

## $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体分子伴侣 *Tmem35a* 的克隆及其功能研究

王紫涵, 于津鹏, 长孙东亭, 朱晓鹏\*, 罗素兰\*

(广西大学医学院, 广西特色生物医药重点实验室, 广西 南宁 530004)

**摘要:** 烟碱型乙酰胆碱受体 (nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs) 属于配体门控离子通道受体, 其中  $\alpha 7$  nAChR 亚型广泛分布于大脑皮层、丘脑和海马体等区域。此外, 在小胶质细胞、巨噬细胞、骨髓细胞等也有分布, 研究发现其与胆碱能抗炎通路的功能密切相关, 是阿尔茨海默症和精神分裂症药物开发的重要靶标。建立稳定的体外药物筛选体系, 对于靶向  $\alpha 7$  nAChR 新药的高效筛选至关重要。在非洲爪蟾卵母细胞膜上, 重组表达 nAChRs 的不同亚型, 并通过电生理技术进行电流检测, 是一种先进而复杂的新药筛选模型。分子伴侣可以协助部分 nAChRs 亚基组装形成功能性受体, 为靶向该受体的化合物筛选提供稳定表达的模型。为此, 本研究从大鼠体内分离克隆了  $\alpha 7$  nAChR 的一个分子伴侣基因, 其名称为 *Tmem35a* (transmembrane protein 35A), 进一步构建了该基因的重组表达载体, 再利用体外转录技术获得了该基因的 cRNA, 将之与  $\alpha 7$  nAChR 的 cRNA 混合后同时注射到非洲爪蟾卵母细胞中进行表达。然后, 利用双电极电压钳检测该分子伴侣对  $\alpha 7$  nAChR 电流表达和通道药理活性的影响。结果显示, TMEM35A (也被称为 novel acetylcholine receptor chaperone, NACHO) 可有效提高  $\alpha 7$  nAChR 蛋白在卵母细胞膜上的表达, 受体蛋白表达量提高了约 1 倍; 其配体乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) 刺激诱发的峰值电流提高了约 10 倍。注入 *Tmem35a* cRNA 后的卵母细胞, 其表达的  $\alpha 7$  nAChR 对激动剂 ACh 的半数效应浓度为  $228.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 和本身  $223.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  基本一致, 维持了  $\alpha 7$  受体正常功能特性。研究结果表明, 分子伴侣 NACHO 有效协助了  $\alpha 7$  nAChR 在非洲爪蟾卵母细胞的异源表达, 稳定表达的  $\alpha 7$  nAChR 可以为靶向该受体的先导化合物活性筛选提供模型。本研究所有动物实验过程经广西大学伦理委员会审查批准 (批准号: GXU-2023-0249)。

**关键词:**  $\alpha 7$  烟碱型乙酰胆碱受体; 分子伴侣 NACHO; 基因克隆; 双电极电压钳; 药物筛选模型

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)07-1993-09

## Cloning and functional characterization of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor molecular chaperone *Tmem35a*

WANG Zi-han, YU Jin-peng, ZHANGSUN Dong-ting, ZHU Xiao-peng\*, LUO Su-lan\*

(Guangxi Key Laboratory of Special Biomedicine, School of Medicine, Guangxi University, Nanning 530004, China)

**Abstract:** Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) belong to ligand-gated ion channel receptors, of which  $\alpha 7$  nAChR subtype is widely distributed in the cerebral cortex, thalamus, hippocampus, and also identified in microglia, macrophages, bone marrow cells, etc. Previous studies revealed that  $\alpha 7$  nAChR is closely related to the function of the cholinergic anti-inflammatory pathway, and is a vital target for drug development of Alzheimer's disease and schizophrenia. The establishment of a stable  $\alpha 7$  nAChR *in vitro* drug screening system is crucial for the efficient screening of novel drugs targeting this target. Recombinant expression of different subtypes of nAChRs on *Xenopus laevis* oocyte membranes and current detected by two-electrode voltage clamp (TEVC) is an advanced and complex model for novel drug screening. Molecular chaperones can assist the assembly of some nAChR

收稿日期: 2024-02-07; 修回日期: 2024-04-24.

基金项目: 国家重点研发计划政府间国际科技创新合作重点专项 (2022YFE0132700); 广西科技基地和人才专项 (桂科 AD22035948); 国家自然科学基金资助项目 (42376112, 82320108019, 82360698).

\*通讯作者 Tel: 86-771-3949335, E-mail: sulan2021@gxu.edu.cn; biozxp@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0121

subunits to form functional receptors, providing a stable expression model for the screening of compounds targeting this receptor. In this study, a molecular chaperone gene of  $\alpha 7$  nAChR, transmembrane protein 35A (*Tmem35a*), was isolated and cloned from rats. We constructed the recombinant expression vector and obtained the cRNA of *Tmem35a* by *in vitro* transcription technique. Two cRNAs (*Tmem35a* and  $\alpha 7$ ) were mixed and injected into *X. laevis* oocytes for expression. Then, the effects of this molecular chaperone on the current expression and pharmacological properties of  $\alpha 7$  nAChR were evaluated by the TEVC. The results revealed that TMEM35A, also known as novel acetylcholine receptor chaperone (NACHO) could effectively increase the expression of  $\alpha 7$  nAChR protein on oocyte membranes, and the amount of  $\alpha 7$  nAChR protein was increased about 1-fold. The peak current induced by agonist acetylcholine (ACh) was increased about 10-fold. After injection of *Tmem35a* cRNA, the median effect concentration ( $EC_{50}$ ) value of  $\alpha 7$  nAChR to agonist ACh is  $228.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , which shows almost no difference from native  $\alpha 7$  nAChR ( $EC_{50}$ :  $223.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), indicating the preservation of the normal properties of  $\alpha 7$  nAChR. The results of this investigation indicate that the molecular chaperone NACHO effectively assists the heterologous expression of  $\alpha 7$  nAChR in *X. laevis* oocytes, which provides a model for screening the potency of lead compounds targeting  $\alpha 7$  nAChR. All animal experiments in this study were reviewed and approved by the Ethics Committee of Guangxi University (approval number: GXU-2023-0249).

