

文章编号: 1674 - 7054(2020)04 - 0391 - 08

$\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ 乙酰胆碱受体在非洲爪蟾 卵母细胞中的表达

熊 洋, 朱晓鹏, 吴 勇, 长孙东亭, 罗素兰

(海南大学 生命科学与药学院/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: $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ 烟碱型乙酰胆碱受体($\alpha 6\beta 4^*$ nAChRs, *代表其他亚基)主要分布于大脑海马区、外周神经节和入源肾上腺嗜铬细胞等, 与神经性疼痛和炎症反应、情绪等生理疾病密切相关。本研究拟对大鼠 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR 在非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)卵母细胞膜上进行重组表达, 并利用双电极电压钳电生理学技术检测该重组受体的功能。在不同浓度的激动剂乙酰胆碱的刺激下, 比较了 $\alpha 6/\alpha 3$ 和 $\beta 4$ 亚基的不同配比形成的受体通道开放而产生的电流大小, 并用其拮抗剂 α -芋螺毒素 TxID 验证了该受体的敏感性。结果表明, 亚基不同配比的 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR 均可在非洲爪蟾卵母细胞膜上成功表达, 并具有较好的配体门控敏感性。

关键词: $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ 烟碱型乙酰胆碱受体; 非洲爪蟾卵母细胞; 双电极电压钳; 重组表达

中图分类号: Q 812; R 962

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.2020.04.001

烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs)属于配体门控阳离子通道蛋白成员之一, 在哺乳动物体内广泛存在且具有重要生理功能和临床意义。nAChRs 存在于整个中枢(CNS)和外周神经系统(PNS), 以及血液和免疫细胞上^[1-3]。这些离子通道蛋白主要位于突触前膜和突触后膜上, 具有调节神经递质释放和介导快速突触传递的生理作用。按其分布主要分为神经型乙酰胆碱受体和肌肉型乙酰胆碱受体两大类。根据亚基组成的不同, nAChRs 可以分为由 5 个相同亚基构成的同源五聚体(如 $\alpha 7$)或者由至少两种亚基共同组成的异源五聚体(如 $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 6\beta 2$ 等), 其中 α 与 β 亚基的交界面是受体与配体相互作用的关键部位^[4-5]。nAChRs 不同亚型的结构非常相似, 但它们的生理学和药理学功能却截然不同, 它们是一些重大疾病的潜在药物靶点, 如癫痫、尼古丁或酒精成瘾、慢性疼痛综合症、帕金森病、阿尔茨海默病和癌症等^[6-7]。含 $\alpha 6$ 亚基的乙酰胆碱受体亚型($\alpha 6^*$ nAChRs), 主要分布于儿茶酚胺能神经元、海马体、背根神经节和中脑多巴胺能区域, 介导生物体的生理调节功能, 如情绪、疼痛、抑郁等^[1, 8-9]。其中, 位于海马脑区中的 $\alpha 6\beta 4^*$ nAChRs 可调节去甲肾上腺素的分泌, 且与学习、记忆等生理活动密切相关。 $\alpha 6\beta 4^*$ nAChRs 在控制入源肾上腺嗜铬细胞外分泌的过程中发挥了重要作用, 主要控制肾上腺素向血液的释放, 以及在交感神经的支配下负责机体对压力调控的应答^[10-11]。 $\alpha 6\beta 4^*$ nAChRs 也分布于背根神经节神经元上, 共表达 $\alpha 6\beta 4^*$ nAChRs 和 P2X 受体会导致延长 P2X 受体的脱敏时间, 激动 $\alpha 6\beta 4^*$ nAChRs 可通过抑制 P2X 受体而发挥镇痛作用^[12-13]。天然的 $\alpha 6$ 亚基与 $\beta 4$ 亚基组合形成的受体在体外很难表达、不稳定。 $\alpha 6$ 亚基与其他亚基的组装形式复杂多变, 且与 $\alpha 3$ 亚基的跨膜区域和胞内区域同源性较高, 为了增加其功能性表达, 研究者利用 $\alpha 6/\alpha 3$ 嵌合亚基代替 $\alpha 6$ 亚基, 即由 $\alpha 6$ 亚基的 N 端胞外配体结合区域与 $\alpha 3$ 亚基的跨膜区嵌合而成, 与 $\beta 4$ 亚基共表达所形成的 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ 受体与天然 $\alpha 6\beta 4$ 受

收稿日期: 2020 - 05 - 19

修回日期: 2020 - 05 - 31

基金项目: 国家自然科学基金项目(41966003, 81872794); 海南省重大科技计划(ZDKJ2016002)

