍, 导致 Vc1.1 和 RgIA 在人体的镇痛效果大幅度下降<sup>[10-12]</sup>。为了研究  $\alpha$ -CTx TxID 对大鼠和人类  $\alpha 3\beta 4$  和  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChRs 亚型的阻断活性是否也具有差异, 本课题组对  $\alpha$ -CTx TxID 的 3 个二硫键异构体分别进行了人工合成, 并对它们与人类  $\alpha 3\beta 4$  与  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChRs 的阻断活性进行了对比研究。本研究结果将为后续研发  $\alpha$ -CTx TxID 工具药和治疗药物提供理论基础。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

性成熟雌性非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 从美国 Enasco 公司进口。质粒中量抽提试剂盒、限制性内切酶、相对分子质量标准等常规分子生物学试剂 (TaKaRa 大连宝生物工程有限公司)。cRNA 合成试剂盒 mMMESSAGE mMACHINE SP6、T7 Kit、MEGA clear Kit (美国 Ambion 公司); 胶原酶、乙酰胆碱 (美国 Sigma 公司); 三氟乙酸、乙腈 (色谱级, 美国 Tedia 公司); TFA (美国 Tedia 公司); 乙腈 (美国 Fisher) 公司。其他试剂为国产分析纯。缓冲液 OR-2 组成为 96.0 mmol/L NaCl, 2.0 mmol/L KCl, 1.0 mmol/L  $MgCl_2$ , 5 mmol/L Hepes, pH 7.1 ~ 7.7。缓冲液 ND96 组成为 96.0 mmol/L NaCl, 2.0 mmol/L KCl, 1.8 mmol/L  $CaCl_2$ , 1.0 mmol/L  $MgCl_2$ , 5 mmol/L Hepes, pH 7.1 ~ 7.5。

### 1.2 仪器

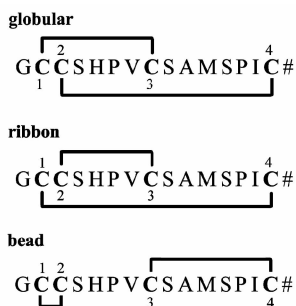
多肽合成和检测仪器包括美国全自动多肽合成系统 ABI433A; 美国 Waters 2535 HPLC 制备系统; 日本岛津高效液相色谱 LC-20A; 岛津 LCMS-IT-TOF 质谱仪; 德国 Christ Alpha 1-4L 冷冻干燥机等。检测电流的电生理仪器为 AXOCLAMP 900A 双电极电压钳 (美国 Molecular Devices 公司); P-97 微电极拉制仪 (美国 Sutter 公司); SZX-ILLD2-200

研究级体视显微镜(日本 Olympus 公司);Nanoliter 2000 显微注射仪(美国 Sutter 公司)。所有用于 mRNA 实验的非玻璃器皿用 0.1 % DEPC 浸泡 12 h 以上,玻璃器皿经 250 ℃ 烘烤 6 h 以上。

## 2 方 法

### 2.1 α-芋螺毒素 TxID 异构体线性肽的合成

参照以前的方法<sup>[9]</sup>,采用 Fmoc 化学方法分别合成 α-CTx TxID 的 3 个异构体(图 1)的线性树脂肽。合成过程中所用半胱氨酸(Cys)分别用 Trt 或 Acm 保护基团成对保护。对于球状异构体(globular),其 Cys 1 和 Cys 3 用 Trt 保护基团,Cys 2 和 Cys 4 用 Acm 保护基团。与此类似,带状异构体(ribbon)的 Cys 2 和 Cys 3 用 Trt 保护基团,Cys 1 和 Cys 4 用 Acm 保护基团;珠子状异构体(bead)的 Cys 1 和 Cys 2 用 Trt 保护基团,Cys 3 和 Cys 4 用 Acm 保护基团。树脂肽合成后,用反应液 K(三氟乙酸-水-乙二硫醇-苯酚-茴香硫醚,90:5:2.5:7.5:5)将线性肽从树脂上切割下来,并用冰乙醚沉淀和洗涤回收线性肽粗品,用制备型反向 HPLC C<sub>18</sub> 柱纯化,缓冲液 A 是 0.075% TFA 的水溶液,缓冲液 B 为含有 0.05% TFA 和 90% 的乙腈(ACN)。洗脱线性梯度为 0 ~ 30 min 10% B→40% B,90% A→60% A,其中制备柱流速为 15 mL/min,在 UV 214 nm 的紫外波长下监测洗脱情况。纯化后的线性肽用分析型的 HPLC C<sub>18</sub> 柱进行纯度检测,洗脱梯度同上,分析柱流速为 1 mL/min。经过 HPLC 反复纯化后获得线性肽,其纯度达 95% 以上,通过质谱(MS)鉴定无误后,进行冻干保存,用于后续的氧化折叠反应。



