

文章编号: 1674-7054(2020)02-0125-07

## 芋螺毒素 Lv68 的一步氧化及其对乙酰胆碱受体的阻断活性

李 丞, 张 雨, 罗 安, 鞠 双, 符 影, 罗 素 兰

(海南大学 热带生物资源教育部重点实验室/生命科学与药学院/

海口市海洋药物重点实验室, 海口 570228)

**摘要:** 本研究通过固相合成法合成芋螺毒素 Lv68 线性肽, 研究并优化了其主异构体的一步氧化折叠条件, 并通过电压膜片钳技术对主导构体产物进行了多种乙酰胆碱受体亚型( $\alpha 3\beta 4$ ,  $\alpha 6\beta 4$ ,  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 9\alpha 10$ ,  $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ ,  $\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$  nAChRs)的活性测试, 旨在为以烟碱型乙酰胆碱受体为靶点的先导药物分子的发现奠定基础, 同时为该类其他芋螺毒素的氧化折叠方法、生物活性研究以及深入开发利用提供参考和借鉴。结果表明, 芋螺毒素 Lv68 的一步法氧化折叠最优条件为反应体系组成为  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl,  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA, GSH/GSSG  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}/1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 线性肽浓度为  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 反应时间为 2 h, 产率高达 18.14%, Lv68 折叠肽在  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下对  $\alpha 9\alpha 10$  nAChR 具有较好的阻断作用(阻断率约 80%)。本研究明确了芋螺毒素 Lv68 的一步氧化折叠条件, 证实了 Lv68 对  $\alpha 9\alpha 10$  乙酰胆碱受体亚型具有阻断活性, 拓宽了含半胱氨酸框架 III 的 M 超家族芋螺毒素的作用靶点范围。

**关键词:** 芋螺毒素; 二硫键; 氧化折叠;  $\alpha 9\alpha 10$  乙酰胆碱受体

**中图分类号:** Q 178.53; R 996.3

**文献标志码:** A

**DOI:** 10.15886/j.cnki.rds wxb.2020.02.001

芋螺毒素(conotoxins)是由热带海洋肉食性软体动物芋螺(*Conus*)分泌的一类活性多肽, 主要用于捕食猎物和防御天敌, 可特异性作用于配体门控离子通道(包括烟碱型乙酰胆碱受体、5-羟色胺、 $\gamma$ -氨基丁酸等)和电压门控离子通道(包括钠离子、钙离子、钾离子等通道)、G 蛋白耦联受体和神经递质转运体等诸多疾病的关键靶点<sup>[1-6]</sup>。由于其分子量小、结构多样、针对靶点特异性强、活性显著等特点, 现已经成为二硫键氧化折叠、多肽-受体相互作用、以及新药开发的研究热点<sup>[7-9]</sup>。芋螺毒素对神经痛、成瘾、癫痫、精神病、癌症等多种疑难杂症的治疗有极好的开发应用前景<sup>[6, 10-11]</sup>, 已成为当今神经科学研究和新药研发的热点。国际上已有 10 种芋螺毒素进入过临床研究的不同阶段<sup>[12]</sup>, 其中来源于幻芋螺(*Conus magus*)的含 3 对二硫键的  $\omega$ -芋螺毒素 MVIIA(齐考诺肽, ziconotide, Prialt, Elan Pharmaceuticals)于 2004 年经 FDA 批准用于严重慢性疼痛的治疗<sup>[13-15]</sup>。芋螺毒素通常由 10~40 个氨基酸组成, 富含半胱氨酸, 可形成 2~4 对分子内二硫键<sup>[16]</sup>。二硫键是芋螺毒素发挥生物活性的结构基础<sup>[17]</sup>, 对稳定其高级结构、增强其作用活性、提高其对靶受体的选择性等具有重要意义<sup>[18]</sup>。二硫键连接方式不同(形成二硫键构造异构体), 直接影响芋螺毒素的三维结构, 继而导致其活性以及选择性的差异<sup>[18-20]</sup>。芋螺毒素的化学合成过程中, 二硫键氧化折叠过程是其中的关键步骤, 同时也是难点所在<sup>[19, 21]</sup>。当含有 2 对、3 对、4 对二硫键的芋螺毒素进行氧化折叠时, 理论上应分别存在 3, 15, 105 种二硫键连接方式的构造异构体。目前, 芋螺毒素二硫键的氧化折叠多采用化学方法, 其中包括一步氧化法和定点合成法<sup>[21]</sup>。相比于定点合成法,

收稿日期: 2020-02-19

修回日期: 2020-02-29

基金项目: 海南省自然科学基金高层次人才项目(2019RC053); 国家自然科学基金青年基金(81903492); 高等学校学科创新引智计划资助(D20010)

