电压门控钠离子通道$Na_V1.8$在非洲爪蟾卵母细胞中的表达及优化

王 楠, 高昕宇, 丁恺志, 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: 电压门控钠离子通道 (voltage-gated sodium channels, VGSCs, Na_V) 使可兴奋细胞产生动作电位并传导。其中, $Na_V1.8$亚型主要表达在感觉神经元, 特别是背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 的小直径神经元中, 参与慢性疼痛、神经病理性疼痛和炎性疼痛的信号传导。$Na_V1.8$的抗河豚毒素、慢激活和慢失活的电生理特性, 使其在神经元的重复放电中起关键作用, $Na_V1.8$成为镇痛药物开发的重要靶标之一。因此, 体外建立基于$Na_V1.8$为靶标的药物筛选模型, 对发现具备镇痛活性的先导药物有重要意义。目前, $Na_V1.8$的异源表达存在一定困难, 主要表现为在体外非神经元细胞系中表达水平过低, 不利于药物筛选。本研究拟利用非洲爪蟾卵母细胞表达系统, 建立大鼠$Na_V1.8$的体外表达模型, 利用双电极电压钳 (two electrode voltage clamp, TEVC) 技术, 表征通道活性, 为活性化合物筛选提供平台。利用实时荧光定量PCR确认了大鼠的$Na_V1.8$主要表达在DRG和三叉神经节中 (广西大学伦理委员会审查批准号: GXU-2022-159), 同时克隆了$Na_V1.8$的全长基因, 并构建了2个$Na_V1.8$嵌合体 ($Na_V1.8$-N和$Na_V1.8$-C)。体外转录获得对应基因的加帽RNA后, 转入非洲爪蟾卵母细胞进行异源表达, 利用TEVC对$Na_V1.8$及其嵌合体的表达进行了检测, 并利用*I-V*曲线、稳态激活曲线、$Na_V1.8$特异性拮抗剂A-803467和VX-548评估了该体外模型的通道活性。其中, 嵌合体$Na_V1.8$-C解决了$Na_V1.8$难以体外稳定表达的问题, 且与$Na_V1.8$具有类似的药理活性, 可为今后靶向电压门控钠离子通道$Na_V1.8$亚型的活性化合物筛选提供重要工具。

关键词: 电压门控钠离子通道; $Na_V1.8$; 嵌合体构建; 非洲爪蟾卵母细胞; 电生理

中图分类号: R966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)08-2535-10

Expression and optimization of voltage-gated sodium channels $Na_V1.8$ in *Xenopus laevis* oocytes

WANG Nan, GAO Xin-yu, DING Kai-zhi, YU Jin-peng, ZHANGSUN Dong-ting, ZHU Xiao-peng*, LUO Su-lan*

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

Abstract: Voltage-gated sodium channels (VGSCs, Na_V) are essential for the generation and conduction of action potentials in excitable cells. The $Na_V1.8$ subtype is predominantly expressed in sensory neurons, particularly in small-diameter neurons of the dorsal root ganglia (DRG), and plays a critical role in the signal transduction of chronic, neuropathic, and inflammatory pain. Due to its tetrodotoxin-resistant properties and electrophysiological characteristics of slow activation and inactivation, $Na_V1.8$ is a key target for analgesic drug development, facilitating repeated neuronal firing. Consequently, establishing an *in vitro* drug screening model based on $Na_V1.8$ is crucial for identifying lead compounds with analgesic potential. However, heterologous expression of $Na_V1.8$ remains challenging, primarily due to low expression levels in non-neuronal cell lines, which hinders effective drug screening. In this study, we established an *in vitro* expression model of rat $Na_V1.8$ using *Xenopus laevis* oocytes as

收稿日期: 2025-02-19; 修回日期: 2025-05-14.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82173736); 广西重点研发计划“带土移植”人才引育计划 (桂科AA25069003); 广西自然科学基金重点项目 (2024GXNSFDA999003).

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

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0162

the expression system. Channel property was characterized using the two electrode voltage clamp (TEVC) technique, providing a platform for screening active compounds. Quantitative polymerase chain reaction confirmed that rat $Na_V1.8$ is predominantly expressed in the DRG and trigeminal ganglia (Guangxi University Ethics Committee Review and approval number: GXU-2022-159). We cloned the full-length $Na_V1.8$ gene and constructed two chimeric variants, $Na_V1.8$-N and $Na_V1.8$-C. Following *in vitro* transcription of the corresponding capped RNA, it was injected into *Xenopus laevis* oocytes for heterologous expression. TEVC recordings were used to detect $Na_V1.8$ and chimera expression, and channel activity was evaluated through *I-V* curves, steady-state activation curves, and the specific $Na_V1.8$ antagonists A-803467 and VX-548. The chimera $Na_V1.8$-C resolved the problem in stable expression of $Na_V1.8$ *in vitro* and exhibited similar pharmacological properties with native $Na_V1.8$, offering a valuable tool for future screening of compounds targeting voltage-gated sodium channel.

Key words: voltage-gated sodium channel; $Na_V1.8$; chimera construction; *Xenopus laevis* oocyte; electrophysiology

细胞膜上的电压门控离子通道在细胞信号传递中至关重要, 包括电压门控钾离子通道 (K_V)、钙离子通道 (Ca_V) 和钠离子通道等对膜电位的变化极为敏感的离子通道[1]。当细胞膜电位发生改变时, 这些通道会相应地开放或关闭, 选择性地调控特定离子的流动[2]。其中, 电压门控钠离子通道 (voltage-gated sodium channels, VGSCs, Na_V) 在离子通道相关疾病的机制研究和药物开发中具有重要价值。其开放或关闭状态与癫痫、自闭症、心律失常和神经性疼痛等多种疾病的发生密切相关[3]。

19世纪70年代, Neher和Sakmann[4]首次通过膜片钳技术在青蛙肌肉组织中记录到了单个钠离子通道的电流。1984年, Noda等[5]利用电鳗的放电特性, 从其cDNA文库中成功克隆出钠通道基因, 并推导出了VGSCs的一级结构。此后, 随着VGSCs的全部基因亚型被陆续发现、克隆[6], 其生理特性和药理活性的研究得到了极大的推动。迄今为止, 在哺乳动物体内已发现了9种VGSCs[7]。这些通道在形成功能性蛋白时, 由核心的α亚基和1、2个辅助的β亚基组成[8]。α亚基折叠成I至IV四个同源结构域 (domain, DI～DIV), 每个结构域包含S1至S6六个跨膜螺旋。其中, S1至S4跨膜螺旋构成通道的电压敏感结构区域 (voltage-sensor domain, VSD), 而S5和S6则构成离子孔道区 (pore domain, PD)。诸如芋螺毒素等许多生物毒素可以结合PD, 抑制或激活通道功能[3]。根据α亚基的不同, 基因 *SCN1A* 至 *SCN5A* 编码 $Na_V1.1$ 至 $Na_V1.5$, 而 *SCN8A* 至 *SCN11A* 编码 $Na_V1.6$ 至 $Na_V1.9$。$Na_V1.1$、$Na_V1.2$、$Na_V1.3$ 和 $Na_V1.6$ 主要分布于中枢神经系统[9], $Na_V1.4$ 和 $Na_V1.5$ 分别在骨骼肌[10]和心肌细胞[11]中特异性表达, 而 $Na_V1.7$、$Na_V1.8$ 和 $Na_V1.9$ 在外周神经系统 (peripheral nervous system, PNS) 中广泛分布[12], 与神经性疼痛和炎性疼痛等疾病的发生密切相关[13]。根据对河豚毒素的敏感性差异, VGSCs分为河豚毒素敏感型 (tetrodotoxin-sensitive, TTX-S) 和河豚毒素不敏感型 (tetrodotoxin-resistant, TTX-R)。*SCN10A* 基因编码的 $Na_V1.8$ 属于TTX-R的电压门控钠离子通道[14], 主要表达在神经元末梢, 尤其是三叉神经节、背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 等小直径的无髓鞘神经元中[15]。研究表明, $Na_V1.8$ 的基因敲除鼠痛觉显著减轻, 反映了 $Na_V1.8$ 在疼痛神经信号传导中的关键作用[16,17]。近年来, $Na_V1.8$ 的冷冻电镜 (cryo-electron microscopy, cryo-EM) 解析揭示了通道的更多精细结构, 部分氨基酸是亚型特异性孔阻断剂结合的潜在位点[18]。与其他亚型相比, $Na_V1.8$ 需要更大的去极化膜电位刺激才能被激活, 并且具有更缓慢的失活动力学[19]。这种高频放电的过度兴奋状态是导致疼痛的重要机制之一[20]。尽管近年来开发了一系列 $Na_V1.8$ 阻断剂[21], 如 A-803467、PF-04531083、PF-06305591 和 VX-150 等[22], 但均未通过临床试验阶段。新发现的VX-548在拇囊炎切除术和腹壁成形术的疼痛治疗中表现出较好的镇痛效果[23], 其口服片剂JOURNAVX™ (suzetrigine/VX-548) 的上市批准也使其成为数年来首个非阿片类止痛药物。因此, 发现更多靶向 $Na_V1.8$ 的先导化合物作为镇痛先导药物极具开发潜力。

