

# 非洲爪蟾卵母细胞表达系统中N-型电压门控钙离子通道新药筛选模型的建立与优化

秦源, 崔城, 朱晓鹏, 长孙东亭, 于津鹏\*, 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:** N-型电压门控钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 通道 (N-type voltage-gated calcium channel, N-type VGCC,  $\text{Ca}_v2.2$ ) 在突触前末端响应动作电位介导  $\text{Ca}^{2+}$  内流, 并在突触发生、神经递质释放和伤害性信号传递中发挥重要作用, 是神经痛 (慢性痛) 等重大疾病治疗药物研发的关键靶点。由于钙离子通道体外表达困难, 通道电流检测技术复杂, 其新药筛选模型极其缺乏。因此, 本研究利用非洲爪蟾卵母细胞表达系统, 进行  $\text{Ca}_v2.2$  体外重组表达, 建立电生理学技术药物筛选模型, 并对该表达技术体系进行了优化 (本研究获得广西大学伦理委员会审查批准, 批准号: GXU-2023-0249)。首先, 以大鼠  $\text{Ca}_v2.2$  的主亚基  $\alpha1B$  及其辅助亚基  $\alpha2\delta1$  和  $\beta3$  的 cDNA 基因为模板, 分别在体外进行转录, 人工合成了  $\text{Ca}_v2.2$  3 个亚基的 mRNA (cRNA), 按照 2:1:1 的质量比混合, 将 3 种 cRNA 注射到非洲爪蟾卵母细胞中进行表达。随后使用双电极电压钳技术检测  $\text{Ca}_v2.2$  离子通道是否产生细胞膜内向电流, 同时对各个表达条件进行了优化, 从通道的激活、失活等方面表征了其门控功能。结果显示, 在 cRNA 显微注射后的第 3~5 天, 使用四乙基氢氧化铵 (TEAOH) 和 1,2-双(2-氨基苯氧基)乙烷-*N,N,N',N'*-四乙酸四酯 (BAPTA-AM) 处理, 可分别消除内源性钾离子通道和  $\text{Ca}^{2+}$  激活的氯离子通道干扰, 成功检测到稳定的  $\text{Ca}_v2.2$  介导的钡离子电流。  $\text{Ca}_v2.2$  的最大激活膜电位为 0 mV, 当膜电位大于 +50 mV 时会出现电流方向反转。通过拟合稳态激活和失活曲线获知  $\text{Ca}_v2.2$  的半激活电位和半失活电位分别为 -15.9 和 -60.2 mV。本研究基于非洲爪蟾卵母细胞, 通过条件优化, 建立了稳定的  $\text{Ca}_v2.2$  表达系统。该体外表达系统可以为靶向  $\text{Ca}_v2.2$  活性化合物或先导药物的筛选提供新的途径。

**关键词:** 电压门控钙离子通道; 双电极电压钳; 非洲爪蟾卵母细胞; 电生理; 门控特性

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)07-2002-10

## Establishment and optimization of drug screening model for N-type voltage-gated calcium channels in *Xenopus laevis* oocyte expression system

QIN Yuan, CUI Cheng, ZHU Xiao-peng, ZHANGSUN Dong-ting, YU Jin-peng\*, LUO Su-lan\*

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

**Abstract:** N-type voltage-gated calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) channels (N-type VGCC,  $\text{Ca}_v2.2$ ) mediate  $\text{Ca}^{2+}$  influx in response to action potential at the presynaptic terminal, and play an important role in synaptogenesis, neurotransmitter release and nociceptive signal transduction. It is a new target for the development of drugs for the treatment of neuralgia (chronic pain) and other major diseases. Due to the difficulty of calcium channel expression *in vitro* and the detection of channel current, there is a great lack of new drug screening models. In this study, we established and optimized the electrophysiological drug screening model using *Xenopus laevis* oocytes for the

收稿日期: 2024-02-23; 修回日期: 2024-04-25.

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFE0132700); 广西自然科学基金资助项目 (2022GXNSFBA035662); 国家自然科学基金资助项目 (82104059); 广西科技基地和人才专项 (桂科AD22035948).

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

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0156

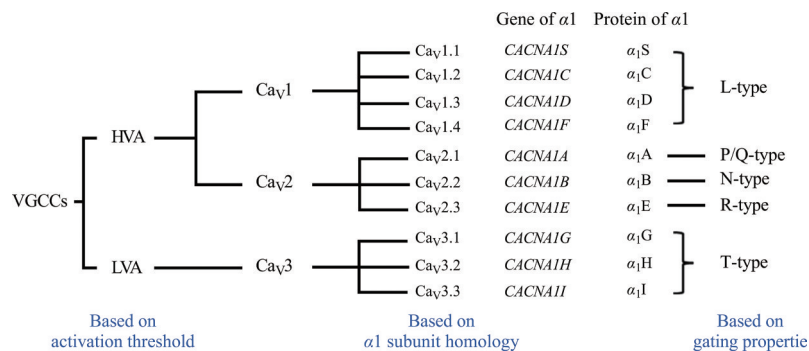
recombinant expression of  $Ca_v2.2$  *in vitro* (this study were reviewed and approved by the Ethics Committee of Guangxi University, approval number: GXU-2023-0249). Firstly, the linear plasmids encoding cDNA of major subunit  $\alpha1B$  and auxiliary subunits  $\alpha2\delta1$  and  $\beta3$  of rat  $Ca_v2.2$  were used as templates for *in vitro* transcription to generate their related mRNA (cRNA), after which three kinds of cRNA were injected into *Xenopus laevis* oocytes at the mass ratio of 2:1:1 for expression. The two-electrode voltage clamp (TEVC) technique was used to detect the inward current produced by  $Ca_v2.2$ . At the same time, the expression conditions of  $Ca_v2.2$  were optimized, and its gating function was characterized from the aspects of channel activation and inactivation. The results showed that 3–5 days after cRNA microinjection, stable  $Ca_v2.2$ -mediated barium ion ( $Ba^{2+}$ ) currents were successfully detected. The interference of endogenous potassium channels and  $Ca^{2+}$ -activated chloride channels can be eliminated by tetraethylammonium hydroxide (TEAOH) and 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid tetrakis (BAPTA-AM) treatment. The maximum potential for  $Ca_v2.2$  activation is 0 mV, and the current reverses to be outward when the membrane potential is greater than +50 mV. By fitting the steady-state activation and inactivation curves, the half-maximal activation potential and half-maximal inactivation potential of  $Ca_v2.2$  are identified as -15.9 and -60.2 mV. In this study, a stable  $Ca_v2.2$  expression system was established based on *Xenopus laevis* oocytes. The *in vitro* expression system can provide a new way for the screening of  $Ca_v2.2$  active compounds or lead drugs.