**Key words:**  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor; molecular chaperone NACHO; gene cloning; two-electrode voltage clamp; drug screening model

烟碱型乙酰胆碱受体 (nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs) 是配体门控离子通道超家族中重要成员之一, 主要分为肌肉型受体和神经型受体<sup>[1-4]</sup>。神经型 nAChRs 是由  $\alpha$  和  $\beta$  亚基以同型或异型构成的五聚体通道蛋白, 不同的亚基组成使受体表现出不同的生理功能和通道特性, 包括通道打开时间、离子渗透性、通道脱敏和失活速率以及激动剂敏感性等<sup>[5-7]</sup>。建立不同 nAChRs 亚型的异源表达的模型有助于体外研究受体的功能。目前, 常用的异源表达系统有非洲爪蟾卵母细胞、哺乳动物细胞系等, 体外模型为受体通道功能的研究和靶向受体候选药物先导化合物的鉴定提供了条件<sup>[8,9]</sup>。作为多亚基、跨膜通道蛋白, nAChRs 的组装是一个复杂且低效的过程, 亚基首先要在内质网折叠组装, 没有组装的亚基中间体在泛素化后被蛋白酶降解, 成功组装的亚基通过囊泡运输到高尔基体最后到达细胞膜表面, 不同 nAChRs 亚型在不同细胞、组织中组装和运输的效率差异很大, 只有大约 30% 新合成的亚基可以形成功能性五聚体, 因此 nAChRs 的体外异源表达具有一定的难度<sup>[3,10,11]</sup>。

$\alpha 7$  nAChR 是由  $\alpha 7$  亚基组成的同型五聚体, 在大脑的海马体、皮层和丘脑等区域广泛表达, 与认知、记忆等精神类行为密切相关, 对  $\text{Ca}^{2+}$  有较高的渗透性, 可以快速脱敏<sup>[12-14]</sup>。研究发现, 增强  $\alpha 7$  nAChR 的功能是治疗阿尔茨海默病和精神分裂症等神经系统疾病的一种新型治疗策略, 它的下调可以抑制胰腺癌和肺癌中癌细胞的增殖<sup>[13,15-19]</sup>; 此外它也存在一些非神经元细胞中, 如内皮细胞、骨髓细胞, 通过调节骨髓内红细胞的生成从而参与血管生成, 被认为是缺血性心脏病血

运重建的新内皮靶标<sup>[20,21]</sup>; 在巨噬细胞、小胶质细胞中也有  $\alpha 7$  nAChR 的分布, 它们通过参与胆碱能抗炎途径抑制细胞因子合成, 从而在免疫、抗炎等方面发挥作用<sup>[22-24]</sup>;  $\alpha 7$  nAChR 在生理、病理过程中扮演了重要角色, 因此成为相关靶向药物开发关注的重点。先前研究发现  $\alpha 7$  选择性激动剂, 如 GTS-21 (也称为 DMBX-anabaseine) 和 EVP-6124 (encenicline) 通过激活  $\alpha 7$  nAChR, 在改善记忆方面表现出一定效果, 后者在临床试验中也表现出较好的作用, 被认为是与胆碱酯酶抑制剂联合治疗阿尔茨海默症的良好候选药物<sup>[25-28]</sup>。因此, 建立  $\alpha 7$  nAChR 体外表达模型, 开展药物先导化合物高通量筛选对新药发现和相关疾病治疗具有重要意义。

$\alpha 7$  nAChR 的异源表达存在一定的困难, 在不同表达系统中情况不尽相同, 如在哺乳动物细胞系中,  $\alpha 7$  的功能表达严重依赖宿主细胞的类型; 在非洲爪蟾卵母细胞中表达不稳定, 表达天数久, 并且依赖 cRNA 质量和卵母细胞状态<sup>[29]</sup>。研究发现, 细胞内存在分子伴侣, 参与众多细胞代谢过程, 如蛋白折叠、组装、转运和降解, 此外分子伴侣还可以通过调节蛋白构象变化、寡聚状态等来影响功能蛋白的活性<sup>[30,31]</sup>。通过文库高通量筛选发现的 TMEM35A (transmembrane protein 35A) 是一种神经元特异性的跨膜蛋白, 由 167 个氨基酸所组成, 由于功能未知曾被称为 TUF1 (termed the unknown factor-1), 2016 年 Gu 等将其命名为 NACHO (novel acetylcholine receptor chaperone)<sup>[32,33]</sup>。基因水平的研究表明, NACHO 在大脑中富集, 主要在海马体、大脑皮层和嗅球等特定区域表达。对其蛋白结构进行

预测,结果显示NACHO中包含4个 $\alpha$ -螺旋的跨膜结构域、1个胞质N端及C末端。研究表明,NACHO可以介导非神经元细胞系中 $\alpha 7$  nAChR的组装,通过共转染增加了人胚胎肾293T细胞(human embryonic kidney 293T cells, HEK293T cells)上 $\alpha 7$ 的表达,且乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)诱发的电流也显著增加。NACHO在非洲爪蟾卵母细胞表达系统中是否协助 $\alpha 7$  nAChR表达,为体外模型的构建提供帮助,有待进一步探索。本研究从大鼠中克隆了*Tmem35a*基因,体外构建重组载体,利用非洲爪蟾卵母细胞表达体系和双电极电压钳技术检测NACHO对 $\alpha 7$  nAChR表达的影响,为构建稳定的体外药筛模型提供基础。

## 材料与方法

**实验动物** 实验所用雌性非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)购自中国科学院昆明动物研究所,实验室17℃饲养,水温12~25℃,人工照明昼夜交替各12h。实验所用大鼠购于斯贝福生物技术有限公司,动物许可证号为SCXK(京)2019-0010。所有动物实验过程经广西大学伦理委员会审查批准(批准号:GXU-2023-0249)。

**实验材料** 包含大鼠 $\alpha 7$  nAChR基因的质粒和pGEMHE载体(载体大小3 030 bp)获赠于美国犹他大学。2×Taq Master Mix (Dye Plus) (#7E562A1)、胶回收试剂盒(FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit, #017E2272EA)、同源重组酶(ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit, #007E2211BA)、质粒小提试剂盒(FastPure Plasmid Mini Kit, #017E2210FA)、DH5 $\alpha$ 化学感受态细胞(#7E570A1)购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司;限制性核酸内切酶*Sma* I (#AK21416A)、*Hind* III (#AGY0906A)和*Nhe* I (#AM50990A)、DNA片段纯化试剂盒(MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.4.0, #AL61457A)购于宝日医生物技术(北京)有限公司;体外转录试剂盒(mMESSAGE mMACHINE™ T7, #2760935)、RNA纯化试剂盒(MEGAclean™ Transcription Kit, #2776183)购于Thermo Fisher Scientific(美国);氨苄青霉素钠(#3230810001)购于北京索莱宝科技有限公司;ACh(#0001433126)购于Sigma-Aldrich(美国);牛血清白蛋白(#G2322070)、十二烷基- $\beta$ -D-麦芽糖苷(#A2203359)、三(羟甲基)氨基甲烷Tris(#F2206400)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;氯化钠(#2303151)、氯化钾(#2107101)、六水合氯化镁(#2103041)、无水氯化钙(#2104211)购于西陇科学股份有限公司;HEPES(#J413BA0011)购于生工生物工程(上海)股份有限公司;PMSF(#ST505)购于上海碧云