第一作者: 熊洋(1994-), 男, 海南大学生命科学与药学院 2017 级硕士研究生. E-mail: ncdxy@163.com

通信作者: 罗素兰(1969-), 女, 教授, 博士生导师. 研究方向: 海洋药物. E-mail: luosulan2003@163.com

体具有相似的结合活性,可以作为体外药物筛选的模型^[14]。 $\alpha 6\beta 4^*$ nAChRs 在大脑区域中常常以低水平表达,且 $\alpha 6\beta 4^*$ nAChRs 的表达往往伴随 $\alpha 6\beta 2^*$ 、 $\alpha 3\beta 4$ nAChRs 等相似亚型的表达并被遮盖而很难区分,导致其结构和参与的生理功能难以研究,至今仍不清楚^[1],如位于背根神经节上的 $\alpha 4\beta 2$ 、 $\alpha 7$ 、 $\alpha 9\alpha 10$ 、 $\alpha 6\beta 4$ nAChRs 都与神经型疼痛和炎症相关,但各亚型起什么作用不得而知。若能发现专一地作用于 $\alpha 6\beta 4$ nAChR 的新型配体,将有助于解析该受体亚型的结构、与配体之间的相互作用关系以及生理药理功能和开发分子探针进一步研究疼痛等相关疾病的病理分子机制,而这些研究的前提是需有效地表达出各种亚型,以此为模型去发现相应的配体。

非洲爪蟾卵母细胞作为分析膜蛋白功能的表达系统具有 2 大优势:第一,卵母细胞具有丰富的 rRNA 和 tRNA,因此可以将外源引入的 mRNA 表达为功能受体蛋白;第二,卵母细胞具有多种内源性信号转导组件,如腺苷酸环化酶、phospholipase C、 Ca^{2+} 激活的氯离子通道等。目前,卵母细胞表达体系广泛运用于离子通道学领域,由于其卵母细胞体积大(直径约为 1 mm),通常以全细胞灌流方法给药研究配体与受体之间的相互作用关系。在卵母细胞膜上表达 nAChRs、G 蛋白偶联受体(G Protein-Coupled Receptors, GPCRs)、谷氨酸受体(Glutamate Receptor)、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 阳离子通道蛋白模型,对于研究阐明离子通道的功能多样性和构型提供理论基础^[15]。因此,本研究针对难表达的 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ 乙酰胆碱受体亚型,建立并优化了其在非洲爪蟾卵母细胞中的表达体系,旨在为 $\alpha 6\beta 4^*$ nAChRs 的配体筛选提供实验模型和研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂与仪器 大鼠(rat, r) $\alpha 6/\alpha 3$ 、 $\beta 4$ 亚基 cDNA 的质粒均由美国犹他大学 J. Michael McIntosh 教授馈赠;DH5 α 、限制性内切酶(*Sal* I 和 *Nhe* I)、DNA 纯化试剂盒(MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.4.0)均购于宝生物工程(大连)有限公司;质粒小量提取试剂盒购于美国 OMEGA 公司;体外转录试剂盒(mMESSAGE mMACHINE T7 Kit)、RNA 纯化试剂盒(MEGA clear Kit)购于美国 Thermo Fisher 公司;成熟雌性非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)购于美国 eNaso 公司;胶原酶 A(Collagenase A)、阿托品(Atropine)、乙酰胆碱(Acetylcholine chloride, ACh)均购于美国 Sigma 公司;电生理 OR2 溶液($82.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, $2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES, pH 7.1 ~ 7.5)和 ND96 溶液($96 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, $2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $1.8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES, pH 7.1 ~ 7.5);其他化学试剂均为国产分析纯,购于广州化学剂厂。双电极电压膜片钳系统(Axon 900A 信号放大器和 Digidata 1550B 数模转换器, Molecular Device, USA),微电极拉针仪(P-1000, Sutter),显微注射仪(Nanoliter 2000, Sutter),NanoDrop 2000 超微量分光光度计(Thermo Fisher Scientific),凝胶成像系统(Alpha-2200, Protein Simple);恒温恒湿培养箱(KCL-2000A, EYELA)。

1.2 r $\alpha 6/\alpha 3$ 、r $\beta 4$ 亚基 cRNA 的制备 从 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中取出感受态细胞 *E.coli* DH5 α 和质粒,通过转化实验将质粒转染到 DH5 α 菌株中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温恒湿扩大培养 12 ~ 14 h,用质粒小量提取试剂盒提取质粒。向离心管中依次加入 $20\text{ }\mu\text{L}$ $10\times\text{H}$ 或 $10\times\text{M}$ Buffer 和 $115\text{ }\mu\text{L}$ ddH $_2\text{O}$ 与 $50\text{ }\mu\text{L}$ 质粒混合均匀,再加入 $15\text{ }\mu\text{L}$ 相对应的限制性内切酶混匀封膜, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴反应 4 h。酶切完全后,利用 DNA 纯化试剂盒对酶切产物进行纯化。纯化后产物取 $2\text{ }\mu\text{L}$ 用于 Nanodrop 定量测定浓度和琼脂糖凝胶电泳鉴定是否酶切完全, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

以上述得到的线性质粒 DNA 作为模板,使用 T7 体外转录试剂盒。向离心管中依次加入 $2\text{ }\mu\text{L}$ $10\times$ Rxn Buffer、 $10\text{ }\mu\text{L}$ $2\times$ NTP/CAP、 $4\text{ }\mu\text{L}$ 线性 DNA 和 $2\text{ }\mu\text{L}$ Nuclease-free Water,混合均匀后,加入 $2\text{ }\mu\text{L}$ Enzyme Mix 封膜, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴反应 4 ~ 6 h。转录完成后,加入 $2\text{ }\mu\text{L}$ TUBRO DNase,轻轻吹打混匀,封膜,离心 1 min, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴反应 20 min,收集产物备用。利用 RNA 纯化试剂盒对上述产物进行纯化,收集 RNA,取 $2\text{ }\mu\text{L}$ 用于 Nanodrop 测定浓度和琼脂糖凝胶电泳鉴定纯度,分装于无 RNA 酶管中, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

