

文章编号: 1674-7054(2021)04-0403-09



# $\alpha 6 / \alpha 3 \beta 4$ 烟碱型乙酰胆碱受体 $\beta 4$ 亚基双点突变体的制备及其功能研究

李旭扬<sup>1</sup>, 陈舒苗<sup>1</sup>, 于津鹏<sup>2</sup>, 罗素兰<sup>1</sup>, 长孙东亭<sup>1</sup>

(1. 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/生命科学与药学院, 海口 570228;

2. 广西大学 医学院, 南宁 530004)

**摘要:** 在烟碱型乙酰胆碱受体家族中, 含  $\alpha 6$  亚型的受体是比较特殊的一类。研究发现  $\alpha 6\beta 4^*$  亚型 (\*表示含其他亚基) 在神经系统方面具有一定的调节作用, 与神经性疼痛、成瘾等多种疾病的发病机制密切相关, 可作为潜在的治疗靶点。比对大鼠与人类  $\alpha 6$  和  $\beta 4$  亚基的序列, 以野生型基因为模板, 采用基因定点突变的方式, 成功得到 3 种相邻位点突变的  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  受体突变型基因。通过体外转录、显微注射等手段, 构建  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  受体野生型和突变型在非洲爪蟾卵母细胞上的表达模型, 并使用双电极电压钳检测受体的表达情况。结果表明, 与野生型受体相比, 突变体  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ [S52N, I53V] 对 ACh 的敏感性有所提升,  $EC_{50}$  为  $59.58 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 是野生型的 1/2, 而其他两种突变体的敏感性与野生型相同。

**关键词:**  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  烟碱型乙酰胆碱受体; 相邻位点突变; 体外表达; 双电极电压钳

**中图分类号:** Q 78; R 91 **文献标志码:** A

**引用格式:** 李旭扬, 陈舒苗, 于津鹏, 等.  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  烟碱型乙酰胆碱受体  $\beta 4$  亚基双点突变体的制备及其功能研究 [J]. 热带生物学报, 2021, 12(4): 403-411. DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.2021.04.001

烟碱型乙酰胆碱受体 (Nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs) 属于配体门控离子通道, 由 5 个独立的亚基组装而成。在哺乳动物中发现有 16 种不同的亚基用于 nAChRs 的构成, 分别为  $\alpha 1-\alpha 7$ 、 $\alpha 9$ 、 $\alpha 10$ 、 $\beta 1-\beta 4$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ ; 鸟类及家禽类动物还含有  $\alpha 8$  亚基<sup>[1]</sup>。nAChRs 能够传递 ACh 刺激产生的信号, 由于分布广泛, 它可介导脑部及其外周的多种生理作用<sup>[2-3]</sup>, 并且这些受体结构在许多物种中高度保守, 可通过异源表达进行相关研究<sup>[4]</sup>。虽然 nAChRs 是研究前景很好的治疗靶点, 但由于一些亚型表达困难, 相应药物和基础科学的研究进展缓慢, 尤其是含有  $\alpha 6$  亚基的受体, 它们在任何重组表达系统中都很难正常表达、形成功能通道<sup>[5-6]</sup>。这也间接导致  $\alpha 6\beta 4^*$  nAChRs ( $\alpha 6\beta 4$  或包含其他亚基形成的亚型) 在分子水平上与配体相互作用的研究尚不多见。过去有学者认为含  $\alpha 6$  亚基的 nAChRs 主要存在于中枢神经系统的儿茶酚胺能神经元中, 随着研究深入, 研究者们发现  $\alpha 6\beta 4^*$  nAChRs 具有可调节人和猴肾上腺嗜铬细胞的胞吐<sup>[7-8]</sup>、控制小鼠海马去甲肾上腺素的释放等作用<sup>[9-10]</sup>。目前,  $\alpha 6\beta 4^*$  nAChR 被认为是一种治疗神经病理性疼痛的新靶点, 且可用于抑制成瘾。已经确定  $\alpha 6\beta 4^*$  亚型的受体在大鼠、小鼠背根神经节 (dorsal root ganglia, DRG) 中有表达。WIESKOPF 等在小鼠上使用表达基因组学鉴定出机械性异常性疼痛与 DRG 中  $\alpha 6^*$  受体的表达水平有关。通过基因编辑, 构建  $\alpha 6^*$  受体功能获得和缺失的突变体, 发现基因敲除的小鼠机械性异常性疼痛水平增加, 同时与神经性、炎性损伤相关的表现与野生型的受体完全不同, 推测是由于在 DRG 伤害感受器中  $\alpha 6^*$  nAChRs 与 P2X2/3 受体的共表达产生相互作用, 抑制疼痛信号的传导, 发挥

收稿日期: 2021-03-15 修回日期: 2021-05-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41966003)

第一作者: 李旭扬 (1994-), 男, 海南大学生命科学与药学院 2018 级硕士研究生. E-mail: lxyjoe123@126.com

通信作者: 长孙东亭 (1964-), 男, 研究员. 研究方向: 海洋药物. E-mail: zhangsundt@163.com

镇痛作用<sup>[11-14]</sup>。DONVITO等<sup>[15]</sup>的研究证实, $\alpha 6\beta 4^*$  nAChRs具有调节THC( $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, $\Delta^9$ -四氢大麻酚)成瘾后戒断的效果,可作为靶点用于THC戒断药物的开发。以上研究结果为 $\alpha 6\beta 4^*$  nAChRs的药理学研究提供了重要思路,且有助于研究神经病理性疼痛的发病机理。