天生物技术有限公司;PVDF膜(#CR2305015)购于武汉赛维尔生物科技有限公司; $\alpha 7$ 抗体(#00096475)、GAPDH抗体兔源IgG(#00136428)购于Proteintech(美国);山羊抗兔IgG H&L(HRP)(#GR3357864-9)购于Abcam(美国);ECL化学发光底物(#23166455)购于合肥Biosharp生物公司;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;ND96溶液组分浓度(96 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 2 mmol·L<sup>-1</sup> KCl, 1 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1.8 mmol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 5 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES, pH7.5)。

**实验仪器** 卧式振荡培养箱MQD-B3(上海曼泉仪器有限公司);KCL-2000W恒温恒湿培养箱(EYELA,日本);Biometra TAdvanced 96 PCR仪(Jena,德国);多功能离心机CF16RN(Eppendorf,德国);FluorChem E化学发光凝胶成像仪(Proteinsimple,美国);超微量分光光度计DS-11(DeNovix,美国);P1000微电极拉制仪(Sutter,美国);纳升级微量注射器主机Nanoject II(DRUMMOND,美国);OC-725D卵母细胞钳制放大器(Warner,美国);Axon Digidata 1550B数模转换器(Molecular Devices,美国);PowerPac Basic(Bio-Rad,美国)。

***Tmem35a*基因的克隆和表达载体构建** 解剖大鼠获取大脑,提取大脑总RNA,反转录获得对应的cDNA。*Tmem35a*(NCBI: NM\_001001799.1), Primer Premier5软件设计正向引物(5'-GGGCTTCTTTTA-ACTTCTGCACG-3')和反向引物(5'-GAATGAGC-GAAAGAAGACAAGT-3'),目的基因理论长度1 893 bp,其中编码区长度为504 bp。使用2×Taq Master Mix (Dye Plus)进行PCR,扩增基因全长。PCR反应条件:95℃变性,57℃退火,72℃延伸,设置35个循环。胶回收PCR产物并进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。利用限制性内切酶*Sma* I和*Hind* III对质粒载体pGEMHE双酶切,获取线性化质粒。将目的基因片段与线性化载体进行重组连接,线性载体与基因片段的摩尔比为1:2。同源重组的反应条件如下:50℃加热5 min,随后冰上冷却。重组产物转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞,涂布在含氨苄青霉素钠的LB固体平板上,37℃,过夜培养16 h。挑取单菌落进行菌液PCR验证后,送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,确定目的基因的正确性。

**cRNA的制备与显微注射** 包含大鼠 $\alpha 7$ 和*Tmem35a*基因的质粒分别用限制性内切酶*Sma* I和*Nhe* I进行酶切,获得线性化DNA模板。使用mMESSAGE mMACHINE™ T7试剂盒进行体外转录,在20  $\mu$ L的反应体系中,添加线性化DNA模板1  $\mu$ g, 2×NTP/CAP 10  $\mu$ L, 10×Reaction Buffer 2  $\mu$ L, Enzyme

Mix 2  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 5 h; 利用 MEGAclear™ Transcription Kit 纯化 cRNA, 分别利用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳对浓度和纯度进行鉴定, 每管 2  $\mu\text{L}$  分装后 -80  $^{\circ}\text{C}$  保存。

显微注射前将  $\alpha 7$  与 *Tmem35a* 的 cRNA 按质量比 1:1 混合, 对照组加入与 *Tmem35a* 等体积的 RNase-free ddH<sub>2</sub>O, 以保证实验组和对照组中  $\alpha 7$  cRNA 浓度相同。注射用硅酸盐玻璃针 (内径 0.69 mm, 外径 1.20 mm) 灌满矿物油, 排出气泡后, 将 1.5  $\mu\text{L}$  cRNA 吸入注射针中, 针尖斜 45 $^{\circ}$  扎入卵母细胞进行显微注射 (卵母细胞获取方法如前所述<sup>[34]</sup>)。通过调整注射体积分别注射 8、12、16、22、27 ng 的  $\alpha 7$  cRNA 到卵母细胞中, 对照组按照相同体积注射。注射后的卵母细胞置于含抗生素的 ND96 溶液中 17  $^{\circ}\text{C}$  培养, 每天更换新鲜的培养液。培养 2~5 天, 可以进行电生理检测。

**电生理检测和受体药理活性分析** 使用双电极电压钳对受体的表达情况进行检测 (放大器 OC-725D)。电生理实验中, 用 3 mol·L<sup>-1</sup> KCl 溶液灌注电极针, 电阻在 0.5~2 M $\Omega$  之间。ND96 灌流液 (含 0.1 mg·mL<sup>-1</sup> 牛血清白蛋白) 脱气处理, 流速 4 mL·min<sup>-1</sup>。电极针入液后调零, 进入卵母细胞后, 切换 TEVC 模式, 钳制电压 -70 mV。利用 pCLAMP 软件进行数据的采集, 在 1 min 的灌流时间内, 给予 2 s ACh 刺激, 每个程序 3 次重复<sup>[35]</sup>。利用 Clampfit11.0.3 软件进行数据处理和分析。

**$\alpha 7$  nAChR 蛋白水平表达量检测** 提取 *X. laevis* 卵母细胞膜蛋白, 鉴定分子伴侣 *Tmem35a* 对  $\alpha 7$  nAChR 蛋白表达水平的影响。收集注射 cRNA 后培养 3~4 天的卵母细胞于离心管中, 加入 30~50  $\mu\text{L}$  缓冲液 (0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaCl; 1% 十二烷基- $\beta$ -D-麦芽糖苷; 1 mmol·L<sup>-1</sup> PMSF; 20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl; pH 7.6) 并破碎细胞, 冰上孵育 1 h 后 10 000  $\times g$  离心 10 min, 收集上清进行蛋白免疫印迹实验。制备 5% 浓缩胶、10% 分离胶进行电泳, 再将蛋白电转至 PVDF 膜, 分离目的蛋白和内参蛋白条带, 用 5% 脱脂奶粉封闭。封闭结束后用 1 $\times$ TBST 清洗, 然后将含目的蛋白和内参蛋白的膜

