烟碱型乙酰胆碱受体*α6/α3β2β3*突变型的构建及其功能研究

唐则佩, 周　煊, 安佰雪, 于津鹏, 罗素兰*, 长孙东亭*

(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, nAChR) *α6/α3β2β3* 亚型广泛分布于中脑边缘多巴胺能神经通路等区域, 对多种神经递质的释放和药物奖励机制具有重要影响, 因此已成为多种神经精神疾病和药物成瘾治疗的潜在靶点。然而, 目前已发现的能够高效特异性作用于*α6/α3β2β3* nAChRs的配体分子多无法将该亚型与较为相似的*α3β2*亚型有效区分开, 且尚缺乏特异性配体作用于*α6/α3β2β3* nAChR的分子机制研究。本研究综合利用受体定点诱变、体外转录、显微注射、电生理检测等技术, 在非洲爪蟾卵母细胞中建立了野生型*α6/α3β2β3* nAChR及其*α6/α3*亚基单点突变体药物筛选模型, 并进一步分析了单氨基酸残基置换对*α6/α3β2β3* nAChRs的功能影响。本研究所涉及的动物实验方案已通过广西大学伦理委员会审批 (批准号: GXU-2023-0249)。结果表明, 乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) 激活野生型*α6/α3β2β3* nAChR的半激活剂量 (half maximal effective concentration, EC_{50}) 为18.5 μmol·L^{-1}。7种*α6/α3*亚基单点突变均导致激动剂活性不同程度的提升, 其中ACh作用于*α6/α3*[V112E]*β2β3*、*α6/α3*[T147S]*β2β3*、*α6/α3*[E152K]*β2β3* nAChR的活性变化最为显著, EC_{50}分别3.5、4.4、2.0 μmol·L^{-1}, 约为本体的0.1～0.2倍。相关结果为*α6/α3β2β3* nAChRs的结构−功能研究、与药物特异性结合的分子机制研究提供了模型, 也为靶向*α6/α3β2β3* nAChRs的药物设计和专一性改造优化提供了理论依据。

关键词: *α6/α3β2β3*烟碱型乙酰胆碱受体; PCR介导的定点诱变; 双电极电压钳; 非洲爪蟾卵母细胞; 半激活剂量

中图分类号: R966　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0513-4870(2026)01-0184-10

Construction and function of nicotinic acetylcholine receptor *α6/α3β2β3* mutants

TANG Ze-pei, ZHOU Xuan, AN Bai-xue, YU Jin-peng, LUO Su-lan*, ZHANGSUN Dong-ting*

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

Abstract: *α6/α3β2β3* nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) subtype is widely expressed in mesolimbic dopaminergic pathway and other regions, which plays a vital role in modulating the release of multiple neurotransmitters and drug reward mechanisms. It has become a potential therapeutic target for the treatment of various neuropsychiatric disorders and drug addiction. However, most ligands identified with high affinity and selectivity targeting *α6/α3β2β3* subtype showed limited subtype discrimination against the closely related *α3β2* subtype. Furthermore, the molecular mechanisms underlying ligands interact with *α6/α3β2β3* nAChR remain absent. In this study, the related approaches of site-directed mutagenesis of receptor, *in vitro* transcription and electrophysiological assay were utilized to establish the drug screening models of wild-type *α6/α3β2β3* nAChR and its *α6/α3* subunit single-point mutants. The effects led by single amino acid substitution to the function of *α6/α3β2β3* nAChR were also evaluated. The animal experimental protocol involved in this study has been approved by the

收稿日期: 2025-06-18;　修回日期: 2025-08-30.

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: sulan2021@gxu.edu.cn; zhangsundt@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0693

Ethics Committee of Guangxi University (Approval No: GXU-2023-0249). As the results showed, the half maximal effective concentration (EC_{50}) for ACh activating *α*6/*α*3*β*2*β*3 nAChR was 18.5 μmol·L^{-1}. All 7 single-point mutations of *α*6/*α*3 subunit resulted in increase of the agonist sensitivity, while the EC_{50} of ACh towards mutants *α*6/*α*3[V112E]*β*2*β*3、*α*6/*α*3[T147S]*β*2*β*3、*α*6/*α*3[E152K]*β*2*β*3 nAChR decreased to the greatest extent (EC_{50}s were 3.5, 4.4, and 2.0 μmol·L^{-1}, respectively, which were 0.1−0.2-fold relative to that of the wild-type receptor). These results established models for the research of structure-function relationship of *α*6/*α*3*β*2*β*3 nAChRs and molecular mechanism of ligand-receptor specific binding, as well as provided theoretical foundation for the design and optimization of selective drug leads targeting *α*6/*α*3*β*2*β*3 nAChRs.