**Key words:** voltage-gated calcium channel; two-electrode voltage clamp; *Xenopus laevis* oocyte; electrophysiology; gating characteristics

电压门控钙离子 ( $Ca^{2+}$ ) 通道 (voltage-gated calcium channels, VGCCs) 是一种镶嵌于细胞膜上的复合体通道蛋白, 广泛分布于全身可兴奋细胞, 在许多生理过程中起关键作用。VGCCs 对  $Ca^{2+}$  的选择性滤过是去极化诱发  $Ca^{2+}$  进入大脑、心脏和肌肉可兴奋细胞的主要来源, 能驱动许多生理过程, 包括激素分泌、神经递质释放、肌肉收缩、多种基因的钙依赖转录等<sup>[1,2]</sup>。而 VGCCs 的突变和功能失调则与许多心血管疾病和精神性疾病的发生密切相关, 如心律失常、高血压、偏头痛、精神分裂症、癫痫和抑郁症等, 因此 VGCCs 一直是诊断和治疗很多重要疾病的关键靶点, 对其门控特性和阻断剂的研究在相关疾病治疗药物的筛选和研发中具有重要意义<sup>[3-5]</sup>。

作为体内表达最丰富的离子通道之一, VGCCs 具

有多种选择性剪接变体, 以适应它们在体内的分布和功能需求。通常根据激活阈值不同, VGCCs 可分为高压激活钙离子通道 (high voltage-activated, HVA) 和低压激活钙离子通道 (low voltage-activated, LVA)。 $\alpha1$  亚基作为主亚基, 决定了 VGCCs 的激活阈值以及介导的电流类型, 是形成 VGCCs 亚型的主要决定因素。目前的研究表明, 哺乳动物的  $\alpha1$  亚基由 10 个基因编码, 因此根据序列同源性又将 VGCCs 分为 10 种不同的亚型:  $Ca_v1.1\sim1.4$ 、 $Ca_v2.1\sim2.3$ 、 $Ca_v3.1\sim3.3$ <sup>[6]</sup> (图 1)。除  $Ca_v3$  为主亚基单独行使功能外,  $Ca_v1$  和  $Ca_v2$  均由  $\alpha1$  主亚基与  $\alpha2\delta$  和  $\beta$  两个辅助亚基共同组成异源多聚体行使通道功能 ( $Ca_v1.1$  组成中还包括  $\gamma$  亚基)<sup>[7]</sup>。其中,  $\alpha1$  亚基形成  $Ca^{2+}$  选择性孔道, 行使通道的主要功能, 是第二信使 (如  $Ca^{2+}$ 、cAMP)、药物和毒素调节通道的主



**Figure 1** Classification and nomenclature of voltage-gated calcium channels (VGCCs). VGCCs were historically first divided into high voltage-activated (HVA) and low voltage-activated (LVA) calcium channels according to their activation threshold. Based on the types of  $Ca^{2+}$  current, VGCCs are categorized into 5 members (L-, P/Q-, N-, R- and T-types VGCCs). The latest research indicated that VGCCs could be further classified into three sub families based on  $\alpha1$  subunit homology ( $Ca_v1$ ,  $Ca_v2$ , and  $Ca_v3$ )

要靶点<sup>[8]</sup>;  $\alpha 2\delta$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  为辅助亚基, 具有辅助通道转运、调节通道门控特性等功能<sup>[9-11]</sup>。虽然所有 VGCCs 亚型都具有相似的  $\alpha 1$  主亚基结构, 但是它们的门控特性、对药物的敏感性以及在体内的分布、功能等却截然不同, 如  $Ca_v 1$  广泛分布于心肌、骨骼肌和平滑肌等组织, 其阻断剂二氢吡啶类药物被用于治疗心绞痛和高血压;  $Ca_v 2$  属于神经元型 VGCCs, 主要分布于中枢和外周神经系统, 参与突触分化和快速神经递质释放;  $Ca_v 3$  分布于神经元和其他可兴奋细胞, 介导 T 型  $Ca^{2+}$  电流, 在精神疾病治疗中具有潜在作用<sup>[12]</sup>。

$Ca_v 2.2$  又称为 N-型电压门控钙离子通道, 属于高压激活的钙离子通道亚型, 主要分布于中枢和外周神经元, 是突触前神经末梢主要表达的钙离子通道亚型之一, 通过介导  $Ca^{2+}$  内流, 触发神经递质释放和突触前短期可塑性<sup>[13]</sup>。因其在疼痛通路的初级传入突触中起主导作用, 已成为慢性疼痛治疗的重要药物靶点<sup>[14,15]</sup>。研究发现, 敲除  $Ca_v 2.2$  能使小鼠对炎症性和神经性疼痛的疼痛敏感性降低, 而产生不良反应的水平相较敲除其余亚型更轻<sup>[16]</sup>;  $Ca_v 2.2$   $\alpha 1$  亚基的孔道阻滞剂齐考诺肽 ( $\omega$ -芋螺毒素 MVIIA) 治疗顽固性疼痛的效果是吗啡的 1 000 倍, 且无成瘾性<sup>[17]</sup>。以上研究结果表明, 靶向阻断  $Ca_v 2.2$  功能的先导化合物在疼痛治疗过程中的应用可能比传统的阿片受体激动剂类药物具有更大的潜力。自然界有多种有毒生物, 其毒液组分中存在靶向  $Ca_v 2.2$  的活性化合物, 丰富的毒素资源为靶向  $Ca_v 2.2$  先导药物筛选和发现提供了便利, 但是目前仅极少数  $Ca_v 2.2$  阻滞剂进入临床研究, 开发潜力巨大<sup>[18]</sup>。新药筛选模型匮乏以及很多传统方法在用于药物筛选时针对性差、筛选速度慢、精确度不足等原因导致天然药物开发速度慢, 因此急需建立一种方便可靠的药物筛选方法用于  $Ca_v 2.2$  靶向药物先导物的发掘和功能活性评估。

电生理技术 (electrophysiological techniques) 从诞生开始便广泛用于受体和配体的构效关系研究, 被认为是研究离子通道的黄金标准<sup>[19]</sup>。其中, 应用于非洲爪蟾卵母细胞的双电极电压钳技术 (two electrode voltage clamp, TEVC) 具有可操作性强、重复性好等优点, 一直是研究转运体和离子通道的重要手段, 至今仍广泛应用于从细胞层面研究受体的功能和结构、配体-受体相互作用关系、针对特异性受体的先导化合物开发等领域。本研究基于非洲爪蟾卵母细胞进行  $Ca_v 2.2$  的体外功能性表达, 针对钙离子通道体外表达困难、通道电流检测技术复杂等难题进行了优化, 并使用双电极电压钳技术分析受体的功能特征, 旨在建立一种稳定的 VGCCs 电生理药物筛选模型, 为多肽和小

分子药物先导物的开发、筛选和作用机制研究提供可靠的工具和平台。

## 材料与方法

**实验材料** 包含大鼠 (rat, r) VGCC  $\alpha 1B$ 、 $ra2\delta 1$  (Addgene plasmid #26575) 和  $r\beta 3$  (Addgene plasmid #26574) 亚基 cDNA 的质粒获赠于 Diane Lipscombe; 雌性非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 购于中国科学院昆明动物研究所, 实验室 17 °C 养殖 6 个月以上可用于卵母细胞分离, 本研究中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)。

**实验试剂** 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞 (货号: C502-02) 和质粒提取试剂盒 (货号: DC201-01) 购于南京诺唯赞生物科技有限公司; 500~9 000 bases ssRNA ladder (货号: N0362S) 和限制性内切酶 *Ase I* (货号: R0526V) 购于美国 NEB 公司; 限制性内切酶 *EcoR I* (货号: 1040S) 和 *Apa I* (货号: 1005S)、DL10 000 DNA marker (货号: 3584A) 和 DNA 片段纯化试剂盒 (货号: 9761) 购于宝日医生物科技 (北京) 有限公司; mMES-SAGE mMACHINE<sup>®</sup> T7 体外转录试剂盒 (货号: AM1344) 和 MEGAclean<sup>™</sup> 转录纯化试剂盒 (货号: AM1908) 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 1,2-双(2-氨基苯氧基)乙烷-*N,N,N',N'*-四乙酸四酯 (BAPTA-AM) (货号: B115502)、丙酮酸 (货号: P104136)、四乙基氢氧化铵 (TEAOH) (货号: T434179) 购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 4S Red Plus 核酸染料 (货号: A606695)、HEPES (货号: A100511)、硫酸庆大霉素 (货号: A100304)、氨苄西林 (货号: A61002)、硫酸链霉素 (货号: A610494)、青霉素 G 钠盐 (货号: A600135) 购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 胶原蛋白酶 A (货号: COLLA-RO) 购于美国 Sigma-Aldrich 公司。其他生化试剂均为国产分析纯。