$\beta 4$ 亚基在 $\alpha 6\beta 4^*$  nAChRs的功能研究中显示出重要的作用,能够直接影响与配体药物、激动剂的结合活性。通过对比人类和大鼠 $\beta 4$ 亚基胞外配体结合区序列差异,笔者恰好在形成配体结合口袋的Loop D(54-59)、Loop E(102-118)、Loop F(160-167)附近分别发现52-53,115-116,160-161这3个双差异位点(图1),对于活性影响有较大的可能<sup>[16-17]</sup>,因此,利用PCR介导的受体定点突变技术,实现一次性将相邻2个位点同时突变,构建了3种双点突变体。将野生型和突变型亚基的DNA通过体外转录的方式得到cRNA,注射入非洲爪蟾卵母细胞内,诱导表达后用双电极电压钳系统检测野生型和突变型nAChRs的表达情况。通过比较野生型和突变型受体对激动剂乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)的反应电流值,发现 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ [S52N, I53V] nAChR在相同浓度ACh刺激下的电流值更大,受体通道的开放程度更高。本研究旨在通过受体结构与功能的研究,找到影响受体敏感度的氨基酸位点,并构建突变体模型,为后续配体与该受体相互作用分子机制的研究打下基础。

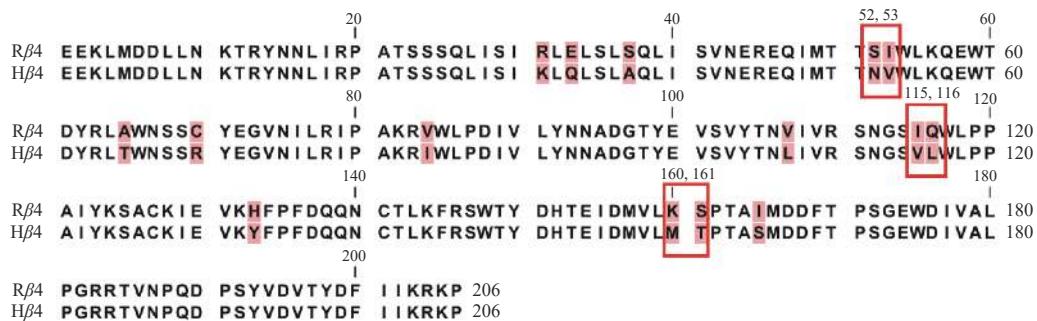


图1 大鼠、人类 $\beta 4$ 亚基胞外配体结合域序列对比  
红色方框表示突变位点。

Fig. 1 Sequence comparison of ligand binding domain of rat and human  $\beta 4$  subunits  
The mutation sites are marked in red boxes.

## 1 材料与方法

1.1 材料与试剂 雌性非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)购自美国Nasco公司,在实验室饲养1个月以上。饲养用水经过滤、沉淀处理,饲养温度17℃。载有大鼠 $\alpha 6/\alpha 3$ 、 $\beta 4$  nAChRs亚基基因的质粒来自美国犹他大学。由于 $\alpha 6$ 亚基表达困难,故使用 $\alpha 6/\alpha 3$ 嵌合体亚基替代( $\alpha 6$ 亚基的胞外配体结合域替换 $\alpha 3$ 亚基的对应区域产生的嵌合体,其胞外结合域的结构和功能与 $\alpha 6$ 亚基相同,且对配体的结合活性研究无影响)<sup>[18-19]</sup>,利用该嵌合体构建的 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChR能正常表达。

质粒提取试剂盒(FastPure Plasmid Mini Kit)购自南京诺唯赞生物科技有限公司;DNA纯化试剂盒(MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver. 4.0)、DL 15000 Marker、限制性内切酶*Nhe* I、*Dpn* I、Q5超保真聚合酶均购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA体外转录试剂盒(mMESSAGE-mMACHINE® T7 Transcription Kit)、RNA纯化试剂盒(MEGAclear™ Transcription Clean-Up Kit)购自美国Thermo Fisher Scientific公司;DNA marker IV购自天根生化科技(北京)有限公司;HEPES购自生工生物工程(上海)有限公司;乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)、阿托品(Atropine)、胶原蛋白酶(Collagenase)均购自美国Sigma-Aldrich公司;其他生化试剂均为国产分析纯。OR2溶液(NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>和HEPES分别为82.5、2.0、1.0、5 mmol·L<sup>-1</sup>, pH7.5);ND-96溶液(NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>和HEPES分别为96、2.0、1.0、1.8、5 mmol·L<sup>-1</sup>, pH7.5)。引物的合成和基因序列的测定由生工生物工程(上海)有限公司完成。

1.2 仪器 超微量分光光度计(Nanodrop 2000,美国Thermo Fisher Scientific公司);PCR仪(Mastercycler

X50s, 德国 Eppendorf); 小型水平电泳仪(美国 Bio-Rad); Alpha-2200 凝胶成像分析系统(美国 Protein-Simple); Drummond 微量注射器(Drummond Scientific, Broomall, PA); KCL-2000A 恒温恒湿培养箱(日本 EYELA); 双电极电压钳放大器 AxoClamp 900A, 数模转换器 Axon Digidata1550B(美国 Molecular Devices)。

**1.3 突变体引物设计** 对比大鼠与人类  $\beta 4$  亚基的胞外配体结合域序列, 确定 3 处双突变位点(图 1 中红色方框圈出的位置)。利用 PCR 介导的受体定点诱变方法, 分别将这 3 处位点的氨基酸编码序列由大鼠  $\beta 4$  亚基替换为人类  $\beta 4$  亚基。