Key words: *α*6/*α*3*β*2*β*3 nicotinic acetylcholine receptor; PCR-mediated site-directed mutagenesis; two-electrode voltage clamp technique; *Xenopus* oocyte; half-maximal excitatory concentration

nAChRs是一类可由内源性神经递质乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)激活开放的配体门控离子通道。根据其主要分布的组织差异性, 可将其分为肌肉型nAChRs (muscle-type nAChRs)和神经型nAChRs (neuronal nAChRs)。其中, 神经型nAChRs广泛分布于中枢和外周神经系统以及多种非神经元细胞中, 参与阿尔茨海默病、帕金森氏病、精神分裂症、焦虑、抑郁、神经性疼痛、肺癌等一系列疑难疾病的病理过程, 因此被视为潜在的新型药物治疗靶点进行深入研究[1,2]。神经型nAChRs由5个亚基聚合组成五聚体而产生功能活性, 而目前在哺乳动物细胞中已鉴定出11种不同的亚基用于神经型nAChRs的功能性组装(*α*2～*α*7、*α*9、*α*10、*β*2～*β*4等)。根据亚基组成方式和配比的差异, 神经型nAChRs又可分为由同种亚基构成的同源五聚体(如*α*7和*α*9 nAChRs亚型), 以及由两种不同亚基按特定比例组合构成的异源五聚体(*α*3*β*4、*α*6/*α*3*β*2*β*3、*α*6*β*4 nAChRs亚型等)[3,4]。复杂多变的组成方式为nAChRs不同亚型的功能多样性提供了结构基础, 使其能够在多种生命进程中发挥重要的调控作用。

含*α*6/*α*3亚基的nAChRs (*α*6/*α*3* nAChRs)在中枢神经系统中呈现选择性分布, 主要定位于纹状体、视神经通路及中脑多巴胺能神经元(如腹侧被盖区)等区域, 在尼古丁依赖和情绪调控等过程中起着关键作用[5-10]。目前已知的*α*6/*α*3* nAChRs主要包括*α*6/*α*3*β*2*β*3和*α*6*β*4两种亚型, 其中, *α*6/*α*3*β*2*β*3 nAChRs主要分布于黑质纹状体多巴胺能神经末梢、腹侧被盖区、伏隔核、视网膜、肾上腺嗜铬细胞等区域, 与多种神经递质释放和药物奖赏机制密切相关, 因此, *α*6/*α*3*β*2*β*3 nAChRs可作为治疗多种神经疾病和药物成瘾的潜在靶点[11-17]。然而, *α*6/*α*3*β*2*β*3 nAChRs在体外模型中难以表达, 几乎不能产生可检测的内向电流, 且*α*6亚基的N-端胞外结合域与*α*3亚基同源性较高(约为68%), 导致*α*6/*α*3*β*2*β*3和*α*3*β*2 nAChRs配体结合区空间结构较为相似, 现已发现的配体药物多难以将这两种亚型进行有效地区分。如*α*-芋螺毒素MII可高效阻断*α*6/*α*3*β*2*β*3和*α*3*β*2 nAChR, 其半阻断剂量(half-maximal inhibitory concentration, IC_{50})仅为390 pmol·L^{-1}, 但同时对*α*3*β*2亚型也具有较强的抑制作用(IC_{50}= 4.4 nmol·L^{-1})[18,19]。利用受体定点诱变构建技术建立*α*6/*α*3亚基突变体, 构建*α*6/*α*3*β*2*β*3突变体电生理筛选模型, 将为深入探究*α*6/*α*3亚基上影响配体结合的关键氨基酸位点及其作用机制, 以及专一性靶向*α*6/*α*3*β*2*β*3 nAChRs药物的设计、开发和改造提供重要基础。探究*α*6与*α*3亚基之间的关键差异位点, 有助于后期*α*6/*α*3*β*2*β*3和*α*3*β*2相关的药物改造, 进一步开发对*α*6/*α*3*β*2*β*3 nAChRs引起的疾病的专一性药物。高特异性配体药物如*α*-芋螺毒素TxIB能够专一性靶向*α*6/*α*3*β*2*β*3 nAChRs, 其IC_{50}仅为28 nmol·L^{-1}, 而对包括*α*3*β*2在内的其他nAChRs亚型无作用[20-25]。专一性药物的发现为*α*6/*α*3*β*2*β*3 nAChRs的结构−功能关系、相关疾病发病机制的研究提供宝贵的分子探针和药物先导物, 然而配体−受体相互作用分子机制相关研究的缺乏严重限制了这些高效活性分子的开发和利用。