OR-2 缓冲液: 82.5 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、2.0 mmol·L<sup>-1</sup> KCl、1.0 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、5 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES, pH 7.5; ND-96 缓冲液: 96.0 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、2.0 mmol·L<sup>-1</sup> KCl、1.0 mmol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>、1.0 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、5.0 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES、5.0 mmol·L<sup>-1</sup> 丙酮酸, pH 7.5<sup>[20]</sup>。

**实验仪器** PowerPac Basic 小型电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); FluorChem E 凝胶成像系统 (美国 ProteinSimple 公司); Nanodrop One 微量分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); KCL-2000 恒温恒湿培养箱 (日本 EYELA 公司); NANOJECT II 显微注射仪 (美国 Drummond 公司); Oocyte Clamp OC-725D 信号放大器 [美国 Warner (Harvard) 公司]; P-1000 微电极控制仪、Dendrite<sup>™</sup> 数模转换器 (美国 Sutter 公司)。

**目的基因质粒的提取** 分别将含有  $\alpha 1B$  基因质粒的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株、含有  $\alpha 2\delta 1$  和  $r\beta 3$  基因质粒的 Top10F' 菌株使用平板划线法接种于 Amp<sup>+</sup> LB 固体培养基并置于 37 °C 培养 18 h, 挑取单个菌落接种于 30 mL Amp<sup>+</sup> LB 液体培养基, 37 °C、220 r·min<sup>-1</sup> 扩大培养 14 h 后, 使用质粒提取试剂盒分别提取载有目的基因的质粒。所有质粒通过超微量分光光度计及琼脂糖凝胶电泳分析其浓度和纯度, 并通过 DNA 测序 [生工生物工程(上海)股份有限公司] 进行鉴定。

**目的基因 cRNA 的制备** 分别使用限制性内切酶 *Ase I*、*Apa I* 和 *EcoR I* 对含  $\alpha 1B$ 、 $\alpha 2\delta 1$  和  $r\beta 3$  亚基基因的质粒进行酶切, 线性化产物使用 DNA 片段纯化试剂盒回收, 并使用超微量分光光度计及琼脂糖凝胶电泳鉴定回收产物。以线性化质粒为模板, 使用 T7 体外转录试剂盒制备对应亚基的 cRNA, 转录体系为: 10  $\mu$ L 2 $\times$ T7 NTP/CAP; 2  $\mu$ L 10 $\times$ T7 reaction buffer; 1  $\mu$ L T7 GTP; 2  $\mu$ L T7 enzyme mix; 线性质粒模板 1.0~1.5  $\mu$ g; 无酶水补足至 20  $\mu$ L。37 °C 反应 10 h ( $\alpha 2\delta 1$  和  $r\beta 3$  亚基 cRNA 反应 10 h,  $\alpha 1B$  亚基 cRNA 反应 7、10 和 16 h) 后加入 2  $\mu$ L TURBO DNase 继续反应 30 min 消除质粒模板。转录终产物 cRNA 经纯化回收后, 使用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测其浓度和纯度。

**卵母细胞的获取及显微注射** 取一只性成熟的雌性非洲爪蟾, 冰浴麻醉 60 min 使其完全麻痹后, 在其右下腹手术取出适量卵母细胞, 置于含 0.6 g·L<sup>-1</sup> 胶原酶的 OR-2 溶液中, 室温下震荡酶解 30~50 min, 待大部分细胞团块散开为单独细胞时, 使用 OR-2 溶液清洗卵母细胞 8~10 次停止酶解反应<sup>[21]</sup>。在显微镜下筛选出状态良好的 V-VI 期卵母细胞, 温度 17 °C、湿度 35% 条件下, 于含青霉素 10  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>、链霉素 10  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>、庆大霉素 100  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 的 ND-96 溶液中培养 12 h 后用于注射。

将  $\alpha 1B$ 、 $\alpha 2\delta 1$  和  $r\beta 3$  亚基的 cRNA 按照质量比 2:1:1 混合后, 每个细胞 50.6 nL (cRNA 注射量约为 50 ng) 显微注射入卵母细胞。注射完成的卵母细胞置于含抗 ND-96 溶液中, 温度 17 °C、湿度 35% 培养 3~5 天后用于电生理检测。

**电生理检测** 记录前将诱导表达 Ca<sub>v</sub>2.2 的卵母细胞置于含 100  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> BAPTA-AM 的灌流液中孵育 2 或 4 h, 螯合细胞内部游离 Ca<sup>2+</sup>, 消除内源性 Ca<sup>2+</sup> 激活的氯离子通道电流 (calcium-activated chloride channel, CaCC)<sup>[22]</sup>。电生理检测过程中, 将卵母细胞置于细胞槽中 (约 50  $\mu$ L), 以 3 mL·min<sup>-1</sup> 的速度进行持续灌流, 灌流液组成为 5.0 mmol·L<sup>-1</sup> BaCl<sub>2</sub>、85.0 mmol·L<sup>-1</sup> TEAOH、5.0 mmol·L<sup>-1</sup> KCl 和 5.0 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES, 使

用甲烷磺酸调 pH 至 7.4, 其中 TEAOH 用于阻断内源性钾离子通道, 并以钡离子 (Ba<sup>2+</sup>) 代替 Ca<sup>2+</sup> 作为电荷载体<sup>[20]</sup>。使用水平拉针仪拉制用于钳制卵母细胞的玻璃微电极, 填充 3 mol·L<sup>-1</sup> KCl 溶液后电极电阻为 0.4~2.0 M $\Omega$ 。将卵母细胞钳制在 -100 mV, 每 10 s 给予一次 200 ms 阶跃去极化至 0 mV 的电压刺激, 使用 Dendrite<sup>TM</sup> 数模转换器和 OC-725D 信号放大器记录内向 Ba<sup>2+</sup> 电流 ( $I_{Ba}$ ), 当重复去极化引起的峰值电流稳定且误差小于 2% 时, 开始后续实验<sup>[23]</sup>。使用 Igor Pro 9.00 软件监测电流幅度, 采样频率为 10 kHz, 过滤频率为 1 kHz, 采用 P/4 漏减方案消除漏电流<sup>[24]</sup>。

**数据处理** 使用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行分析。采用 Boltzmann 方程  $\frac{G}{G_{\max}}$  =

$$\frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V - V_{0.5, \text{act}}}{k}\right)}$$

拟合 Ca<sub>v</sub>2.2 的稳态激活曲线, 其中  $G$  是全细胞通道电导, 以公式  $G = I/(V - V_{\text{rev}})$  计算;  $V$  是测试电位;  $V_{\text{rev}}$  是反转电位;  $I$  是不同测试电位诱发的电流;  $G_{\max}$  是 Ca<sub>v</sub>2.2 的最大电导;  $V_{0.5, \text{act}}$  是半最大激活电位 (half-maximal activation voltage);  $k$  是斜率因子。稳态激活曲线图中  $G/G_{\max}$  为平均数  $\pm$  标准误 (mean  $\pm$  SEM)。

$$\text{采用 Boltzmann 方程 } \frac{I}{I_{\max}} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V - V_{0.5, \text{inact}}}{k}\right)}$$

拟合 Ca<sub>v</sub>2.2 的稳态失活曲线。其中  $I$  是预刺激电位充分失活后测试电位诱发的电流;  $I_{\max}$  是 Ca<sub>v</sub>2.2 激活的最大电流;  $V$  是预刺激电位;  $V_{0.5, \text{inact}}$  是半最大失活电位 (half-maximal inactivation voltage);  $k$  是斜率因子。稳态失活曲线图中  $I/I_{\max}$  为平均数  $\pm$  标准误 (mean  $\pm$  SEM)。