第一作者: 李丞(1994-), 男, 海南大学生命科学与药学院 2017 级硕士研究生. E-mail: 365353464@qq.com

通信作者: 符影(1987-), 女, 副教授, 硕导. 研究方向: 多肽药物化学. E-mail: fuying926@163.com; 罗素兰(1969-), 女, 教授, 博导. 研究方向: 海洋药物与生物技术. E-mail: luosulan2003@163.com

一步氧化法经济成本较低、操作简便、且不使用有毒有害化学试剂,还可快速获得在化学结构上更稳定的二硫键异构体,减少对二硫键异构体的探索步骤,提高合成效率,以便进行后续的相关活性研究。全世界约有 700 种芋螺,遍布世界各个暖海海域<sup>[22]</sup>。我国有超过 100 种芋螺,南海分布的芋螺超过 60 种,是我国迈进“海洋强国”、振兴“蓝色医药产业”的重要战略资源,极具研究开发价值。疣缢芋螺(*Conus lividus*)为南海产食虫芋螺,迄今为止,近百种芋螺毒素成熟肽序列从疣缢芋螺中被发现<sup>[23]</sup>,其中, LvIA 不仅是  $\alpha 3\beta 2$  nAChR 的强阻断剂( $IC_{50}$  为  $8.7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),还能显著区分  $\alpha 3\beta 2$  与  $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 4$  nAChRs, 具有较好的研究潜力<sup>[24]</sup>。芋螺毒素 Lv68 为本课题组从疣缢芋螺 cDNA 中克隆得到的新型 M 超家族芋螺毒素,氨基酸序列为 CCLWTCNPYCFPCCY,具有典型的 III 型半胱氨酸框架(-CC-C-C-CC-),含 6 个半胱氨酸,氧化折叠后可形成三对分子内二硫键。M 超家族芋螺毒素通常可作用于电压门控钠离子通道( $\mu$ -conotoxins)、电压门控钾离子通道( $\kappa$ M-conotoxins)和烟碱型乙酰胆碱受体( $\psi$ -conotoxins)<sup>[17, 19, 25-26]</sup>。芋螺毒素 Lv68 具有 III 型半胱氨酸框架,与其同类的 M 超家族芋螺毒素的作用靶点大多集中于电压门控钠离子通道,其中仅有 3 个  $\psi$ -conotoxins 作用于肌肉型乙酰胆碱受体<sup>[25, 27]</sup>,未见有作用于神经型乙酰胆碱受体的该类芋螺毒素报道。通过序列比对,发现芋螺毒素 Lv68 与芋螺毒素 Asi3a, Pr3a, Pu3.4 等具有较高的序列相似性。LEBBE<sup>[28]</sup> 等对芋螺毒素 Asi3a 作用于电压门控钠离子通道的 7 个亚型、电压门控钾离子通道的 6 个亚型,以及乙酰胆碱受体的 4 个亚型( $\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 4\beta 4$ ,  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs)进行了活性测试,均无阻断作用。JIMENEZ<sup>[29]</sup> 等发现 Pr3a 在金鱼实验中可致使金鱼瘫痪。说明此类芋螺毒素的活性靶点尚不明确。笔者对含半胱氨酸框架 III 的 M 超家族新型芋螺毒素 Lv68 的一步氧化折叠及其产物活性进行研究,旨在为以烟碱型乙酰胆碱受体为靶点的先导药物分子的发现奠定基础,同时为该类其他芋螺毒素的氧化折叠方法、生物活性研究以及深入开发利用提供参考和借鉴。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** Fmoc-氨基酸 [Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH]; Wang 树脂、N,N-二环己基碳二亚酰胺(DCC)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、1-羟基苯并三唑(HOBt)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、二甲基亚砜(DMSO),均购自吉尔生化上海有限公司;色谱级乙腈(Acetonitrile, ACN, 美国 Tedia 公司);色谱级三氟乙酸(Trifluoroacetic acid, TFA, 美国 Tedia 公司);分析型  $C_{18}$  柱(Vydac,  $5 \mu\text{m}$ ,  $4.6 \text{ mm}\times 250 \text{ mm}$ )和制备型  $C_{18}$  柱(Vydac,  $10 \mu\text{m}$ ,  $22 \text{ mm}\times 250 \text{ mm}$ ),均购于美国 Grace 公司。其他常用试剂均为国产分析纯,均购自广州化学试剂公司。缓冲液 ND96 溶液组成:  $96.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl,  $2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  KCl,  $1.8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Hepes, pH 7.1 ~ 7.5。流动相 A 为  $\text{ddH}_2\text{O}$  含 0.1% TFA,流动相 B 为 90% 乙腈含 0.1% TFA。