分别放置于  $\alpha 7$  抗体溶液 (1:2 000 稀释) 和 GAPDH 抗体溶液 (1:5 000 稀释) 中 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。在 TBST 中洗涤 3 次, 每次 10 min, 然后与二抗山羊抗兔 IgG H&L (HRP) (1:5 000 稀释) 孵育 1 h, 彻底洗涤后添加化学发光底物, 在发光凝胶成像仪上测量化学发光。

**数据分析** 使用 Clampfit11.0.3 对记录到的电流进行分析, 使用 Graphpad Prism9.5.1 软件进行数据处理与作图。通过非线性拟合:  $\text{Response}\% = 100/[1 + (\text{EC}_{50}/[\text{ACh}])^n]$  (nH 代表 Hill 系数) 获得受体对 ACh 的半数效应浓度 (median effect concentration, EC<sub>50</sub>)。实验中的数据以平均值  $\pm$  标准误 (mean  $\pm$  SEM) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 电生理实验数据来自于不少于 6 个蛙卵细胞的结果, 取自 3 个不同批次的非洲爪蟾。使用 ImageJ 软件对免疫印迹条带进行灰度分析, 将目的蛋白的灰度值除以内参蛋白的灰度值, 进行归一化处理。

## 结果

### 1 分子伴侣 *Tmem35a* 的克隆和重组载体构建

基因克隆和重组载体构建流程如图 1 所示。分光光度计测得大脑总 RNA 浓度为 1.57 g·L<sup>-1</sup>; PCR 扩增后胶回收获取目的基因片段的浓度为 0.33 g·L<sup>-1</sup>; pGEMHE 质粒双酶切后胶回收获取线性载体, 浓度为 64 g·L<sup>-1</sup>。取 1  $\mu\text{L}$  线性载体和 0.24  $\mu\text{L}$  目的基因片段添加同源重组体系进行反应, 转化过夜培养后重组产物转化的 LB 固体培养基长出了较为密集的菌落, 而对照组几乎没有菌落长出。

选取菌液 PCR 产物分子量大小与理论一致的重组载体进行测序, 测序结果与 *Tmem35a* 理论序列对比分析, 结果如图 2 所示, 除了第 300 位的碱基由 T (胸腺嘧啶) 变为 A (腺嘌呤) 之外, 其他碱基与 NCBI 序列一致。对比氨基酸序列, 发现该位点的变化不影响翻译后的氨基酸序列, 克隆所得 *Tmem35a* 基因翻译后对应的氨基酸序列与理论值一致, 长度为 167 个氨基酸, 对应 *Tmem35a* 基因编码区长度 504 bp。

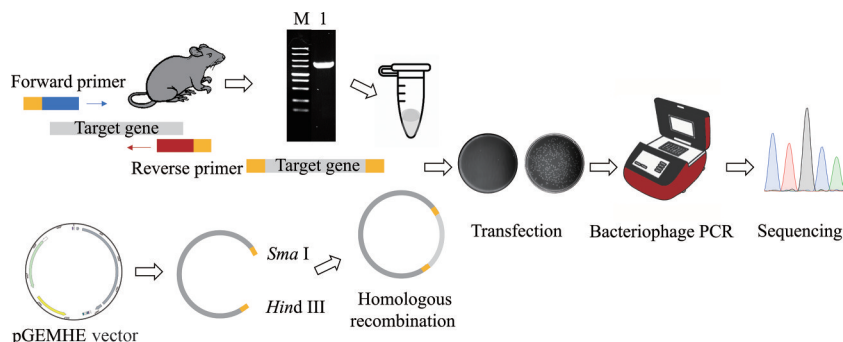
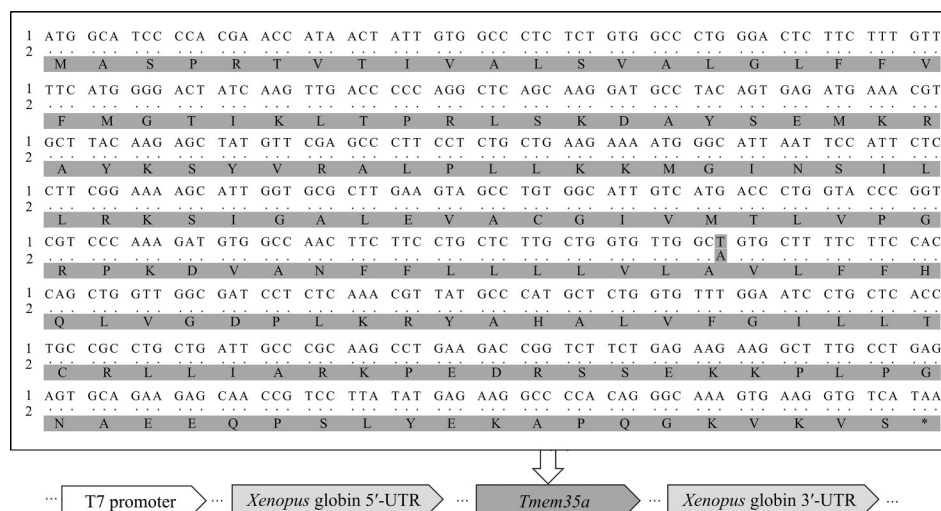


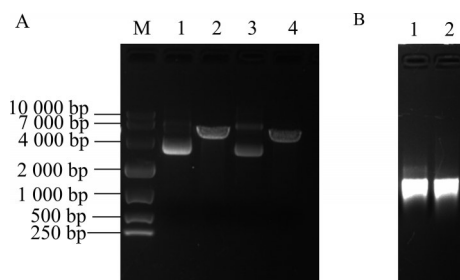
Figure 1 Flow chart of molecular cloning and recombinant vector construction



**Figure 2** Transmembrane protein 35A (*Tmem35a*) gene sequence analysis. 1: Coding sequence of the *Tmem35a* gene; 2: Coding sequence of the cloned *Tmem35a* gene, the number of base pairs is 504; Gray area: Amino acids sequence of *Tmem35a* protein, the number of amino acids is 167

