

## $\alpha$ -芋螺毒素 MIA 和 MIB 特异性阻断肌肉型乙酰胆碱受体研究

吴茜茜<sup>1</sup>, 王柳珺<sup>1</sup>, 朱晓鹏<sup>2</sup>, 长孙东亭<sup>1</sup>, 吴勇<sup>2\*</sup>, 罗素兰<sup>1,2\*</sup>

(1. 海南大学热带生物资源教育部重点实验室, 海南大学药学院, 海南海口 570228;

2. 广西大学医学院, 广西南宁 530004)

**摘要:**  $\alpha$ -芋螺毒素是从海洋软体动物芋螺毒液中发现的多肽类毒素, 能够特异作用于各种不同亚型烟碱型乙酰胆碱受体 (nAChRs)。nAChRs 在调节神经递质释放、细胞兴奋性等方面发挥重要生理功能。因为 nAChRs 功能异常与多种疾病密切相关, 所以  $\alpha$ -芋螺毒素可以开发为研究 nAChRs 的分子探针或直接作为先导药物进行开发。前期, 研究人员从幻芋螺中发现的 4 种  $\alpha$ -3/5 型芋螺毒素 MI、MIA、MIB 和 MIC, 但 MIA 和 MIB 对不同亚型的 nAChRs 阻断活性及选择性还没有深入研究, 本研究通过 9-芴甲氧羰基 (Fmoc) 固相法合成了  $\alpha$ -芋螺毒素 MI、MIA、MIB 和 MIC, 并利用电生理技术对它们抑制不同亚型鼠源 nAChRs 的活性进行系统测定, 结果表明 MIA 和 MIB 是肌肉型乙酰胆碱受体拮抗剂, 半阻断剂量 ( $IC_{50}$ ) 分别是 14.45 和 72.78  $nmol \cdot L^{-1}$ , 稍弱于 MI 与 MIC, 且对其他神经型 nAChRs 阻断活性微弱。分子对接研究显示, MIA 和 MIB 与肌肉型 nAChRs 作用机制类似, N-端氨基酸序列差异是其活性差异的主要原因。本研究表明, 芋螺毒素 MIA 和 MIB 有潜力发展成为检测肌肉型 nAChRs 功能以及诊断或治疗相关疾病的工具药物。

**关键词:** 幻芋螺;  $\alpha$ -芋螺毒素; 9-芴甲氧羰基固相合成法; 氧化折叠; 肌肉型乙酰胆碱受体; 分子对接

中图分类号: R964 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)03-0724-07

## Specific blockade of muscle acetylcholine receptor by $\alpha$ -conotoxin MIA and MIB

WU Xi-xi<sup>1</sup>, WANG Liu-jun<sup>1</sup>, ZHU Xiao-peng<sup>2</sup>, ZHANGSUN Dong-ting<sup>1</sup>, WU Yong<sup>2\*</sup>, LUO Su-lan<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Tropical Biological Resources of Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. School of Medicine, Guangxi University, Nanning 530004, China)

**Abstract:** The  $\alpha$ -conotoxins are peptide toxins that are identified from the venom of marine cone snails and they hold outstanding potency on various subtypes of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). nAChRs have an important role in regulating transmitter release, cell excitability, and neuronal integration, so nAChR dysfunctions have been involved in a variety of severe pathologies. Four types of  $\alpha$ -3/5 conotoxins MI, MIA, MIB and MIC have been found from *Conus magus*. Among them, the activity and selectivity of MIA and MIB have not been well studied. In this study, four  $\alpha$ -3/5 conotoxins MI, MIA, MIB and MIC were synthesized by solid peptide synthesis method, and the bioactivities of them were screened by double electrode voltage clamp electrophysiology. The results showed that MIA and MIB selectively inhibited muscle type acetylcholine receptors with  $IC_{50}$  values of 14.45 and 72.78  $nmol \cdot L^{-1}$ , respectively, which are slightly weaker than MI and MIC. Molecular docking results have shown MIA and MIB interact with muscle-type nAChRs with similar mechanism. The reasons for activity differences may relate to the size of the N-terminal amino acids. Together, the conotoxins MIA and MIB may have the potential to develop as a tool for detect the function of muscle type nAChRs, as well as the diagnosis or treat of related diseases.

收稿日期: 2021-09-30; 修回日期: 2021-11-02.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31860246).

\*通讯作者 Tel: 86-898-66289538, E-mail: wuyong@gux.edu.cn; luosulan2003@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1434

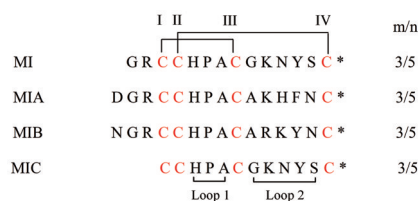
**Key words:** *Conus magus*;  $\alpha$ -conotoxin; solid phase synthesis of 9-fluorene methoxycarbonyl; oxidative folding; muscle type nAChRs; molecular docking

烟碱型乙酰胆碱受体 (nAChRs) 是配体门控离子通道家族成员, 介导着中枢和外周神经系统的快速兴奋性胆碱能神经传递, 广泛存在于整个中枢与外周神经系统中<sup>[1,2]</sup>。nAChRs 根据组织分布可分为神经型 nAChRs 和肌肉型 nAChRs 两种类型<sup>[3]</sup>。神经型 nAChRs 主要分布于自主神经节突触后膜和中枢神经系统, 其中  $\alpha 4\beta 2$  是中枢神经系统中最主要的亚型<sup>[4,5]</sup>。肌肉型 nAChRs 分布于神经肌肉接头处, 介导神经肌肉信号传递, 是一种异五聚体膜蛋白, 由  $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\delta$  和  $\epsilon$  (成人) 或  $\gamma$  (胎儿) 亚基组成。肌肉型 nAChRs 不仅在生物体中扮演重要生理功能, 也已被认为是多种疾病的潜在靶点, 如肌源性疾病、肌肉营养不良和重症肌无力<sup>[6,7]</sup>。因此, 作用于肌肉型 nAChRs 的配体具有开发为研究这类受体的探针或有着重要药用研究价值。