**1.2 实验仪器** 全自动多肽合成系统(ABI433, Applied Biosystems);超纯水系统(PURELAB Ultra, ELGA);制备型高效液相色谱仪(2535 Separations Module, Waters);分析型高效液相色谱仪(ACQUITY UPLC H-Class Bio, Waters);液相色谱-质谱联用仪(Acquity H Class-Xevo TQD, Waters);电子天平(Xs365M-sc, Precisa);磁力搅拌器(RET Basic C, IKA);超微量分光光度计(NanoDrop 2000, Thermo-Fisher);离心浓缩仪(RVC 2-25 CDplus, 北京五洲东方科技发展有限公司);AXON CLAMP 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 体视显微镜(日本 Olympus 公司);Nanoliter 2000 显微注射仪(美国 Sutter 公司)。

**1.3 线性肽的合成及纯化** 芋螺毒素 Lv68 线性肽(CCLWTCNPYCFPCCY)采用 Fmoc 固相合成法<sup>[30]</sup>合成,切割后的线性肽的所有氨基酸均不含有侧链保护基,6 个半胱氨酸的巯基均处于还原状态,该线性肽的理论分子量为 1 819.19 Da。固相合成得到的 Lv68 线性肽粗肽采用制备型 HPLC 进行纯化,分离条件为流动相 B 由 25% 至 50%, 30 min 线性梯度洗脱,柱温箱  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,流速  $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,检测波长 214 nm。收集主峰,将纯化后的线性肽进行 UPLC-MS 分析鉴定。UPLC-MS 线性洗脱梯度条件:柱温箱  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , 90% ~ 50% 流动相 A, 10% ~ 50% 流动相 B, 7 min 线性梯度洗脱,流速  $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,质谱参数

Source Voltages: Capillary 0.5 kV, Cone 30 V; Source Temperalutes: Desolvation Temp. 600 °C; Source Gas Flow: Desolvation 800 L·Hr<sup>-1</sup>, Cone 50 L·Hr<sup>-1</sup>。经离心干燥后冻存,用于后续的氧化折叠反应。

**1.4 一步法氧化折叠及其条件优化** 选择浓度均为 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 的 2 种缓冲液 ( Tris-HCl 和 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> )、3 种氧化还原对 (GSH/GSSG 0.5 mmol·L<sup>-1</sup>/0.5 mmol·L<sup>-1</sup>, GSH/GSSG 1 mmol·L<sup>-1</sup>/0.5 mmol·L<sup>-1</sup>, GSH/GSSG 1 mmol·L<sup>-1</sup>/1 mmol·L<sup>-1</sup>)、3 种线性肽浓度 (10, 20, 50 μmol·L<sup>-1</sup>) 和反应时间 (10 min, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6 h) 作为一步法氧化折叠反应条件的组合方案 (表 1), 并各加入 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA。将纯化后的线性肽溶于少量 60% 乙腈水溶液, 转移至含缓冲液和氧化还原对的反应体系中, 采用选定的线性肽浓度, 磁力搅拌速度 500 r·min<sup>-1</sup>, 室温条件下反应。在适宜的反应时间时取反应溶液 20 μL, 在所取反应溶液样品中加入甲酸, 使甲酸终浓度为 8% 从而终止氧化反应。以 UPLC-MS 分析不同取样时间的反应溶液中产物色谱峰的变化, 动态监测其反应进程, 根据分子量区分氧化产物和副产物, 根据峰面积大小确定主异构体产物。UPLC 线性洗脱梯度条件为: 柱温箱 40 °C, 95% ~ 50% 流动相 A, 5% ~ 50% 流动相 B, 7 min 线性梯度洗脱, 流速 0.5 mL·min<sup>-1</sup>, 紫外吸收检测波长为 214 nm。通过动态监测反应进程, 分别考察缓冲液、氧化剂、线性肽浓度以及反应时间对主异构体产物产率的影响, 以液相图中折叠肽峰面积计算折叠肽的产率, 筛选出产率最高的一步氧化反应条件。

表 1 芋螺毒素 Lv68 氧化折叠反应条件优化方案  
Tab. 1 Optimization scheme of oxidative folding reaction of conotoxin Lv68