## 2 $\alpha 7$ nAChR 和 *Tmem35a* 的 cRNA 制备

提取大鼠  $\alpha 7$  nAChR 质粒和包含 *Tmem35a* 基因的重组质粒, 分光光度计测得质粒浓度分别为 0.45 和 0.43  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 酶切纯化后的线性化 DNA 浓度为 0.30 和 0.28  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 电泳条带位置指示正确且环状质粒已完全线性化 (图 3A)。体外转录获取大鼠  $\alpha 7$  和 *Tmem35a* 的 cRNA, 其浓度分别为 0.50 和 0.47  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 电泳结果如图 3B 所示, 图中可见 cRNA 主条带清晰, 符合后续实验要求。



**Figure 3** The agarose gel electrophoresis analysis rat  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) subunit and *Tmem35a* plasmids, linear DNA, and cRNA. A:  $\alpha 7$  subunit and *Tmem35a* plasmids, linear DNA electropherograms. M: DNA Marker DL 10 000; 1:  $\alpha 7$  plasmid; 2:  $\alpha 7$  plasmid after *Sma* I digestion; 3: *Tmem35a* plasmid; 4: *Tmem35a* plasmid after *Nhe* I digestion; B:  $\alpha 7$  subunit and *Tmem35a* cRNA. 1:  $\alpha 7$  cRNA; 2: *Tmem35a* cRNA

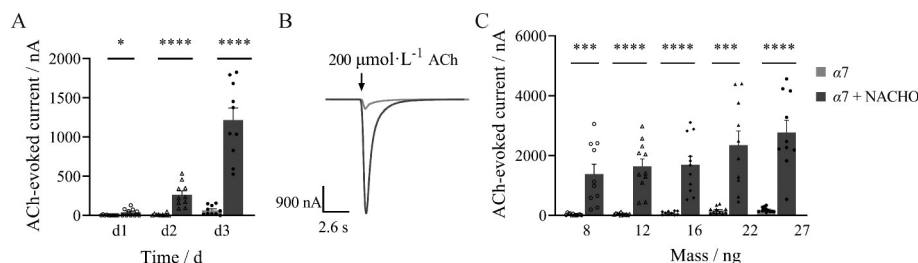
## 3 分子伴侣 NACHO 对 $\alpha 7$ nAChR 表达的影响

用电生理检测  $\alpha 7$  nAChR 在非洲爪蟾卵母细胞中的电流表达。实验组取 0.7  $\mu\text{L}$   $\alpha 7$  cRNA 和 0.8  $\mu\text{L}$  *Tmem35a* cRNA, 混合均匀后显微注射入卵母细胞中, 单个蛙卵细胞注射 69 nL, 此时  $\alpha 7$  和 *Tmem35a* cRNA 注射质量均为 16 ng; 对照组将 0.7  $\mu\text{L}$   $\alpha 7$  cRNA 和

0.8  $\mu\text{L}$  RNase-free ddH<sub>2</sub>O 混合, 单个蛙卵注射体积和实验组保持一致, 即每个细胞 69 nL, 此时对照组  $\alpha 7$  cRNA 的注射质量也为 16 ng。在注射培养后的第 1 天、第 2 天、第 3 天分别用 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ACh 给予蛙卵 2 s 的刺激, 用双电极电压钳检测 ACh 诱发的峰值电流。在实验组 ( $\alpha 7$  + NACHO) 和对照组 ( $\alpha 7$  + RNase-free ddH<sub>2</sub>O) 蛙卵状态、cRNA 注射质量、培养天数、培养环境等实验条件一致的情况下, 检测结果显示分子伴侣组的  $\alpha 7$  nAChR 表达更快, 在显微注射后第 1 天即检测到电流, 此时对照组尚未表达 ( $n = 10$ )。随着培养天数的增加, 和 NACHO 共表达的  $\alpha 7$  nAChR 在第 3 天电流已经超过 1 000 nA。但是相同条件下的对照组电流依旧较小 (图 4A)。如图 4B 所示, 在相同浓度的 ACh (200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 刺激下, 注射 *Tmem35a* cRNA 的蛙卵细胞诱发产生的电流较对照组大约提高了 10 倍, 分别为 4 447 和 339 nA。在保持  $\alpha 7$  和 *Tmem35a* cRNA 以质量比 1:1 混合的条件下, 通过改变注射体积, 分别检测了 8、12、16、22、27 ng  $\alpha 7$  cRNA 注射质量下 NACHO 作用效果的差异, 注射培养 3 天后, 电生理检测结果如图 4C 所示, 电流值较对照组都有较大幅度增加。单因素方差分析和组间比较的结果显示, 不同注射体积下实验组和对照组的电流峰值均有显著性差异。其中, 在  $\alpha 7$  nAChR 的 cRNA 注射量为 8 ng 的条件下, 对照组几乎检测不到电流, 但是 NACHO 组依然能有效协助  $\alpha 7$  nAChR 的表达, 在蛙卵细胞上针对 ACh 的峰值电流能够达到 2 000 nA 以上 ( $n \geq 10$ , 图 4C)。

## 4 分子伴侣 NACHO 对 $\alpha 7$ nAChR 药理活性影响

利用不同浓度的 ACh 诱导非洲爪蟾卵母细胞产



**Figure 4** TMEM35A (also known as novel acetylcholine receptor chaperone, NACHO) assisted  $\alpha 7$  nAChR expression in *Xenopus laevis* oocytes. A: Quantification of current amplitude in oocytes stimulated with  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  acetylcholine (ACh) within 3 days after injection ( $n = 10$ ); B: Current traces from *X. laevis* oocytes injected with indicated cRNA; C: Quantification of peak currents in response to ACh in oocytes injected with different amounts of cRNA 3 days after injection ( $n \geq 10$  oocytes).  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ . \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

生的内向电流如图 5A (对照组)、图 5B (实验组) 所示。在不同的浓度 ACh 刺激下, NACHO 都有效提高了  $\alpha 7$  nAChR 电流响应的大小, 但没有改变电流峰型。从电流轨迹图中可以看出, 实验组和对照组呈现出了相同的特性, 即在低浓度下电流较小, 随着浓度增大电流也逐渐增加, 在  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时达到最大电流, 当浓度进一步增加到  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 电流呈现下降趋势。为了评估  $\alpha 7$  nAChR 对 ACh 的敏感性是否会随分子伴侣发生变化, 本研究绘制了它对 ACh 的剂量效应曲线。如图 5C 所示, 在注射分子伴侣 NACHO 的条件下,  $\alpha 7$  nAChR 对 ACh 的  $\text{EC}_{50}$  为  $228.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。与对照组 ( $\text{EC}_{50}$  值  $223.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 相比, 基本保持一致, 统计学上无差异显著性 (表 1)。