使用 Primer Premier 5.0 软件完成突变位点引物的设计, 使正反向引物都携带有突变位点且位于中部, 引物长度在 25 ~ 45 bp 之间, 保证 GC 含量大于 40%,  $T_m$  值大于 70 °C(表 1)。

表 1 大鼠  $\beta 4$  亚基突变引物序列  
Tab. 1 Primer sequence of  $\beta 4$  subunit mutation

突变位点 Mutant site	突变引物与碱基序列 The sequence of primers (5'→3')
S52N, I53V	正向: CCATTCCTGTTTCAGCCAGACATTGGTGGTCATGATCTGTTCTCGC 反向: GCGAGAACAGATCATGACCACCAATGTCTGGCTGAAACAGGAATGG
I115V, Q116L	正向: GGGGGCAGCCACAGGACGCTGCCGTTGG 反向: CCAACGGCAGCGTCCTGTGGCTGCCCCC
K160M, S161T	正向: CCATGATGGCCGTGGGCGTCATAAGAACCATGTCAATCTCCG 反向: CGGAGATTGACATGGTTCATTATGACGCCACGGCCATCATGG

**1.4 PCR 介导的定点突变** 将载有大鼠  $\beta 4$  亚基 DNA 序列的质粒作为模板, 与诱导突变引物和 Q5 超保真聚合酶体系按比例混合, 采用 PCR 方法进行定点诱变(图 2)。PCR 条件如下: 50  $\mu$ L 体系, 95 °C 预变性 120 s; 随后 95 °C 变性 20 s, 60 °C 退火 10 s, 68 °C 延伸阶段 3 min, 共循环 18 次; 最后 68 °C 延伸 5 min。PCR 反应完成后, 在水浴条件下, 在 PCR 产物中加入 1  $\mu$ L Dpn I, 37 °C 反应 1 h, 水解质粒模板。取少量 PCR 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶中 90 V 电压下电泳 20 min, 观察电泳结果, 验证 PCR 反应成功。取 PCR 产物 3  $\mu$ L 转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞, 将菌液涂布于含有氨苄青霉素的固体平板培养基上, 37 °C 下培养 14 ~ 18 h。每个平板分别挑取 5 个菌落, 转入含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C、250 r·min<sup>-1</sup> 培养 12 ~ 14 h, 提质粒后用 Nanodrop 测定其浓度, 并通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳(条件同上)判断其纯度, 测序验证插入序列突变情况。

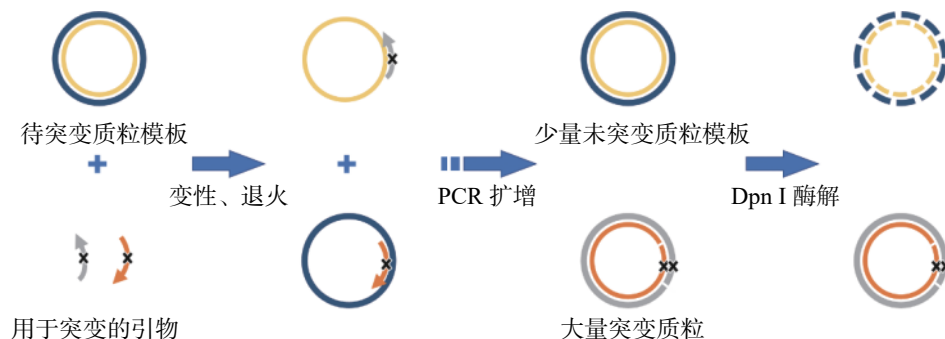


图 2 定点突变原理图

Fig. 2 Strategy for site-directed mutagenesis

**1.5 突变体质粒酶切及回收** 选取测序正确的突变体质粒进行酶切线性化反应。200  $\mu$ L 酶切反应体系如下: 突变体质粒 20  $\mu$ g (40 ~ 60  $\mu$ L), 限制性内切酶 *Nhe* I 10  $\mu$ L, 10 $\times$ M Buffer 20  $\mu$ L, 剩余体积用 ddH<sub>2</sub>O 补齐, 37 °C 反应 4 h。酶切后使用 DNA 纯化试剂盒回收线性化产物。回收的线性质粒使用 Nanodrop 测



定其浓度,并通过1%的琼脂糖凝胶电泳判断其纯度。

**1.6 突变体 RNA 的制备** 将线性突变体质粒作为模版,使用试剂盒法进行体外转录。20  $\mu\text{L}$  反应体系如下:线性模版 2  $\mu\text{g}$  (5 ~ 6  $\mu\text{L}$ ); 2 $\times$ NTP/CAP 10  $\mu\text{L}$ ; 10 $\times$ Rxn Buffer 2  $\mu\text{L}$ ; Enzyme Mix 2  $\mu\text{L}$ ; 剩余体积用无 RNA 酶的 ddH<sub>2</sub>O 补齐,37  $^{\circ}\text{C}$  反应 4 ~ 6 h。随后在反应液中加入 1  $\mu\text{L}$  Dnase,反应 30 min,酶解 DNA 模版。使用 RNA 纯化试剂盒回收 cRNA 产物,Nanodrop 测定其浓度,并通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳验证。