建立 $Na_V1.8$ 体外模型, 为靶向化合物的高效筛选提供了重要途径。但是, $Na_V1.8$ 的异源表达相对困难, 通常需要β亚基的辅助来提高电流密度[24], 这在一定程度上限制了对其的研究。为了克服离子通道异源表达困难的问题, 研究者们采用了将特定离子通道的PD或VSD与其他通道相应跨膜区置换的方法, 构建嵌合体, 实现膜蛋白的成功组装。而构建的嵌合体在门控、电导等通道活性方面也保留了原始特性。如通过构建 $K_V1.2$-$K_V2.1$, 嵌合体 K_V 能够将电流密度提高14倍[25], 同样 $\alpha6\beta2\beta3^*$ (*表示可能存在其他亚基) 烟碱型乙酰胆

碱受体 (nicotinic acetylcholine receptor, nAChR) 难以异源表达形成功能性五聚体, 通过构建$\alpha6/\alpha3$亚基嵌合体实现了其在非洲爪蟾卵母细胞或其他靶细胞的高效表达[26]。在离子通道外源表达的研究中, 非洲爪蟾卵母细胞具备异源表达能力强、易于获取、内源离子通道背景低、电生理技术成熟、快速检测等优点, 常用于受体或离子通道体外表达的研究[27]。

为解决$Na_V1.8$体外表达不稳定的问题, 本研究克隆了大鼠$Na_V1.8$全长基因, 同时构建了$Na_V1.8$-N和$Na_V1.8$-C两个$Na_V1.8$的嵌合体 ($Na_V1.8$-N是N末端$Na_V1.8$的第1～130氨基酸用$Na_V1.4$的第1～131氨基酸所取代; $Na_V1.8$-C是C末端$Na_V1.8$的第1 730～1 956氨基酸用$Na_V1.4$的第1 598～1 840个氨基酸所取代)。利用非洲爪蟾卵母细胞, 对构建的通道及嵌合体模型进行表达, 并利用TEVC对通道的表达情况和通道药理特性进行检测。构建的嵌合体模型克服了$Na_V1.8$异源表达困难的问题, 为靶向$Na_V1.8$镇痛先导药物的研发提供了有效的平台。

材料与方法

实验动物　大鼠 (品系Sprague Dawley) 购自北京斯贝福生物技术有限公司, 许可证号为SCXK (京) 2019-0010。雌性非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 购自中国科学院昆明动物研究所。动物均在适宜的温度下饲养, 保持昼夜交替, 遵循动物福利相关规定。动物实验的实验过程经过广西大学伦理委员会的审查批准 (批准号: GXU-2022-159)。

实验试剂　RNA保存液 (#CR2111138) 购自武汉赛维尔生物技术有限公司; RNAiso Plus (#AO31222A)、*Kpn* I (#AO20755A)、*Not* I (#AL52307A)、*Hind* III (#AGY0906A)、DL10 000 DNA marker (#AM62086A)、MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.4.0片段纯化试剂盒 (#AL61457A7) 购自北京宝日医生物技术有限公司; 2× ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (#7E821A4)、HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) 反转录试剂盒 (#027E2252JA)、2× Phanta Max Master Mix高保真酶 (#7E214K4)、ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit同源重组试剂盒 (#017E22721A) 购自南京诺唯赞生物技术有限公司; 胶原蛋白酶 (#COLLA-RO) 购自美国Sigma-Aldrich公司; Mmessage mMACHINE® T7体外转录试剂盒 (#2880830)、MEGAclear™转录纯化试剂盒 (#2776183) 购自美国Thermo Fisher Scientific公司; 氨苄青霉素 (#A61002)、硫酸链霉素 (#A610494)、硫酸庆大霉素 (#A100304)、4S Gel Red核酸染料 (#K6021CA4477) 购自上海生工生物工程股份有限公司; A-803467 (#60692) 购自上海MedChemexpress公司; VX-548 (#240030) 购自上海陶术生物科技有限公司。

实验仪器　梯度基因扩增仪Biometra TAdvanced 96 SG、实时荧光定量PCR仪qTOWER^3 (德国Analytikjena公司); 恒温恒湿细胞培养箱KCL-2000W (日本EYELA公司); 水平电泳电泳槽PowerPac Basic (美国Bio-Rad公司); 凝胶成像系统FluorChem E (美国ProteinSimple公司); 超微量分光光度计Nanodrop One (美国Thermo Fisher Scientific公司); 落地高速离心机CF16RN (德国Eppendorf公司); 数模转换器Axon 1550B、信号放大器Axon 725D、TEVC系统Axon 725D (美国Molecular Devices公司); 显微注射仪NANOJECT II (美国Drummond公司); 微电极拉制仪P1000 (美国Sutter公司)。

溶液配制　OR2溶液 (82.5 mmol·L^{-1} NaCl, 2 mmol·L^{-1} KCl, 1.0 mmol·L^{-1} $MgCl_2$, 5 mmol·L^{-1} HEPES, pH 7.5), ND96溶液 (96 mmol·L^{-1} NaCl, 1.0 mmol·L^{-1} $MgCl_2$, 1.8 mmol·L^{-1} $CaCl_2$, 2 mmol·L^{-1} KCl, 5 mmol·L^{-1} HEPES, pH 7.5)。

总RNA的提取及cDNA的合成　选取6周龄大鼠, 处死后划开背肌, 分离脊柱, 取出L1～L5 DRG。同时, 取出大脑中的嗅球及颅底的三叉神经节。分离的组织均用预冷的1×PBS冲洗后立即浸泡于RNA保存液中。由于DRG体积较小, 将单侧的5个DRG合并后提取RNA。将上述组织各30 mg在RNAiso Plus中匀浆裂解, 加入氯仿抽提。12 000 ×*g* 离心15 min, 吸取水相, 加入1倍体积的异丙醇, 沉淀RNA。75%乙醇洗涤3次后风干, 用DEPC水溶解RNA沉淀, 分别利用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳, 检测RNA的浓度和质量, 最终得到嗅球、DRG和三叉神经节的总RNA。