**Table 1** The median effect concentration ( $\text{EC}_{50}$ ) and Hill slope values of rat  $\alpha 7$  nAChR with and without NACHO. \*95% confidence intervals of  $\text{EC}_{50}$  shown in parentheses

nAChR	$\text{EC}_{50}^a/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Hill slope
$\alpha 7$	223.3 (205.7-270.6)	1.13 (1.05-1.36)
$\alpha 7 + \text{NACHO}$	228.5 (214.4-248.1)	1.36 (1.31-1.55)

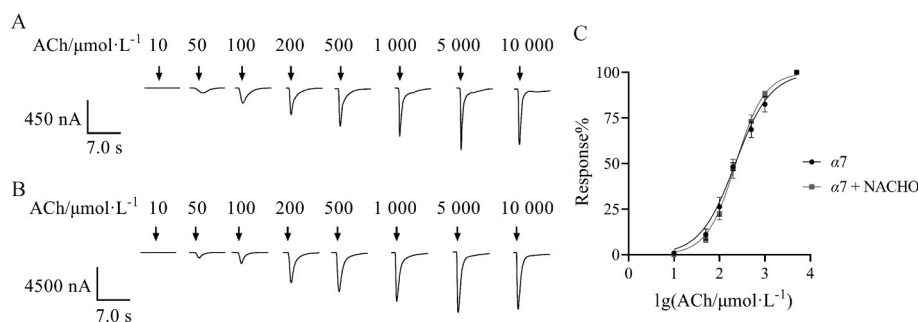
### 5 分子伴侣 NACHO 对 $\alpha 7$ nAChR 蛋白表达量的影响

电生理结果显示分子伴侣 NACHO 对  $\alpha 7$  nAChR 经激动剂 ACh 诱发的电流有很大提高, 推测分子伴侣

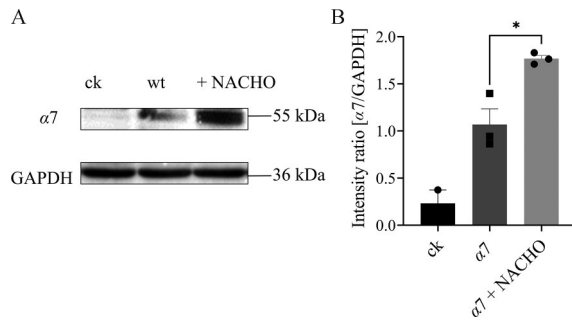
可能有效协助了  $\alpha 7$  nAChR 的组装, 提高了它的表达量。为了进一步验证该结果, 本研究利用蛋白免疫印迹技术检测了 NACHO 对  $\alpha 7$  nAChR 蛋白表达量的影响。分别收集了来自同一批次的空白蛙卵 (ck)、只注射  $\alpha 7$  nAChR cRNA 的蛙卵 (wt) 以及  $\alpha 7$  与 *Tmem35a* cRNA 共同注射的蛙卵 (+ NACHO), 保证实验条件一致, 对 3 组蛙卵 ( $n = 13$ ) 提取的膜蛋白进行免疫印迹实验。结果如图 6A 所示, 在 55 kDa 的位置附近有明显条带, 其分子量大小与  $\alpha 7$  nAChR 蛋白理论分子量基本一致。利用 ImageJ 软件对 3 组蛋白表达量进行分析, 将目的蛋白的灰度值除以内参蛋白的灰度值得到归一化的表达量, 其中 ck 组、wt 组和分子伴侣组分别在 0.2、0.9 和 1.7 左右, 加入分子伴侣后,  $\alpha 7$  nAChR 蛋白表达量较 wt 组提高了约 1 倍, 表达量具有差异显著性 (图 6B)。

### 讨论

$\alpha 7$  nAChR 作为同源五聚体配体门控离子通道之一, 广泛分布在中枢和外周神经系统以及一些非神经元细胞中, 参与认知、记忆、神经保护等生理过程, 是阿尔茨海默症等一些神经系统疾病的潜在靶点<sup>[36]</sup>。随着神经内分泌免疫调控研究的深入,  $\alpha 7$  nAChR 在胆碱能抗炎通路中的作用被逐渐解析, 它是外周介导胆碱能



**Figure 5** Current trace and dose-response curve of  $\alpha 7$  nAChR expressed in *X. laevis* oocytes against agonist ACh. A: Current trace of  $\alpha 7$  nAChR without NACHO; B: Current trace of  $\alpha 7$  nAChR with NACHO; C: Dose-response curve of  $\alpha 7$  nAChR expressed in *X. laevis* oocytes against agonist ACh, data are normalized to  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ACh.  $n = 8$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  (from 3 different batches of oocytes)



**Figure 6** The expression of  $\alpha 7$  nAChR was analyzed by Western blot. A: Bands from Western blot: the oocytes injected  $\alpha 7$  cRNA and mixture ( $\alpha 7$  cRNA + *Tmem35a*) were represented as wt and + NACHO, respectively. ck indicates blank oocytes without injection. GAPDH was used as the internal control; B: Quantification of grayscale analysis of protein bands. \*  $P < 0.05$

抗炎作用的重要靶标<sup>[37]</sup>。除此之外,  $\alpha 7$  nAChR 还参与促进血管生成, 介导尼古丁诱导的肺癌细胞增殖过程。因此, 阻断  $\alpha 7$  nAChR 或成为治疗尼古丁相关肺癌的新策略<sup>[18]</sup>。基于  $\alpha 7$  nAChR 的生理和药理功能, 探索发现靶向该受体的先导化合物具有重要意义<sup>[38]</sup>。

随着分子生物技术和电生理技术的发展, 以离子通道为药物靶点的研究逐渐深入。异源表达模型的建立打破了天然受体研究的局限性, 通过在宿主细胞中表达外源基因蛋白质实现了在体外对离子通道结构、生物学活性和药理学特性的研究, 也为靶向药物的筛选与发现创造了条件<sup>[39]</sup>。哺乳动物细胞系和非洲爪蟾卵母细胞是目前常用的两大类异源表达系统, 其体外异源表达模型的构建存在一定的难度, 主要是因为不同亚型之间亚基构成的差异和受体组装的低效率<sup>[40]</sup>。