**1.7 受体在非洲爪蟾卵母细胞上表达** 选取状态良好的成熟雌性非洲爪蟾,冰冻麻醉 1 h,用手术刀在腹侧剖开小口,取出卵母细胞团块。剪碎团块,使用 OR2 溶液清洗至澄清。将卵母细胞转移至含有 0.5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  胶原蛋白酶的 OR2 溶液中酶解,室温下反应 40 ~ 50 min,使其完全分离成为互不粘连的单个细胞,再用 OR2 溶液清洗至少 10 次后,挑选形态正常饱满的卵母细胞转入含抗 ND-96 溶液中,在 17  $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 35% 的条件下继续培养。

卵母细胞在获取 24 h 后用于显微注射,实验方法参考熊洋等<sup>[20]</sup>对  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  表达研究的优化结果,将野生型或突变型  $\alpha 6/\alpha 3$  与  $\beta 4$  nAChRs 亚基的 cRNA 以 1 : 1 的比例混合,每个亚基的终浓度  $\geq 500 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。将混合后的 RNA 以每个 59.8 nL 的体积显微注射入非洲爪蟾卵母细胞,在 17  $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 35% 条件下继续培养(图 3)。

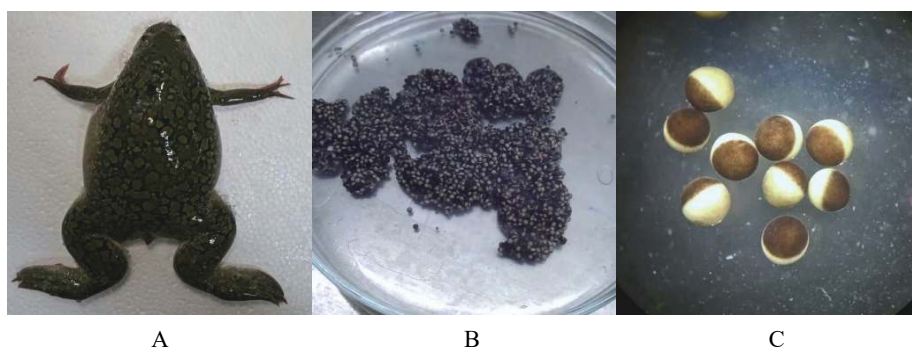


图 3 雌性非洲爪蟾及其卵母细胞

A: 雌性非洲爪蟾; B: 手术取出新鲜卵母细胞团块; C: 酶解后的卵母细胞。

Fig. 3 Female *Xenopus laevis* and oocytes

A: Female *Xenopus laevis*; B: Fresh oocyte masses; C: Oocytes after enzymolysis.

**1.8 受体功能检测** 显微注射后 2 ~ 5 d 使用双电极电压钳检测卵母细胞上受体的表达情况。设置钳制电压为 -70 mV,灌流速度 2 ~ 4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,记录 ACh 刺激细胞产生内向电流的情况。详细过程如下:每个循环总时长 60 s,首先给予 2 s Ach 脉冲刺激,随后使用含有 0.1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  BSA 的 ND-96 缓冲液灌流冲洗,每个记录程序含 3 次循环。数据记录软件为 pClamp 11.0.3,采样模式为 Episodic stimulation,采样频率为 Slow 200 Hz。

**1.9 数据统计分析** 使用不同浓度的 ACh 作为激动剂(1、10、50、100、250、500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和 1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )刺激受体通道开放,检测并记录产生的内向电流值。以 1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ACh 刺激产生的内向电流作为基准,计算其他浓度的 ACh(1 ~ 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )刺激通道开放的反应率。每组实验数据至少在不同卵母细胞上重复 3 ~ 6 次。所得数据导入 GraphPad Prism 6.0 软件使用非线性拟合方程:  $\text{Response}\% = 100 / \{1 + (\text{EC}_{50} / [\text{agonist}])^{nH}\}$ 。式中 Response 代表反应率,agonist 代表激动剂的内向电流值, $nH$  代表 Hill 系数,分析拟合并作图。