序号 Code	缓冲液 Buffer	线性肽浓度 Linear peptide concentration	氧化还原对 Redox pairs
1	0.1 mol·L <sup>-1</sup> Tris-HCl, 1 mmol·L <sup>-1</sup> EDTA	20 μmol·L <sup>-1</sup>	GSH/GSSG 0.5 mmol·L <sup>-1</sup> /0.5 mmol·L <sup>-1</sup>
2	0.1 mol·L <sup>-1</sup> Tris-HCl, 1 mmol·L <sup>-1</sup> EDTA	20 μmol·L <sup>-1</sup>	GSH/GSSG 1 mmol·L <sup>-1</sup> /0.5 mmol·L <sup>-1</sup>
3	0.1 mol·L <sup>-1</sup> Tris-HCl, 1 mmol·L <sup>-1</sup> EDTA	20 μmol·L <sup>-1</sup>	GSH/GSSG 1 mmol·L <sup>-1</sup> /1 mmol·L <sup>-1</sup>
4	0.1 mol·L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , 1 mmol·L <sup>-1</sup> EDTA	20 μmol·L <sup>-1</sup>	GSH/GSSG 0.5 mmol·L <sup>-1</sup> /0.5 mmol·L <sup>-1</sup>
5	0.1 mol·L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , 1 mmol·L <sup>-1</sup> EDTA	20 μmol·L <sup>-1</sup>	GSH/GSSG 1 mmol·L <sup>-1</sup> /0.5 mmol·L <sup>-1</sup>
6	0.1 mol·L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , 1 mmol·L <sup>-1</sup> EDTA	20 μmol·L <sup>-1</sup>	GSH/GSSG 1 mmol·L <sup>-1</sup> /1 mmol·L <sup>-1</sup>
7	0.1 mol·L <sup>-1</sup> Tris-HCl, 1 mmol·L <sup>-1</sup> EDTA	10 μmol·L <sup>-1</sup>	GSH/GSSG 1 mmol·L <sup>-1</sup> /1 mmol·L <sup>-1</sup>
8	0.1 mol·L <sup>-1</sup> Tris-HCl, 1 mmol·L <sup>-1</sup> EDTA	50 μmol·L <sup>-1</sup>	GSH/GSSG 1 mmol·L <sup>-1</sup> /1 mmol·L <sup>-1</sup>

**1.5 氧化折叠产物的分离纯化** 取 20 mg 芋螺毒素 Lv68 线性肽, 采用筛选的最优氧化折叠条件合成 Lv68 折叠肽。将折叠反应终溶液中的主异构体产物通过制备型 HPLC 进行分离纯化, 纯化后的主异构体由 UPLC 分析其纯度, 并用 UPLC-MS 进行相对分子量检测, 用以判断是否为氧化折叠产物。将氧化折叠产物通过超微量分光光度计 NanoDrop 进行定量, 计算产率, 分装 (每管含有 50 nmol 折叠产物), 离心干燥后, 于 -20 °C 贮存待用。

**1.6 氧化折叠产物活性测试** 取纯化后的氧化折叠主异构体产物 (约 50 nmol) 溶解于适量 ND96 溶液中, 涡旋使其充分溶解, 浓度为 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup>。以该浓度作为母液, 10 倍梯度稀释, 获得一系列浓度的肽溶液。利用各种不同亚型的烟碱型乙酰胆碱受体 (nAChRs) 模型, 对芋螺毒素 Lv68 主异构体折叠肽的活性进行筛选。将不同的 nAChRs 亚基 (α, β 等亚基) 的 cRNA 按一定比例分别注入爪蟾卵母细胞中, 分别静待 3 ~ 5 d 表达各种亚型的 nAChRs (α3β4, α6β4, α4β2, α9α10, α1β1γδ, α1β1δε), 利用双电极电压膜片钳系统, 钳制膜电压在 -70 mV, 灌流速度为 2 mL·min<sup>-1</sup>, 通过记录受体产生的电流值变化, 反映受体离子通道开闭情况。

**1.7 数据统计分析** 数据处理和分析采用统计软件 GraphPad Prism6。活性测试的数据分析及剂量反应曲线绘制, 采用 Clampfit 10.2 软件进行处理。

## 2 结果与分析

**2.1 线性肽的合成与纯化** 通过固相合成法合成 Lv68 线性肽粗肽, 采用制备型 HPLC 纯化除杂, UPLC 分析其纯度可达 95% 以上(图 1), 通过 UPLC-MS 对其相对分子量进行鉴定(图 2), 其实验值为 1 819.58 Da, 与理论值一致。