**Figure 1** Peptide sequences of the three isomers of α-conotoxin TxID (α-CTx TxID) with different disulfide connectivities (#; C-terminal carboxamide)

### 2.2 α-芋螺毒素 TxID 异构体的氧化折叠

切割纯化后的 α-芋螺毒素 TxID 异构体线性

肽中的一对 Cys 带有 Acm 基团,另一对 Cys 带有自由的巯基(-SH),用两步氧化法分别在 2 个自由的巯基和 2 个带有 Acm 基团的 Cys 之间定点形成两对二硫键。第一步用铁氰化钾氧化法形成第一对二硫键,第二步用碘氧化法形成第 2 对二硫键<sup>[13]</sup>。

### 2.3 人类 α3、α6/α3 和 β4 nAChR 亚基 cRNA 的制备与受体表达

扩增本实验室保存的含有人类 α3、α6/α3 和 β4 nAChR 亚基基因的克隆,分别提取各个亚基的基因表达质粒,用限制性内切酶对质粒进行酶切线性化,对线性化的 DNA 进行纯化,测定其浓度,若线性化模板浓度太低,则进一步浓缩。用 Ambion mMESSAGE mMACHINE Kit 体外转录试剂盒,以线性化 DNA 为体外转录模板,分别制备出 3 个亚基的 cRNA,经 RNA 纯化试剂盒纯化后,在 260 nm 波长下测定 cRNA 的浓度,小份分装保存于 -70 ℃ 备用。选取成熟的雌性非洲爪蟾,分离出质量合格的卵母细胞(蛙卵),在 17 ℃ 下培养。蛙卵培养的第 2 天,根据各个亚基 cRNA 的浓度,按照 1:1 的比例混合 α 和 β 亚基的 cRNA,即将 α3 与 β4 nAChR 亚基的 cRNA 等量混合,将 α6/α3 和 β4 nAChR 亚基的 cRNA 等量混合,注射到卵母细胞中进行表达,每个蛙卵注射每个亚基的 cRNA 量为 5 ~ 15 ng。注射后的蛙卵转移到新鲜的含有抗生素的 ND96 培养液中培养。蛙卵培养液是在普通 ND96 培养液中分别添加一定浓度的 3 种抗生素,它们分别是链霉素 10 μg/mL、青霉素 10 μg/mL、庆大霉素 100 μg/mL。注射后的蛙卵在第 2 ~ 5 d,α3β4 与 α6/α3β4 nAChRs 可得到有效的表达,用于后续的电生理记录。

### 2.4 人类 α3β4 与 α6/α3β4 nAChRs 的电生理检测

将注射过人类 α3β4 或 α6/α3β4 nAChR cRNA 的 1 个蛙卵,置于 30 μL 记录槽中,重力灌注含有 0.1 mg/L 牛血清白蛋白(BSA)的普通 ND96 培养液,流速约为 2 mL/min。受体开放剂乙酰胆碱(ACh)和 ND96 灌流液之间可用电脑程序进行自动切换。每隔 1 分钟自动灌注 1 s 浓度为 100 μmol/L 的 ACh。利用双电极电压钳系统,膜电压箝制在 -70 mV,检测 α3β4 或 α6/α3β4 nAChRs 电流表达情况,在线记录 ACh 门控电流。

在电流基线平稳后,先用 ND96 灌流液作为阴性对照,在蛙卵槽中温育 5 min 后,立即启动 ACh 脉冲,并灌流 ND96 培养液,对蛙卵槽进行洗脱,温育后的第 1 个电流轨迹即是 ND96 阴性对照产生的电流轨迹。之后,用不同浓度的  $\alpha$ -CTx TxID 异构体,采用与 ND96 阴性对照的相同方法,分别加入到蛙卵槽中,温育 5 min,温育后的第 1 个电流轨迹即是 TxID 异构体某个浓度产生的效应。记录对照电流、毒素电流和洗脱速率。所用 TxID 浓度范围为 1 nmol/L ~ 10  $\mu$ mol/L,每个浓度至少检测 4 个蛙卵的电流反应情况。