nAChRs各亚型结构组成较为相似, 对配体结合功能的特异性主要由N-端胞外配体结合区(N-terminal extracellular ligand binding domain, LBD)决定, 该区域由相邻亚基N-端胞外结构域共同构成, 该区域亚基间一级结构的差异将导致LBD空间结构的变化, 进而影响配体结合特性和离子通道调控机制。单个亚基上特定氨基酸残基的突变可能导致受体的药理学特性发生显著变化, 利用定点诱变技术建立突变体模型并分析受体上关键氨基酸位点在配体结合过程中的重要性, 对于在体外*α*6/*α*3*β*2*β*3 nAChRs药物筛选模型的建立及优化, nAChRs的结构−功能关系的解析和潜在靶向药物的开发具有重要意义[26-28]。

本研究利用PCR介导的受体定点诱变技术对*α*6亚基N-端胞外结构域的特定氨基酸位点进行定向置

换, 并在非洲爪蟾卵母细胞中建立野生型和单点突变型 $\alpha6/\alpha3\beta2\beta3$ nAChRs 药物筛选模型, 通过检测和比较 ACh 激活野生型和突变型受体通道开放的作用活性变化确定 $\alpha6$ 亚基上特定位点变化对受体功能的影响, 对受体上影响配体结合的关键氨基酸位点进行探究。该研究的结果可用于 $\alpha6/\alpha3\beta2\beta3$ nAChRs 的结构−功能研究、可用于靶向药物筛选的 $\alpha6/\alpha3\beta2\beta3$ nAChRs 体外电生理模型建立及优化、为药物特异性作用于该受体亚型的分子机制分析提供了模型, 也为靶向 $\alpha6/\alpha3\beta2\beta3$ nAChRs 的药物设计和专一性改造优化提供了理论依据, 对未来 $\alpha6/\alpha3\beta2\beta3$ nAChRs 相关疾病的机制及其治疗方法的探究奠定了基础。

材料与方法

实验动物 用于获取卵母细胞的 2～3 年龄雌性非洲爪蟾 (Female *Xenopus laevis*) 由昆明动物研究所提供, 在环境温度 17～20 ℃且每日 10～12 h 光照的实验室条件下养殖超过半年后可开展实验。本研究所涉及的动物实验方案已通过广西大学伦理委员会审批 (批准号: GXU-2023-0249)。

实验材料 野生型 $\alpha6$ 亚基难以在体外诱导表达并产生内向电流, 因此本研究使用 $\alpha6/\alpha3$ 嵌合体亚基 (以 $\alpha6$ 亚基 N-端胞外区氨基酸序列替换 $\alpha3$ 亚基对应区域) 代替 $\alpha6$ 亚基进行相关研究[29]。研究表明, 该嵌合体在提高 $\alpha6^*$ nAChR 体外表达效率的同时不影响配体的结合作用。包含大鼠 $\alpha6/\alpha3$、$\beta2$、$\beta3$ nAChR 亚基 cDNA 的质粒获赠于美国 Utah 大学。SanPrep 柱式质粒小量抽提试剂盒 (#L312KA8161)、4SGelred 核酸染料 (#KA10KA6252)、HEPES (#L221BA0001)、硫酸庆大霉素 (#K508BA0015)、硫酸链霉素 (#H107BA0013)、青霉素 G 钠盐 (#J201BA0009) 购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司; Q5 超保真聚合酶 2× 预混液 (#10263592) 及限制性核酸内切酶 *Dpn* I (#10254267) 购于纽英伦生物技术 (北京) 有限公司; DL 10,000 DNA marker (#ANE0253A)、限制性核酸内切酶 *Sal* I (#AM91933A)、*Nhe* I (#AN82031A)、MiniBEST DNA 片段纯化试剂盒 (#AOE0859A) 购于宝日医生物技术 (北京) 有限公司; mMESSAGE mMACHINE™ T7 体外转录试剂盒 (#2760935)、MEGAclear™ 转录纯化试剂盒 (#2978839) 购于赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; ACh (#0001433126)、阿托品 (#SLBH0009V)、胶原酶 A (#9001-12-1) 购于德国 Merck 公司; 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