分子伴侣作为辅助蛋白可以促进亚基的正确组装和转运, 或可以充当辅助亚基, 通过与离子通道亚基相互作用调节通道的组装和表达<sup>[41,42]</sup>。目前许多和 nAChRs 功能表达相关的分子伴侣已被发现, 如  $\beta$  锚定和调节蛋白 ( $\beta$ -anchoring and regulatory protein, BARP), 它是电压依赖型钙通道的辅助亚基, 可以促进  $\alpha 6\beta 4$  nAChR 的功能表达。它的解析也有助于探索  $\alpha 6\beta 4$  亚型在镇痛中药理活性的研究<sup>[43]</sup>; 2002 年 Halevi 等的研究发现抗胆碱酯酶的抑制剂-3 (resistance to inhibitors of cholinesterase 3, RIC-3) 可以调节神经元和其他细胞中多种 nAChRs 的表达, 其中包括  $\alpha 7$  nAChR, 但是对于  $\alpha 7$  受体的组装或功能表达来说, 它并非必需条件<sup>[44-46]</sup>。NACHO 作为神经元内质网上的驻留蛋白, 在内质网中协助介导  $\alpha 7$  nAChR 的折叠、组装与表达, 但 NACHO 不会参与  $\alpha 7$  nAChR 的组成, 因此对  $\alpha 7$  nAChR 的通道功能没有影响。NACHO 在大

脑中分布广泛, 还介导了其他几种 nAChRs 亚型的组装和表达, 包括在大脑中分布较多的  $\alpha 4\beta 2$  nAChR 亚型, 以及在外周分布的  $\alpha 3\beta 2$  和  $\alpha 3\beta 4$  两种亚型, 但对谷氨酸、 $\gamma$ -氨基丁酸等其他配体门控离子通道的功能未有显著影响<sup>[32,47]</sup>。

本研究成功克隆了大鼠 *Tmem35a* 基因, 构建了它的表达载体, 通过体外转录获得 *Tmem35a* 基因的 cRNA, 并与  $\alpha 7$  nAChR 的 cRNA 共注射实现了二者在非非洲爪蟾卵母细胞上的共表达, 成功解决了  $\alpha 7$  nAChR 在非非洲爪蟾卵母细胞中表达天数久、表达不稳定的问题。结果表明, NACHO 不仅提高了 ACh 诱发的电流幅度, 还减少了培养天数, 加快了受体表达的效率。从  $\alpha 7$  nAChR 对激动剂 ACh 响应的电流轨迹和  $EC_{50}$  结果来看, 和 NACHO 共表达不会改变受体对激动剂 ACh 的敏感性, 这表明 NACHO 或许不会影响  $\alpha 7$  的空间构象和激动剂结合位点。免疫印迹结果也验证了 NACHO 增加了  $\alpha 7$  在卵母细胞膜表面蛋白的表达量。本研究采用 *Tmem35a* 和  $\alpha 7$  nAChR 的 cRNA 以质量比 1:1 的方式注射入非洲爪蟾卵母细胞, 但课题组也尝试了 2:1、1:2 和 1:5 等注射比例, 结果发现这几种注射比例都可以有效提高 ACh 诱发的电流, 后续可以通过优化分子伴侣和受体 cRNA 的注射比例, 以获取最适合药理活性研究和多肽药物筛选的电流表达。

不同的 nAChRs 位置分布不同, 具有独特的药理和生理特性, 亚基的不同组装形式以及表达系统的差异使受体的异源表达面临不同的问题。本研究利用分子伴侣 NACHO 实现了  $\alpha 7$  nAChR 在非非洲爪蟾卵母细胞表达系统中稳定高效表达, 有效提高了蛋白表达量和表达效率, 为基于  $\alpha 7$  nAChR 的靶向药物发现提供了基础, 但涉及分子伴侣结构以及作用机制的研究还有待进一步探索, 相信随着全基因组筛选、电生理技术、冷冻电镜技术的发展, 相关研究一定会取得进一步的突破。

**作者贡献:** 罗素兰、朱晓鹏、长孙东亭负责实验设计、实验指导和论文审阅修改; 于津鹏负责电生理平台搭建及技术指导; 王紫涵负责实验研究过程、数据分析、论文撰写。

**利益冲突:** 本文所有作者明确声明研究内容无任何利益冲突。

## References

- [1] Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology [J]. *Prog Neurobiol*, 2004, 74: 363-396.
- [2] Corringer PJ, Le Novère N, Changeux JP. Nicotinic receptors at the amino acid level [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2000, 40: 431-458.