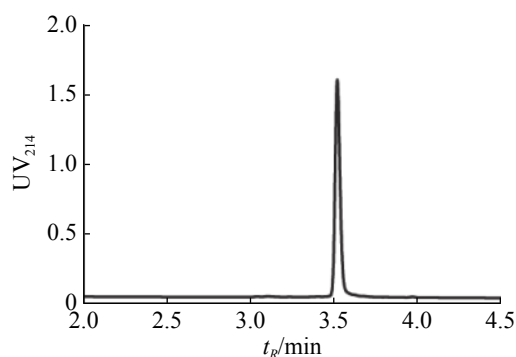


图 1 芋螺毒素 Lv68 线性肽的 UPLC 图谱

Fig. 1 UPLC spectrum of conotoxin Lv68 linear peptide

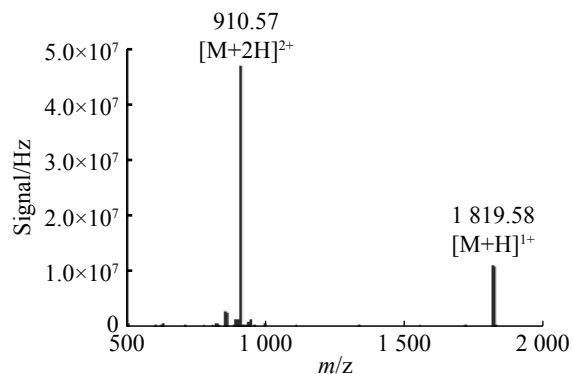


图 2 芋螺毒素 Lv68 线性肽的 UPLC-MS 图谱

Fig. 2 UPLC-MS spectrum of conotoxin Lv68 linear peptide

**2.2 一步法氧化折叠及其条件优化** Lv68 线性肽经氧化折叠后通过 UPLC 对产物进行分析(图 3), 将主异构体产物分离纯化后, 经质谱鉴定其相对分子量为 1 813.55 Da(图 4), 与线性肽相对分子量相差 6.03 Da, 即脱去了 6 个氢原子, 证明其形成了 3 对二硫键的折叠肽。

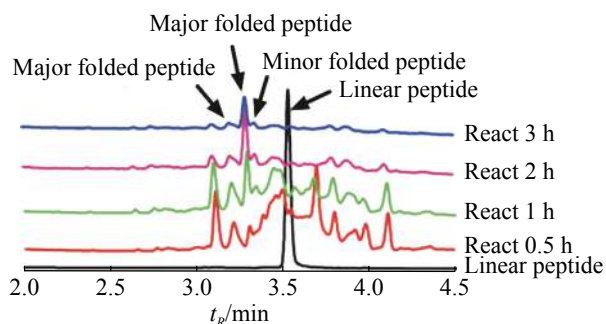


图 3 芋螺毒素 Lv68 氧化折叠反应的动态液相图

Fig. 3 Dynamic liquid chromatographic diagram of oxidative folding reaction of conotoxin Lv68

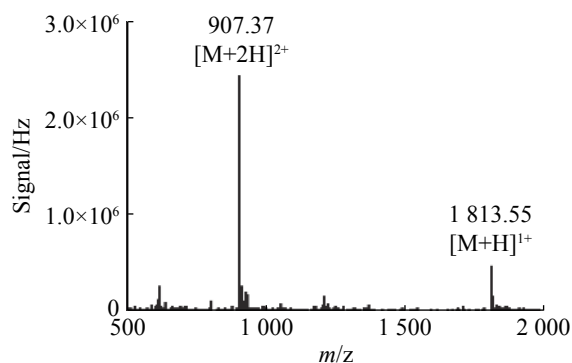


图 4 芋螺毒素 Lv68 氧化折叠主产物质谱图

Fig. 4 Mass spectrum of the major folded product of conotoxin Lv68

通过一步法氧化折叠反应体系的条件优化, 考察缓冲液、氧化剂、线性肽浓度、反应时间对芋螺毒素 Lv68 主异构体产物产率的影响, 发现缓冲液和氧化剂的选择对其氧化折叠产率具有重要影响, 而  $10 \sim 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的线性肽浓度范围对产率的影响不大。综合实验结果, 确定 Lv68 的一步氧化折叠最优条件为  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl,  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA, GSH/GSSG  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}/1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、线性肽浓度  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 反应时间 2 h。

**2.3 氧化折叠产物的分离纯化及定量干燥** 取 20 mg Lv68 线性肽, 采用该最优反应条件合成 Lv68 折叠肽, 以 8% 甲酸酸化淬灭反应后, 经制备型 HPLC 分离纯化, 并通过 UPLC-MS 进行纯度和相对分子量鉴定, 最终获得芋螺毒素 Lv68 氧化折叠产物约 2 000 nmol, 计算产率为 18.14%, 纯度达 95% 以上(图 5), 可用于电生理活性测试。

**2.4 氧化折叠产物活性测试** 芋螺毒素 Lv68 氧化折叠主产物对多种亚型的烟碱型乙酰胆碱受体的电生理活性测试结果表明, 在终浓度为  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  下, Lv68 对  $\alpha 3\beta 4$ ,  $\alpha 6\beta 4$ ,  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ ,  $\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$  乙酰胆碱受

体均无阻断活性,对  $\alpha 9\alpha 10$  乙酰胆碱受体具有一定的阻断活性,  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  可阻断约 80%(图 6), 其  $IC_{50}$  小于  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