按照诺唯赞反转录试剂盒说明书, 以提取的总RNA为底物, 加入1 μL Oligo $(dT)_{23}$ VN, 补充DEPC水至12 μL, 65 ℃孵育5 min后迅速冷却, 打开RNA的二级结构。加入4× gDNA wiper 4 μL孵育2 min, 再加入2 μL HiScript II Reverse Transcriptase, 55 ℃反应45 min, 85 ℃反应2 min, 获得cDNA。cDNA (1 μg) 可用于实时荧光定量PCR的模板。

$Na_V1.8$基因的组织分布鉴定　利用实时荧光定量PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR) 确定$Na_V1.8$基因在嗅球、DRG和三叉神经节中的表达量。以3种组织反转录得到的cDNA为模板, 选取β-actin作为内参基因。在20 μL的反应体系中: 2 μL正向和反向引物 (浓度为5 μmol·L^{-1})、4 μL灭菌去离子水、2 μL cDNA、10 μL 2× ChamQ Universal SYBR

qPCR Master Mix。其中, $Na_V1.8$ (NM_017247.2) 的引物序列分别为: 正向引物 (5'-GTGGTCACCATGGCGTATGAAG-3'), 反向引物 (5'-CTGGAGCGAGGTCGTGTCAA-3'), 内参基因 β-actin (NM_031144.3) 的引物序列为: 正向引物 (5'-CTGAAGTACCCCATTGAACA-3'), 反向引物 (5'-TCTCAAACATGATCTGGGTC-3')。qPCR反应条件: 95 ℃, 预变性处理5 min, 然后95 ℃变性10 s, 60 ℃退火30 s, 72 ℃延伸30 s, 设置45个循环。最后, 在60 ℃条件下进行5 min的延伸。利用jena qTOWER^3 G和qPCRsoft 4.1进行PCR反应的信号采集和数据记录。qPCR的数据分析使用GraphPad Prism 9.0软件。实验采用技术性重复及生物学重复, 以确保数据的准确性和可靠性。以内参基因 β-actin 的 C_t 值为归一化标准, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算各组织中目标基因的相对表达量, 采用单因素方差分析评估不同组织中 $Na_V1.8$ 的表达水平差异性。

$Na_V1.8$ 及其嵌合体重组质粒的构建 根据qPCR的结果, 从DRG中提取总RNA, 克隆 $Na_V1.8$ 的全长基因。以DRG反转录得到的cDNA为模板, 配置50 μL的PCR反应体系。分别加入4 μL正向引物 (5'-CGACCTTATAGAGCAGCAAAGAGTG-3') 和反向引物 (5'-GCAAACCCTAATTCTCAGTGCC-3') (浓度为2 μmol·L^{-1})、9 μL灭菌去离子水、8 μL cDNA、25 μL 2× Phanta Max Master Mix。PCR反应条件: 95 ℃预变性5 min, 95 ℃变性15 s、52 ℃退火15 s、72 ℃延伸5 min, 35个循环, 最终扩增出 $Na_V1.8$ 的基因目的片段。利用PCR产物纯化试剂盒进行回收。构建重组质粒的流程图如图1所示。

使用 *Kpn* I和 *Not* I对pBlue-SK(+)载体进行双酶切, 获得线性化的载体。目的基因与线性化载体摩尔比为2∶1的比例, 在37 ℃下连接30 min, 随后迅速降温至4 ℃, 完成同源重组。将同源重组产物转入DH5α大肠杆菌感受态细胞, 转入重组体的菌株挑取单克隆分别进行PCR验证和测序验证。

如图1所示, 构建 $Na_V1.8$-N 和 $Na_V1.8$-C 嵌合体质粒。在翻译区, 使用PCR法, 使用正向引物 (5'-GATGGCCAGCTCATCTCTGC-3'), 反向引物 (5'-CGCGTGAATGAGCACCTTG-3') 扩增 $Na_V1.4$ 的起始密码子至第一结构域前的氨基端基因 (N端, 第1～131个氨基酸)。替换 $Na_V1.8$ 对应的氨基端 (第1～130个氨基酸), 获得嵌合体 $Na_V1.8$-N。使用正向引物 (5'-ACCGAAGAGAGCAGCGAG-3'), 反向引物 (5'-CTAGACAAGAGACTCTTTGACCCCT-3') 扩增 $Na_V1.4$ 第四结构域至终止密码子的羧基端基因 (C端, 第1 598～1 840个氨基酸), 替换 $Na_V1.8$ 对应的羧基端 (第1 730～1 956个氨基酸), 获得嵌合体 $Na_V1.8$-C。重组质粒的构建使用同源重组法, 采用菌落PCR和测序验证 $Na_V1.8$-N 和 $Na_V1.8$-C 的成功构建。同时, 利用pcDNA3.1(+)载体构建了 $Na_V\beta1$ 亚基的重组质粒 ($Na_V\beta1$), 用于辅助野生型 $Na_V1.8$ 的表达。

所有引物合成、重组质粒的KBSeq全质粒测序均在上海生工生物工程股份有限公司进行, 测序获得的蛋白质序列比对使用Molecular Evolutionary Genetics Analysis 12 (MEGA 12), 可视化分析使用ESPript3.0在线网站 (https://espript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi)。

cRNA的合成 使用限制性内切酶对重组质粒进行单酶切, 其中 $Na_V1.4$、$Na_V1.8$、$Na_V1.8$-N 和 $Na_V1.8$-C 使用 *Not* I, $Na_V\beta1$ 使用 *Hind* III。利用超微量分光光度

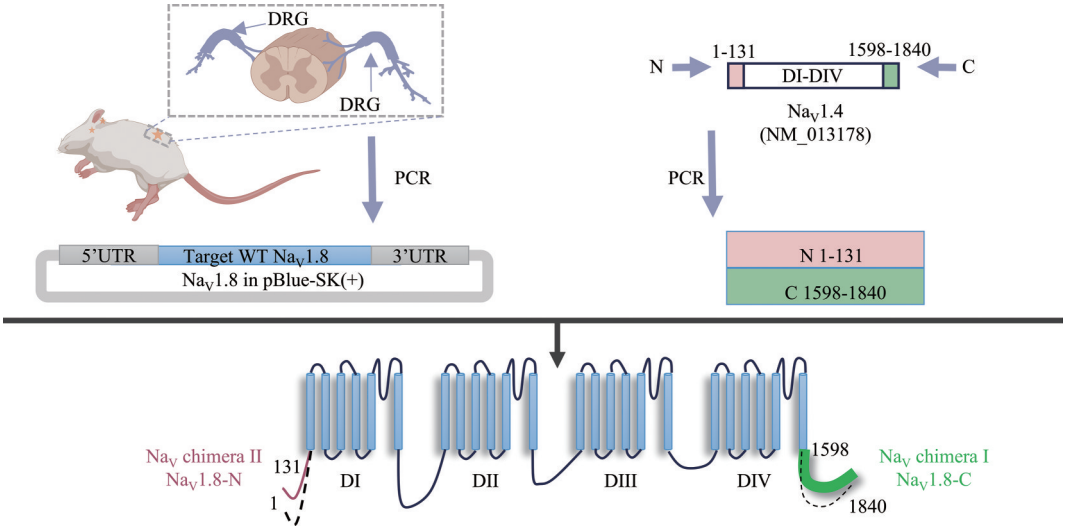


Figure 1 Flowchart of construction of $Na_V1.8$ and its chimera ($Na_V1.8$-C and $Na_V1.8$-N) recombinant plasmid. DRG: Dorsal root ganglion; WT: Wild type