采用双指数函数  $I = I_{\max} + A_1(1 - e^{-t/\tau_f}) + A_2(1 - e^{-t/\tau_s})$  拟合 Ca<sub>v</sub>2.2 的失活时间过程曲线和失活恢复曲线。其中,  $I$  是失活 (恢复) 不同时间的电流;  $I_{\max}$  是峰值电流 (预刺激电位诱发的峰值电流);  $t$  是失活 (恢复) 时间;  $\tau_f$  是快失活 (恢复) 时间常数,  $\tau_s$  是慢失活 (恢复) 时间常数。曲线图中  $I/I_{\max}$  为平均数  $\pm$  标准误 (mean  $\pm$  SEM)。

## 结果

### 1 质粒提取及酶切线性化

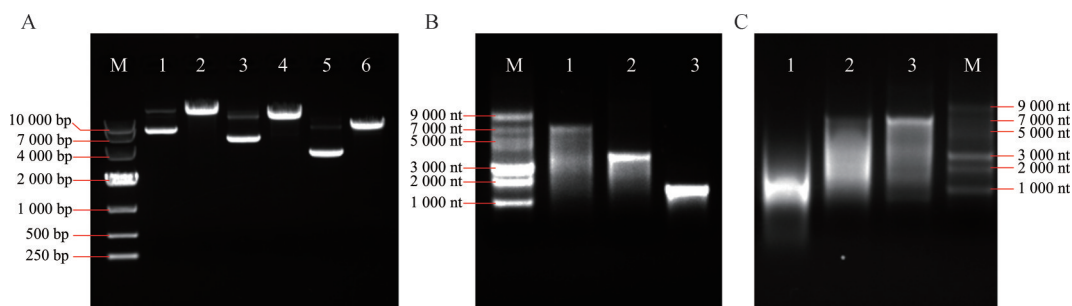
使用质粒小量提取试剂盒提取的  $\alpha 1B$ 、 $\alpha 2\delta 1$  和  $r\beta 3$  亚基质粒浓度分别为 0.12、0.50 和 0.39 g·L<sup>-1</sup>,  $A_{260}/A_{280}$  值均位于 1.8~1.9 之间, 1% 琼脂糖凝胶电泳条带显示质粒较纯净, 符合后续实验要求。经过测序验证,

各亚基基因编码序列均无异常突变,与鼠源野生型一致。

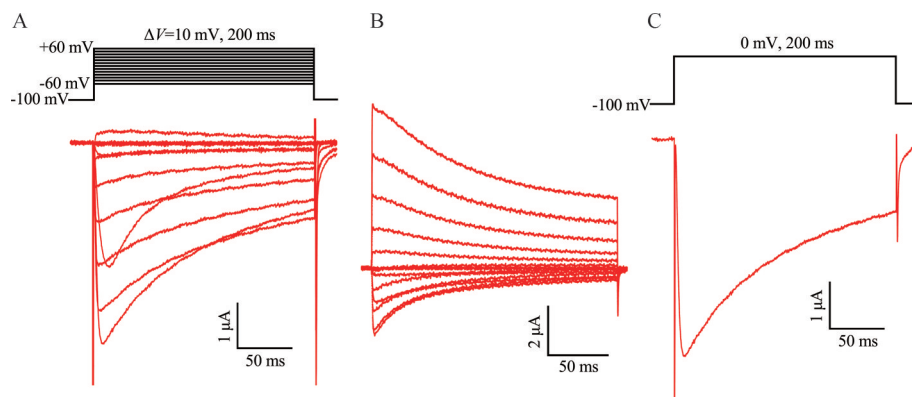
限制性内切酶酶切使质粒线性化用作RNA体外转录模板。经过纯化后,所有线性化质粒浓度均大于 $0.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ,经0.6%琼脂糖凝胶电泳检测,所有亚基质粒酶切完全,线性化模板回收纯度高,符合体外转录要求(图2A)。以线性化质粒为模板,使用T7体外转录试剂盒制备 $\alpha 1\text{B}$ 、 $\alpha 2\delta 1$ 和 $\text{r}\beta 3$ 亚基的cRNA,纯化后浓度分别为0.89、1.61和0.91  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。使用1.2%琼脂糖凝胶120 V运行25 min对制备的cRNA进行验证,凝胶结果显示,用于构成 $\text{Ca}_v 2.2$ 的 $\alpha 1\text{B}$ 、 $\alpha 2\delta 1$ 和 $\text{r}\beta 3$ 亚基的cRNA条带较为明显,且与3种亚基基因的理论编码长度对应(图2B)。其中, $\alpha 1\text{B}$ 亚基cRNA凝胶条带较 $\alpha 2\delta 1$ 和 $\text{r}\beta 3$ 亚基cRNA弥散严重,由于其长度超过7.1 kb,体外转录较难获得高品质的cRNA,反应时间为7和16 h时体外转录产物中完整cRNA的比例均不高,反应时间控制为10 h时成功获得长度较为完整的 $\alpha 1\text{B}$ 亚基cRNA(图2C)。

## 2 $\text{Ca}_v 2.2$ 电生理筛选模型的建立和检测

将 $\alpha 1\text{B}$ 、 $\alpha 2\delta 1$ 和 $\text{r}\beta 3$ 亚基的cRNA按照质量比2:1:1混合后,以每细胞50.6 nL的体积显微注射进入卵母细胞,诱导表达4天后卵母细胞状态良好。设置卵母细胞钳制电位为 $-100 \text{ mV}$ ,以10 mV为增量,分别给予细胞从 $-60 \text{ mV}$ 至 $+60 \text{ mV}$ 的一系列持续200 ms的去极化电位刺激,每次刺激间隔10 s,记录 $\text{Ca}_v 2.2$ 的稳态激活电流。结果表明,使用BAPTA-AM孵育2 h时, $\text{Ca}^{2+}$ 未能被充分整合,由于CaCC电流干扰,卵母细胞在一系列电位刺激下产生大量外向电流,当孵育时间为4 h时,卵母细胞在一系列电位刺激下产生稳定内向电流(其中 $+60 \text{ mV}$ 去极化刺激 $\text{Ca}_v 2.2$ 介导的电流反转)(图3A、B)。由去极化至0 mV时 $\text{Ca}_v 2.2$ 的电流轨迹可知,当给予细胞去极化脉冲时,通道被快速激活并产生内向电流,10 ms左右电流达到峰值,随后进入缓慢失活状态,持续200 ms后仍有约33%的尾电流,符合与亚型为 $\alpha 2\delta 1$ 和 $\text{r}\beta 3$ 的辅助亚基共表达时 $\text{Ca}_v 2.2$ 介导的电流特征,表明 $\text{Ca}_v 2.2$ 在卵母细胞上表达



**Figure 2** Identification of plasmids, linearized products and cRNAs of  $\alpha 1\text{B}$ ,  $\alpha 2\delta 1$  and  $\text{r}\beta 3$  subunits by agarose gel electrophoresis. A: M: DL10 000 DNA marker; 1: Plasmid encoding  $\alpha 1\text{B}$  subunit; 2: Linearized plasmid encoding  $\alpha 1\text{B}$  subunit; 3: Plasmid encoding  $\alpha 2\delta 1$  subunit; 4: Linearized plasmid encoding  $\alpha 2\delta 1$  subunit; 5: Plasmid encoding  $\text{r}\beta 3$  subunit; 6: Linearized plasmid encoding  $\text{r}\beta 3$  subunit; B: M: 500–9 000 bases ssRNA ladder; 1: cRNA of  $\alpha 1\text{B}$  subunit; 2: cRNA of  $\alpha 2\delta 1$  subunit; 3: cRNA of  $\text{r}\beta 3$  subunit; C: 1:  $\alpha 1\text{B}$  subunit cRNA obtained by transcription for 7 h; 2:  $\alpha 1\text{B}$  subunit cRNA obtained by transcription for 16 h; 3:  $\alpha 1\text{B}$  subunit cRNA obtained by transcription for 10 h; M: 500–9 000 bases ssRNA ladder