1.3 非洲爪蟾卵母细胞的分离与培养 选1只健康状态良好的性成熟非洲爪蟾,冰冻麻醉1 h,在无菌条件下解剖取出2~3叶卵母细胞于OR2溶液中,剪成小团块,用OR2溶液反复冲洗至澄清,加入 $0.8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 含胶原酶A的酶解液中,注意观察酶解过程中细胞团块的消化程度,避免酶解过度导致蛙卵易破裂。酶解约40 min直至分解成单个卵母细胞,用OR2溶液清洗至澄清,转移至含抗生素ND96溶液(青霉素 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,链霉素 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,庆大霉素 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)中,在显微镜下挑选黑白分明、不含血丝和粘膜、大小均匀的球状单个卵母细胞于培养皿中, $17\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养12 h后备用。

1.4 cRNA显微注射 将r $\alpha 6/\alpha 3$ 和r $\beta 4$ 亚基的cRNA分别按10:1,1:1,1:10的质量比例混合,使用Sutter P-1000拉针仪将硅酸盐玻璃针(内径0.69 mm,外径1.2 mm)拉制成注射针和电极针。每个卵母细胞的cRNA注射剂量不低于 $5\text{ ng}\cdot\text{个}^{-1}$ (注射体积为46 nL),设定注射量分别为5,10,15 ng。同时分别注射ddH₂O, $\alpha 6/\alpha 3$ cRNA, $\beta 4$ cRNA,以空白蛙卵作为对照。注射完后,将卵母细胞置于含抗生素的无菌ND96培养液中, $17\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温恒湿培养。在注射完后的第2~5天内,每天检测受体表达情况,及时更换新鲜的含抗生素培养液。

1.5 电生理活性检测 准备好ND96灌流液,真空脱气20 min以上,配制含 $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿托品和 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ BSA的ND96缓冲液(阿托品可抑制卵母细胞本体mAChR的表达,排除干扰),用 $3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl溶液灌注电极针,电阻在 $0.5\sim 2\text{ M}\Omega$ 范围内。吸取单个卵母细胞固定于容积为 $50\text{ }\mu\text{L}$ 的细胞槽中,将两端电极针倾斜 45° 进入细胞槽液面,调节放大器上的电压旋钮将两侧电压值调为零,然后调整电极针位置刺入卵母细胞,两侧电压值变为 -10 至 -40 mV 即可,切换放大器模式为Vm Clamp Slow模式,以初始漏电流不大于 100 nA 为宜。钳制电压 -70 mV ,filter 10 Hz, Gain 1000。在检测ACh激活nAChRs产生的功能性内向电流的过程中,设置1个检测程序:1 min内先给予卵母细胞2 s不同浓度的ACh脉冲刺激,58 s的ND96溶液灌流,重复3次,即分别用浓度为5,10,50,100,200,500, $1\text{ }000\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的ACh激活通道开放,检测受体表达的电流大小。建立稳定的表达模型后,用 α -芋螺毒素TxID验证表达受体的活性和敏感性。

1.6 数据处理与分析 用pClamp 10.2软件记录电流情况,采样频率slow 100 Hz,filter 10 Hz。取3~6个蛙卵所记录的电流大小为平均值,利用Graphpad Prism 6.0软件进行作图。检测敏感性时,以最高浓度 $1\text{ }000\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACh的激发电流为分母,计算不同ACh浓度激活通道开放的电流所对应的反应百分数。在验证受体的有效性时,用GraphPad Prism 6.0软件通过非线性拟合方程 $\%_{\text{Response}}=100/[1+([\text{toxin}]/IC_{50})^{nH}]$ 拟合分析数据(nH 代表Hill系数)。