计测定纯化产物的浓度。以单酶切线性化质粒为模板, 利用T7体外转录试剂盒, 进行体外转录, 获得对应加帽RNA (capped RNA, cRNA)[28]。20 μL反应体系中包含1.5 μg线性化模板、2 μL reaction buffer、10 μL 2× NTP/CAP、1 μL GTP、2 μL T7 enzyme mix, DEPC水将体系补充至20 μL。在37 ℃下反应14 h, 加入1 μL TURBO™ DNase消化未反应完全的线性化模板, 获得cRNA。利用MEGAclear™转录纯化试剂盒对cRNA进行纯化。所有纯化产物利用1%琼脂糖凝胶电泳和超微量分光光度计鉴定质量和浓度。

非洲爪蟾卵母细胞的获取及显微注射　冰浴麻醉性成熟的*Xenopus laevis*, 划开外皮及内部肌肉层, 暴露并轻柔取出卵叶, 缝合伤口。在含有1.6 g·L^{-1}胶原酶的OR2溶液中酶解卵叶碎块20～40 min, 消化滤泡层, 获得单独的卵母细胞。使用OR2溶液彻底漂洗去除残余的胶原蛋白酶, 最终将卵母细胞置于含有10 μg·mL^{-1}青霉素、10 μg·mL^{-1}链霉素、100 μg·mL^{-1}庆大霉素的ND96溶液中, 在17 ℃下培养过夜后进行显微注射。

分别将等比例混合 (1∶1) 的$Na_V\beta1$和$Na_V1.8$的cRNA、单独的$Na_V1.4$、$Na_V1.8$-N和$Na_V1.8$-C的cRNA (约30 ng) 注射到卵母细胞中, 在17 ℃、35%湿度的培养箱中培养2～5天, 以供电生理检测。

蛙卵–双电极电压钳检测　使用培养2～5天的非洲爪蟾卵母细胞进行检测。在进行TEVC检测时, 须将电极电阻控制在2 MΩ以内。电极针中充盈3 mol·L^{-1} KCl溶液。将培养好的卵母细胞置于细胞槽中, 电极针刺破卵母细胞后, 使用已脱气的含有0.1 mg·mL^{-1}胎牛血清的ND96灌流液灌流[29]。将卵母细胞钳制在−80 mV, 电压跃增到+20 mV并持续50 ms。在进行稳态激活测试时, 卵母细胞被钳制在−80 mV, 电压阶梯式地跃增+10 mV并持续50 ms, 进行13个循环, 记录电流对于电压的依赖性。

TEVC的信号记录使用Axon 1550B数模转换器和Axon 725D信号放大器, 使用pCLAMP软件和Clampfit 11.0.3进行数据的采集及数据处理和分析, 并使用P/4漏减程序消除产生的漏电流。分别对表达了2～5天$Na_V1.8$ (注射等比例的$Na_V\beta1$)、$Na_V1.8$-N、$Na_V1.8$-C和$Na_V1.4$的卵母细胞中产生的电流密度进行检测。配制10 μmol·L^{-1}浓度的$Na_V1.8$的特异性阻断剂A-803467 (DMSO溶解), 在细胞槽中孵育5 min, 测试对$Na_V1.8$-C和$Na_V1.4$电流的反应率。配制$Na_V1.8$的特异性阻断剂A-803467 (浓度范围10^{-7}～10^{-4} mol·L^{-1}的溶液) 和VX-548 (DMSO溶解, 浓度范围10^{-9}～10^{-5} mol·L^{-1}), 在细胞槽中使用梯度浓度孵育5 min, 计算不同浓度下A-803467和VX-548对$Na_V1.8$-C和$Na_V1.4$的反应率并拟合半数抑制浓度 (half-maximal inhibitory concentration, IC_{50})。

统计学分析　使用GraphPad Prism 9.0软件进行显著性差异分析, 使用ORIGIN 2021对数据进行拟合和统计分析。采用Boltzmann方程 (1) 拟合VGSCs的稳态激活曲线。

$$G/G_{max} = 1/[1 + \exp(V-V_{1/2})/k] \quad (1)$$

其中, G是全细胞通道电导, 以公式$G = I/(V-Vr)$计算; V是测试电位; Vr是反转电位 (reverse potential); I是不同测试电位诱发的电流; G_{max}是测试的最大电导; $V_{1/2}$是半最大激活电位 (half activation voltage, $V_{1/2}$); k是斜率因子。

Response%代表反应率, 计算IC_{50}的非线性拟合方程 (2) 为:

$$Response\% = 100/\{1 + ([inhibitor]/IC_{50})^{HillSlope}\} \quad (2)$$

其中HillSlope是Hill系数, inhibitor是药物浓度, 95%置信区间的值用括号表示, 数据分析基于VGSCs的激活电流获得。全部数据使用平均值 ± 标准误 ($\bar{x}$ ± SEM) 表示。$^*P < 0.05$说明具有显著性差异。

结果

1　$Na_V1.8$基因在不同组织中的分布

qPCR鉴定大鼠$Na_V1.8$在嗅球、DRG和三叉神经节中的基因表达水平。如图2A所示, 提取大鼠的嗅球、DRG、三叉神经节组织中的总RNA, 经过1%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 浓度分别为962.25、352.64和423.51 ng·μL^{-1}, RNA条带清晰, 结构完整。qPCR检测$Na_V1.8$时, 以β-actin为内参基因, 结果表明, $Na_V1.8$在

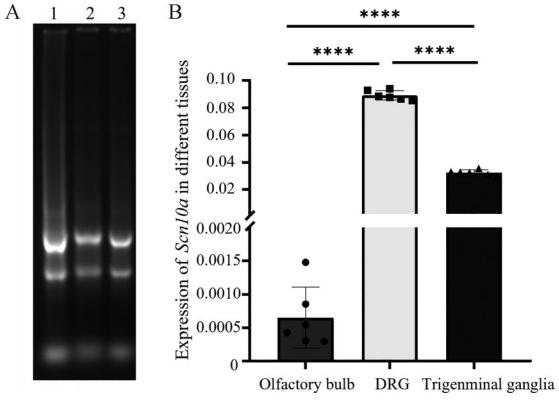


Figure 2　qPCR analysis the $Na_V1.8$ gene distribution in different tissues. A: The total RNA extracted from different tissues. 1: Olfactory bulb; 2: Dorsal root ganglion (DRG); 3: Trigeminal ganglion tissue; B: The gene expression levels of $Na_V1.8$ in the three tissues show significant differences. $n = 6$, $\bar{x}$ ± SEM. $^{****}P < 0.000\ 1$ (by one-way analysis of variance)

嗅球组织中表达量较低, 在DRG和三叉神经节中具有很高的基因表达水平, 且在DRG的表达量最高, 3个组织间的表达量均存在显著性差异 (图2B)。这一结果为克隆$Na_V1.8$基因全长时的组织选择提供了基础。

2 $Na_V1.8$及其嵌合体重组质粒的构建及测序

按照图1所示策略, 构建$Na_V1.8$及嵌合体$Na_V1.8$-C和$Na_V1.8$-N的重组质粒。选择表达量最高的DRG组织, 提取RNA用于cDNA的合成, 扩增出包含非翻译区5'-UTR和3'-UTR的全长基因, 保证翻译的顺利进行。提取的RNA经过1%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 具有清晰完整的28S、18S和5.8S三条条带, 且28S rRNA条带的亮度是18S rRNA条带的两倍以上, 超微量分光光度计测量RNA浓度为352.64 μg·L^{-1}, OD_{260}/OD_{280}比值为1.86, 可用于扩增基因。扩增并纯化$Na_V1.8$和$Na_V1.4$的N端 (1～131个氨基酸)、C端 (1 598～1 840个氨基酸) 的3个目的基因。3个目的基因片段和线性化载体进行同源重组后, 得到重组质粒$Na_V1.8$、$Na_V1.8$-N和$Na_V1.8$-C。提取重组质粒进行琼脂糖凝胶电泳分析 (图3A)。3种质粒的浓度分别为584.32、624.65和658.95 μg·L^{-1}。以$Na_V1.8$-N和$Na_V1.8$-C与野生型$Na_V1.8$和$Na_V1.4$的蛋白序列比对结果显示N端 (图3B) 和C端 (图3C) 被成功替换, 重组质粒$Na_V1.8$-N和$Na_V1.8$-C构建成功, 嵌合体的序列中无发生突变的氨基酸, 翻译后的蛋白长度与理论值保持一致, $Na_V1.8$、$Na_V1.8$-N和$Na_V1.8$-C的氨基酸长度分别是1 956、1 840和1 956 aa。