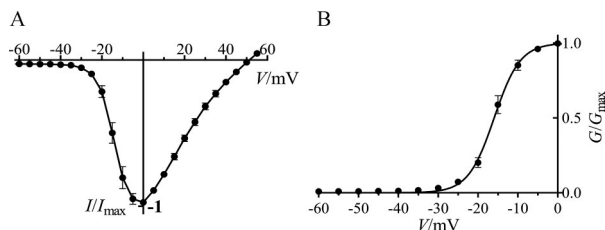


**Figure 3** Electrophysiological evaluation of  $\text{Ca}_v 2.2$  expressed in oocytes. A, B: The steady-state activation current of  $\text{Ca}_v 2.2$  induced by a series of 200 ms depolarizing pulses from  $-60 \text{ mV}$  to  $+60 \text{ mV}$  in 10 mV increments after incubation with  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BAPTA-AM for 4 h (A) or 2 h (B); C: The current of  $\text{Ca}_v 2.2$  induced by 0 mV depolarizing pulse after incubation with  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BAPTA-AM for 4 h

成功<sup>[25]</sup>。

### 3 Ca<sub>v</sub>2.2 稳态激活的电压依赖性分析

将卵母细胞钳制于-100 mV, 每隔 10 s 给予一次持续 200 ms 的测试电位, 每次去极化刺激中测试电位以 5 mV 为增量从-60 mV 逐步去极化至+60 mV, 记录在不同测试电位刺激下产生的内向电流并研究 Ca<sub>v</sub>2.2 稳态激活的电压依赖性。以  $I/I_{\max}$  为纵坐标, 测试电位  $V$  为横坐标, 绘制 Ca<sub>v</sub>2.2 的  $I-V$  曲线用于表征 Ca<sub>v</sub>2.2 去极化激活的电压依赖性。检测结果显示, 通道在-30 mV 测试电位刺激下开始开放, 0 mV 时达到最大开放, 当测试电位大于+50 mV 后电流反转为外向电流 (图 4A)。计算全细胞通道电导  $G$ , 以  $G/G_{\max}$  为纵坐标, 测试电位  $V$  为横坐标, 绘制稳态激活曲线, 使用 Boltzmann 方程拟合后获得 Ca<sub>v</sub>2.2 的  $V_{0.5,act}$  为-15.9 mV (图 4B)。

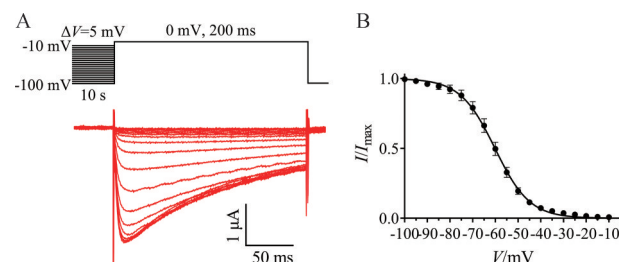


**Figure 4** Voltage dependence analysis of steady-state activation of Ca<sub>v</sub>2.2. A: The  $I-V$  curve of Ca<sub>v</sub>2.2 obtained by fitting the activation currents induced by different test potentials; B: Steady-state activation curve of Ca<sub>v</sub>2.2. The results were normalized to the conductance-voltage ( $G/I$ ) relationship, and the curve fits to Boltzman equation.  $n = 8, \bar{x} \pm \text{SEM}$

### 4 Ca<sub>v</sub>2.2 稳态失活的电压依赖性分析

电压门控离子通道的  $V_{0.5,inact}$  能很好地表征通道失活的电压依赖性, 通常在表征药物或者功能性突变对通道门控电压依赖性的影响时具有重要意义。体外表达的 Ca<sub>v</sub>2.2 不具有 Ca<sup>2+</sup> 依赖性失活机制, 其失活受 Ca<sup>2+</sup> 的影响较小, 使用 Ba<sup>2+</sup> 代替 Ca<sup>2+</sup> 作为电荷载体或使用螯合剂螯合胞内 Ca<sup>2+</sup> 均不会明显改变 Ca<sub>v</sub>2.2 的失活特性<sup>[26]</sup>。研究 Ca<sub>v</sub>2.2 的稳态失活时, 设置钳制电位为-100 mV, 以每次 5 mV 为增量给予细胞从-100 mV 至-10 mV 持续 10 s 的预刺激使通道充分失活, 随即给予 0 mV 测试电位维持 200 ms, 记录不同预刺激条件下剩余的通道电流<sup>[27]</sup> (图 5A)。电生理检测结果表明, 预刺激电位为-100 mV 时 Ca<sub>v</sub>2.2 尚未失活, 此时响应测试电位的通道开放达到最大, 并设置此时峰值电流为最大开放电流  $I_{\max}$ , 随着预刺激电位逐步上升, 失活通道的比例增大, 当预刺激电位升至-30 mV 以上时 Ca<sub>v</sub>2.2 完全失活, 用测试电位刺激时通道产生的内向

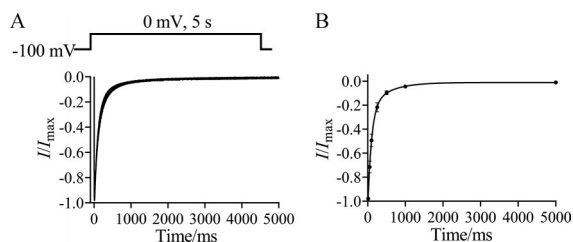
电流不明显 (图 5B)。以  $I/I_{\max}$  为纵坐标, 预刺激电位  $V$  为横坐标, 绘制 Ca<sub>v</sub>2.2 的稳态失活曲线, 使用 Boltzmann 方程拟合获得 Ca<sub>v</sub>2.2 的  $V_{0.5,inact}$  为-60.2 mV。



**Figure 5** Voltage dependence analysis of steady-state inactivation of Ca<sub>v</sub>2.2. A: Steady-state inactivation current traces of Ca<sub>v</sub>2.2 elicited by a 0 mV test potential after a series of 10 s prepulses ranging from -100 mV to -10 mV in 5 mV increments; B: Steady-state inactivation curve of Ca<sub>v</sub>2.2. The electrophysiological results were fitted by Boltzman equation.  $n = 6, \bar{x} \pm \text{SEM}$

### 5 Ca<sub>v</sub>2.2 稳态失活的时间过程分析

由于通道的失活时间进程加速或减慢均会影响通道功能行使, 进而引发胞内 Ca<sup>2+</sup> 稳态破坏, 因此失活动力学也是研究通道功能的重要指征之一。设置细胞钳制电位为-100 mV, 记录持续给予 5 000 ms 的 0 mV 测试电位时 Ca<sub>v</sub>2.2 的失活过程。以去极化刺激期间产生的内向峰值电流为  $I_{\max}$ , 将曲线归一化为  $I/I_{\max}$ , 绘制的 Ca<sub>v</sub>2.2 失活时间过程曲线。由图可知, 在持续去极化至 2 000 ms 时通道几乎完全失活, 不再产生明显内向电流 (图 6A)。去极化 10、50、100、250、500、1 000、5 000 ms 的剩余电流百分比分别为 97.9%、71.5%、49.4%、21.8%、9.6%、4.5%、1.1%。使用双指数函数拟合获得 Ca<sub>v</sub>2.2 的快失活时间常数  $\tau_f=99.6$  ms, 慢失活时间常数  $\tau_s=515.3$  ms<sup>[28]</sup> (图 6B)。Ca<sub>v</sub>2.2 与 Ca<sub>v</sub>1 亚家族相比失活更快, 如 Ca<sub>v</sub>1.3 通道在去极化刺激开放持续 1 000 ms 时仍有约 57.4% 的剩余电流<sup>[29]</sup>。因此, 在研究 Ca<sub>v</sub>2.2 稳态失活的电压依赖性时, 为保证在预刺激电位下通道能充分失活, 预刺激的维持时间需要足够长。