- [3] Millar NS. Assembly and subunit diversity of nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Biochem Soc Trans*, 2003, 31: 869-874.
- [4] Chrestia JF, Turani O, Araujo NR, et al. Regulation of nicotinic acetylcholine receptors by post-translational modifications [J]. *Pharmacol Res*, 2023, 190: 106712.
- [5] Changeux JP, Edelstein SJ. Allosteric receptors after 30 years [J]. *Neuron*, 1998, 21: 959-980.
- [6] Dani JA, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007, 47: 699-729.
- [7] Deneris ES, Connolly J, Rogers SW, et al. Pharmacological and functional diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1991, 12: 34-40.
- [8] Romero MF, Kanai Y, Gunshin H, et al. Expression cloning using *Xenopus laevis* oocytes [J]. *Methods Enzymol*, 1998, 296: 17-52.
- [9] Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, et al. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells [J]. *Nature*, 1971, 233: 177-182.
- [10] Colombo SF, Mazzo F, Pistillo F, et al. Biogenesis, trafficking and up-regulation of nicotinic ACh receptors [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 86: 1063-1073.
- [11] Green WN, Claudio T. Acetylcholine receptor assembly: subunit folding and oligomerization occur sequentially [J]. *Cell*, 1993, 74: 57-69.
- [12] Messi ML, Renganathan M, Grigorenko E, et al. Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor promotes survival of spinal cord motoneurons [J]. *FEBS Lett*, 1997, 411: 32-38.
- [13] Broide RS, Leslie FM. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity [J]. *Mol Neurobiol*, 1999, 20: 1-16.
- [14] Bouzat C, Bartos M, Corradi J, et al. The interface between extracellular and transmembrane domains of homomeric Cys-loop receptors governs open-channel lifetime and rate of desensitization [J]. *J Neurosci*, 2008, 28: 7808-7819.
- [15] Deutsch SI, Burket JA, Benson AD, et al. The 15q13.3 deletion syndrome: deficient  $\alpha(7)$ -containing nicotinic acetylcholine receptor-mediated neurotransmission in the pathogenesis of neurodevelopmental disorders [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2016, 64: 109-117.
- [16] Lendvai B, Kassai F, Száji A, et al.  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors and their role in cognition [J]. *Brain Res Bull*, 2013, 93: 86-96.
- [17] Rubboli F, Court JA, Sala C, et al. Distribution of nicotinic receptors in the human hippocampus and thalamus [J]. *Eur J Neurosci*, 1994, 6: 1596-1604.
- [18] Trombino S, Cesario A, Margaritora S, et al. Alpha7-nicotinic acetylcholine receptors affect growth regulation of human mesothelioma cells: role of mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 135-145.
- [19] Egleton RD, Brown KC, Dasgupta P. Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: multiple roles in proliferation and inhibition of apoptosis [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2008, 29: 151-158.
- [20] Koval LM, Zverkova AS, Grailhe R, et al. Nicotinic acetylcholine receptors alpha4beta2 and alpha7 regulate myeloid and erythropoiesis within the bone marrow [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40: 980-990.
- [21] Li XW, Wang H. Non-neuronal nicotinic alpha 7 receptor, a new endothelial target for revascularization [J]. *Life Sci*, 2006, 78: 1863-1870.
- [22] Gallowitsch-Puerta M, Tracey KJ. Immunologic role of the cholinergic anti-inflammatory pathway and the nicotinic acetylcholine alpha 7 receptor [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1062: 209-219.
- [23] Su Y, Zhang W, Zhang R, et al. Activation of cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates cerebral and cardiac dysfunction after intracerebral hemorrhage through autophagy [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 870174.
- [24] Liu EYL, Xia Y, Kong X, et al. Interacting with  $\alpha 7$  nAChR is a new mechanism for AChE to enhance the inflammatory response in macrophages [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10: 1926-1942.
- [25] Papke RL, Horenstein NA. Therapeutic targeting of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Pharmacol Rev*, 2021, 73: 1118-1149.
- [26] Meyer EM, Tay ET, Papke RL, et al. 3-[2,4-Dimethoxybenzylidene]anabaseine (DMXB) selectively activates rat alpha7 receptors and improves memory-related behaviors in a mecamylamine-sensitive manner [J]. *Brain Res*, 1997, 768: 49-56.
- [27] Prickaerts J, Van Goethem NP, Chesworth R, et al. EVP-6124, a novel and selective  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, improves memory performance by potentiating the acetylcholine response of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Neuropharmacol*, 2012, 62: 1099-1110.
- [28] Yang T, Xiao T, Sun Q, et al. The current agonists and positive allosteric modulators of  $\alpha 7$  nAChR for CNS indications in clinical trials [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2017, 7: 611-622.
- [29] Sweileh W, Wenberg K, Xu J, et al. Multistep expression and assembly of neuronal nicotinic receptors is both host-cell- and receptor-subtype-dependent [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2000, 75: 293-302.
- [30] Wanamaker CP, Green WN. Endoplasmic reticulum chaperones stabilize nicotinic receptor subunits and regulate receptor assembly [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 31113-31123.
- [31] Millar NS, Harkness PC. Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholine receptors (review) [J]. *Mol Membr Biol*, 2008, 25: 279-292.
- [32] Gu S, Matta JA, Lord B, et al. Brain  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor assembly requires NACHO [J]. *Neuron*, 2016, 89: 948-955.

- [33] Tran PV, Georgieff MK, Engeland WC. Sodium depletion increases sympathetic neurite outgrowth and expression of a novel TMEM35 gene-derived protein (TUF1) in the rat adrenal zona glomerulosa [J]. *Endocrinology*, 2010, 151: 4852-4860.
- [34] Chen S, Yu J, Zhang X, et al. Construction and functional evaluation of an  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T]  $\beta 4$  nicotinic acetylcholine receptor mutant [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1054-1062.
- [35] Cartier GE, Yoshikami D, Gray WR, et al. A new alpha-conotoxin which targets alpha3beta2 nicotinic acetylcholine receptors [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 7522-7528.
- [36] Vallés AS, Barrantes FJ. Nicotinic acetylcholine receptor dysfunction in addiction and in some neurodegenerative and neuropsychiatric diseases [J]. *Cells*, 2023, 12: 2051.
- [37] Wang H, Yu M, Ochani M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation [J]. *Nature*, 2003, 421: 384-388.
- [38] Bouzat C, Lasala M, Nielsen BE, et al. Molecular function of  $\alpha 7$  nicotinic receptors as drug targets [J]. *J Physiol*, 2018, 596: 1847-1861.
- [39] Brunello L, Ménard C, Rousset M, et al. Different efficiency of auxiliary/chaperone proteins to promote the functional reconstitution of honeybee glutamate and acetylcholine receptors in *Xenopus laevis* oocytes [J]. *Insect Mol Biol*, 2022, 31: 620-633.
- [40] Green WN, Millar NS. Ion-channel assembly [J]. *Trends Neurosci*, 1995, 18: 280-287.
- [41] Crespi A, Colombo SF, Gotti C. Proteins and chemical chaperones involved in neuronal nicotinic receptor expression and function: an update [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175: 1869-1879.
- [42] Matta JA, Gu S, Davini WB, et al. Nicotinic acetylcholine receptor redux: discovery of accessories opens therapeutic vistas [J]. *Science*, 2021, 373: eabg6539.
- [43] Knowland D, Gu S, Eckert WA, et al. Functional  $\alpha 6\beta 4$  acetylcholine receptor expression enables pharmacological testing of nicotinic agonists with analgesic properties [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130: 6158-6170.
- [44] Alexander JK, Sagher D, Krivoshein AV, et al. Ric-3 promotes alpha7 nicotinic receptor assembly and trafficking through the ER subcompartment of dendrites [J]. *J Neurosci*, 2010, 30: 10112-10126.
- [45] Vallés AS, Roccamo AM, Barrantes FJ. Ric-3 chaperone-mediated stable cell-surface expression of the neuronal alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in mammalian cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30: 818-827.
- [46] Halevi S, McKay J, Palfreyman M, et al. The *C. elegans* ric-3 gene is required for maturation of nicotinic acetylcholine receptors [J]. *EMBO J*, 2002, 21: 1012-1020.
- [47] Matta JA, Gu S, Davini WB, et al. NACHO mediates nicotinic acetylcholine receptor function throughout the brain [J]. *Cell Rep*, 2017, 19: 688-696.