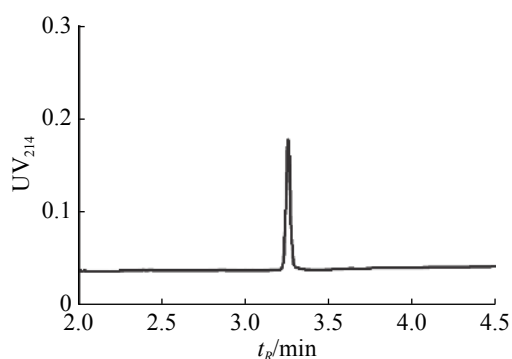


图 5 芋螺毒素 Lv68 氧化折叠主产物的 UPLC 图谱

Fig. 5 UPLC spectrum of the major folded product of conotoxin Lv68

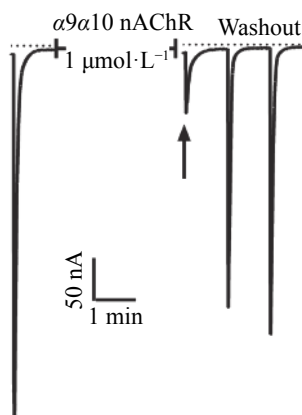


图 6 Lv68 氧化折叠主产物的电生理活性测试结果

Fig. 6 Electrophysiological assay of the major folded product of Lv68

### 3 讨 论

芋螺毒素 Lv68 含 6 个半胱氨酸, 可形成 3 对二硫键, 理论上 有 15 种二硫键异构体, 本研究采用一步氧化法对线性 Lv68 进行氧化折叠, 但由于其自身的结构性质, 通过一步氧化法得到的二硫键异构体比例悬殊, 主产物占有明显优势。一步氧化法具有操作步骤简单、合成效率高、折叠产物稳定、产率较高等优点, 适用于芋螺毒素 Lv68 的大量合成。芋螺毒素 Lv68 的大量合成利于开展 Lv68 的结构与功能等相关的研究。本研究结果证明, 芋螺毒素 Lv68 对  $\alpha 9\alpha 10$  nAChR 具有一定阻断活性。文献 [31] 报道  $\alpha 9\alpha 10$  nAChR 与神经痛治疗靶点密切相关。 $\alpha 9\alpha 10$  nAChR 强阻断剂(例如: 芋螺毒素 Vc1.1<sup>[32]</sup>, RgIA<sup>[33]</sup>, GeXIVA<sup>[34]</sup>)具有显著的镇痛活性。癌症、创伤等神经病理性疼痛是中枢或外周神经系统损伤或功能异常导致的疼痛综合征<sup>[35]</sup>, 且这类神经病变很难自我修复, 给患者带来极大的痛苦<sup>[36]</sup>。临床常用的作用于阿片受体的镇痛药物(如吗啡)对神经痛镇痛效果差、副作用多、易成瘾、存在剂量耐受效应。因此, 新型高效镇痛药的研发需求迫在眉睫, 新型神经痛治疗药物的候选分子亟待研究开发。Vc1.1 曾作为镇痛药进入临床 II 期研究阶段(后因种属差异问题终止)<sup>[37]</sup>, GeXIVA<sup>[38]</sup> 正作为治疗神经痛的镇痛药处于临床前研究阶段, 说明了  $\alpha 9\alpha 10$  nAChR 阻断剂作为镇痛开发的前景良好。芋螺毒素 Lv68 对  $\alpha 9\alpha 10$  nAChR 具有阻断作用, 不仅拓宽了含半胱氨酸框架 III 的 M 超家族芋螺毒素的作用靶点范围, 对该类芋螺毒素的进一步研究具有重要意义, 而且也提示 Lv68 可作为以  $\alpha 9\alpha 10$  nAChR 为作用靶点的镇痛药物先导分子, 尚有待进行深入研究。本实验结果可为其他含半胱氨酸模式 III 的 M 超家族  $\Psi$ -芋螺毒素的氧化折叠反应、生物活性研究以及深入开发利用提供重要的参考和借鉴。

### 参考文献:

- [1] LAIKOWSKI M M, REISDORFER F, MOURA S. NACHR  $\alpha 4\beta 2$  subtype and their relation with nicotine addiction, cognition, depression and hyperactivity disorder [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2019, 26(20): 3792 – 811.
- [2] AUBIN H, LUQUIENS A, BERLIN I. Pharmacotherapy for smoking cessation: pharmacological principles and clinical practice [J]. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2014, 77(2): 324 – 336.
- [3] WEST R, BAKER C L, CAPPELLERI J C, et al. Effect of varenicline and bupropion SR on craving, nicotine withdrawal symptoms, and rewarding effects of smoking during a quit attempt [J]. *Psychopharmacology*, 2008, 197(3): 371 – 377.
- [4] MONARREZESPINO J, GALANTI M R, HANSSON J, et al. Treatment with bupropion and varenicline for smoking cessation and the risk of acute cardiovascular events and injuries: a Swedish case-crossover study [J]. *Nicotine & Tobacco Research*, 2018, 20(5): 606 – 613.
- [5] LIU X, PALMATIER M I, CAGGIULA A R, et al. Reinforcement enhancing effect of nicotine and its attenuation by nicotin-