芋螺毒素 (conopeptides; conotoxins, CTxs) 是由热带海洋软体动物芋螺 (*Conus*) 毒管分泌的毒液中分离出的富含二硫化物的小肽毒素, 主要生物功能是捕食猎物和抵御天敌。每种芋螺毒液中含有上千种毒素肽, 每种多肽约含有 12~20 个氨基酸, 它们富含半胱氨酸, 形成二硫键, 这些芋螺毒素能够高效作用于多种不同类型离子通道受体<sup>[8-10]</sup>。在芋螺毒素家族中,  $\alpha$ -CTxs 是研究最为深入而广泛的一类芋螺毒素, 其主要结构特征是含有  $C^I C^m C^{III} C^n C^{IV}$  半胱氨酸框架, 其中 m 和 n 表示半胱氨酸之间的氨基酸残基数, 根据 m 和 n 数目不同,  $\alpha$ -芋螺毒素可以分为  $\alpha$ -3/5、 $\alpha$ -4/3 和  $\alpha$ -4/7 等多种亚型, 其中多种  $\alpha$ -3/5 型芋螺毒素以高效力阻断肌肉型 nAChRs, 因而这类芋螺毒素可以作为研究肌肉型 nAChRs 的分子探针或直接作为药物先导分子进行研究。

随着分离鉴定和毒素组学技术的发展, 有着许多新发现的芋螺毒素多肽药理学活性需要进一步深入研究。早在上世纪 80 年代, 科研人员从食鱼芋螺幻芋螺 (*Conus magus*) 毒液中发现了多种拮抗各种电压和配体门控离子通道的芋螺毒素, 其中  $\omega$ -MVIIA 已经作为治疗神经痛的药物被 FDA 批准。 $\alpha$ -CTx MI 是从幻芋螺中发现的, 能够有效拮抗肌肉型 nAChRs, 半阻断剂量 ( $IC_{50}$ ) 仅有 400 pmol·L<sup>-1</sup><sup>[11]</sup>, 其后又从幻芋螺发现了 3 种类似 MI 序列的  $\alpha$ -CTx MIA、MIB 和 MIC (图 1), McIntosh 等<sup>[12]</sup>根据  $\alpha$ -CTx MIA 和 MIB 与 MI 序列相似性, 认为  $\alpha$ -CTx MIA 和 MIB 也作用于肌肉型乙酰胆碱受体, 但未进行实验深入其活性, 也没有研究 MIA 与 MIB 针对其他亚型 nAChRs 的活性。Kapon 等<sup>[13]</sup>从幻

芋螺中分离鉴定了  $\alpha$ -CTx MIC, 发现 MIC 对肌肉型 nAChRs 的半阻断剂量为 248.70 nmol·L<sup>-1</sup>, 对  $\alpha 4\beta 2$  和  $\alpha 3\beta 4$  几乎无活性。本研究以芋螺毒素 MI 和 MIC 为对照, 深入研究  $\alpha$ -CTx MIA 和 MIB 对不同亚型 nAChRs ( $\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$ 、 $\alpha 4\beta 2$ 、 $\alpha 2\beta 4$ 、 $\alpha 4\beta 4$ 、 $\alpha 3\beta 2$ 、 $\alpha 6\beta 4$ 、 $\alpha 3\beta 4$ ) 的作用, 电生理实验证明  $\alpha$ -CTx MIA 和 MIB 对肌肉型 nAChRs 有着非常强阻断作用, 且有着很好的受体亚型选择性, 这些研究结果表明, 这两种芋螺毒素在幻芋螺捕食中也发挥着重要作用。



**Figure 1** Peptide sequence of  $\alpha$ -CTx MI, MIA, MIB and MIC. The CysI-CysIII and CysII-CysIV disulfide bridge are indicated by the connecting lines above the sequence. \* indicates a C-terminal amide

## 材料与方法

**实验材料** 微波多肽合成仪 CEM Liberty Blue 购自美国 CEM 公司; Waters 2535Q 制备型高效液相色谱仪、Waters 2695 分析型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); 分析型 C18 柱 (Vydac, 5  $\mu$ m, 4.6 mm  $\times$  250 mm) 和制备型 C18 柱 (Vydac, 10  $\mu$ m, 22 mm  $\times$  250 mm) 均购于美国 Grace 公司; 色谱级乙腈 (acetonitrile, ACN, 美国 Thermo Fisher 公司); 色谱级三氟乙酸 (trifluoroacetic acid, TFA) 购自美国 Tedia 公司; 合成多肽所需树脂、保护氨基酸和偶联切割试剂购自上海吉尔生化有限公司; 其他常用试剂均为国产分析纯, 购自广州化学试剂公司。双电极电压钳系统 (Axon 900A)、Digidata 1440A 数模转换器、Axon 900A 放大器购自美国 Molecular Device 公司; Alpha 1-4L 冷冻干燥机购自德国 Christ 公司; 非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 购自美国 Nasco 公司, 动物实验由海南大学伦理学委员会批准, 并严格遵守动物管理条例指南。