OR-2 缓冲液配制如下: 82.5 mmol·L^{-1} NaCl, 2.0 mmol·L^{-1} KCl, 1.0 mmol·L^{-1} $MgCl_2$, 5 mmol·L^{-1} HEPES, pH 7.1～7.7[29]。

ND-96 缓冲液配制如下: 96 mmol·L^{-1} NaCl, 2.0 mmol·L^{-1} KCl, 1.0 mmol·L^{-1} $MgCl_2$, 1.8 mmol·L^{-1} $CaCl_2$, 5.0 mmol·L^{-1} HEPES, pH 7.1～7.7[25]。

实验仪器 KCL-2000W 恒温恒湿培养箱 (日本 EYELA 东京理化器材株式会社); Mastercycler X50s 梯度 PCR 仪 (德国 Eppendorf AG 公司); Fluorchem E 凝胶成像系统 (美国 ProteinSimple Instruments 公司); Nanodrop One 超微量分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); P-1000 水平拉针仪 (美国 Sutter Instrument 公司); Nanoject II 显微注射仪 (美国 Drummond Scientific Company); Dendrite™ 数模转化器 (美国 Sutter Instrument 公司); OC-725D 双电极电压钳信号放大器 (美国 Warner Instruments 公司)。

单点诱变引物设计与合成 将 $\alpha6$ 和 $\alpha3$ nAChR 亚基 N-端胞外结构域 (N-terminal extracellular domain, ECD) 的氨基酸序列进行比对并确定第 34、63、112、116、140、147、152 位点差异 (图 1)。根据待突变单点氨基酸及 cDNA 编码信息, 使用 Primer Premier 5.0 针对每个突变位点设计一对完全互补的单点突变引物。引物长度一般为 25～45 bp, 与底物解链温度 (melting temperature, T_m) ≥ 78 ℃, GC 含量 ≥ 40%, 突变位点设计于引物序列中部, 两侧各保留 10～15 bp 正确碱基序列且以 1 个或多个 G 或 C 碱基结尾[30]。引物序列如表 1 所示, 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

PCR 介导的受体定点诱变 以载有 $\alpha6/\alpha3$ 亚基 cDNA 的质粒为模板, 与对应的单点诱变引物和 Q5 超保真聚合酶系按比例混合建立 PCR 反应体系如下: Q5 超保真聚合酶 2× 预混液 25 μL, 两条突变引物各 125 ng, 模板质粒 100 ng, ddH_2O 补至总体积 50 μL。利用 PCR 介导的定点诱变技术分别构建 $\alpha6/\alpha3$ 亚基单点突变型编码基因, 反应程序设置为: 预变性 (95 ℃、2 min), 变性 (95 ℃、20 s), 退火 (60 ℃、10 s), 延伸 (68 ℃、3 min), 18 个循环; 最后延伸 (68 ℃、5 min)[30,31]。待 PCR 反应结束后, 向反应液中加入 1 μL *Dpn* I, 充分混匀并在 37 ℃继续反应 2 h, 水解甲基化质粒模板。使用琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测, 确认目的产物条带后, 分别取 5 μL PCR 产物转化 DH5α 大肠杆菌感受态细胞。转化的细胞在 37 ℃、200 r·min^{-1} 培养 1 h 后涂布于含 60 μg·mL^{-1} 氨苄青霉素 (ampicillin, Amp^+) 的 LB 固体平板, 37 ℃培养 16～20 h, 挑取单菌落放入 Amp^+ 液体 LB 培养基中, 于 37 ℃、200 r·min^{-1} 扩大培养 12～14 h。12 000 r·min^{-1} 离心菌液获得菌体, 使用质粒小量抽提试剂盒提取突变体质粒, 并通过生工生物工程