## 2.5 电生理数据统计分析

观察记录每个电流轨迹的电流大小和变化趋势。计算每个  $\alpha$ -CTx TxID 异构体的每个浓度的电流反应百分数(%),即温育后 ACh 脉冲产生的第一个电流轨迹的电流大小与 ND96 对照电流的百分比。将这些数据输入 GraphPad Prism 软件进行统计分析,绘制剂量反应曲线,将 ND96 对照电流标准化为 100%,计算芋螺毒素的  $IC_{50}$  和曲线斜率,以及其他相关参数。剂量反应曲线上的每个数据点代表至少 4 个蛙卵的电流反应百分数的  $\bar{x} \pm s$ 。采用非线性回归分析法,用 GraphPad Prism 软件计算半阻断剂量。

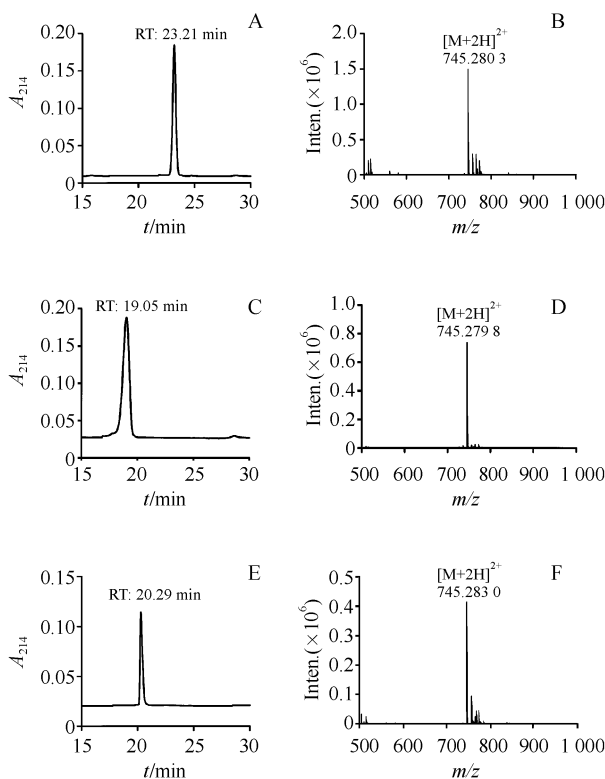
## 3 结果

### 3.1 $\alpha$ -芋螺毒素 TxID 异构体的合成

$\alpha$ -芋螺毒素 TxID 有 3 个可能的二硫键异构体:globular、ribbon 和 bead。TxID 的 3 个异构体氨基酸序列及其二硫键连接方式如图 1 所示。3 个异构体都采用两步氧化法进行折叠,其 HPLC 和质谱鉴定结果如图 2 所示。

3 个异构体在 HPLC 图谱中洗脱的先后顺序为,ribbon 异构体最快,其次是 bead 异构体,globular 异构体最慢。globular 异构体的疏水性要比另外 2 个异构体的疏水性要强一些,ribbon 和 bead 异构体的亲水性要强于 globular 异构体。3 个异构体经 ESI 质谱鉴定,相对分子质量都正确(图 2-B, D, F)。3 个异构体的理论相对分子质量均为 1 488. 559 3 D,它们的实测相对分子质量分别为:globular 异构体为 1 488. 560 6(图 2-B);ribbon 异构体为 1 488. 559 6(图 2-D);bead 异构体为 1 488. 566 0(图 2-F)。该结果说明 TxID 的 3 个异