**9-苄基甲氧基羰基 (Fmoc) 法合成芋螺毒素多肽** 线性肽合成方法为 Fmoc 多肽固相合成法, 合成仪器使用 CEM Liberty Blue (CEM 公司) 微波多肽合成仪, 合成规模为 100  $\mu$ mol, 合成树脂为可产生酰胺化的 Rink Amide 树脂, 4 min 进行 1 个氨基酸连接循环: 其中

2 min 偶联 (90 °C), 1 min 脱保护 (90 °C), 1 min 进行清洗处理, 合成过程中使用五倍过量的 Fmoc 保护氨基酸, 偶联试剂为 2-脞氧乙酸乙酯 (Oxyma) 和 *N,N*-二异丙基碳二亚胺 (DIC)。线性肽合成后使用裂解溶液 [TFA/三异丙基硅烷/H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5)] 室温下切割 2 h, 切割后的多肽用冰乙醚处理后冻干。合成的粗肽进一步利用制备型液相纯化至  $\geq 70\%$  后, 进行下一步氧化折叠。制备液相纯化使用 Vydac-Grace C18 制备柱 (10  $\mu\text{m}$ , 22 mm  $\times$  250 mm), 梯度洗脱: 10%~40% 的溶剂 B (99.9% ACN 和 0.1% TFA) 梯度洗脱 40 min, 液相流速 15 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>, 监测波长 214 nm。合成线性肽使用 Wasters TQD 质谱仪 (UPLC-ESI-MS) 确证分子质量。

**多肽氧化折叠形成二硫键** 合成的芋螺毒素线性肽第 I、III 位半胱氨酸 (cysteine, Cys, C) 侧链保护基团采用 triphenylmethyl (S-Trt) 保护。芋螺毒素线性肽第 II、IV 位半胱氨酸侧链基团被 acetomidomethyl (S-Acm) 保护, 再通过两步氧化折叠法定点连接二硫键。切割过程中, 侧链保护基团 S-Trt 已经被脱除, 形成自由巯基, 利用铁氰化钾 (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) 氧化法氧化自由巯基形成第一对二硫键, 即将已经纯化好的线性肽溶解于 60% 乙腈溶液中, 缓慢滴加到氧化缓冲液 (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 10 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>, Tris 0.1 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>, pH 7.5) 中, 氧化 45 min。氧化后形成的含有一对二硫键的多肽通过制备型反相高效液相色谱纯化, 纯化后的多肽产物进行第二步碘氧化, 去除 S-Acm 基团, 同时形成第二对二硫键, 氧化产物缓慢加入充满氮气保护的碘反应液中 (7.5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> I<sub>2</sub> 溶液; 溶液为水/TFA/乙腈 = 20:1:8, v/v/v), 震荡反应 10 min, 然后轻轻加入饱和抗坏血酸 (Vc) 至溶液澄清, 终止反应。通过两步氧化法合成的含有两对二硫键的芋螺毒素多肽, 利用制备液相纯化, 合成结果分析型液相检测纯度 (> 95%), ESI-MS 鉴定合成多肽分子质量, 合成产物冻干分装备用。

**cRNA 的制备注射与受体表达** 分别将 nAChRs 各个类型亚基质粒, 包括小鼠  $\alpha 1$  (序列信息 Genebank 号: NM\_007389.5)、 $\beta 1$  (XR\_003949231)、 $\delta$  (NM\_021600) 和  $\epsilon$  (XR\_004936687)、 $\alpha 2$  (NM\_144803)、 $\alpha 3$  (NM\_145129)、 $\alpha 4$  (NM\_015730)、 $\alpha 6$  (NM\_021369)、 $\alpha 9$  (NM\_001081104) 和  $\alpha 10$  (NM\_001081424)、 $\beta 2$  (NM\_009602) 和  $\beta 4$  (NM\_148944) 转入感受态细胞 *E. coli* DH5 $\alpha$  中, 提取质粒, 测定质粒的浓度, 用相应的限制性内切酶对所提取的质粒酶切线性化, 获得线性化 DNA, 纯化并测定其浓度。以纯化后的线性化 DNA 作为模板, 用 Ambion mMESSAGE mMACHINE Kit 体外转录试剂盒进行 cRNA 合成, 之后用 RNA 纯化试剂盒, 按步骤对所获得

的 cRNA 进行纯化, 并在 260 nm 波长下测定 cRNA 的浓度, 分装于无 RNA 酶管中, 保存于 -80 °C 备用。

非洲爪蟾卵母细胞取自成熟雌性非洲爪蟾, 用 1.5 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup> 胶原酶 (I 型, Sigma 公司) 去卵泡, 并在 18 °C 下, 置于无菌 ND96 缓冲液 (96.0 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> NaCl、1.8 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>、2.0 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> KCl、1.0 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 和 5.0 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> HEPES, pH 7.4)。利用显微注射器 (Nanojet, Drummond Scientific Co. 公司), 各亚基以 1:1 的比例向卵母细胞注射每个亚型的 5 ng cRNA, 其中肌肉型  $\alpha 1$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  亚基的 cRNA 按 2:1:1:1 的质量比例混合, 注射完后, 将卵母细胞放置于含抗生素 (青霉素 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、链霉素 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、庆大霉素 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 的无菌 ND96 培养液中, 17 °C 恒温恒湿培养。在注射后 2~5 天进行电生理记录, 观察 nAChRs 的表达状况。