**Figure 6** Kinetic analysis of Ca<sub>v</sub>2.2 inactivation. A: Inactivation time course of Ca<sub>v</sub>2.2 during 5 s depolarizing pulses to 0 mV starting from a holding potential of -100 mV; B: Analysis of inactivation process of Ca<sub>v</sub>2.2. The results were fitted by a double exponential function.  $n = 7, \bar{x} \pm \text{SEM}$

## 6 $\text{Ca}_v2.2$ 从稳态失活中恢复的时间依赖性分析

VGCCs 具有 3 个功能状态: 静息态、开放态和失活态, 失活状态能防止通道持续开放, 避免了神经递质的持续释放或者肌细胞发生强直收缩。处于失活状态的通道不能被激活, 需要恢复一段时间才能脱离失活状态, 再次响应去极化刺激恢复开放。在研究  $\text{Ca}_v2.2$  从稳态失活中的恢复时, 首先给予细胞持续 5 s 的 0 mV 预刺激电位使通道完全失活, 随后将细胞钳制于 -100 mV 使通道恢复不同时长后再给予持续 200 ms 的 0 mV 测试电位, 记录通道恢复 1、3、10、30、100、300、600 ms、1、1.5、2、3、4、6、8、10、15、20 s 后产生的内向电流<sup>[10]</sup> (图 7A)。并通过双指数函数拟合  $\text{Ca}_v2.2$  的失活-恢复曲线, 分析失活恢复过程中通道的开放比例与恢复时长的关系<sup>[30]</sup>。根据失活-恢复曲线分析得到,  $\text{Ca}_v2.2$  失活后恢复的快时间常数  $\tau_f=287.3$  ms, 慢时间常数  $\tau_s=2\ 723$  ms (图 7B)。

## 讨论

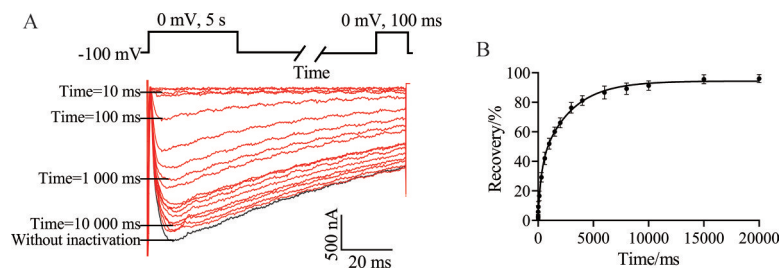
$\text{Ca}_v2.2$  广泛分布于中枢和外周神经系统, 因能介导疼痛信号传导以及受 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs) 调节而被广泛研究, 其阻断剂是治疗神经痛 (慢性痛) 等重大疾病的潜在药物<sup>[31, 32]</sup>。作为一种神经型 VGCCs 亚型,  $\text{Ca}_v2.2$  参与精确控制神经递质的释放, 研究其门控功能对突触可塑性的机制探索具有重要意义。然而无论是药物活性评估还是受体功能研究都极其依赖可靠的药物筛选手段,  $\text{Ca}_v2.2$  新药筛选模型由于体外表达困难、通道电流检测技术复杂等原因较为缺乏, 导致其阻断药物开发缓慢。因此, 本研究针对  $\text{Ca}_v2.2$  体外表达的难点进行优化, 寻找  $\text{Ca}_v2.2$  稳定表达的方法, 并从激活、失活以及失活恢复等方面表征  $\text{Ca}_v2.2$  的门控功能, 以建立全面可靠的  $\text{Ca}_v2.2$  新药筛选模型。

非洲爪蟾卵母细胞具有丰富的 rRNA 和 tRNA 以及多种内源性信号转导因子, 是一种较为理想的膜蛋白体外表达系统。与哺乳动物表达系统相比, 卵母细

胞中离子通道的表达量更高, 一般诱导表达 3~5 天就能获得  $\mu\text{A}$  级别的电流。与高通量筛选系统 (如 FLIPR) 相比, 能够做到利用 cRNA 在单一细胞中快速表达某种特定受体, 并对电压和电流进行精确的控制和检测记录, 具有灵活性强、数据准确度高等特点。然而, 当将该系统用于 VGCCs 的体外表达研究时, 其内源性 CaCC 以及内源性钾离子通道会严重干扰 VGCCs 的电流检测, 因此在进行 VGCCs 电生理记录时需要消除这些内源性离子通道的影响<sup>[33, 34]</sup>。

本研究采用了 3 种措施消除 CaCC 及钾离子通道的影响: ① 电生理记录前, 使用  $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  快速钙螯合剂 BAPTA-AM 与卵母细胞共孵育 4 h, 以螯合细胞内的  $\text{Ca}^{2+}$ , 消除 CaCC 电流; ② 使用  $\text{Ba}^{2+}$  取代  $\text{Ca}^{2+}$  作为电荷载体, 可以降低  $\text{Ca}^{2+}$  进入细胞后对 CaCC 的激活, 同时  $\text{Ba}^{2+}$  具有钾离子通道阻断活性; ③ 在灌流液中加入 TEAOH, 实现钾离子通道的完全阻断<sup>[35, 36]</sup>。选择膜透性螯合剂 BAPTA-AM, 通过孵育的形式螯合卵母细胞内部  $\text{Ca}^{2+}$ , 相较注射形式能极大减少螯合过程对细胞膜的损伤。但是, 当使用  $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BAPTA-AM 进行孵育时, 螯合时间相较注射形式会更长, 若孵育时间过短, 胞内  $\text{Ca}^{2+}$  螯合不彻底, 仍会有部分 CaCC 电流干扰  $\text{Ca}_v2.2$  电流检测, 而孵育时间过长则会使蛙卵质量下降。本研究发现, 孵育时间为 4 h 时能达到最佳螯合效果, 此时卵母细胞状态良好, 给予细胞从 -60 mV 至 +60 mV 的一系列去极化测试电位能准确记录  $\text{Ca}_v2.2$  的稳态激活电流 (图 3A、B)。

针对  $\text{Ca}_v2.2$  表达困难的问题, 本研究发现 *ralB* 亚基 cRNA 的质量为影响  $\text{Ca}_v2.2$  表达的关键。在进行 *ralB* 亚基的体外转录时, 首先参考试剂盒说明书, 将转录时间控制为 4 h, 经琼脂糖凝胶电泳检测转录后的纯化产物 (cRNA), 发现条带呈弥散状且无明显主条带。利用该条件下制备的 cRNA 进行显微注射和卵母细胞电生理检测, 也未检测到电流。判断可能是 cRNA 质量影响了受体表达。考虑到目的基因长度较长 (7.1 kb), 本研究优化了体外转录体系, 加入了 GTP 并延长了反应



**Figure 7** Time-dependent analysis of  $\text{Ca}_v2.2$  recovery from steady-state inactivation. A: The current of  $\text{Ca}_v2.2$  showing recovery from inactivation caused by 5 s pre-stimulation. Red: Current obtained by different recovery time; Black: Current without pre-stimulation inactivation; B: The  $\text{Ca}_v2.2$  recovery time course was fitted to a double exponential function.  $n = 7, \bar{x} \pm \text{SEM}$