构体的线性肽合成和氧化折叠结果都很成功,这些多肽将用于后续电生理研究。



**Figure 2** Chromatographic and mass spectrum properties of isomers of  $\alpha$ -conotoxin TxID

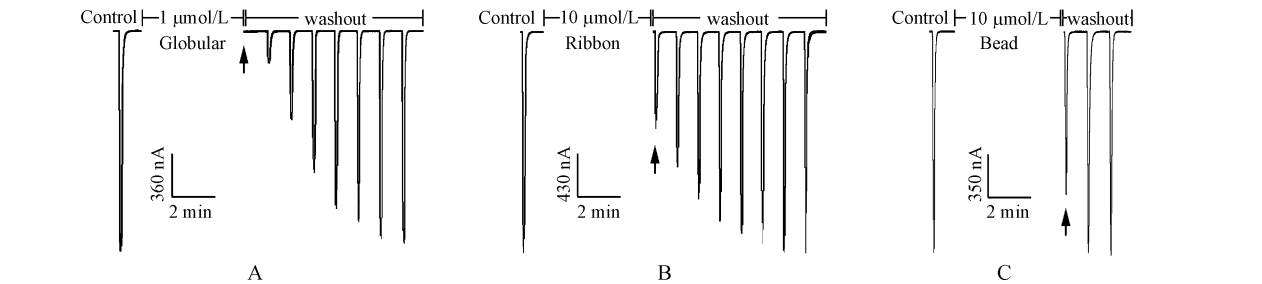
A: HPLC chromatograms of globular isomer; B: Mass spectrum of globular isomer; C: HPLC chromatograms of ribbon isomer; D: Mass spectrum of ribbon isomer; E: HPLC chromatograms of bead isomer; F: Mass spectrum of bead isomer

### 3.2 $\alpha$ -芋螺毒素 TxID 异构体对人类 $\alpha 3\beta 4$ nAChRs 的阻断活性

$\alpha$ -芋螺毒素 TxID 3 个异构体对人类  $\alpha 3\beta 4$  乙酰胆碱受体 ( $\alpha 3\beta 4$  nAChRs) 的活性差异很大。它们对  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs 电流阻断情况如图 3 所示。1  $\mu$ mol/L globular 异构体完全阻断了  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs 的电流(图 3-A),洗脱速率稍慢,在 6 ~ 7 min 内可完全恢复到对照电流的水平。可是高于 globular 异构体 10 倍浓度的 10  $\mu$ mol/L ribbon 异构体仅阻断了对照电流的 55%(图 3-B),洗脱也稍慢,在 5 ~ 6 min 内可完全恢复到对照电流的水平。而 10  $\mu$ mol/L bead 异构体只阻断了对照电流的 28%,不到对照电流的一半,由于活性非常微弱,很快就洗脱完全,在 1 min 内就恢复到了对照电流的水平(图 3-C)。检测了 3 个异构体不同浓度对  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs 的电流影响情况,获得了它们

的剂量反应曲线如图 4 所示。globular 异构体的剂量反应曲线较陡,ribbon 和 bead 异构体的剂量反应曲线较缓。各自的半阻断剂量( $IC_{50}$ )和曲线斜率(Hill slope)总结于表 1 中。globular 异构体对  $h\alpha 3\beta 4$  nAChRs 的  $IC_{50}$  仅为 9.31 nmol/L,活性极强,ribbon 异构体的  $IC_{50}$  高达 5 304 nmol/L,活性很微

弱,比天然的 globular 活性要下降约 570 倍。bead 异构体的  $IC_{50}$  大于 10  $\mu$ mol/L,对  $h\alpha 3\beta 4$  nAChRs 几乎没有活性。3 个异构体对  $h\alpha 3\beta 4$  nAChRs 的阻断活性大小为:globular、ribbon、bead,其中 globular 远远大于后两者。



**Figure 3** Traces of 3 isomers of  $\alpha$ -CTx TxID on human  $\alpha 3\beta 4$  nAChR subtype  
A:Traces of 1  $\mu$ mol/L TxID globular; B:Traces of 10  $\mu$ mol/L TxID ribbon; C:Traces of 10  $\mu$ mol/L TxID bead. Oocytes expressing human  $\alpha 3\beta 4$  nAChR were subjected to a 1 s pulse of 10  $\mu$ mol/L ACh every min. The arrow denotes the first ACh response in the presence of toxin. Toxin was then washed out and subsequent responses to ACh measured at 1 min intervals

**Table 1**  $IC_{50}$  and Hill slope values for block of human  $\alpha 3\beta 4$  nAChR subtype by 3 isomers of  $\alpha$ -CTx TxID