**电生理活性检测** 先准备好 ND96 灌流液, 脱气至少 30 min, 再将配制好的 0.1 g $\cdot$ L<sup>-1</sup> BSA 倒入 ND96 灌流液中。再将 3 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> KCl 溶液灌入电极针中, 使得电阻范围在 0.5~2 M $\Omega$  内。打开数模转换器、放大器的操作程序, 吸取表达好的单个卵母细胞放入 50  $\mu\text{L}$  的细胞槽内, 将电极针以 45° 的倾斜角度刺入卵母细胞中, 调至 TEVC 模式钳住卵母细胞, 钳制电压为 -70 mV, 基准电流小于 200 nA, 运行程序, 以流速为 2 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup> 的 ND96 灌流液, 浓度为 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酰胆碱 (ACh) 激活, 使得通道开放后产生电流。电流平稳后, 开启记录模式, 记录时间为 1 min, 其中 2 s ND96 冲洗, 2 s ACh 刺激, 56 s ND96 冲洗。然后以 ND96 为空白对照, 将芋螺毒素多肽加入到细胞槽内孵育 5 min, 使用 Clampfit 10.2 软件 (Molecular Devices Corp. 公司) 记录和分析电生理数据。所有测定数据均表示为至少 3~6 个卵母细胞的平均值  $\pm$  标准误。浓度反应曲线拟合方程反应 (%) = 100 / [1 + ([conotoxin] / IC<sub>50</sub>)<sup>nH</sup>], 其中 nH 是 Hill 系数, IC<sub>50</sub> 通过使用 GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software 公司) 软件进行非线性回归分析。

**芋螺毒素结构模拟和分子对接** MI、MIA、MIB 和 MIC 属于  $\alpha$ -3/5 型芋螺毒素, 经过比较发现与芋螺毒素 GI (PDB ID: 1QS3) 相似度高, 在此基础上, 本研究利用 Modeller 9.16 构建 MIA 和 MIB 结构。利用 Rosetta 软件中柔性对接包 FlexPepDock 进行分子对接, 对接以金环蛇毒素结合 Torpedo nAChR 冷冻电镜结构为模型 (PDB ID: 6UWZ), 配体对接肌肉型 nAChRs 的  $\alpha 1$  和  $\delta$  相互作用界面。在对接过程中, 首先使用了柔性对接算法中的 prepack 模块对蛋白和多肽的侧链进行结构初始优化, 以减少多肽的侧链冲突和优化骨架。然后, 对每个多肽进行了 100 次侧链搜索以产生高分辨率的

理论预测结合结构。对接结果利用软件“Total\_Score”方式评价,选择100次对接中的最优结构,进行对接结果分析。

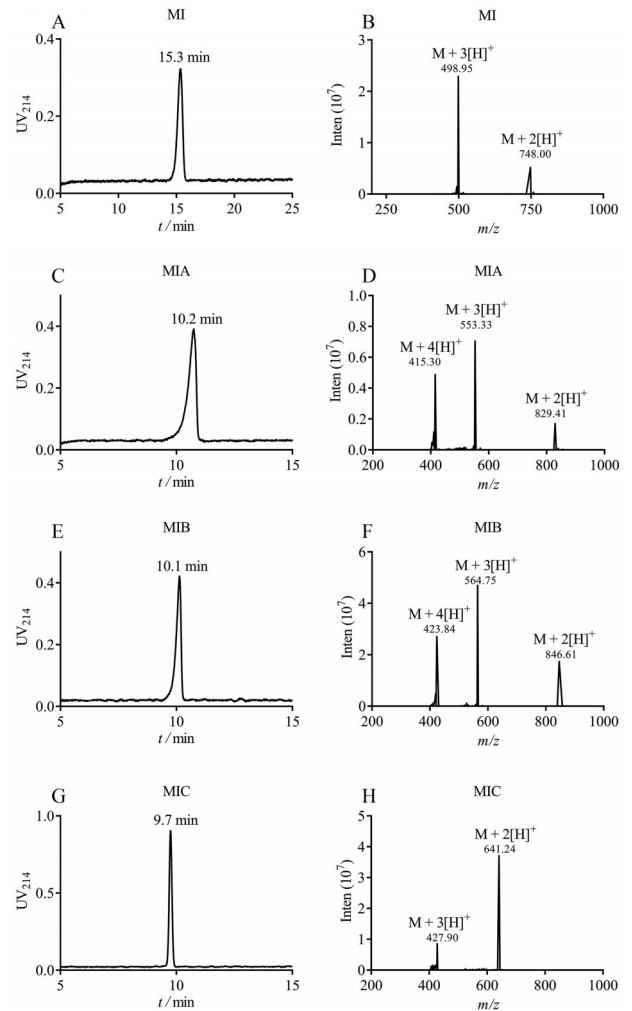
## 结果

### 1 $\alpha$ -芋螺毒素MI、MIA、MIB和MIC合成

本研究首先采用Fmoc固相合成法合成4种 $\alpha$ -芋螺毒素MI、MIA、MIB和MIC线性肽,利用制备型RP-HPLC对线性肽进行纯化,纯化后进行两步法氧化折叠,形成两对二硫键后,用分析型RP-HPLC检测和ESI-MS进行鉴定,最终产物纯度大于95%以上,具体检测结果如图2所示,芋螺毒素MI、MIA、MIB、MIC的保留时间分别是15.3、10.2、10.1和9.7 min。每个合成的多肽分子利用ESI-MS鉴定其分子质量,检测结果表明芋螺毒素MI、MIA、MIB、MIC的分子质量分别为1 493.8、1 659.9、1 691.2和1 280.4 Da,与理论相对分子质量相符。