时间。保证反应体系一致的情况下,将体外转录的时间分别调整到7、10、16 h。结果发现,反应7 h时的转录产物条带弥散严重,推测是由于转录时间较短,产物中主要为未完全合成的cRNA片段,而反应16 h的转录产物的电泳条带中,存在目的cRNA条带但明显少于10 h转录产物,推测是由于时间过长、RNA不稳定而导致cRNA降解(图2C)。10 h转录过程在3种时间方案中获得转录产物效果最佳,但仍由于RNA不稳定、易降解,以及长片段RNA体外转录过程中出现未完全合成的片段产物等原因,存在一定程度条带弥散现象。在进行Ca<sub>v</sub>2.2的表达时,参考文献<sup>[25]</sup>研究,先采用了1:1:1的质量比进行3种亚基cRNA的混合。显微注射后,在培养的过程中,检测受体的表达情况。结果发现,培养5天后,电流仍然非常小,受体表达情况不好。考虑到 $\alpha 1B$ 作为主要亚基,本研究提高了该亚基的注射量,调整质量比为2:1:1。在该比例条件下,Ca<sub>v</sub>2.2的表达效率显著提高,注射后培养3~5天,在相同条件下,受体表达的电流量可达到1~5  $\mu A$ 。

Ca<sub>v</sub>2.2的门控特性对突触功能的正常行使具有重要意义,尤其在外周神经系统的信号传递过程中,该通道去极化激活的电压依赖性突触前终末兴奋性的关键,而稳态失活则在很大程度上决定了通道对Ca<sup>2+</sup>的透过作用,进而直接影响突触效率<sup>[37]</sup>。在表征通道的门控功能时,稳态激活曲线左移、稳态失活曲线右移、激活开放速度加快及失活关闭速度减慢等特征都表示通道功能增强并介导更多的Ca<sup>2+</sup>内流,反之则表示通道功能减弱,Ca<sup>2+</sup>内流减少<sup>[10]</sup>。体内的选择性剪接或者功能性突变都会影响Ca<sub>v</sub>2.2门控特性,通常为了满足不同分布和功能需求,Ca<sub>v</sub>2.2的激活和失活会在辅助亚基的调节下表现出一定的差异,但是当异常突变使通道的门控特性发生变化时,常常会引起细胞内钙稳态的破坏,从而导致疾病的发生<sup>[38-40]</sup>。

Ca<sub>v</sub>2.2属于高压激活的VGCCs,具有复杂的失活机制,其失活最快时通道并非处于完全去极化激活的状态,而是处于静息闭合与激活开放的中间状态,这种独特的失活机制被称为闭态失活<sup>[41]</sup>。为防止闭态失活影响电流的记录,应确保钳制电位下Ca<sub>v</sub>2.2不受闭态失活影响。本研究电生理记录过程中,将卵母细胞膜电位钳制在-100 mV,通过给予0 mV测试电位后获得了典型的去极化激活Ca<sub>v</sub>2.2内向电流轨迹,该方法能获得通道的最大开放电流,常用于药物活性的筛选以及剂量响应曲线的绘制<sup>[42]</sup>。

在药物的筛选过程中, $V_{0.5,act}$ 和 $V_{0.5,inact}$ 变化也能直观地体现药物对离子通道电压依赖性的影响,是评估药物作用效果的两个重要参数。2004年,Yasuda等<sup>[25]</sup>

的研究表明,大鼠的主亚基 $\alpha 1B$ 与辅助亚基 $\alpha 2\delta 1$ 、 $\beta 3$ 共表达时,在 $\beta 3$ 亚基的调节作用下,会导致Ca<sub>v</sub>2.2的闭态失活超极化移动,对Ca<sub>v</sub>2.2的稳态失活电压依赖性具有明显影响。在不同比例的 $\beta 3$ 亚基参与功能性离子通道形成时,Ca<sub>v</sub>2.2的 $V_{0.5,inact}$ 在-80 mV到-45 mV之间。本研究中将大鼠的 $\alpha 1B$ 、 $\alpha 2\delta 1$ 和 $\beta 3$ 亚基cRNA按照质量比2:1:1混合,显微注射入非洲爪蟾卵母细胞,诱导表达后对Ca<sub>v</sub>2.2的稳态失活进行研究,获得Ca<sub>v</sub>2.2的 $V_{0.5,inact}$ 为-60.2 mV;相比之下 $\beta 3$ 亚基对激活影响较小,不同比例的 $\beta 3$ 亚基参与表达时Ca<sub>v</sub>2.2的最大激活电压均为0 mV,反转电位为+50 mV,与本研究结果一致<sup>[25]</sup>。此外,Ca<sub>v</sub>2.2的失活动力学以及从失活中恢复的时间依赖性也是表征通道功能的重要参数,在众多研究中被用于评估药物作用效果。Ca<sub>v</sub>2.2的失活分为快失活和慢失活两种情况,本研究通过双指数函数拟合获得了Ca<sub>v</sub>2.2的失活时间常数( $\tau_f=99.6$  ms,  $\tau_s=515.3$  ms)和失活恢复时间常数( $\tau_f=287.3$  ms,  $\tau_s=2723$  ms),与基于组织细胞膜片钳得到的失活时间常数( $\tau_f=33.8$  ms,  $\tau_s=308.1$  ms)和失活恢复时间常数( $\tau_f=4.36$  s,  $\tau_s=33.8$  s)比较,Ca<sub>v</sub>2.2在卵母细胞上失活更为缓慢,恢复更为快速,推测可能是不同表达体系以及不同辅助亚基等因素影响的结果<sup>[30,43]</sup>。

药物对Ca<sub>v</sub>2.2的特异性作用具有多种方式,既可以通过阻断离子通透孔道直接抑制Ca<sup>2+</sup>的通过,也可以通过调节Ca<sub>v</sub>2.2的门控特性间接影响Ca<sup>2+</sup>的进入<sup>[44]</sup>。本研究建立的Ca<sub>v</sub>2.2新药筛选模型能灵活地用于多肽和小分子新化合物的筛选,以及结合机制研究和可逆性分析等方面。随着国内外研究的不断深入,Ca<sub>v</sub>2.2的冷冻电镜结构已经得到解析,与其特异性拮抗剂齐考诺肽的相互作用机制也得到了进一步的阐明<sup>[27]</sup>。这为VGCCs等电压门控离子通道生理功能的进一步探究提供了重要结构基础,而电生理技术则可以将通道的结构信息和生理功能进行联系,在探究通道和受体构效关系的研究中发挥更加重要的作用。

**作者贡献:** 秦源负责cRNA制备、电生理检测、数据分析、论文撰写;崔城负责质粒提取;于津鹏、罗素兰、朱晓鹏、长孙东亭负责实验设计、过程指导和论文审阅修改。

**利益冲突:** 本文作者声明无任何利益冲突。

## References

- [1] Catterall WA. Voltage-gated calcium channels [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011, 3: a003947.
- [2] Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, et al. The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential [J]. Pharmacol Rev, 2015,