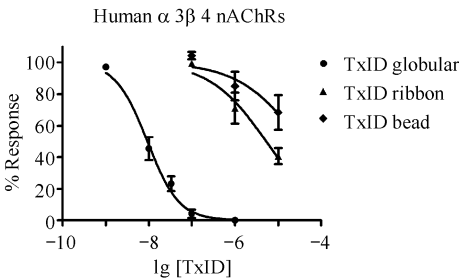
TxID isomer	$IC_{50}/(nmol/L)^a$	Hill slope <sup>a</sup>
Globular	9.31 (6.92-12.53)	1.19 (0.74-1.63)
Ribbon	5 304 (2 677-10 510)	0.67 (0.31-1.02)
Bead	> 10 000	-

<sup>a</sup>Numbers in parentheses are 95% confidence intervals

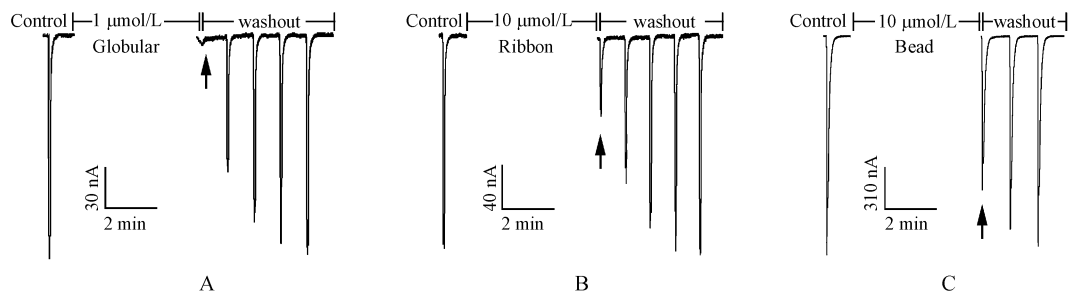
### 3.3 α-芋螺毒素 TxID 异构体对人类 α6/α3β4 nAChRs 的阻断活性

α-芋螺毒素 TxID 3 个异构体对人类 α6/α3β4 乙酰胆碱受体 ( $h\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChRs) 的活性差异也很大,其活性顺序与对  $h\alpha 3\beta 4$  nAChRs 的活性顺序极其相似。图 5 显示它们对  $h\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChRs 电流的阻断情况。1  $\mu$ mol/L globular 异构体完全阻断了  $h\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChRs 的电流 (图 5-A),洗脱速率稍快,在 3 ~ 4 min 内可完全恢复到对照电流的水平。同样,高于 globular 异构体 10 倍浓度的 10  $\mu$ mol/L ribbon 异构体阻断了  $h\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChRs 对照电流的 64% (图 5-B),洗脱也稍快,在 2 ~ 3 min 内可完全恢复到对照电流的水平。类似的,10  $\mu$ mol/L bead 异构体仅仅阻断了  $h\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChRs 对照电流的 29%,远不到对照电流的一半,1 ~ 2 min 内很快就洗脱完全,并恢复到了

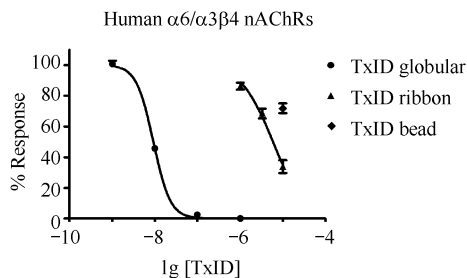
对照电流的水平 (图 5-C)。图 6 显示了 3 个异构体的剂量反应曲线,其中 globular 异构体的剂量反应曲线也很陡,ribbon 剂量反应曲线较陡。3 个异构体对的  $h\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChRs 的  $IC_{50}$  和曲线斜率总结于表 2 中。globular 异构体对  $h\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChRs 的  $IC_{50}$  只有 9.26 nmol/L,活性非常强,ribbon 异构体的  $IC_{50}$  高达 5 903 nmol/L,活性非常微弱,比天然的 globular 活性要下降约 637 倍。bead 异构体的  $IC_{50}$  也大于 10  $\mu$ mol/L,对  $h\alpha 3\beta 4$  nAChRs 也几乎没有活性。α-CTx TxID 3 个异构体对人类 α6/α3β4 和 α3β4 nAChRs 两个亚型的活性影响趋势一致。