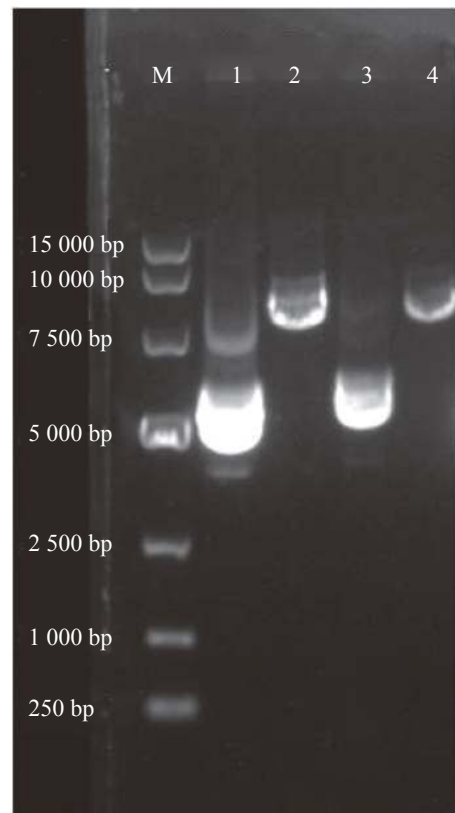


图1 含有r $\alpha 6/\alpha 3$ 、r $\beta 4$ 亚基基因的质粒及其酶切线性化后产物的电泳图

M: DNA Marker DL 15 000; 1: r $\alpha 6/\alpha 3$ 质粒; 2: *Sal* I酶切后的r $\alpha 6/\alpha 3$ 线性质粒; 3: r $\beta 4$ 质粒; 4: *Nhe* I酶切后的r $\beta 4$ 线性质粒。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of plasmid and linearized DNA containing r $\alpha 6/\alpha 3$ or r $\beta 4$ subunit gene

M: DNA Marker DL 15 000; 1: r $\alpha 6/\alpha 3$ plasmid; 2: r $\alpha 6/\alpha 3$ linearized plasmid with *Sal* I; 3: r $\beta 4$ plasmid; 4: r $\beta 4$ linearized plasmid with *Nhe* I.

2 结果与分析

2.1 cRNA 的制备 通过 $w=0.8\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测 $\alpha 6/\alpha 3$ 、 $\beta 4$ 亚基基因质粒和酶切后的纯度。从图 1 可知,第 1 和第 3 泳道分别为 $\alpha 6/\alpha 3$ 、 $\beta 4$ 亚基基因质粒,条带清晰明亮,完整性好,且质量浓度都高于 $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (表 1),适合进一步进行酶切形成线性质粒。根据目的基因 3'-非翻译区下游的酶切位点,用 *Sal* I 酶切 $\alpha 6/\alpha 3$ 质粒、*Nhe* I 酶切 $\beta 4$ 质粒,形成线性化质粒,检测纯度。第 2 和第 4 泳道分别为 $\alpha 6/\alpha 3$ 、 $\beta 4$ 亚基基因质粒的酶切产物(图 1),环状质粒已完全线性化,DNA 条带单一明亮,无明显杂质,且与环状质粒相比具有明显滞后性,线性化产物质量浓度约为 $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (表 1)。

通过 $w=2\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测转录完后获得 cRNA 的纯度。第 1 和第 2 泳道分别为 $\alpha 6/\alpha 3$ 、 $\beta 4$ 的 cRNA(图 2),条带单一明亮,测定 $\alpha 6/\alpha 3$ 的质量浓度为 $0.62 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\beta 4$ 为 $0.58 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,按需分装, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.2 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR 亚型表达检测 为了研究每个蛙卵 cRNA 的不同配比和培养时间对 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR 亚型表达的影响,用 3~6 个卵母细胞检测其电流大小取平均值进行比较,注射后第 2 天检测 3 种不用配比形成的 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ 亚型均无明显大小的电流;在第 3 天检测 10:1, 1:1, 1:10 形成的 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ 亚型表达电流大小,取平均值分别对应 359 nA, 2421 nA, 1810 nA。1:1 和 1:10 配比条件下形成的 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ 亚型针对 ACh 诱导产生的电流差异无明显变化,与 10:1 配比条件下形成的 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ 亚型相比具有统计学显著性差异;第 4 天经过检测与第 3 天无明显差异;第 5 天检测 3 种不用配比形成的 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ 亚型的电流比第 4 天稍许下降,可能由于蛙卵质量下降或敏感性减弱所致(图 3A)。

从图 3B 中可知,当以 1:1 配比的 cRNA 注射量为 5 ng 时,检测多个蛙卵均无明显电流,即蛙卵均不能表达受体;当注射量为 10 或 15 ng 时,均可检测到较大电流且稳定,说明表达受体的情况较佳。

在任何浓度 ACh 的刺激下,单独注射 $\alpha 6/\alpha 3$ cRNA、 $\beta 4$ cRNA、ddH₂O 以及空白蛙卵都不能产生明显的电流,说明单独的 $\alpha 6/\alpha 3$ 或 $\beta 4$ 亚基不能组装形成功能性 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR,空白蛙卵细胞膜上不存在 nAChRs。只有同时注射以一定比例混合的 $\alpha 6/\alpha 3$ 和 $\beta 4$ 亚基 cRNA 才能形成功能受体并在 ACh 刺激下通道开放而产生内向电流,说明 $\alpha 6/\alpha 3$ 和 $\beta 4$ 亚基以一定比例组合形成的功能受体是 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR 表达的必备条件。

表 1 包含 $r \alpha 6/\alpha 3$ 和 $r \beta 4$ 亚基基因的质粒、线性化 DNA 和 cRNA 浓度

Tab. 1 The concentrations of plasmid, linearized DNA and cRNA containing $r \alpha 6/\alpha 3$ or $r \beta 4$ subunit gene

名称 Subunit	质粒DNA/ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) Plasmid DNA	线性DNA/ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) Linearized DNA	cRNA/ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$A_{260}/$ A_{280}
$r \alpha 6/\alpha 3$	0.68	0.46	0.62	2.11
$r \beta 4$	0.79	0.51	0.58	2.12