## 2 结果与分析

**2.1 PCR 诱导的定点突变琼脂糖电泳结果** 琼脂糖凝胶电泳结果表明,经 PCR 后,3 种突变体基因均有条带产生(图 4-A 胶孔 3、4、5),与线性质粒模板(图 4-A 胶孔 2)的位置一致,可以将 PCR 产物用于转化实验。

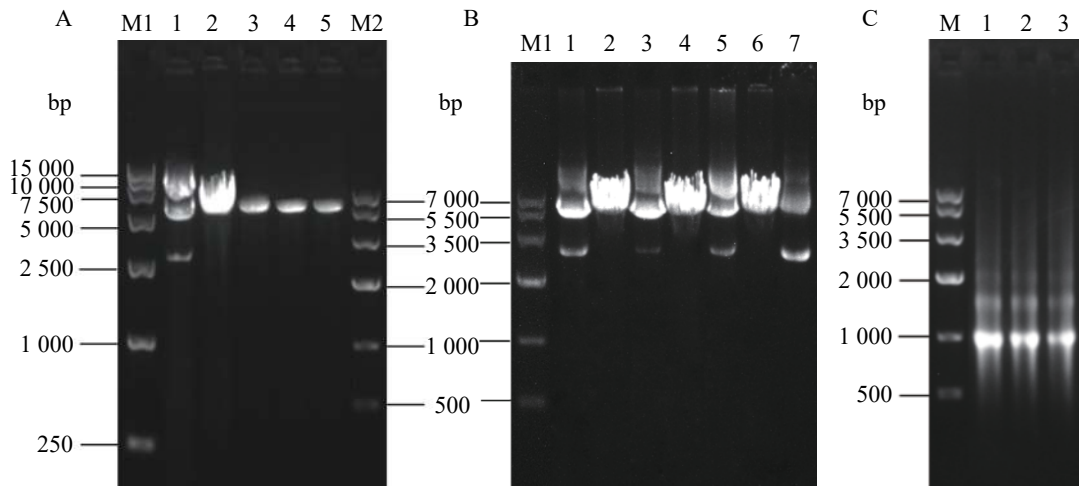


图4 定点突变 PCR 产物、突变体亚基质粒酶切及转录后 cRNA 检测的琼脂糖电泳

A.1: 野生型 rat  $\beta 4$  质粒; 2: 线性 rat  $\beta 4$  质粒; 3~5: 突变体  $\beta 4$  [S52N, I53V]、 $\beta 4$  [I115V, Q116L]、 $\beta 4$  [K160M, S161T]; B.1、3、5、7: 突变体  $\beta 4$  [S52N, I53V]、[I115V, Q116L]、[K160M, S161T]、野生型  $\beta 4$  亚基质粒; 2、4、6: 突变体  $\beta 4$  [S52N, I53V]、[I115V, Q116L]、[K160M, S161T] 线性质粒; C: 1~3: 突变体  $\beta 4$  [S52N, I53V]、 $\beta 4$  [I115V, Q116L]、 $\beta 4$  [K160M, S161T] cRNA; M1: DL15 000 DNA marker; M: DNA marker IV。

Fig. 4 Agarose electrophoresis of PCR site-directed mutation products, linear mutant plasmid after digestion and cRNA

A.1: Wild-type rat  $\beta 4$  plasmid; 2: Linear rat  $\beta 4$  plasmid; 3-5:  $\beta 4$  subunit mutant after PCR site-directed mutation [S52N, I53V], [I115V, Q116L], [K160M, S161T]; B. 1, 3, 5, 7: Plasmids of  $\beta 4$  subunit mutants [S52N, I53V], [I115V, Q116L], [K160M, S161T] and wild-type subunit; 2, 4, 6: Linear plasmids of  $\beta 4$  subunit mutant [S52N, I53V], [I115V, Q116L], [K160M, S161T]; C: 1-3: cRNA of  $\beta 4$  subunit mutant [S52N, I53V], [I115V, Q116L], [K160M, S161T]; M1: DL15 000 DNA marker; M: DNA marker IV.

**2.2 质粒提取与酶切结果** 使用质粒提取试剂盒提取突变质粒, 所得结果经超微量分光光度计测得浓度(表2)。琼脂糖凝胶电泳结果验证质粒纯度良好。插入基因测序结果使用 NCBI 网站中的 BLAST 在线序列比对验证, 证实 3 个突变体质粒均构建成功。将测序正确的  $\beta 4$  突变体质粒与本体质粒分别进行酶切反应, 琼脂糖凝胶电泳验证。环状质粒(图4-B 胶孔 1、3、5、7)因呈超螺旋结构, 在琼脂糖凝胶中空间位阻小, 所以移动更快。而线性化的质粒(图4-B 胶孔 2、4、6)移动较慢。电泳结果中线性化质粒对应泳道在环状质粒对应位置已无条带, 证明酶切完全。经超微量分光光度计测得浓度与  $A_{260/280}$  值(表2), 均在正常范围内, 可进行后续实验。

表2 突变体质粒、线性质粒浓度与  $A_{260/280}$  值

Tab. 2 Mutant plasmid and linear plasmid concentration and  $A_{260/280}$

质粒 Plasmid	浓度 $/(g \cdot L^{-1})$ Concentration	$A_{260/280}$	线性质粒 Linear plasmid	浓度 $/(g \cdot L^{-1})$ Concentration	$A_{260/280}$
S52N, I53V	0.247 5	1.86	S52N, I53V	0.288 2	1.88
I115V, Q116L	0.240 3	1.86	I115V, Q116L	0.291 1	1.88
K160M, S161T	0.231 5	1.85	K160M, S161T	0.226 5	1.86

**2.3 cRNA 的制备** 测定体外转录获得的 cRNA 浓度(表3), 均达到  $500 \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。琼脂糖凝胶结果显示, 图4-C 中胶孔 1、2、3 相同高度均有对应的较为清晰明亮的条带, 证明体外转录成功, 可用于下一步卵母细胞显微注射。

**2.4 野生型及突变型  $\alpha 6\beta 4^*$  nAChR 的功能检测** 使用双电极电压钳对野生型和 3 种突变型受体的功能进行检测。 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ [S52N, I53V] 突变型的受体与其他几种相比, 表达时间略有提前, 在注射后的第 3 天即达到正常水平。另外 2 种突变型与野生型的受体表达时间无明显的差异, 均在第 4 天达到正常水平。结果表明, ACh 浓度为  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时无电流产生, 未达到产生内向电流的最小刺激强度。随着 ACh 浓

度的增大,受体接受 ACh 刺激产生的电流值也随之增大,呈现出先快后慢的变化趋势。对比图 5 中 A、B、C、D 的电流轨迹图,突变受体与野生型对 ACh 的敏感程度相当,可以初步判断,突变并未影响受体的基本结构及功能。当给予相同浓度 ACh 刺激时,突变型  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ [S52N, I53V] nAChR 相比于野生型和其他的突变型,电流值明显更大,推测是  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ [S52N, I53V] nAChR 离子通道的开放水平更高。