**Figure 4** Concentration-responses of the 3 isomers of  $\alpha$ -CTx TxID on human  $\alpha 3\beta 4$  nAChR subtype ( $\bar{x} \pm s, n=4-6$ )



**Figure 5** Traces of 3 isomers of  $\alpha$ -CTx TxID on human  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChR subtype  
A;Traces of 1  $\mu$ mol/L TxID globular;B;Traces of 10  $\mu$ mol/L TxID ribbon;C;Traces of 10  $\mu$ mol/L TxID bead



**Figure 6** Concentration-responses of the 3 isomers of  $\alpha$ -CTx TxID on human  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChR subtype ( $\bar{x} \pm s, n=4-6$ )

**Table 2**  $IC_{50}$  and Hill slope values for block of human  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChR subtype by 3 isomers of  $\alpha$ -CTx TxID

TxID isomer	$IC_{50}/(nmol/L)^a$	Hillslope <sup>a</sup>
Globular	9.26 (8.53-10.06)	2.20 (0.61-3.76)
Ribbon	5903 (4790-7270)	1.16 (0.83-1.48)
Bead	> 10000	-

<sup>a</sup>Numbers in parentheses are 95% confidence intervals

## 4 讨论

本研究分别合成了  $\alpha$ -芋螺毒素 TxID 3 个二硫键异构体,测试了它们对人类  $\alpha 3\beta 4$  与  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  乙酰胆碱受体 2 个极其相似亚型的阻断活性。结果表明,具有天然构象的 globular 活性最强,对这两个亚型的活性很接近,其  $IC_{50}$  均约为 9.3 nmol/L;其 ribbon 对这两个亚型的活性急剧下降,比 globular 的活性要减弱 570 ~ 637 倍,导致其  $IC_{50}$  在 5  $\mu$ mol/L 以上。而 bead 对这两个亚型几乎没有作用,其  $IC_{50}$  都大于 10  $\mu$ mol/L。这 3 个异构体的氨基酸序列和相对分子质量完全相同,只有二硫键的连接方式不同,可是活性却相差甚远,这充分说明了二硫键在维持  $\alpha$ -CTx TxID 的结构稳定性和发挥受体结合活性方面起着很关键的作用。因此,在人工合成  $\alpha$ -CTx 时,确保合成产物是否具有天然二硫键构象至关重要。否则,其他二硫键异构体的杂质出现会

降低  $\alpha$ -CTx 的活性,从而得出不准确的结论。特别是在一步氧化法合成过程中,3 个异构体同时出现在折叠产物中,有时很难区分,这种现象很常见。因而,对于含有 2 对二硫键的  $\alpha$ -CTx 来说,最好采用两步氧化法进行定点二硫键连接,可获得高质量的  $\alpha$ -CTx。只有当 3 个异构体的 HPLC 出峰时间相差很远,彼此没有交叠时,才可用一步氧化法。

一般来说, $\alpha$ -CTx 的 3 个异构体活性顺序应与本研究结果一致,因为 globular 异构体的结构是最稳定的,而具有相邻连接二硫键的 bead 异构体结构是最不稳定的,因而活性最小或丧失活性,而 ribbon 居于这二者之间,活性也介于 globular 和 bead 之间,就像本研究的  $\alpha$ -芋螺毒素 TxID<sup>[9]</sup> 和之前研究过的  $\alpha$ -CTx TxIA<sup>[14]</sup>。 $\alpha$ -CTx TxIA 的 ribbon 异构体活性比 globular 的活性下降了约 80 倍,比本研究的 TxID 的 ribbon 异构体(约 600 倍)活性下降要小,这两个  $\alpha$ -CTx(TxID 和 TxIA)的 bead 异构体都丧失了活性。但也有例外, $\alpha$ -CTx AuIB 的 ribbon 异构体活性比具有天然构象的 globular 异构体的活性要强 10 倍以上<sup>[15]</sup>。另一个  $\alpha$ -CTx BuIA 的非天然 ribbon 异构体却有一个稳定的空间结构<sup>[16]</sup>。因而,针对不同的芋螺毒素,研究其二硫键异构体与其结构与功能的关系具有重要意义。