### 2 芋螺毒素MI、MIA、MIB和MIC对肌肉型nAChRs抑制活性

$\alpha$ -3/5型芋螺毒素的主要作用靶点是肌肉型nAChRs,以ND96溶液对肌肉型nAChRs做一个空白对照实验(图3A),用ND96溶液溶解芋螺毒素MI、MIA、MIB和MIC,测试其对肌肉型nAChRs抑制活性,电生理结果如图3B~E所示,在 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 多肽给药浓度下,芋螺毒素MI、MIA、MIB和MIC几乎可以完全阻断ACh激发的肌肉型nAChRs电流,表明合成的4种芋螺毒素对肌肉型nAChRs都有很强的阻断活性。在此基础上,进一步测定4种多肽毒素在不同浓度下电流抑制情况,绘制浓度剂量反应曲线,每个浓度条件下至少测定3个蛙卵数据,实验结果如图3F所示,4种芋螺毒素对肌肉型乙酰胆碱受体都有极强的阻断活性。 $\text{IC}_{50}$ 计算结果如表1所示,芋螺毒素MI的活性最强, $\text{IC}_{50}$ 值为 $0.23 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。与MI活性相比,MIC的 $\text{IC}_{50}$ 值为 $1.28 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,升高了约5.6倍。另外,与MI相比,MIA和MIB活性降低更多,测定的 $\text{IC}_{50}$ 分别为 $14.45$ 和 $72.78 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,提升了62.8和316.4倍。如图1所示,序列比对MI序列N端比MIC多了Gly和Arg两个2个氨基酸,导致MIC活性降低。MIA和MIB与MI序列差异较大,主要表现在N端和loop2区,

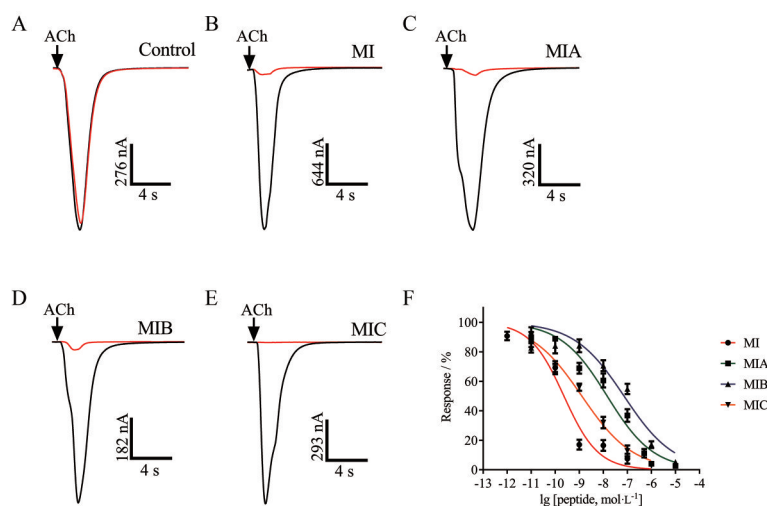


**Figure 2** MI, MIA, MIB and MIC were identified using RP-HPLC and ESI-MS. Analytical RP-HPLC elution method: UV detecting wavelength: 214 nm, temperature:  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , A:  $\text{ddH}_2\text{O}$  (0.75% trifluoroacetic acid); B: B90 (10%  $\text{ddH}_2\text{O}$ , 90% acetonitrile, 0.5% trifluoroacetic acid). Figure A chromatographic conditions for B liquid from 5% to 30% change, A liquid 95% to 70% change, flow rate:  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Figures C, E, G chromatographic conditions for B liquid from 5% to 50% change, A liquid 95% to 50% change, flow rate:  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Figures B, D, F, H: MS data of MI, MIA, MIB and MIC, with single isotope mass of 1 493.8, 1 659.9, 1 691.2 and 1 280 Da, respectively

MIA和MIB的N端分别多出了Asp和Asn, loop2区氨基酸序列也存在明显差异,这些氨基酸序列区别导致MIA和MIB活性降低。

**Table 1** Potencies of MI, MIA, MIB and MIC on mouse muscular nAChR subtype expressed in *Xenopus* oocytes

Name	$\text{IC}_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (95% confidence interval)	Hillslope	Ratio ( $\text{IC}_{50}$ of MI = 1)	Oocyte count/n
MI	0.23 (0.15–0.36)	0.6 (0.85–0.47)	1	6
MIA	14.45 (9.135–22.51)	0.4 (0.54–0.38)	62.8	6
MIB	72.78 (41.84–23.10)	0.4 (0.55–0.32)	316.4	6
MIC	1.28 (0.85–1.93)	0.4 (0.48–0.35)	5.6	6



**Figure 3**  $\alpha$ -CTX MI, MIA, MIB and MIC inhibit muscle type nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). A: Blank control using ND96 solution; B–E: Inhibition of  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MI, MIA, MIB and MIC on muscle type nAChRs; F: Comparison of concentration-response curves of MI, MIA, MIB and MIC in inhibiting muscle type nAChRs. The operation mode was: 2 s ND96 washing, 2 s acetylcholine (ACh) stimulation, 56 s ND96 washing. Each data point is the average of responses obtained from 3–6 oocytes. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (San Diego, CA). The semi-blocking concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) and the slope of the curve (Hillslope) were calculated using the nonlinear regression equation