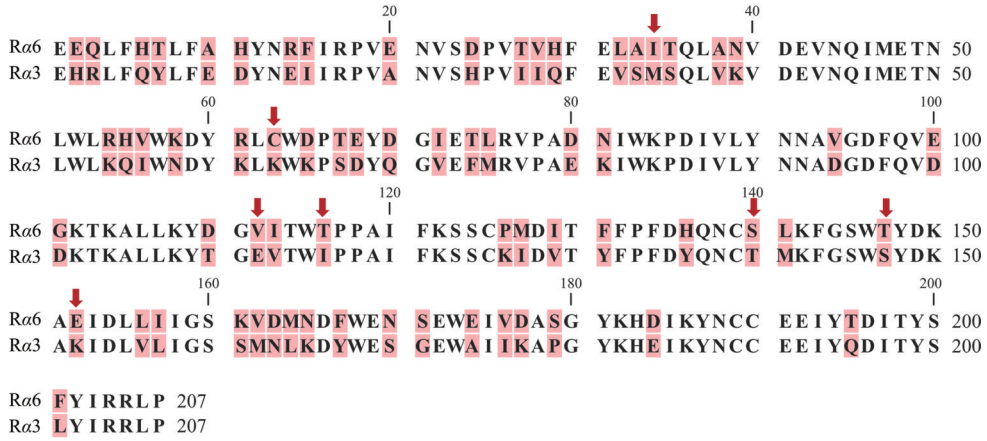


Figure 1 Amino acid sequence comparison of N-terminal extracellular domain (ECDs) of $\alpha6$ and $\alpha3$ nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits. ECD sequence alignment revealed that $\alpha6$ and $\alpha3$ subunits displayed high homology of 68% with 67 differences (shaded with red color) of total 207 residues. The mutation sites are marked with red arrows

Table 1 The primer sequences for single-point substitutions of $\alpha6/\alpha3$ nAChR subunit

Mutant	Sequence of primer (5'→3')
$\alpha6/\alpha3$[I34M]	FM: GCACTTTGAGTTGGCCATGACGCAGCTGGC
	RM: GCCAGCTGCGTCATGGCCAACTCAAAGTGC
$\alpha6/\alpha3$[C63K]	FM: GGAAGGACTACAGATTGAAATGGGATCCAACGGAGTACGATGGC
	RM: GCCATCGTACTCCGTTGGATCCCATTTCAATCTGTAGTCCTTCC
$\alpha6/\alpha3$[V112E]	FM: GTACGATGGGGAAATAACCTGGACCCCGCCAGC
	RM: GCTGGCGGGGTCCAGGTTATTTCCCCATCGTAC
$\alpha6/\alpha3$[T116I]	FM: GGGGTGATAACCTGGATCCCGCCAGCC
	RM: GGCTGGCGGGATCCAGGTTATCACCCC
$\alpha6/\alpha3$[S140T]	FM: CCCATTTGATCATCAAAACTGCACCCTGAAATTTGGG
	RM: CCCAAATTTCAGGGTGCAGTTTTGATGATCAAATGGG
$\alpha6/\alpha3$[T147S]	FM: CCTGAAATTTGGGTCCTGGTCCTACGACAAGGCTG
	RM: CAGCCTTGTCGTAGGACCAGGACCCAAATTTCAGG
$\alpha6/\alpha3$[E152K]	FM: GGACTTACGACAAGGCTAAGATCGACCTTCTCATCATTGG
	RM: CCAATGATGAGAAGGTCGATCTTAGCCTTGTCGTAAGTCC

(上海) 股份有限公司测序鉴定目标位点突变的正确性。

nAChR 亚基 cRNA 的制备 分别提取载有野生型和突变型 nAChRs 亚基 cDNA 的质粒, 并使用对应的限制性内切酶对质粒进行酶切使其线性化。以线性化质粒为模板, 依据 mMESSAGE mMACHINE™ T7 体外转录试剂盒说明书建立体外转录体系, 反应获得编码野生型和突变型 nAChRs 亚基的 cRNA, 具体为: 线性化质粒 1.0～1.5 ng、10× reaction buffer 2 μL、2× CAP/NTP 10 μL、enzyme mix 2 μL, 无酶 ddH_2O 补至终体积 20 μL, 37 ℃反应 10～12 h。使用 MEGAclear™ 转录纯化试剂盒回收 cRNA 产物, 并利用超微量分光光度计和琼脂糖凝胶电泳对其进行检测鉴定。