$\alpha$ -芋螺毒素 TxID globular 异构体对大鼠  $\alpha 3\beta 4$  和大鼠  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChRs 的  $IC_{50}$  分别为 12.5 和 94.1 nmol/L<sup>[9]</sup>。本研究中  $\alpha$ -CTx TxID globular 异构体对人类  $\alpha 3\beta 4$  和  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChRs 的  $IC_{50}$  分别为 9.31 和 9.26 nmol/L。也就是说,TxID 对大鼠的  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs 和对人类的  $\alpha 3\beta 4$ 、 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChRs 的活性很相似,TxID 对人类  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChRs 的活比大鼠的  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChRs 活性提高了近 10 倍,对大鼠和人类的  $\alpha 3\beta 4$  亚型之间的

活性没有变化,这跟  $\alpha$ -CTx Vc1.1 和 RgIA 对人类比大鼠的  $\alpha 9\alpha 10$  nAChR 的阻断活性下降 30 ~ 300 倍形成了鲜明对比<sup>[10-12]</sup>。因而, $\alpha$ -CTx TxID 在大鼠的作用与人类的药理学活性是一致的,不会导致象 Vc1.1 和 RgIA 在人体药效大幅下降的现象。

nAChRs 的每种亚型都有截然不同的药理学作用,其结构非常相似,很难区分<sup>[17]</sup>。由于缺乏针对各种亚型的高选择性配体化合物,要研究和阐明各种各样的 nAChRs 亚型的精细结构和功能较为困难。 $\alpha$ -CTx 对 nAChRs 各种亚型具有高度的选择性,对神经型 nAChRs 亚型不同  $\alpha$  和  $\beta$  亚基交界面的区分能力很强,因此, $\alpha$ -CTx 是研究 nAChRs 各种亚型精细结构和生理药理功能的重要分子探针,还是治疗 nAChRs 相关疾病的新药来源<sup>[18-19]</sup>。

研究表明,含有  $\alpha 3$ -亚基的 nAChRs,包括  $\alpha 3\beta 2$  与  $\alpha 3\beta 4$  亚型主要表达在外周神经系统,是神经痛药物作用的靶点。阻断  $\alpha 3\beta 2$  或  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs 的  $\alpha$ -CTx 在临床前多种顽固性疼痛(chronic pain)模型上显示出很好的镇痛活性,且不成瘾<sup>[20-23]</sup>。 $\alpha 3\beta 4$  nAChR 是感觉以及自律神经中枢中主要的乙酰胆碱受体亚型, $\alpha 3\beta 4$  nAChR 涉及到中枢边缘多巴胺途径,对于滥用某种物质(如毒品)产生的“奖赏”效应起着非常重要的作用。该亚型在成瘾、疼痛、恐惧以及神经递质释放的生理与病理过程中起着很重要的作用。最近研究表明, $\alpha 3\beta 4$  nAChR 介导小细胞肺癌细胞的生长, $\alpha 3\beta 4$  nAChR 阻断剂可抑制肺癌细胞的可变性从而抑制肿瘤的生长<sup>[24]</sup>。因而,本研究针对的  $\alpha 3\beta 4$  nAChR 强阻断剂  $\alpha$ -芋螺毒素 TxID,在该受体结构与功能的研究以及在小细胞肺癌、成瘾、神经痛等的发病机制和治疗药物研发也具有重要价值。