### 3 $\alpha$ -芋螺毒素 MI、MIA、MIB 和 MIC 对其他亚型 nAChRs 抑制活性

在测定 4 种  $\alpha$ -芋螺毒素抑制肌肉型乙酰胆碱受体活性的基础上,本研究利用双电极电压钳技术,进一步检测芋螺毒素 MIA 和 MIB 对其他不同亚型神经型 nAChRs 的抑制活性,实验结果如图 4 所示,在  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酰胆碱浓度刺激下,不同亚型乙酰胆碱受体门控通道都被激活打开,加入  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MIA 条件下,电流如图 4A~C、G~I 所示,  $\alpha 4\beta 2$ 、 $\alpha 2\beta 4$ 、 $\alpha 4\beta 4$ 、 $\alpha 3\beta 2$ 、 $\alpha 6\beta 4$  和  $\alpha 3\beta 4$  的通道开放率分别为 64%、68%、98%、48%、73% 和 92%,表明高浓度情况下, MIA 对  $\alpha 4\beta 2$ 、 $\alpha 2\beta 4$  和  $\alpha 3\beta 2$  有一定抑制活性。与 MIA 类似,在  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MIB 的给药浓度条件下,  $\alpha 4\beta 2$ 、 $\alpha 2\beta 4$ 、 $\alpha 4\beta 4$ 、 $\alpha 3\beta 2$ 、 $\alpha 6\beta 4$  和  $\alpha 3\beta 4$  的电流开放依旧保持 75%、52%、94%、64%、55% 和 88% (图 4D~F、J~L),表明在高浓度情况下, MIB 对  $\alpha 2\beta 4$  和  $\alpha 6\beta 4$  具有一定的抑制活性。通过 3 次平行实验, MIA 和 MIB 对 6 种鼠源神经型 nAChRs 和肌肉型 nAChRs 的阻断活性如图 5 所示,对肌肉型 nAChRs 的活性非常强,而对其他神经型 nAChRs 活性偏弱。

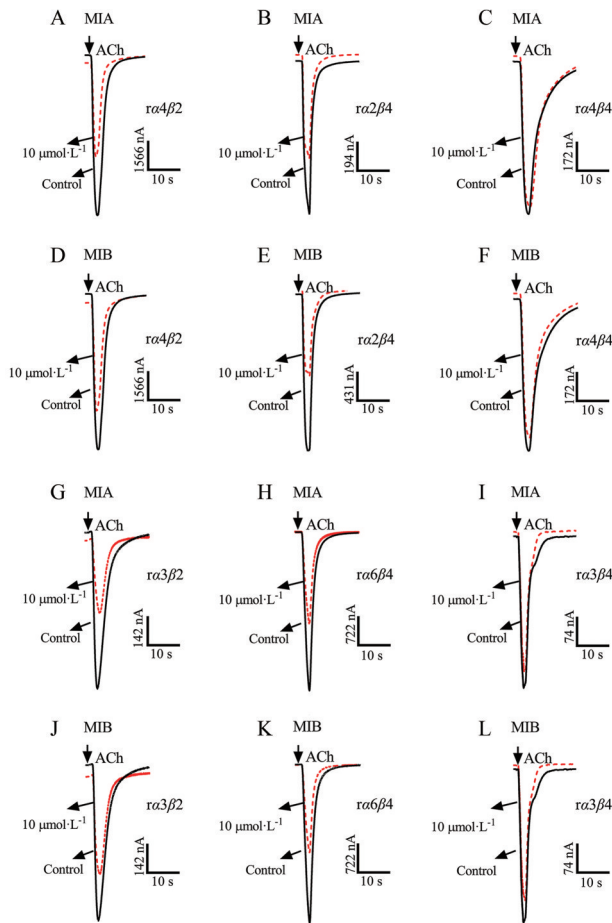
### 4 芋螺毒素 MIA 和 MIB 与肌肉型 nAChRs 相互作用分析

MIA 和 MIB 等属于  $\alpha$ -3/5 亚型芋螺毒素,其结构与同属  $\alpha$ -3/5 亚型芋螺毒素 GI 同源性非常高,本研究利用同源建模的方式构建了芋螺毒素 MI、MIA 和 MIB 结构,在此基础上利用 Rosetta 软件中 FlexPepDock 进

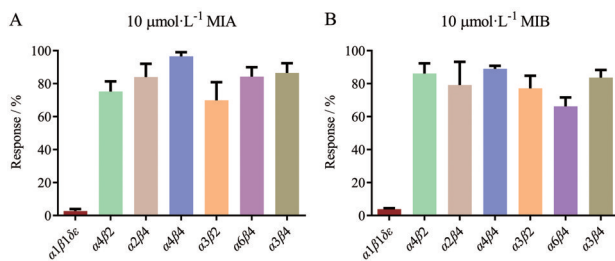
行分子对接,选择打分最低的稳定结构 (Supporting Information 1), 构建了 MIA 和 MIB 与  $\alpha 1(+)\delta(-)$  结合位点之间的复合物的分子模型 (图 6), 对接结果显示 2 种芋螺毒素与  $\alpha 1(+)\delta(-)$  亚基形成的分子模型非常类似。芋螺毒素 MIA 与 MIB 结构中 N-端和 loop1 与  $\delta$  亚基中  $\beta$ -折叠相互作用紧密,其中  $\delta$  亚基中 113 位带正电荷精氨酸与 N-氨基酸发生相互作用,是影响 MIA 和 MIB 的活性差异的关键因素。芋螺毒素 MIA 与 MIB 的 loop2 区在体系外侧,对结合作用影响相对较小, C-末端的半胱氨酸形成二硫键,对芋螺毒素 MIA 和 MIB 三维结构维持十分重要,且与  $\alpha 1$  亚基中 C-loop 相互作用,表明 Cys II-Cys IV 形成的二硫键对芋螺毒素活性影响重大。