使用 Graphpad Prism 6.0 软件对测定结果进行分析,绘制浓度-反应率曲线图,并计算受体对 ACh 刺激的  $EC_{50}$ 。对比图 6 中 A、B、C 图中的曲线,结果表明,野生型与突变型受体的变化趋势相似。野生型

表 3 突变体 cRNA 浓度与  $A_{260/280}$  值

Tab. 3 Mutant cRNA concentration and  $A_{260/280}$

突变位点 Mutant site	cRNA 浓度 / (g·L <sup>-1</sup> ) Concentration	$A_{260/280}$
S52N, I53V	0.5915	2.08
I115V, Q116L	0.7097	2.07
K160M, S161T	0.5867	2.08

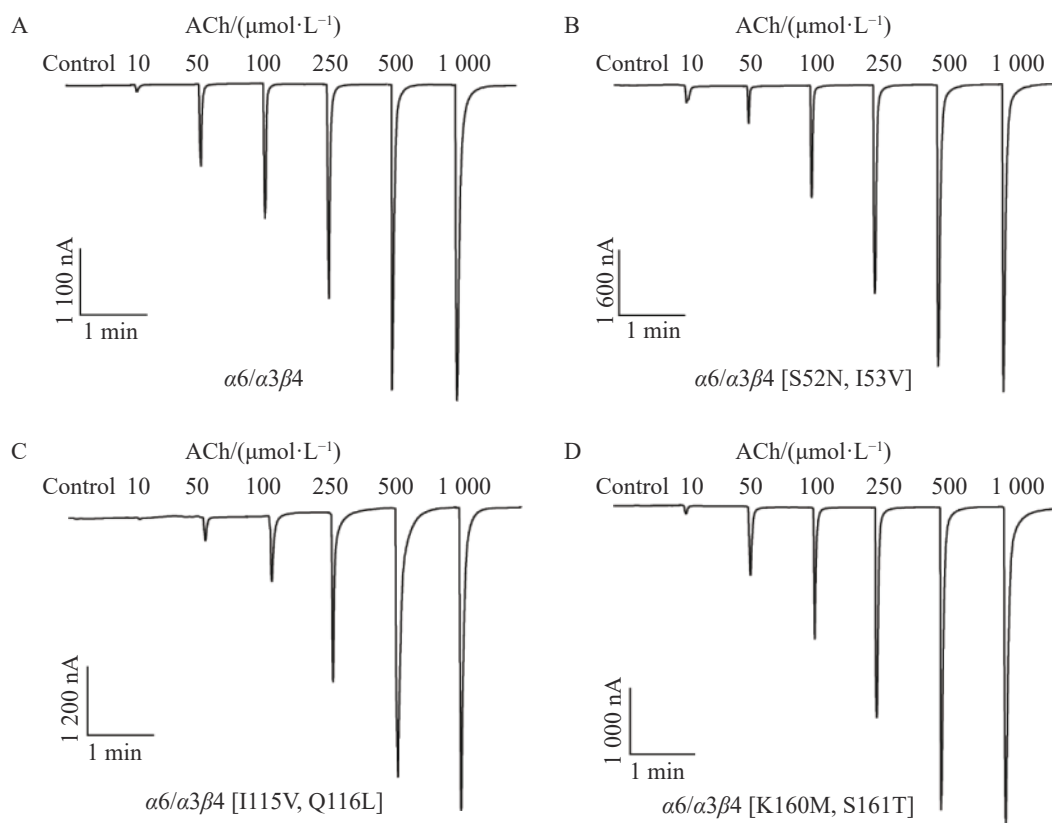


图 5 野生型和突变型  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChR 对不同浓度 ACh 的电流图

Fig. 5 Current traces of wild-type and mutant  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChR evoked by different concentrations of ACh

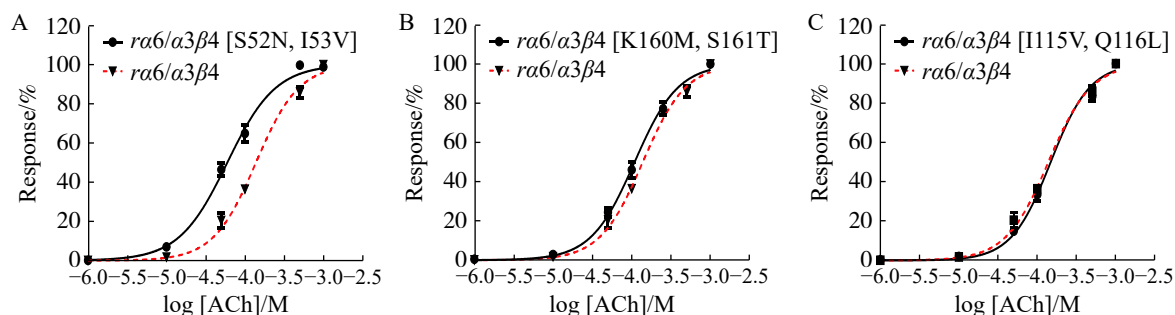


图 6 野生型及突变型  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChR 对激动剂 ACh 的浓度-反应曲线 Mean $\pm$ SEM,  $n=3 \sim 6$ 。

Fig. 6 Concentration response curve of wild-type and mutant  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChR to the agonist ACh Mean  $\pm$  SEM,  $n=3 \sim 6$ .