3 $Na_V1.8$及其嵌合体的电生理特征检测

制备大鼠来源的$Na_V1.4$、$Na_V1.8$、$Na_V1.8$-N、$Na_V1.8$-C和$Na_V\beta1$的cRNA用于显微注射。转录后纯化得到的cRNA经1%琼脂糖凝胶电泳和微量分光光度计测定, 浓度均大于0.9 mg·mL^{-1}, OD_{260}/OD_{280}比值均在1.95～2.05之间, 可用于非洲爪蟾卵母细胞的显微注射。

注射后, 在培养的2～5天内, 每天对通道在卵母细胞中的电流表达情况进行检测。其中, $Na_V\beta1$辅助的$Na_V1.8$和$Na_V1.8$-N并不能很好地产生电流, 在多次测定中 ($n > 50$), 即使卵母细胞具有极好的质量, 但仍然仅有4颗注射了等比例$Na_V\beta1$进行辅助的卵母细胞产生了电流 (图4A), 大小为897.16 ± 52.50 nA ($n = 4$)。$Na_V1.8$-N并未检测到任何电流, 但$Na_V1.8$-C可以产生典型的钠电流。注射$Na_V1.8$-C cRNA的卵母细胞均可检测到电流 (图4B), 在翻译初期 (第1～3天) 电流较小, 在卵母细胞翻译的第4天达到电流高峰, 达873.26 ± 45.72 nA ($n = 8$), 在第5天明显衰减至282.99 ± 12.54 nA ($n = 8$, 图4C)。根据方波阶跃电压刺激程序记录到的$Na_V1.8$的*I-V*曲线结果显示 (图4D), $Na_V1.8$从−40 mV开始激活, 在10 mV电压下电流达到峰值。$Na_V1.8$-C (图4E) 的*I-V*曲线结果显示, 在−30 mV开始激活, 10 mV的电压刺激下可以达到电流峰值。

4 嵌合体$Na_V1.8$-C的稳态激活电生理特性及功能验证

本研究检测了$Na_V1.8$-C和$Na_V1.4$的稳态激活曲

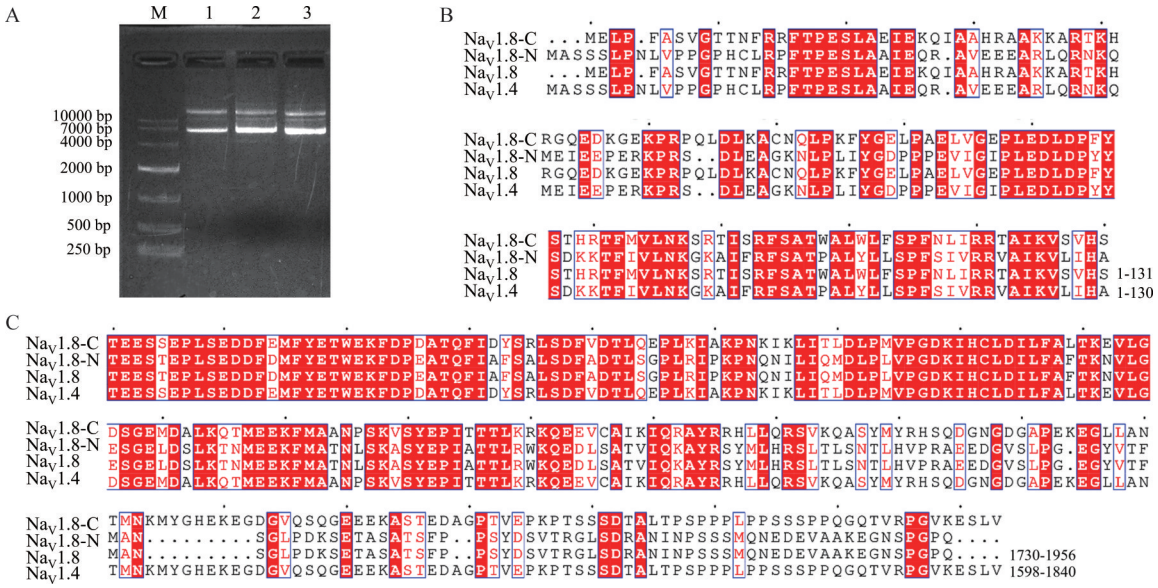


Figure 3 Native and chimera $Na_V1.8$ detection and sequence alignment. A: Agarose gel electrophoresis analysis of three plasmids. M: 10 000 bp standard DNA marker; 1: $Na_V1.8$ plasmid; 2: $Na_V1.8$-N plasmid; 3: $Na_V1.8$-C plasmid; B: Sequence alignment of $Na_V1.8$-C and $Na_V1.8$-N with $Na_V1.8$ (1−130 amino acids) and $Na_V1.4$ (1−131 amino acids); C: Sequence alignment of $Na_V1.8$-C and $Na_V1.8$-N with $Na_V1.8$ (1 730−1 956 amino acids) and $Na_V1.4$ (1 598−1 840 amino acids)

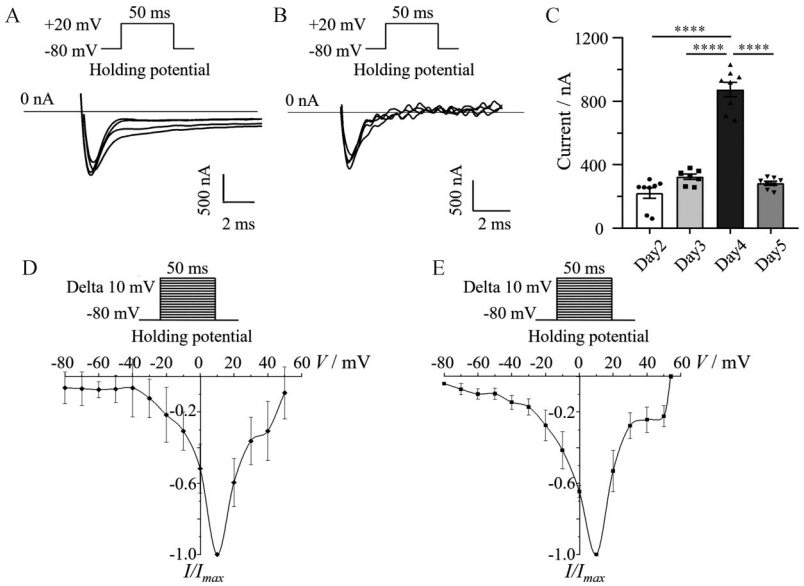


Figure 4　The electrophysiological characteristics of native and chimera $Na_V1.8$. A: Single stimulus program and typical current of $Na_V1.8$ (n = 4); B: Single stimulus program and typical current of $Na_V1.8$-C (n = 6); C: Current of $Na_V1.8$-C expression at 2−5 days (n = 8); D: The I-V curve of the native $Na_V1.8$ under square-wave step stimulation (n = 3); E: The I-V curve of the chimera $Na_V1.8$-C under square-wave step stimulation (n = 6). $\bar{x}$ ± SEM. $^{****}P$ < 0.000 1 (by one-way analysis of variance)