### 讨论

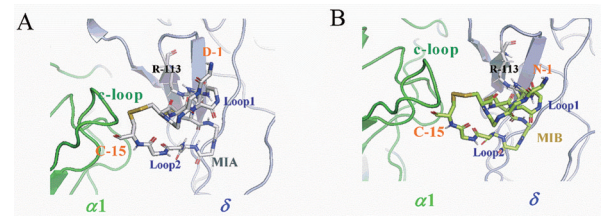
海洋软体动物芋螺毒管中分泌上千种甚至更多的活性多肽,这些芋螺毒素多肽分子都是通过长期进化形成,扮演着重要生理功能,主要麻痹被捕食的对象,或是防御捕食者。食肉型芋螺幻芋螺是人们研究最为深入的芋螺种类,根据芋螺毒素数据库 Conoserver 记载,科学家已从幻芋螺毒液中发现了 30 多种芋螺毒素,主要包括 O1-超家族、A-超家族和 I1-超家族,其中最著名的是作用于  $\text{Cav}_{2.2}$  的芋螺毒素  $\omega$ -MVIIA,它于 2004 年被 FDA 批准,开发为治疗神经痛的药物<sup>[14-16]</sup>。 $\alpha$ -芋螺毒素 MII 也是从幻芋螺中发现,能够特异作用于神经性  $\alpha 3\beta 2$  nAChRs<sup>[17]</sup>。此外,人们还在幻芋螺中



**Figure 4** Representative superimposed ACh-evoked currents mediated by  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 2\beta 4$ ,  $\alpha 4\beta 4$ ,  $\alpha 3\beta 2$ ,  $\alpha 6\beta 4$  and  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs obtained in the absence (control,  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ACh) and presence of  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  peptides MIA and MIB



**Figure 5** Bar graphs showing relative ACh-evoked peak current inhibition of muscle-type nAChRs by MIA and MIB ( $n = 3$ )



**Figure 6** Molecular models of the binding modes of MIA and MIB at the  $\alpha 1/\delta$  nAChR. A: The MIA- $\alpha 1\delta$  complex structure; B: The MIB- $\alpha 1\delta$  complex structure. The  $\alpha 1$  subunit is shown in green, and  $\delta$  subunit is shown in gray

发现了多种  $\alpha$ -3/5 家族芋螺毒素, 如 MI、MIA、MIB 和 MIC, 前期研究已证明能够特异作用于肌肉型 nAChRs, 其中 MI 和 MIC 活性已经进行定量测试, 本研究进一步鉴定了芋螺毒素 MIA 和 MIB 的活性。这些不同类型芋螺毒素, 能够协同作用于不同类型离子通道, 它们相互协同作用, 在幻芋螺捕食海洋中快速运动的鱼类发挥着重要作用。

科学家已经从芋螺毒液中发现了多个针对肌肉型 nAChRs  $\alpha$ -3/5 型 CTxs, 如表 2<sup>[11,13,18-22]</sup>所示, 这些芋螺毒素中 loop1 区非常保守, 一般为组氨酸-脯氨酸-丙氨酸组合, 从已发现的  $\alpha$ -3/5 型芋螺毒素结构看, 这一结构形成的转角结构对维持芋螺毒素结构发挥重要作用。而 loop2 结构相对可变, 对芋螺毒素活性影响较小, 这也与本研究对接结果一致, loop2 结构区域在芋螺毒素与受体  $\alpha 1/\delta$  结合部位的外侧, 因此对芋螺毒素活性影响相对较小。本研究化学合成了 MI、MIA、MIB 和 MIC 4 种来源幻芋螺的 3/5 型芋螺毒素, 其序列差异主要在 N-端和 loop2 区域, 对接结果显示 N 端可能在其活性差异中扮演着重要作用, N-端氨基酸残基与  $\delta$  亚基中 113 位精氨酸间存在空间位阻和静电作用, 可通过精氨酸突变等方法进一步进行深入研究。除  $\alpha$ -3/5 型作用于肌肉型 nAChRs 的芋螺毒素, 还有一些  $\alpha$ -4/7 型芋螺毒素也能够阻断肌肉型 nAChRs, 如  $\alpha$ -Lo1a、 $\alpha$ -EI, 但它们不仅对肌肉型 nAChRs 有活性, 也对其他神经型 nAChRs 有活性, 表明这些亚型的作用于肌肉型 nAChRs 的芋螺毒素选择性不高<sup>[23,24]</sup>。

**Table 2** The sequence alignments of 3/5  $\alpha$ -conotoxins are shown in Table. The cysteines residues are shaded in red. #C-terminal carboxamide

Conotoxin	Sequence	Target	Reference
Ac1.1a	NGR <b>C</b> CH <b>P</b> AC <b>G</b> KHF <b>N</b> C#	$\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ ( $3.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	[18]
CIA	NGR <b>C</b> CH <b>P</b> AC <b>G</b> KHF <b>S</b> C#	$\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ ( $5.7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ); $\alpha 3\beta 2$ ( $2.06 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	[19]
GI	E <b>C</b> CC <b>N</b> PA <b>C</b> GRH <b>Y</b> S <b>C</b> #	$\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ ( $5.86 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	[20]
MI	GR <b>C</b> CH <b>P</b> AC <b>G</b> K <b>N</b> Y <b>S</b> C#	$\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ ( $400 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	[11], this work
MIA	DGR <b>C</b> CH <b>P</b> AC <b>A</b> KHF <b>N</b> C#	$\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$ ( $14.45 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	This work
MIB	NGR <b>C</b> CH <b>P</b> AC <b>A</b> R <b>K</b> Y <b>N</b> C#	$\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$ ( $72.78 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	This work
MIC	<b>C</b> CH <b>P</b> AC <b>G</b> K <b>N</b> Y <b>S</b> C#	$\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$ ( $1.28 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	[13], this work
SIA	Y <b>C</b> CH <b>P</b> AC <b>G</b> K <b>N</b> F <b>D</b> C#	Not determined	[21]
SII	G <b>C</b> CC <b>N</b> PA <b>C</b> GP <b>N</b> Y <b>G</b> CG <b>T</b> S <b>C</b> S#	$\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ ( $8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	[22]