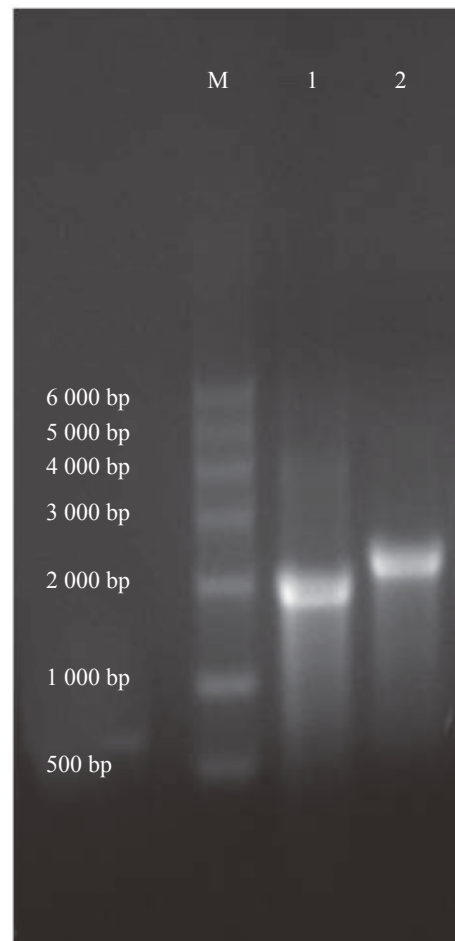


图 2 $r \alpha 6/\alpha 3$ 和 $r \beta 4$ 亚基的 cRNA 电泳图

M: DNA Marker DL 6 000; 1: $r \alpha 6/\alpha 3$ cRNA;
2: $r \beta 4$ cRNA

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of $r \alpha 6/\alpha 3$, $r \beta 4$ cRNA.

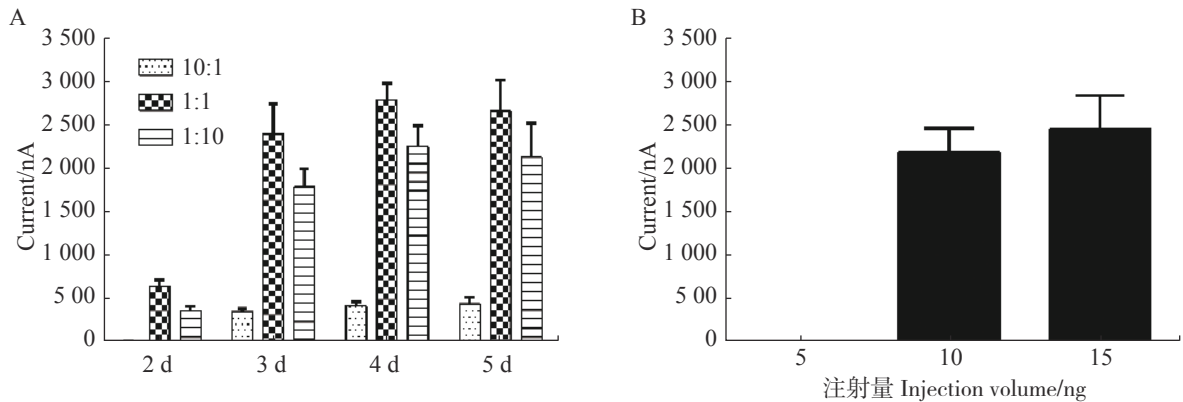


图3 cRNA 不同配比和注射量对 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ 受体表达的影响

A: 不同配比形成 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ 在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACh 诱导下产生的电流; B: 不同注射剂量形成的 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ 在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACh 诱导下产生的电流。Mean \pm SEM. $n=3\sim 6$ 。

Fig. 3 Effect of different ratios and injection volume of cRNA on the expression of $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR

A: Inward current amplitudes of $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR with different ratios evoked by perfusion with $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACh; B: Inward current amplitudes of $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR with different injection volumes evoked by perfusion with $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACh.

通过在不同浓度 5, 10, 50, 100, 200, 500, 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ACh 刺激下, 1:1 配比形成的 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR 通道开放产生的电流具有浓度依赖性, 随着浓度的依次增加, 电流持续增大。从图 4A 中可知, 当 ACh 浓度为 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 能检测到微弱的电流, 约 200 nA; 当 ACh 浓度高达 $1\ 000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR 通道开放产生的电流达到最大, 约 4 800 nA; ACh 的浓度与激发电流的大小呈非线性相关(图 4B), ACh 的半数有效浓度(concentration for 50% of maximal effect, EC_{50})为 $101.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。由于 ACh 浓度太高电流过大易导致受体过度开放而脱敏, ACh 浓度太低电流过小易造成数据误差, 而 ACh 的浓度在 $50\sim 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的范围内较好, 其电流较大且稳定。因此, 选择 ACh 配体浓度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR 通道开放可产生明显的电流。

在 ACh 浓度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\alpha 6/\alpha 3$ 和 $\beta 4$ 亚基以 1:1 配比且注射量为 $10 \text{ ng}\cdot\text{个}^{-1}$ 的情况下, 检测 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR 表达活性和敏感性。从图 5 中可知, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ α -芋螺毒素 TxID 几乎能完全阻断 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR 的电流, 较易洗脱, 其 IC_{50} 值为 $125.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 与文献 [16] 的结果一致, 说明受体具有良好的生理功能与敏感性。