线 (图 5A) 和 I-V 曲线 (图 5B), 根据 Boltzmann 方程拟合出 Vr 和 $V_{1/2}$。拟合结果显示, $Na_V1.8$-C 的激活电压为−50 mV (图 5A), Vr 为 54.15 ± 1.24 mV, $V_{1/2}$ 为 9.02 ± 2.31 mV, 在+10 mV 达到峰值电流 (n = 6)。而作为 TTX-S 型的 $Na_V1.4$, 激活电压为−70 mV (图 5A), Vr 为 37.09 ± 2.15 mV, $V_{1/2}$为−13.51 ± 0.98 mV, 在 0 mV 即可达到峰值电流 (n = 5)。$Na_V1.8$ 的 Vr 为 59.1 ± 0.7 mV[30], $V_{1/2}$ 为 6.24 ± 0.68 mV[31], 嵌合体 $Na_V1.8$-C 与其相似。嵌合体 $Na_V1.8$-C 与 $Na_V1.4$ 的 Vr 和 $V_{1/2}$ 存在显著性差异 (P < 0.01, Mann-Whitney U 检验), 因此电生理特性并未因末端替换产生偏移, 与 $Na_V1.4$ 仍然具有显著性差异。

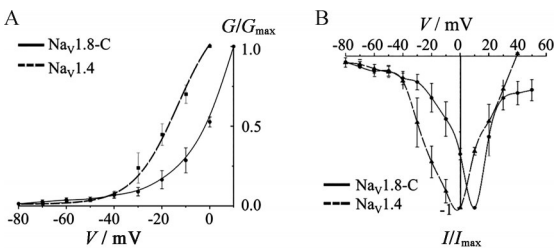


Figure 5　Electrophysiological characteristics of $Na_V1.8$-C and $Na_V1.4$. A: Steady-state activation curves of $Na_V1.8$-C (n = 6) and $Na_V1.4$ (n = 5); B: I-V curves of $Na_V1.8$-C (n = 6) and $Na_V1.4$ (n = 5). $\bar{x}$ ± SEM (by the Boltzmann equation)

使用 $Na_V1.8$ 特异性阻断剂 A-803467 分别对 $Na_V1.8$-C 和 $Na_V1.4$ 进行阻断。结果显示, 孵育 5 min 的 10 μmol·L^{-1} A-803467, $Na_V1.8$-C 产生的电流被完全阻断 (图 6A、C), 反应率为 2.88% ± 0.58% (n = 11)。$Na_V1.4$ 的电流并未被抑制 (图 6B、C), 反应率为 101.24% ± 1.2% (n = 11)。A-803467 在 $Na_V1.8$-C 的筛选中存在剂量依赖性 (图 6D), IC_{50} 为 284.5 nmol·L^{-1} (234.1～345.1 nmol·L^{-1}), HillSlope 为−1.06 (−1.25～−0.89)。证明 $Na_V1.8$-C 的药理学特性仍然与 $Na_V1.8$ 一致。VX-548 在 $Na_V1.8$-C 的筛选中同样存在剂量依赖性 (图 6E), IC_{50} 为 14.9 nmol·L^{-1} (11.88～18.87 nmol·L^{-1}), HillSlope 为−0.93 (−1.14～−0.77), IC_{50} 与 Osteen 等[32]报道的 56 nmol·L^{-1} (36～93 nmol·L^{-1}) 近似, 验证了嵌合体 $Na_V1.8$-C 在药物筛选中的普适性。

讨论

电压门控钠离子通道负责 Na^+ 在细胞膜上的快速跨膜转运, 是神经纤维和肌肉细胞等靶细胞动作电位产生与传导的关键因素, 广泛参与神经兴奋性调节、肌肉收缩与心脏节律、疼痛信号传导及细胞极化等重要生理过程。其中, $Na_V1.8$ 主要在 PNS 的感觉神经元中表达, 尤其是 DRG 和三叉神经节神经元中[33]。$Na_V1.8$ 参与慢性疼痛、神经病理性疼痛和炎性疼痛的信号传导过程, 独特的激活门和失活门特性, 使其能够在去极化条件下支持高频动作电位的传导, 将疼痛信号有效地传输至中枢神经系统[34]。在疼痛状态下, $Na_V1.8$ 的上调会导致感觉神经元的过度兴奋。此外, 炎性介质如前列腺素 E_2 能够增强 $Na_V1.8$ 的活性, 使感觉神经元

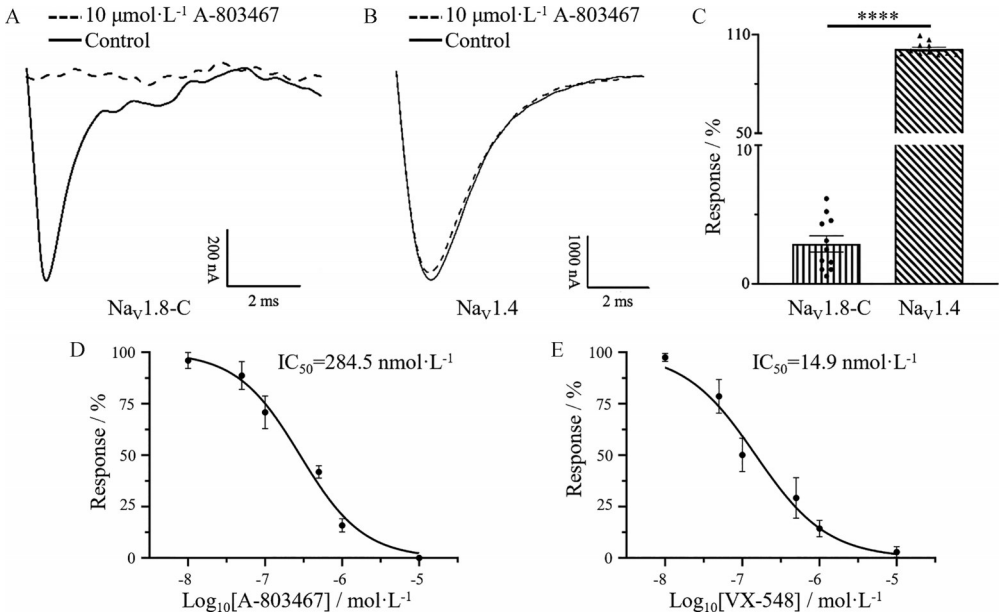


Figure 6 Blocking effects of the specific blockers A-803467 and VX-548 on $Na_V1.8$-C, and A-803467 on $Na_V1.4$. A: 10 μmol·L^{-1} A-803467 completely inhibited the current of $Na_V1.8$-C; B: 10 μmol·L^{-1} A-803467 did not inhibit the current of $Na_V1.4$; C: The response of A-803467 at 10 μmol·L^{-1} for $Na_V1.8$-C and $Na_V1.4$ (n = 11); D: The IC_{50} of A-803467 for $Na_V1.8$-C was 284.5 nmol·L^{-1} (n = 3); E: The IC_{50} of VX-548 for $Na_V1.8$-C was 14.9 nmol·L^{-1} (n = 4). $\bar{x}$ ± SEM. $^{****}P$ < 0.000 1 (by one-way analysis of variance)

对伤害性刺激的敏感性增加, 从而加剧炎性疼痛的感知[35]。$Na_V1.8$ 的功能获得性基因突变 G1662S, 引发小纤维神经病变和神经病理性疼痛[36]。$Na_V1.8$ 主要在外周神经系统中表达, 不参与中枢神经系统的活动, 这一特性使得 $Na_V1.8$ 抑制剂在避免成瘾、镇静和运动功能障碍等中枢不良反应方面具有独特优势。因此, $Na_V1.8$ 成为新型镇痛药物研发的重要靶点, 其抑制剂有望在避免中枢不良反应的同时, 发挥良好的非成瘾性的镇痛作用。