- ic antagonists in rats [J]. *Psychopharmacology*, 2007, 194(4): 463 – 473.
- [6] TOBEY K M, VALENTINY D M, WILEY J L, et al. Effects of the specific  $\alpha 4\beta 2$  nAChR antagonist, 2-fluoro-3-(4-nitrophenyl) deschloroepibatidine, on nicotine reward-related behaviors in rats and mice [J]. *Psychopharmacology*, 2012, 223(2): 159 – 168.
- [7] JIN A, VETTER I, HIMAYA S W A, et al. Transcriptome and proteome of *Conus planorbis* identify the nicotinic receptors as primary target for the defensive venom [J]. *Proteomics*, 2015, 15: 4030 – 4040.
- [8] MIR R, KARIM S, KAMAL M A, et al. Conotoxins: Structure, therapeutic potential and pharmacological applications [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2016, 22(5): 582 – 589.
- [9] FANG G, CHEN X, YANG Q, et al. Discovery, structure, and chemical synthesis of disulfide-rich peptide toxins and their analogs [J]. *Chinese Chemical Letters*, 2018, 29(7): 1033 – 1042.
- [10] WU J, CIPPITELLI A, ZHANG Y, et al. Highly selective and potent  $\alpha 4\beta 2$  nAChR antagonist inhibits nicotine self-administration and reinstatement in rats [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 60(24): 10092 – 10104.
- [11] MILLS E J, WU P, LOCKHART I, et al. Comparisons of high-dose and combination nicotine replacement therapy, varenicline, and bupropion for smoking cessation: A systematic review and multiple treatment meta-analysis [J]. *Annals of Medicine*, 2012, 44(6): 588 – 597.
- [12] HARVEY A L. Toxins and drug discovery [J]. *Toxicon*, 2014, 92: 193 – 200.
- [13] MILJANICH G P. Ziconotide: Neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2004, 11(23): 3029 – 3040.
- [14] CINCIRIPINI P M, ROBINSON J D, KARAMHAGE M, et al. Effects of varenicline and bupropion sustained-release use plus intensive smoking cessation counseling on prolonged abstinence from smoking and on depression, negative affect, and other symptoms of nicotine withdrawal [J]. *JAMA Psychiatry*, 2013, 70(5): 522 – 533.
- [15] ROLLEMA H, SHRIKHANDE A, WARD K M, et al. Preclinical properties of the  $\alpha 4\beta 2$  nAChR partial agonists varenicline, cytisine and dianicline translate to clinical efficacy for nicotine dependence [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2009, 78(7): 918 – 919.
- [16] AKONDI K B, MUTTENTHALER M, DUTERTRE S, et al. Discovery, synthesis, and structure: activity relationships of conotoxins [J]. *Chemical Reviews*, 2014, 114(11): 5815 – 5847.
- [17] XU X, XU Q, CHEN F, et al. Role of the disulfide bond on the structure and activity of  $\mu$ -conotoxin P III A in the inhibition of NaV1.4 [J]. *RSC Advances*, 2019, 9(2): 668 – 674.
- [18] LEWIS R J, DUTERTRE S, VETTER I, et al. Conus venom peptide pharmacology [J]. *Pharmacological Reviews*, 2012, 64(2): 259 – 298.
- [19] VETTER I, LEWIS R J. Therapeutic potential of cone snail venom peptides (conopeptides) [J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2012, 12(14): 1546 – 1552.
- [20] PRASHANTH J R, BRUST A, JIN A, et al. Cone snail venomics: from novel biology to novel therapeutics [J]. *Future Medicinal Chemistry*, 2014, 6(15): 1659 – 1675.
- [21] BULAJ G, OLIVERA B M. Folding of conotoxins: Formation of the native disulfide bridges during chemical synthesis and biosynthesis of conus peptides [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2008, 10(1): 141 – 155.
- [22] ROLLEMA H, HURST R S. The contribution of agonist and antagonist activities of  $\alpha 4\beta 2^*$  nAChR ligands to smoking cessation efficacy: a quantitative analysis of literature data [J]. *Psychopharmacology*, 2018, 235(9): 2479 – 2505.
- [23] KAAS Q, YU R, JIN A H, et al. ConoServer: Updated content, knowledge, and discovery tools in the conopeptide database [J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 40(D1): D325 – D330.
- [24] LUO S, ZHU X, WU Y, et al. Conotoxins and drug discovery with special reference to Hainan species [M]//GOPALAKRISHNAKONE P. *Toxins and Drug Discovery*. Dordrecht: Springer Netherlands. 2015: 1 – 39.
- [25] LLUISMA A O, LOPEZVERA E, BULAJ G, et al. Characterization of a novel  $\psi$ -conotoxin from *Conus parius* Reeve [J]. *Toxicon*, 2008, 51(2): 174 – 80.
- [26] ABRAHAM N, LEWIS R J. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor modulators from cone snails [J]. *Marine Drugs*, 2018, 16(6): 208.
- [27] VAN WAGONER R M, JACOBSEN R B, OLIVERA B M, et al. Characterization and three-dimensional structure determination of  $\psi$ -conotoxin P III f, a novel noncompetitive antagonist of nicotinic acetylcholine receptors, [J]. *Biochemistry*, 2003, 42(21): 6353 – 6362.
- [28] LEBBE E K M, GHEQUIRE M G K, PEIGNEUR S, et al. Novel conopeptides of largely unexplored Indo Pacific *Conus* sp [J]. *Marine Drugs*, 2016, 14(11): 199.
- [29] JIMENEZ E C, OLIVERA B M. Divergent M- and O-superfamily peptides from venom of fish-hunting *Conus parius* [J]. *Peptides*, 2010, 31(9): 1678 – 83.