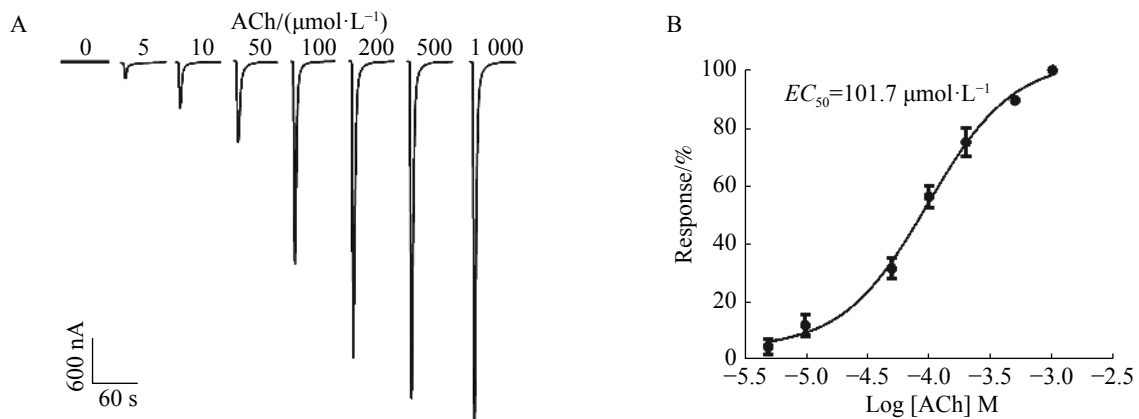


图4 ACh 浓度对 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ 受体表达的影响

A: 不同浓度配体 ACh 诱发 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR 产生的电流; B: ACh 激活 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR 的浓度反应曲线。Mean \pm SEM. $n=3\sim 6$ 。

Fig. 4 Effect of ACh concentrations on the expression of $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR receptor

A: Currents evoked by ACh at different concentrations at $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR. B: ACh concentration-response curve for $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR.

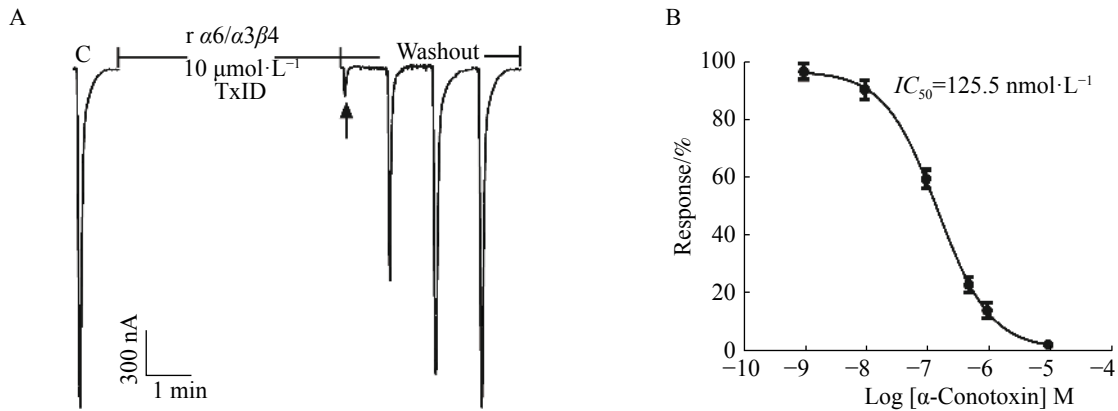


图5 α -芋螺毒素 TxID 阻断 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR 的效果图

A: TxID 阻断大鼠 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR 的电流轨迹图; B: TxID 对大鼠 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR 的浓度-反应曲线图。

Mean \pm SEM. $n=3\sim 6$ 。

Fig. 5 Blocking of $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR with α -CTx TxID

A: Current trace of inhibition of $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR by α -CTx TxID; B: Concentration-response analysis for inhibition of rat $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ by α -CTx TxID.

3 讨论

非洲爪蟾卵母细胞已被广泛应用于表达各种外源受体蛋白和离子通道蛋白,为研究离子通道与配体之间的相互作用关系和其结构组成等提供了重要手段。利用双电极电压钳电生理学技术检测膜电流的变化,可有效地检测表达在非洲爪蟾卵母细胞膜上的受体和离子通道等的生物活性和生理功能。大鼠 $\alpha 3\beta 2$ 、 $\alpha 4\beta 2$ 和 $\alpha 3\beta 4$ nAChRs 等多种乙酰胆碱受体亚型在非洲爪蟾卵母细胞膜上可稳定表达^[17-19],但含有 $\alpha 6$ 亚基的 nAChRs,包括 $\alpha 6\beta 4^*$ 与 $\alpha 6\beta 2^*$ nAChRs,在体外很难表达,常规表达方法常常表达不出来或者表达受体的电流非常小,不能用于药物筛选及其结构与功能的研究。本研究针对 $\alpha 6\beta 4^*$ nAChRs,采用 $\alpha 6/\alpha 3$ 嵌合亚基、 $\beta 4$ 亚基高表达载体,优化关键表达因素,通过体外转录合成 $\alpha 6/\alpha 3$ 与 $\beta 4$ 亚基的 cRNA、显微注射和双电极电压钳技术,在非洲爪蟾卵母细胞膜上成功表达了 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR。笔者重组表达的 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR 具有良好的乙酰胆碱配体门控特性,并用该受体的特异性阻断剂 α -芋螺毒素 TxID 验证了其配体结合的敏感性和有效性。