近年来, cryo-EM 技术的发展极大地推动了对 $Na_V1.8$ 复杂结构及其功能机制的深入理解。通过 cryo-EM 解析的 $Na_V1.8$ 高分辨率结构揭示了其独特的激活和失活特性, $Na_V1.8$ 的激活需要在更偏向去极化的膜电位, 且相比其他亚型具有更慢的失活动力学, 这进一步证实了其在疼痛信号传导中的关键作用[18]。目前, 已发现多种靶向 $Na_V1.8$ 的拮抗剂, 如 A-803467[37]、VX-548[23]和 LTGO-33[38]等, 均显示出对 $Na_V1.8$ 的高度选择性。结合 cryo-EM 与 AlphaFold 等技术, 对 $Na_V1.8$ 进行结构预测和动态变化模拟, 为靶向药物结合位点的预测及先导化合物的筛选提供了新的策略。此外, 建立体外靶向筛选系统对于验证先导化合物的活性具有重要意义。

TEVC 技术能够详细记录单个亚型离子通道的电流变化, 从而揭示其通道特性, 为通道功能研究和活性化合物筛选提供了重要基础。非洲爪蟾卵母细胞因其体积大、蛋白表达高效且内源性离子通道背景低等优点, 被广泛应用于电生理学研究[39]。基于非洲爪蟾卵母细胞进行高通量药物筛选时, 成本较低, 且同时能够对药物的生物安全性进行评估。如 Wallace 等[40]在非洲爪蟾卵母细胞中表达 α7 nAChR, 结合电生理学方法筛选出 α7 nAChR 的激动剂 RG3487。HEK293T 细胞作为膜片钳研究中广泛使用的细胞系, 易于培养和转染, 能够高效表达外源性离子通道。通过转染 hERG 基因, HEK293T 细胞可以稳定表达人类快速激活 K_V, 用于研究药物对 hERG 通道的作用[41]。除此之外, CHO、SH-SY5Y、PC12、ND7/23 等细胞系和原代培养细胞在膜片钳技术中也有着广泛应用。

非洲爪蟾卵母细胞具有独特的表达系统, 能够高效表达外源 VGSCs, 并且其电生理特性稳定, 适合进行长期的电生理记录和药物筛选[42]。这使卵母细胞模型成为研究 VGSCs 功能和筛选活性化合物的重要工具。在非洲爪蟾卵母细胞的异源表达系统中, TEVC 技术被广泛用于研究 VGSCs 的激活和失活过程。通过电流−电压关系曲线 (*I-V*) 和激活曲线等, 可以深入了解 VGSCs 的电压依赖性和离子选择性, 该技术为靶向 VGSCs 的特异性药物筛选和作用机制研究提供了有力工具。不同类型受体和通道蛋白在不同表达体系中存在不同的难易程度, $Na_V1.8$ 在非洲爪蟾卵母细胞中的异源表达仍然存在挑战, 主要原因包括在这类非神经元细胞系中表达水平低或不表达。常用解决此问

题的方法包括构建嵌合体和利用分子伴侣辅助表达等。研究表明, 用$Na_V1.4$、$Na_V1.5$或$Na_V1.7$的序列替换$Na_V1.8$的C末端, 可以提高其在HEK293T细胞中的表达水平[43]。此外, $Na_V1.8$的胞内环中存在内质网滞留的相关氨基酸位点, 阻止其在细胞膜上的表达, 通过突变这些位点可以增加其在细胞膜上的表达量[44]。$Na_V1.8$的C末端是限制其功能表达的关键因素, 其中异亮氨酸–谷氨酰胺 (isoleucine glutamine, IQ) 序列 (核心序列为IQ---RG---R) 与钙调蛋白CaM的结合对钠通道产生内向电流至关重要, $Na_V1.8$ IQ序列上游存在色氨酸 (W1849) 而不是精氨酸, 可能会破坏与CaM的结合[45]。这一发现为提高$Na_V1.8$的异源表达水平提供了重要的分子基础和策略。本研究采用构建嵌合体的方式解决表达难题, $Na_V1.8$-N的C末端IQ序列与$Na_V1.8$保持一致, 但$Na_V1.8$-C的C末端被替换, 这一结构的差异是$Na_V1.8$-C顺利在卵母细胞中表达的关键。在检测$Na_V1.8$的电流时, 本研究对$Na_V\beta1$和$Na_V1.8$的注射比例 (0∶1、1∶1、5∶1和10∶1) 以及注射体积 (5、30、60和100 ng) 进行了正交实验优化, 但仅在1∶1比例下注射30 ng cRNA时检测到了部分电流, 且随着注入量的增加, 卵母细胞的质量明显下降。在检测$Na_V1.4$的电流时, 非洲爪蟾卵母细胞能够高效合成$Na_V1.4$, 电流可达数千nA, 且其氨基酸结构不会阻碍蛋白的跨膜运输过程。此外, $Na_V1.4$在骨骼肌组织中特异性表达, 而$Na_V1.8$在骨骼肌组织中未见分布, 因此$Na_V1.4$的结构和功能特性使其成为构建嵌合体的理想选择。

本研究成功构建了$Na_V1.8$野生型和两种嵌合体 ($Na_V1.8$-N和$Na_V1.8$-C) 的重组质粒, 并在非洲爪蟾卵母细胞中进行了表达和检测, 其中嵌合体$Na_V1.8$-C显著提高了电流密度和表达稳定性, A-803467在嵌合体中仍然具有剂量依赖性, VX-548在嵌合体静息态测试的IC_{50}与文献值的近似[32]也体现了嵌合体在药物筛选中的普适性。嵌合体有效解决了$Na_V1.8$在非洲爪蟾卵母细胞中难以稳定表达的问题, 为筛选靶向$Na_V1.8$的活性化合物提供了重要体外筛选工具。

致谢: 特别感谢美国犹他大学Michael McIntosh教授友情赠送的$Na_V1.4$重组质粒。

作者贡献: 王楠完成实验过程、数据分析和论文初稿的写作; 高昕宇参与实验数据采集、结果分析和论文审阅; 丁恺志参与实验结果分析和论文审阅; 于津鹏负责电生理平台的搭建及指导; 长孙东亭、朱晓鹏和罗素兰构思了实验, 指导实验设计、数据分析和论文写作与修改。

利益冲突: 全体作者均已阅读并同意最终的文本, 并明确所有研究内容没有任何利益冲突。

References

[1] Huang J, Pan X, Yan N. Structural biology and molecular pharmacology of voltage-gated ion channels [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2024, 25: 904-925.

[2] Tóth K. Diversity of ion channels [J]. J Physiol, 2021, 599: 2603-2604.

[3] Pei S, Wang N, Mei Z, et al. Conotoxins targeting voltage-gated sodium ion channels [J]. Pharmacol Rev, 2024, 76: 828-845.

[4] Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres [J]. Nature, 1976, 260: 799-802.

[5] Noda M, Shimizu S, Tanabe T, et al. Primary structure of electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence [J]. Nature, 1984, 312: 121-127.

[6] Catterall WA. Forty years of sodium channels: structure, function, pharmacology, and epilepsy [J]. Neurochem Res, 2017, 42: 2495-2504.

[7] Han R, Cai YL, Zhen XT, et al. Development of analgesic drugs targeting $Na_V1.7$: advances in clinical trials and discovery of selective inhibitors [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2024, 59: 2417-2428.

[8] Vinson V. Structures of voltage-gated sodium channels [J]. Science, 2018, 362: 300-302.

[9] Mantegazza M, Cestèle S, Catterall WA. Sodium channelopathies of skeletal muscle and brain [J]. Physiol Rev, 2021, 101: 1633-1689.