- 67: 821-870.
- [3] Nanou E, Catterall WA. Calcium channels, synaptic plasticity, and neuropsychiatric disease [J]. *Neuron*, 2018, 98: 466-481.
- [4] Cain SM, Snutch TP. Voltage-gated calcium channels and disease [J]. *Biofactors*, 2011, 37: 197-205.
- [5] Andrade A, Brennecke A, Mallat S, et al. Genetic associations between voltage-gated calcium channels and psychiatric disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 3537.
- [6] Catterall WA, Striessnig J, Snutch TP, et al. International union of pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels [J]. *Pharmacol Rev*, 2003, 55: 579-581.
- [7] Dolphin AC. Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology [J]. *J Physiol*, 2016, 594: 5369-5390.
- [8] Hering S, Zangerl-Plessl EM, Beyl S, et al. Calcium channel gating [J]. *Pflugers Arch*, 2018, 470: 1291-1309.
- [9] Tran-Van-Minh A, De Waard M, Weiss N. Cav $\beta$  surface charged residues contribute to the regulation of neuronal calcium channels [J]. *Mol Brain*, 2022, 15: 3.
- [10] Siller A, Hofer NT, Tomagra G, et al.  $\beta$ 2-subunit alternative splicing stabilizes Cav2.3 Ca<sup>2+</sup> channel activity during continuous midbrain dopamine neuron-like activity [J]. *Elife*, 2022, 11: e67464.
- [11] Cassidy JS, Ferron L, Kadurin I, et al. Functional exofacially tagged N-type calcium channels elucidate the interaction with auxiliary  $\alpha$ 2 $\delta$ -1 subunits [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: 8979-8984.
- [12] Kim JW, Shin CY. Deciphering the role of T-type calcium channels in regulating adult hippocampal neurogenesis [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2021, 232: e13643.
- [13] Dolphin AC. Functions of presynaptic voltage-gated calcium channels [J]. *Function (Oxf)*, 2021, 2: zqaa027.
- [14] Patel R, Montagut-Bordas C, Dickenson AH. Calcium channel modulation as a target in chronic pain control [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175: 2173-2184.
- [15] Chen K, Wang T, Li Y, et al. Rhodajaponin VI indirectly targets Cav2.2 channels via N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein to alleviate neuropathic pain [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 13: 1326-1336.
- [16] Saegusa H, Kurihara T, Zong S, et al. Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca<sup>2+</sup> channel [J]. *EMBO J*, 2001, 20: 2349-2356.
- [17] Garber K. Peptide leads new class of chronic pain drugs [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 399.
- [18] Akondi KB, Muttenthaler M, Dutertre S, et al. Discovery, synthesis, and structure-activity relationships of conotoxins [J]. *Chem Rev*, 2014, 114: 5815-5847.
- [19] Kvist T, Hansen KB, Bräuner-Osborne H. The use of *Xenopus oocytes* in drug screening [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2011, 6: 141-153.
- [20] Lewis RJ, Nielsen KJ, Craik DJ, et al. Novel omega-conotoxins from *Conus catus* discriminate among neuronal calcium channel subtypes [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 35335-35344.
- [21] Chen SM, Yu JP, Zhang XF, 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.
- [22] Marcovich I, Moglie MJ, Carpaneto Freixas AE, et al. Distinct evolutionary trajectories of neuronal and hair cell nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Mol Biol Evol*, 2020, 37: 1070-1089.
- [23] Berecki G, Motin L, Haythornthwaite A, et al. Analgesic (omega)-conotoxins CVIE and CVIF selectively and voltage-dependently block recombinant and native N-type calcium channels [J]. *Mol Pharmacol*, 2010, 77: 139-148.
- [24] Liu ZW. Practical Patch Clamp Techniques (实用膜片钳技术) [M]. 2nd ed. Beijing: Beijing Science and Technology Press, 2016: 535.
- [25] Yasuda T, Lewis RJ, Adams DJ. Overexpressed Cav $\beta$ 3 inhibits N-type (Cav2.2) calcium channel currents through a hyperpolarizing shift of ultra-slow and closed-state inactivation [J]. *J Gen Physiol*, 2004, 123: 401-416.
- [26] Jones LP, Demaria CD, Yue DT. N-type calcium channel inactivation probed by gating-current analysis [J]. *Biophys J*, 1999, 76: 2530-2552.
- [27] Dong Y, Gao Y, Xu S, et al. Closed-state inactivation and pore-blocker modulation mechanisms of human Cav2.2 [J]. *Cell Rep*, 2021, 37: 109931.
- [28] Reyes-Vaca A, De La Cruz L, Garduño J, et al. Fast inactivation of Cav2.2 channels is prevented by the G $\beta$ 1 subunit in rat sympathetic neurons [J]. *J Mol Neurosci*, 2017, 63: 377-384.
- [29] Hofer NT, Tuluc P, Ortner NJ, et al. Biophysical classification of a CACNA1D *de novo* mutation as a high-risk mutation for a severe neurodevelopmental disorder [J]. *Mol Autism*, 2020, 11: 4.
- [30] Berecki G, Motin L, Adams DJ. Mechanism of direct Cav2.2 channel block by the  $\kappa$ -opioid receptor agonist U50488H [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 109: 49-58.
- [31] Yousuf A, Wu X, Bony AR, et al.  $\alpha$ O-conotoxin GeXIVA isomers modulate N-type calcium (Cav2.2) channels and inwardly-rectifying potassium (GIRK) channels via GABA<sub>B</sub> receptor activation [J]. *J Neurochem*, 2022, 160: 154-171.
- [32] Huynh TG, Cuny H, Slesinger PA, et al. Novel mechanism of voltage-gated N-type (Cav2.2) calcium channel inhibition revealed through  $\alpha$ -conotoxin Vc1.1 activation of the GABA<sub>B</sub> receptor [J]. *Mol Pharmacol*, 2015, 87: 240-250.
- [33] Dascal N, Snutch TP, Lübbert H, et al. Expression and modulation of voltage-gated calcium channels after RNA injection in *Xenopus oocytes* [J]. *Science*, 1986, 231: 1147-1150.
- [34] Barish ME. A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus oocyte* [J]. *J Physiol*, 1983, 342: 309-325.

- [35] Parker I, Miledi R. Transient potassium current in native *Xenopus* oocytes [J]. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1988, 234: 45-53.
- [36] Motin L, Yasuda T, Schroeder CI, et al. Omega-conotoxin CVIB differentially inhibits native and recombinant N- and P/Q-type calcium channels [J]. Eur J Neurosci, 2007, 25: 435-444.
- [37] He L, Yu Z, Geng Z, et al. Structure, gating, and pharmacology of human Cav3.3 channel [J]. Nat Commun, 2022, 13: 2084.
- [38] Stea A, Dubel SJ, Snutch TP. Alpha 1B N-type calcium channel isoforms with distinct biophysical properties [J]. Ann N Y Acad Sci, 1999, 868: 118-130.
- [39] Keum D, Baek C, Kim DI, et al. Voltage-dependent regulation of Cav2.2 channels by Gq-coupled receptor is facilitated by membrane-localized  $\beta$  subunit [J]. J Gen Physiol, 2014, 144: 297-309.
- [40] Tomlinson SE, Tan SV, Burke D, et al. *In vivo* impact of presynaptic calcium channel dysfunction on motor axons in episodic ataxia type 2 [J]. Brain, 2016, 139: 380-391.
- [41] Patil PG, Brody DL, Yue DT. Preferential closed-state inactivation of neuronal calcium channels [J]. Neuron, 1998, 20: 1027-1038.
- [42] Chen J, Liu X, Yu S, et al. A novel  $\omega$ -conotoxin Bu8 inhibiting N-type voltage-gated calcium channels displays potent analgesic activity [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11: 2685-2693.
- [43] García-Ferreiro RE, Hernández-Ochoa EO, García DE. Modulation of N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel current kinetics by PMA in rat sympathetic neurons [J]. Pflugers Arch, 2001, 442: 848-858.
- [44] Wang S, Bartels P, Zhao C, et al. A 4/8 subtype  $\alpha$ -conotoxin Vt1.27 inhibits N-type calcium channels with potent anti-allodynic effect [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 881732.