虽有研究表明, $\alpha 6$ 亚基主要分布于中枢神经的儿茶酚胺能神经元上,也存在于视觉神经通路和外周神经等部位,但其真正的生理分布和功能尚不明晰^[2,20]。况且, $\alpha 6/\alpha 3$ 与 $\beta 4$ nAChR 不同亚基数量的组成,也会影响受体的结构和功能,从而产生不同的生理效应。异源型乙酰胆碱受体的 α 亚基和 β 亚基,在某个亚基(限制性亚基)蛋白表达量不足时形成的异源五聚体受体分子中,往往只含有 2 个限制性亚基,另一个丰富表达的亚基则含有 3 个^[21]。在体外重组表达时,若 $\alpha 3$ 与 $\beta 4$ 亚基的 cRNA 分别以 1:10 和 10:1 的不同比例注射到非洲爪蟾卵母细胞中,将会组装成不同化学构型的异源五聚体受体,其构型分别为 $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ 与 $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$;若以 1:1 的比例进行注射, $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ 与 $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$ 这两种构型均会形成,但 $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ 构型占主导作用^[4]。这些不同化学构型的受体异构体,往往具有不同的生理意义和功能特征,有时对同一配体的结合活性还有差异。因而,这些不同构型的受体需要分别表达出来用于各项研究。

在实验中笔者发现,当 $\alpha 6/\alpha 3$ 与 $\beta 4$ 亚基的 cRNA 的注射比例为 1:1 和 1:10 时,2 个 α 亚基和 3 个 β 亚基可形成正常的功能性五聚体 $(\alpha 6/\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ nAChR,对 ACh 的敏感性高,其门控特性相似;当注射比例为 10:1 时,可形成 $(\alpha 6/\alpha 3)_3(\beta 4)_2$ nAChR,该构型对 ACh 的敏感度降低,再次证明 $\alpha 6$ 和 $\beta 4$ 亚基数量组成改变后,可形成不同的 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ 构型,包括 $(\alpha 6/\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ 和 $(\alpha 6/\alpha 3)_3(\beta 4)_2$ ^[22]。ACh 的活性结合位点位于 α 与 β 亚基的临界结合处,10:1 配比形成的 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR 结构可能导致 $\alpha 6$ 和 $\beta 4$ 亚基的位置关系发生了变化,相邻亚基交界面的改变会影响配体与受体之间的结合活性,从而影响受体的功能。

cRNA 注射量的差异对受体表达的影响很明显,在保证 cRNA 注射量约 10 ng,注射体积 46 ~ 50 nL 的条件下, $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR 的表达稳定,产生的电流较大。若注射体积过大(>100 nL),很容易使蛙卵被胀破而死亡。蛙卵的质量是直接影响受体表达的另一关键因素,需精心挑选不同批次的、发育良好的、健康的非洲爪蟾卵母细胞进行注射。因此,须挑选大小正常、动植物极分明、圆形饱满的蛙卵, $\alpha 6/\alpha 3$ 与 $\beta 4$ cRNA 按 1:1 进行显微注射,可获得稳定的 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ 受体表达模型;该受体在 ACh 浓度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的刺激下,其电流稳定在 2 000 ~ 3 000 nA 范围内,以此为实验模型,可开展针对 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR 的新药靶向筛选等研究。

参考文献:

- [1] HONE A J, MEYER E L, MCINTYRE M, et al. Nicotinic acetylcholine receptors in dorsal root ganglion neurons include the $\alpha 6\beta 4$ subtype [J]. *FASEB Journal*, 2012, 26(2): 917 – 926.
- [2] MACKEY E D, ENGLE S E, KIM M R, et al. $\alpha 6$ nicotinic acetylcholine receptor expression and function in a visual salience circuit [J]. *Journal of Neuroscience*, 2012, 32(30): 10226 – 10237.
- [3] GIRIBALDI J, DUTERTRE S. α -Conotoxins to explore the molecular, physiological and pathophysiological functions of neuronal nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Neuroscience Letters*, 2018, 679: 24 – 34.
- [4] KRASHIA P, MORONI M, BROADBENT S, et al. Human $\alpha 3\beta 4$ neuronal nicotinic receptors show different stoichiometry if they are expressed in *Xenopus* oocytes or mammalian HEK293 cells [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13611.
- [5] CECCHINI M, CHANGEUX J P. The nicotinic acetylcholine receptor and its prokaryotic homologues: Structure, conformational transitions & allosteric modulation [J]. *Neuropharmacology*, 2015, 96(Pt B): 137 – 149.
- [6] EGLETON R D, BROWN K C, DASGUPTA P. Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: multiple roles in proliferation and inhibition of apoptosis [J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2008, 29(3): 151 – 158.
- [7] GAO F, CHEN D, MA X, et al. $\alpha 6$ -containing nicotinic acetylcholine receptor is a highly sensitive target of alcohol [J]. *Neuropharmacology*, 2019, 149: 45 – 54.
- [8] LUO S, ZHANGSUN D, WU Y, et al. Characterization of a novel α -conotoxin from *Conus textile* that selectively targets $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ nicotinic acetylcholine receptors [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(2): 894 – 902.
- [9] LEINO S, KOSKI S K, RANNANPAA S, et al. Effects of antidyskinetic nicotine treatment on dopamine release in dorsal and ventral striatum [J]. *Neuroscience Letters*, 2018, 672: 40 – 45.
- [10] EIDEN L E. Commentary on chapters 'clinical and developmental aspects' and 'stress responses of the adrenal medulla' [J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2010, 30(8): 1371 – 1375.
- [11] PEREZ-ALVAREZ A, HERNANDEZ-VIVANCO A, MCINTOSH J M, et al. Native $\alpha 6\beta 4$ nicotinic receptors control exocytosis in human chromaffin cells of the adrenal gland [J]. *FASEB Journal*, 2012, 26(1): 346 – 354.
- [12] LIMAPICHAT W, DOUGHERTY D A, LESTER H A. Subtype-specific mechanisms for functional interaction between $\alpha 6\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors and P2X receptors [J]. *Molecular Pharmacology*, 2014, 86(3): 263 – 274.
- [13] HONE A J, MCINTOSH J M. Nicotinic acetylcholine receptors in neuropathic and inflammatory pain [J]. *FEBS Letters*, 2018, 592(7): 1045 – 1062.
- [14] JENSEN A B, HOESTGAARD-JENSEN K, JENSEN A A. Pharmacological characterisation of $\alpha 6\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors assembled from three chimeric $\alpha 6/\alpha 3$ subunits in tsA201 cells [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2014, 740: 703 – 713.
- [15] NAKAGAWA T, TOUHARA K. Functional assays for insect olfactory receptors in *Xenopus* oocytes [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 1068: 107 – 119.
- [16] LUO S, ZHANGSUN D, ZHU X, et al. Characterization of a novel α -conotoxin TxID from *Conus textile* that potently blocks rat $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 56(23): 9655 – 9663.
- [17] LUO S, AKONDI K B, ZHANGSUN D, et al. Atypical α -conotoxin LtIA from *Conus litteratus* targets a novel microsite of the $\alpha 3\beta 2$ nicotinic receptor [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(16): 12355 – 12366.
- [18] MILLARD E L, NEVIN S T, LOUGHNAN M L, et al. Inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes by α -Conotoxin GID and analogues [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(8): 4944 – 4951.
- [19] YU J, ZHU X, HARVEY P J, et al. Single amino acid substitution in α -conotoxin TxID reveals a specific $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptor antagonist [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 61(20): 9256 – 9265.
- [20] PONS S, FATTORE L, COSSU G, et al. Crucial role of $\alpha 4$ and $\alpha 6$ nicotinic acetylcholine receptor subunits from ventral tegmental area in systemic nicotine self-administration [J]. *Journal of Neuroscience*, 2008, 28(47): 12318 – 12327.

- [21] GRISHIN A A, WANG C I, MUTTENTHALER M, et al. Alpha-conotoxin AuIB isomers exhibit distinct inhibitory mechanisms and differential sensitivity to stoichiometry of $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(29): 22254 – 22263.
- [22] WU X, TAE H S, HUANG Y H, et al. Stoichiometry dependent inhibition of rat $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptor by the ribbon isomer of alpha-conotoxin AuIB [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2018, 155: 288 – 297.

Expression of $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ Nicotinic Acetylcholine Receptor in *Xenopus Oocytes*

XIONG Yang, ZHU Xiaopeng, WU Yong, ZHANGSUN Dongting, LUO Sulan
(School of Life and Pharmaceutical Sciences, Key Laboratory of Tropical Biological Resources of Ministry of Education,
Key Laboratory for Marine Drugs of Haikou, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors ($\alpha 6\beta 4^*$ nAChRs, the asterisk denotes the possible presence of additional subunits) are mainly distributed in the hippocampus, peripheral ganglia and human adrenal chromaffin cells, and are closely related to neuropathic and inflammatory pain, stress, etc. Recombinant expression of rat $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR on *Xenopus laevis* oocytes was detected by using the two-electrode voltage clamp to record inward currents elicited by acetylcholine at different concentrations in light of α and β subunits at different ratios, and the sensitivity of this receptor was verified by its antagonist α -conotoxin TxID. The results showed that $\alpha 6\beta 4$ nAChR subtypes with different ratios of subunits were successfully expressed in the oocyte membrane, and had good sensitivity of ligand-gated ion channel function.

Keywords: $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR; *Xenopus oocytes*; two-electrode voltage clamp; recombinant expression

(责任编辑:潘学峰)