$\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChR 的  $EC_{50}$  是突变型  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ [S52N, I53V] nAChR 的 2 倍(表 4), 证明 52、53 位双点突变, 对 ACh 的激动活性有一定的提升, 使  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChR 与 ACh 结合后离子通道的开放程度增加。

表 4 野生型及突变型  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChRs 对 ACh 门控的半数有效浓度

Tab. 4 Median effective concentration ( $EC_{50}$ ) of wild type and mutant  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChRs for ACh stimulation

受体名称	$EC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ (95% CI)	与 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ 的比值	Hill slope (95% CI)
$\alpha 6/\alpha 3\beta 4$	138.2 (127.1 ~ 150.2)	1	1.592 (1.395 ~ 1.790)
$\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ [S52N, I53V]	59.58 (53.07 ~ 66.89)	0.4	1.407 (1.156 ~ 1.658)
$\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ [I115V, Q116L]	147.8 (134.6 ~ 162.4)	1.1	1.727 (1.490 ~ 1.974)
$\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ [K160M, S161T]	108.8 (127.6 ~ 185.8)	0.8	1.567 (1.276 ~ 1.858)

注:  $EC_{50}$ 值、95% CI (95% confidence interval)、Hill slope(nH)等数据来自浓度-反应曲线图; 所有数据来源于至少3个不同的非洲爪蟾卵母细胞。

Note:  $EC_{50}$  value, 95% CI (95% confidence interval), Hill slope (nH) and other data are from the concentration response curve; All data were derived from at least three different *Xenopus* oocytes.

### 3 讨论

$\alpha 6\beta 4^*$  作为一类特殊的 nAChRs 受到广泛关注, 但含  $\alpha 6$  亚基 nAChRs 的异源表达却十分困难。烟碱型乙酰胆碱受体与配体结合的主要结构位于细胞膜外的 N-端结合域, 通过基因改造, 构建  $\alpha 6/\alpha 3$  的嵌合体可以辅助受体正常表达, 不影响受体的功能活性。

本研究比较了人类和大鼠的  $\alpha 6$  和  $\beta 4$  两种亚基的胞外 N-端结合域的序列, 发现人类和大鼠  $\alpha 6$  亚基的同源性较高, 而  $\beta 4$  亚基的种属差异性更大。芋螺毒素是一类作用于 nAChRs 的小分子多肽, 可以作为分子探针, 研究配体与受体结合的关键位点。HONE 等进行了人类(Human)和大鼠(Rat)  $\alpha 6/\alpha 3$  和  $\beta 4$  亚基的混合表达实验, 构建了  $Ha6/\alpha 3H\beta 4$ 、 $Ra6/\alpha 3R\beta 4$ 、 $Ha6/\alpha 3R\beta 4$  和  $Ra6/\alpha 3H\beta 4$  这 4 种受体, 并选取 3 种作用于  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChR 的芋螺毒素 PeIA、PnIA 和 TxIB 作为拮抗剂, 分别比较配体对突变受体的阻断作用。结果显示, 这 3 种芋螺毒素对受体的阻断作用具有一致性, 由强到弱依次为  $Ha6/\alpha 3H\beta 4 > Ra6/\alpha 3H\beta 4 > Ha6/\alpha 3R\beta 4 > Ra6/\alpha 3R\beta 4$ 。该实验从一定程度上说明  $\beta 4$  亚基对  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChR 的配体识别和选择具有重要作用<sup>[21]</sup>。

本实验利用受体定点突变技术对大鼠  $\beta 4$  亚基非保守残基进行受体突变, 将其替换人类  $\beta 4$  亚基相同位置处的残基, 对比序列发现有 3 处位点均为相邻 2 个残基的差异。将 2 个差异位点均设计在突变引物内, 经一次突变即得到具有相邻 2 个残基差异的突变受体, 大大缩短了突变体构建的时间, 并且为后续大鼠和人类  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChR 对芋螺毒素活性差异关键位点的筛选, 构建了 3 个双点突变体模型。

在对突变体进行电生理活性检测中, 电流值的大小和变化趋势与野生型受体均相似, 表明受体基本的结构和功能保持不变。而观察 ACh 浓度-反应率曲线图, 其中 1 种突变体  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ [S52N, I53V] 相比于野生型, 对 ACh 敏感性更高,  $EC_{50}$  值仅为本体的一半。并且在标准浓度 ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) ACh 下, 突变体  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ [S52N, I53V] 产生的激发电流值更大。推测可能是由于 52 位由丝氨酸变为天冬酰胺后更易形成氢键, 而 53 位由异亮氨酸到缬氨酸的改变, 导致其空间位阻减小, 使得在与 ACh 结合时, 通道的敏感性增加, 且开放程度增大。由于在  $\beta 4$  亚基上人类和大鼠还存在其他差异位点, 因此,  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChR 对于激动剂 ACh 和拮抗剂芋螺毒素活性的关键氨基酸位点还有待研究。

### 参考文献:

- [1] ALBUQUERQUE E X, PEREIRA E F, ALKONDON M, et al. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function [J]. *Physiol Rev*, 2009, 89(1): 73 - 120.
- [2] GOTTI C, CLEMENTI F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology [J]. *Progress in Neurobiology*, 2004, 74(6): 363 - 396.