- [30] BEHRENDT R, WHITE P D, OFFER J. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis [J]. *Journal of Peptide Science*, 2016, 22(1): 4 – 27.
- [31] GIRIBALDI J, DUTERTRE S.  $\alpha$ -Conotoxins to explore the molecular, physiological and pathophysiological functions of neuronal nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Neuroscience Letters*, 2018, 679: 24 – 34.
- [32] CASTRO J, HARRINGTON A C, GARCIACARABALLO S, et al.  $\alpha$ -Conotoxin Vc1.1 inhibits human dorsal root ganglion neuroexcitability and mouse colonic nociception via GABAB receptors [J]. *Gut*, 2017, 66(6): 1083 – 1094.
- [33] AZAM L, PAPAKYRIAKOU A, ZOURIDAKIS M, et al. Molecular interaction of  $\alpha$ -conotoxin Rg1A with the rat  $\alpha 9\alpha 10$  nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Molecular Pharmacology*, 2015, 87(5): 855.
- [34] LUO S, ZHANGSUN D, HARVEY P J, et al. Cloning, synthesis, and characterization of  $\alpha$ O-conotoxin GeXIVA, a potent  $\alpha 9\alpha 10$  nicotinic acetylcholine receptor antagonist [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(30): E4026 – E4035.
- [35] HOLMES D. The pain drain [J]. *Nature*, 2016, 535(7611): S2 – 3.
- [36] FU X, WU H, LI J, et al. Efficacy of drug interventions for chemotherapy-induced chronic peripheral neurotoxicity: A network meta-analysis [J]. *Frontiers in Neurology*, 2017, 8: 223.
- [37] DUREK T, CRAIK D J. Therapeutic conotoxins: a US patent literature survey [J]. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2015, 25(10): 1159 – 1173.
- [38] WANG H, LI X, ZHANGSUN D, et al. The  $\alpha 9\alpha 10$  Nicotinic acetylcholine receptor antagonist  $\alpha$ O-conotoxin GeXIVA[1, 2] alleviates and reverses chemotherapy-induced neuropathic pain [J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(5): 265.

## One-step Oxidative Folding and nAChR Blocking Activity of Conotoxin Lv68

LI Cheng, ZHANG Yu, LUO An, JU Shuang, FU Ying, LUO Sulan

(Key Laboratory of Tropical Biological Resources of Ministry of Education / School of Life Science and Pharmacy / Haikou Key Laboratory of Marine Drugs, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

**Abstract:** Conotoxin Lv68 is a new M superfamily conotoxin cloned from the cDNA of *Conus lividus* from Hainan. It consists of 15 amino acid residues, and contains 6 cysteine, and the cysteine framework is -CC-C-C-CC- (type III). Linear peptide of conotoxin Lv68 was synthesized by using Solid Phase Peptide Synthesis. The one-step oxidative conditions of disulfide bond folding for the major folded products of Lv68 were studied and optimized. Bioactivities of the major folded products were assayed on a series of nicotinic acetylcholine receptor (nAChRs) subtypes ( $\alpha 3\beta 4$ ,  $\alpha 6\beta 4$ ,  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 9\alpha 10$ ,  $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$  and  $\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$ ) by using the voltage patch clamp technology. The Lv68 produced maximum folding yield (18.14%) under the optimized folding conditions including reaction system composition ( $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl,  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA, GSH / GSSG  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  /  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), linear peptide concentration ( $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), and reaction time (2 h). A medium blocking effect (80% inhibition) on  $\alpha 9\alpha 10$  nAChR subtype was detected for the Lv68 at the concentration of  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . These results confirmed the optimized folding conditions of conotoxin Lv68 and its activity to block  $\alpha 9\alpha 10$  nAChR, which broadened the target range of the M superfamily conotoxins containing cysteine framework III. The results not only lay the foundation for the further development of Lv68 as an analgesic drug lead targeting  $\alpha 9\alpha 10$  nAChR, but also provide a reference and guidance for the oxidative folding, biological activity research and further development and utilization of other M-conotoxins containing cysteine framework III.

**Keywords:** conotoxins; disulfide bond; oxidative folding;  $\alpha 9\alpha 10$  acetylcholine receptor