肌肉型 nAChRs 的异常会引起横纹肌肉瘤、小儿软组织肿瘤、重症肌无力等疾病,发现能特异作用于肌肉型 nAChRs 的配体对于诊断和治疗这些疾病尤为重要,也对于肌肉型 nAChRs 相关分子探针的开发具有一定的指导意义。本实验研究的 MIA、MIB 对神经元受体 ( $\alpha 4\beta 2$ 、 $\alpha 2\beta 4$ 、 $\alpha 4\beta 4$ 、 $\alpha 3\beta 2$ 、 $\alpha 6\beta 4$  和  $\alpha 3\beta 4$ ) 几乎无活性,仅对肌肉型 nAChRs 有强阻断活性,所以它们具有较高的选择性。本研究对芋螺毒素 MI、MIA、MIB 和 MIC 进行系统研究比较,为后续的多肽改造、突变等提供了基础,也更深入认识了  $\alpha 3/5$  型芋螺毒素与肌肉型 nAChRs 相互作用的分子机制。

**作者贡献:** 吴茜茜、王柳珺、朱晓鹏和吴勇负责多肽的合成、活性测定与稿件撰写;长孙东亭和罗素兰负责实验设计、过程指导、稿件撰写与修改。

**利益冲突:** 所有作者声明无任何利益冲突。

## References

- [1] Hurst R, Rollema H, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics [J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 137: 22-54.
- [2] Lebbe EK, Peigneur S, Wijesekara I, et al. Conotoxins targeting nicotinic acetylcholine receptors: an overview [J]. *Mar Drugs*, 2014, 12: 2970-3004.
- [3] Wells GB. Structural answers and persistent questions about how nicotinic receptors work [J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 5479-5510.
- [4] Chen JH, Bai DL. Advances in the research on nicotinic acetylcholine receptors agonists [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2002, 37: 309-315.
- [5] Kong DW, Yu ZR, Zhou QM, et al.  $\alpha 4\beta 2$ -Nicotine acetylcholine receptor: advances in relevant diseases and drugs [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 1-8.
- [6] Saxena A, Stevens J, Cetin H, et al. Characterization of an anti-fetal AChR monoclonal antibody isolated from a myasthenia gravis patient [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 14426.
- [7] Mott M, Luna VM, Park JY, et al. Expressing acetylcholine receptors after innervation suppresses spontaneous vesicle release and causes muscle fatigue [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 1674.
- [8] Azam L, McIntosh JM. Alpha-conotoxins as pharmacological probes of nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30: 771-783.
- [9] Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, et al. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function [J]. *Physiol Rev*, 2009, 89: 73-120.
- [10] Muttenthaler M, Akondi KB, Alewood PF. Structure-activity studies on alpha-conotoxins [J]. *Curr Pharm Design*, 2011, 17: 4226-4241.
- [11] Jacobsen RB, Delacruz RG, Grose JH, et al. Critical residues influence the affinity and selectivity of  $\alpha$ -conotoxin MI for nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Biochemistry*, 1999, 38: 13310-13315.
- [12] McIntosh JM, Dowell C, Watkins M, et al. Alpha-conotoxin GIC from *Conus geographus*, a novel peptide antagonist of nicotinic acetylcholine receptors [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 33610-33615.
- [13] Kapon CA, Thapa P, Cabaltea CC, et al. Conotoxin truncation as a post-translational modification to increase the pharmacological diversity within the milked venom of *Conus magus* [J]. *Toxicon*, 2013, 70: 170-178.
- [14] Kaas Q, Yu R, Jin AH, et al. ConoServer: updated content, knowledge, and discovery tools in the conopeptide database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: D325-D330.
- [15] Kaas Q, Westermann JC, Halai R, et al. ConoServer, a database for conopeptide sequences and structures [J]. *Bioinformatics*, 2008, 24: 445-446.
- [16] Schroeder CI, Doering CJ, Zamponi GW, et al. N-Type calcium channel blockers: novel therapeutics for the treatment of pain [J]. *Med Chem*, 2006, 2: 535-543.
- [17] Cartier GE, Yoshikami D, Gray WR, et al. A new alpha-conotoxin which targets  $\alpha 3\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptors [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 7522-7528.
- [18] Liu L, Chew G, Hawrot E, et al. Two potent alpha3/5 conotoxins from piscivorous *Conus achatinus* [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2007, 39: 438-444.
- [19] Giribaldi J, Wilson D, Nicke A, et al. Synthesis, structure and biological activity of CIA and CIB, two alpha-conotoxins from the predation-evoked venom of *Conus catus* [J]. *Toxins (Basel)*, 2018, 10: 222.
- [20] Ning J, Li R, Ren J, et al. Alanine-scanning mutagenesis of alpha-conotoxin GI reveals the residues crucial for activity at the muscle acetylcholine receptor [J]. *Mar Drugs*, 2018, 16: 507.
- [21] Myers RA, Zafaralla GC, Gray WR, et al. Alpha-conotoxins, small peptide probes of nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Biochemistry*, 1991, 30: 9370-9377.
- [22] Ramilo CA, Zafaralla GC, Nadasdi L, et al. Novel alpha-and omega-conotoxins from *Conus striatus* venom [J]. *Biochemistry*, 1992, 31: 9919-9926.
- [23] Lebbe EK, Peigneur S, Maiti M, et al. Structure-function elucidation of a new alpha-conotoxin, Lo1a, from *Conus longurionis* [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289: 9573-9583.
- [24] Lopez-Vera E, Aguilar MB, Schiavon E, et al. Novel alpha-conotoxins from *Conus spurius* and the alpha-conotoxin EI share high-affinity potentiation and low-affinity inhibition of nicotinic acetylcholine receptors [J]. *FEBS J*, 2007, 274: 3972-3985.