## 参考文献

- [1] Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology[J]. *Prog Neurobiol*, 2004, **74**(6): 363 - 396.
- [2] Gotti C, Moretti M, Bohr I, et al. Selective nicotinic acetylcholine receptor subunit deficits identified in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies by immunoprecipitation[J]. *Neurobiol Dis*, 2006, **23**(2): 481 - 489.
- [3] Lee CH, Huang CS, Chen CS, et al. Overexpression and activation of the alpha9-nicotinic receptor during tumorigenesis in human breast epithelial cells[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2010, **102**(17): 1322 - 1335.
- [4] Lee CH, Chang YC, Chen CS, et al. Crosstalk between nicotine and estrogen-induced estrogen receptor activation induces alpha9-nicotinic acetylcholine receptor expression in human breast cancer cells[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, **129**(2): 331 - 345.
- [5] Rahman S. Nicotinic receptors as therapeutic targets for drug addictive disorders[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2013, **12**(5): 633 - 640.
- [6] Azam L, McIntosh JM. Alpha-conotoxins as pharmacological probes of nicotinic acetylcholine receptors[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, **30**(6): 771 - 783.
- [7] Olivera BM, Quik M, Vincler M, et al. Subtype-selective conopeptides targeted to nicotinic receptors: concerted discovery and biomedical applications[J]. *Channels (Austin)*, 2008, **2**(2): 143 - 152.
- [8] Lebbe E K, Peigneur S, Wijesekera I, et al. Conotoxins targeting nicotinic acetylcholine receptors: an overview[J]. *Mar Drugs*, 2014, **12**(5): 2970 - 3004.
- [9] Luo S, Zhangsun D, Zhu X, et al. Characterization of a novel alpha-conotoxin TxID from Conus textile that potently blocks rat alpha3beta4 nicotinic acetylcholine receptors[J]. *J Med Chem*, 2013, **56**(23): 9655 - 9663.
- [10] Azam L, McIntosh JM. Molecular basis for the differential sensitivity of rat and human alpha9alpha10 nAChRs to alpha-conotoxin RgIA[J]. *J Neurochem*, 2012, **122**(6): 1137 - 1144.
- [11] Vincler M, Wittenauer S, Parker R, et al. Molecular mechanism for analgesia involving specific antagonism of alpha9 alpha10 nicotinic acetylcholine receptors[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, **103**(47): 17880 - 17884.
- [12] Halai R, Clark RJ, Nevin ST, et al. Scanning mutagenesis of alpha-conotoxin Vc1.1 reveals residues crucial for activity at the alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptor[J]. *J Biol Chem*, 2009, **284**(30): 20275 - 20284.
- [13] McIntosh JM, Azam L, Staheli S, et al. Analogs of alpha-conotoxin MII are selective for alpha6-containing nicotinic acetylcholine receptors[J]. *Mol Pharmacol*, 2004, **65**(4): 944 - 952.
- [14] Wu Y, Wu X, Yu J, et al. Influence of disulfide connectivity on structure and bioactivity of alpha-conotoxin TxIA[J]. *Molecules*, 2014, **19**(1): 966 - 979.
- [15] Dutton JL, Bansal PS, Hogg RC, et al. A new level of conotoxin diversity, a non-native disulfide bond connectivity in alpha-conotoxin AuIB reduces structural definition but increases biological activity[J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**(50): 48849 - 48857.
- [16] Jin AH, Brandstaetter H, Nevin ST, et al. Structure of alpha-conotoxin BuIA: influences of disulfide connectivity on structural dynamics[J]. *BMC Struct Biol*, 2007, **7**: 28.
- [17] Gotti C, Clementi F, Fornari A, et al. Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors[J]. *Biochem Pharmacol*, 2009, **78**(7): 703 - 711.
- [18] Nicke A, Wonnacott S, Lewis RJ. Alpha-conotoxins as tools for

- the elucidation of structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes [J]. *Eur J Biochem*, 2004, **271** (12):2305–2319.
- [19] Kasheverov IE, Utkin YN, Tsetlin VI. Naturally occurring and synthetic peptides acting on nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Curr Pharm Des*, 2009, **15** (21):2430–2452.
- [20] Napier IA, Klimis H, Rycroft BK, *et al.* Intrathecal alpha-conotoxins Vc1. 1, AulB and MII acting on distinct nicotinic receptor subtypes reverse signs of neuropathic pain [J]. *Neuropharmacology*, 2012, **62** (7):2202–2207.
- [21] Blyth FM, March LM, Brnabic AJ, *et al.* Chronic pain in Australia; a prevalence study [J]. *Pain*, 2001, **89** (2/3):127–134.
- [22] Cousins MJ, Brennan F, Carr DB. Pain relief: a universal human right [J]. *Pain*, 2004, **112** (1/2):1–4.
- [23] Eisenberg E, McNicol ED, Carr DB. Efficacy and safety of opioid agonists in the treatment of neuropathic pain of nonmalignant origin: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *JAMA*, 2005, **293** (24):3043–3052.
- [24] Improgo MR, Soll LG, Tapper AR, *et al.* Nicotinic acetylcholine receptors mediate lung cancer growth [J]. *Front Physiol*, 2013, **4**:251.