[10] White MM, Chen L, Kleinfield R, et al. SkM2, a Na^+ channel cDNA clone from denervated skeletal muscle, encodes a tetrodotoxin-insensitive Na^+ channel [J]. Mol Pharmacol, 1991, 39: 604-608.

[11] Cowan LM, Strege PR, Rusinova R, et al. Capsaicin as an amphipathic modulator of $Na_V1.5$ mechanosensitivity [J]. Channels, 2022, 16: 9-26.

[12] Heinle JW, Dalessio S, Janicki P, et al. Insights into the voltage-gated sodium channel, $Na_V1.8$, and its role in visceral pain perception [J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1398409.

[13] Kamei T, Kudo T, Yamane H, et al. Unique electrophysiological property of a novel $Na_V1.7$, $Na_V1.8$, and $Na_V1.9$ sodium channel blocker, ANP-230 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2024, 721: 150126.

[14] Lai J, Gold MS, Kim CS, et al. Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, $Na_V1.8$ [J]. Pain, 2002, 95: 143-152.

[15] Nascimento DL, Zhang H, Chen L, et al. $Na_V1.8$ in small dorsal root ganglion neurons contributes to vincristine-induced mechanical allodynia [J]. Brain, 2024, 147: 3157-3170.

[16] Xue Y, Chidiac C, Herault Y, et al. Pain behavior in SCN9A ($Na_V1.7$) and SCN10A ($Na_V1.8$) mutant rodent models [J]. Neurosci Lett, 2021, 753: 135844.

[17] Goregaoker S, Machemer T, Ramachandra M, et al. siRNA-mediated knockdown of the $Na_V1.8$ sodium channel [J]. J Pain, 2005, 6: S9.

[18] Huang X, Jin X, Huang G, et al. Structural basis for high-voltage activation and subtype-specific inhibition of human $Na_V1.8$ [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022, 119: e2208211119.

[19] Rapedius M, Bruggemann A, Goetze T, et al. Characterization of $Na_V1.8$ on a highly parallel automated patch clamp system [J]. Biophys J, 2016, 110: 113a.

[20] Han C, Huang J, Waxman SG. Sodium channel $Na_V1.8$: emerging links to human disease [J]. Neurology, 2016, 86: 473-483.

[21] Kingwell K. $Na_V1.8$ inhibitor poised to provide opioid-free pain relief [J]. Nat Rev Drug Discov, 2025, 24: 3-5.

[22] Hijma HJ, Siebenga PS, De Kam ML, et al. A phase 1, randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study to evaluate the pharmacodynamic effects of VX-150, a highly selective $Na_V1.8$ inhibitor, in healthy male adults [J]. Pain Med, 2021, 22: 1814-1826.

[23] Jones J, Correll DJ, Lechner SM, et al. Selective inhibition of $Na_V1.8$ with VX-548 for acute pain [J]. N Engl J Med, 2023, 389: 393-405.

[24] Wilson MJ, Zhang MM, Azam L, et al. $Na_V\beta$ subunits modulate the inhibition of $Na_V1.8$ by the analgesic gating modifier μO-conotoxin MrVIB [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2011, 338: 687-693.

[25] Weinstein JJ, Saikia C, Karbat I, et al. One-shot design elevates functional expression levels of a voltage-gated potassium channel [J]. Protein Sci, 2024, 33: e4995.

[26] Kuryatov A, Lindstrom J. Expression of functional human $\alpha6\beta2\beta3^*$ acetylcholine receptors in *Xenopus laevis* oocytes achieved through subunit chimeras and concatamers [J]. Mol Pharmacol, 2011, 79: 126-140.

[27] Wang C, Zhang J, Schroeder JI. Two-electrode voltage-clamp recordings in *Xenopus laevis* oocytes: reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel *via* PYL9 ABA receptor [J]. Bio Protoc, 2017, 7: e2114.

[28] Xu CX, Wang N, Ma T, et al. The $\alpha3\beta4$ nAChR tissue distribution identified by fluorescent α-conotoxin [D11A]LvIA [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 281: 136220.

[29] Wang ZH, Yu JP, Zhangsun DT, et al. Cloning and functional characterization of $\alpha7$ nicotinic acetylcholine receptor molecular chaperone *Tmem35a* [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2024, 59: 1993-2001.

[30] Faber CG, Lauria G, Merkies ISJ, et al. Gain-of-function $Na_V1.8$ mutations in painful neuropathy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109: 19444-19449.

[31] Chevrier P, Vijayaragavan K, Chahine M. Differential modulation of $Na_V1.7$ and $Na_V1.8$ peripheral nerve sodium channels by the local anesthetic lidocaine [J]. Br J Pharmacol, 2004, 142: 576-584.

[32] Osteen JD, Immani S, Tapley TL, et al. Pharmacology and mechanism of action of suzetrigine, a potent and selective $Na_V1.8$ pain signal inhibitor for the treatment of moderate to severe pain [J]. Pain, 2025, 14: 655-674.

[33] Alves SM, Teege L, Tomni C, et al. $Na_V1.8/Na_V1.9$ double deletion mildly affects acute pain responses in mice [J]. Pain, 2022, 166: 773-792.

[34] Goodwin G, Mcmahon SB. The physiological function of different voltage-gated sodium channels in pain [J]. Nat Rev Neurosci, 2021, 22: 263-274.

[35] Zhu J, Zhen G, An S, et al. Aberrant subchondral osteoblastic metabolism modifies $Na_V1.8$ for osteoarthritis [J]. Elife, 2020, 9: e57656.

[36] Han C, Vasylyev D, Macala LJ, et al. The G1662S $Na_V1.8$ mutation in small fibre neuropathy: impaired inactivation underlying DRG neuron hyperexcitability [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2014, 85: 499-505.

[37] Jarvis MF, Honore P, Shieh CC, et al. A-803467, a potent and selective $Na_V1.8$ sodium channel blocker, attenuates neuropathic and inflammatory pain in the rat [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104: 8520-8525.

[38] Gilchrist JM, Yang ND, Jiang V, et al. Pharmacologic characterization of LTGO-33, a selective small molecule inhibitor of the voltage-gated sodium channel $Na_V1.8$ with a unique mechanism of action [J]. Mol Pharmacol, 2024, 105: 233-249.

[39] Ivorra I, Alberola DA, Cobo R, et al. *Xenopus* oocytes as a powerful cellular model to study foreign fully-processed membrane proteins [J]. Membranes, 2022, 12: 986.

[40] Wallace TL, Callahan P, Tehim A, et al. RG3487, a novel nicotinic $\alpha7$ receptor partial agonist, improves cognition and sensorimotor gating in rodents [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2011, 336: 242-253.

[41] Haythornthwaite A, Stoelzle S, Haarmann C, et al. 19 Excitement over automated patch clamp: action potentials from stem cells and temperature effects on hERG inhibition [J]. Heart, 2011, 97: e6.

[42] Zhang G, Cui J. Patch-clamp and perfusion techniques to study ion channels expressed in *Xenopus* oocytes [J]. Cold Spring Harb Protoc, 2018, 2018: prot099051.

[43] Zhou X, Zhang Y, Tang D, et al. A chimeric $Na_V1.8$ channel expression system based on HEK293T cell line [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 337.

[44] Zhang ZN, Li Q, Liu C, et al. The voltage-gated Na^+ channel $Na_V1.8$ contains an ER-retention/retrieval signal antagonized by the $\beta3$ subunit [J]. J Cell Sci, 2008, 121: 3243-3252.

[45] Herzog RI, Liu C, Waxman SG, et al. Calmodulin binds to the C terminus of sodium channels $Na_V1.4$ and $Na_V1.6$ and differentially modulates their functional properties [J]. J Neurosci, 2003, 23: 8261-8270.