- [3] PICCIOTTO M R. Nicotine as a modulator of behavior: beyond the inverted U [J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2003, 24(9): 493 – 499.
- [4] DANI J A, BERTRAND D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system [J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2007, 47: 699 – 729.
- [5] LETCHWORTH S R, WHITEAKER P. Progress and challenges in the study of alpha6-containing nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2011, 82(8): 862 – 872.
- [6] WANG J, KURYATOV A, LINDSTROM J. Expression of cloned alpha6\* nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Neuropharmacology*, 2015, 96(Pt B): 194 – 204.
- [7] HERNANDEZ-VIVANCO A, HONE A J, SCADDEN M L, et al. Monkey adrenal chromaffin cells express alpha6beta4\* nicotinic acetylcholine receptors [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94142.
- [8] PEREZ-ALVAREZ A, HERNANDEZ-VIVANCO A, MCINTOSH J M, et al. Native alpha6beta4\* nicotinic receptors control exocytosis in human chromaffin cells of the adrenal gland [J]. *FASEB J*, 2012, 26(1): 346 – 354.
- [9] AZAM L, MASKOS U, CHANGEUX J P, et al. Alpha-conotoxin BuIA[T5A; P6O]: a novel ligand that discriminates between alpha6ss4 and alpha6ss2 nicotinic acetylcholine receptors and blocks nicotine-stimulated norepinephrine release [J]. *FASEB J*, 2010, 24(12): 5113 – 5123.
- [10] AZAM L, MCINTOSH J M. Characterization of nicotinic acetylcholine receptors that modulate nicotine-evoked [3H]norepinephrine release from mouse hippocampal synaptosomes [J]. *Molecular Pharmacology*, 2006, 70(3): 967 – 976.
- [11] HONE A J, MEYER E L, MCINTYRE M, et al. Nicotinic acetylcholine receptors in dorsal root ganglion neurons include the alpha6beta4\* subtype [J]. *FASEB J*, 2012, 26(2): 917 – 926.
- [12] HONE A J, MCINTOSH J M. Nicotinic acetylcholine receptors in neuropathic and inflammatory pain [J]. *FEBS Lett*, 2018, 592(7): 1045 – 1062.
- [13] WIESKOPF J S, MATHUR J, LIMAPICHAT W, et al. The nicotinic alpha6 subunit gene determines variability in chronic pain sensitivity via cross-inhibition of P2X2/3 receptors [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(287): 272 – 287.
- [14] LIMAPICHAT W, DOUGHERTY D A, LESTER H A. Subtype-specific mechanisms for functional interaction between alpha6beta4\* nicotinic acetylcholine receptors and P2X receptors [J]. *Mol Pharmacol*, 2014, 86(3): 263 – 274.
- [15] DONVITO G, MULDOON P P, JACKSON K J, et al. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors mediate (9) -THC dependence: Mouse and human studies [J]. *Addiction biology*, 2020, 25(1): e12691.
- [16] ZHANGSUN D, ZHU X, WU Y, et al. Key residues in the nicotinic acetylcholine receptor beta2 subunit contribute to alpha-conotoxin LvIA binding [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(15): 9855 – 9862.
- [17] CUNY H, KOMPELLA S N, TAE H S, et al. Key structural determinants in the agonist binding loops of human beta2 and beta4 nicotinic acetylcholine receptor subunits contribute to alpha3 beta4 subtype selectivity of alpha-conotoxins [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(45): 23779 – 23792.
- [18] KURYATOV A, OLALE F, COOPER J, et al. Human  $\alpha 6$  AChR subtypes: subunit composition, assembly, and pharmacological responses [J]. *Neuropharmacology*, 2000, 39(13): 2570 – 2590.
- [19] MCINTOSH J M, 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.
- [20] 熊洋, 朱晓鹏, 吴勇, 等.  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  乙酰胆碱受体在非洲爪蟾卵母细胞中的表达 [J]. *热带生物学报*, 2020, 11(4): 391 – 398.
- [21] HONE A J, TALLEY T T, BOBANGO J, et al. Molecular determinants of alpha-conotoxin potency for inhibition of human and rat alpha6beta4 nicotinic acetylcholine receptors [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(46): 17838 – 17852.



## Preparation and Functional Study of $\beta 4$ Subunit Double-point Mutant of $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ Nicotinic Acetylcholine Receptors

LI Xuyang<sup>1</sup>, CHEN Shumiao<sup>1</sup>, YU Jinpeng<sup>2</sup>, LUO Sulan<sup>1</sup>, ZHANGSUN Dongting<sup>1</sup>

(1. School of Life and Pharmaceutical Sciences/ Ministry of Education Key Laboratory of Tropical Biological Resources/Haikou Key Laboratory for Marine Drugs, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 2. Medical College, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China)

**Abstract:** The receptor containing  $\alpha 6$  subunit is one of the special nicotinic acetylcholine receptors. Recent studies have found that the  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  subtypes have a certain regulatory effect on the nervous system. And it is related to the pathogenesis of many diseases, such as neuropathic pain, addiction, etc., which have been regarded as potential therapeutic targets. The sequences of rat and human  $\alpha 6$  and  $\beta 4$  subunits were compared, and three mutant  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  receptor genes with adjacent site mutations were produced on the basis of wild-type genes by site-directed mutagenesis. The  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  receptors and their mutants were expressed on *Xenopus* oocytes by transcription *in vitro*, microinjection and other methods. And the functions of the receptors were detected by using the two-electrode voltage-clamp system. The results indicated that the mutant receptor  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  [S52N, I53V] was more sensitive to ACh, with its  $EC_{50}$  being  $59.58 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , which is half of the wild-type receptor. Meanwhile, the other two mutant receptors had similar sensitivities to the wild type.

**Keywords:**  $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$  nAChR; adjacent site mutagenesis; expression *in vitro*; two-electrode voltage clamp

(责任编辑:张业旺 责任编辑:钟云芳)