非洲爪蟾卵母细胞的分离 挑选性成熟且饲养 6 个月以上的非洲雌性爪蟾, 冰浴 45～60 min 使其完全麻醉, 将其腹部朝上置于手术台, 在下腹部距中线 1～2 cm 处消毒后纵向切开皮肤及肌肉黏膜 (切口长约 1 cm), 取出适量卵母细胞团块并暂存于 OR-2 缓冲液中。术后使用可吸收缝合线分别缝合肌肉黏膜和皮肤, 并将爪蟾单独饲养于含青霉素的 0.5% 生理盐水缓冲液中恢复[32]。

将取出的卵母细胞团分剪成直径约 0.5 cm 小团块, 并用 OR-2 缓冲液反复清洗 5～8 次至溶液澄清。称取 15～20 mg 胶原酶 A 溶于 OR-2 缓冲液, 与卵母细胞溶液充分混合并定容至 25 mL, 75 $r \cdot min^{-1}$ 室温反应 30～60 min, 待大部分卵母细胞呈分离状态而不再粘连时, 使用 OR-2 缓冲液反复清洗卵母细胞 10～15 次以完全去除胶原酶并终止反应[33]。挑选处于 V～VI 期、动植物极分明且生长状态良好的卵母细胞用于显微注射和电生理检测实验。

电生理筛选模型的建立与功能检测 将编码野生型或突变型 $\alpha6/\alpha3$ 亚基与野生型 $\beta2$、$\beta3$ 亚基的 cRNA 按照 1∶1∶1 (n∶n∶n) 的比例均匀混合后, 显微注射入挑选好的卵母细胞中, 并确保单亚基注射总量不低于每

细胞 15 ng。注射后将卵母细胞培养于含抗生素的 ND-96 缓冲液中, 17 ℃恒温培养 4～6 天后, 采用双电极电压钳技术检测受体在卵母细胞膜上的表达情况。

使用水平拉针仪拉制用于电生理检测的玻璃电极, 其尖端直径约为 1～3 μm, 填充 3 mol·L^{-1} KCl 溶液后电阻值约为 0.5～2 MΩ。将卵母细胞置于容积约 50 μL 的细胞槽中, 设置钳制电压为−70 mV, 并使用含 0.1 mg·mL^{-1} BSA 和 1 μmol·L^{-1} 阿托品的 ND-96 缓冲液以 2～4 mL·min^{-1} 流速持续灌流[30,31]。检测过程中, 每分钟给予细胞 2 s 不同浓度的 ACh (0.1、1、10、50、100、200、500 μmol·L^{-1}) 脉冲刺激, 记录通道开放产生的内向电流大小, 使用 Clampex 记录电生理数据。

数据处理 使用 Clampfit 11.3 分析全细胞电流信号, 以 100 μmol·L^{-1} ACh 诱导产生的内向电流数值为基准 (100%), 计算各浓度下 ACh 诱发电流的反应率, 将浓度与反应率数据导入 GraphPad Prism 8.0 软件, 采用非线性拟合方程 Response% = 100/[1+(EC_{50}/[ACh])^{nH}] (nH 为 Hill 系数) 分析数据并获得浓度−反应曲线和 ACh 激活野生型或突变型 *α*6/*α*3*β*2*β*3 nAChR 的半激活剂量 (half-maximal excitatory concentration, EC_{50})[33]。浓度−反应曲线上的每个数据点均来自至少 5 个不同卵母细胞的重复实验 ($n \geqslant 5$), 且以平均值 ± 标准误 (mean ± SEM) 的方式表示。

结果

1 *α*6/*α*3 nAChR 亚基基因的定点诱变

以包含 *α*6/*α*3 亚基 cDNA 的质粒为模板, 根据氨基酸差异位点设计引物并利用 PCR 介导的定点诱变技术构建单点突变型基因。结果表明, PCR 反应产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳检测中均呈现明显条带 (图 2A)。将 PCR 产物转化入 DH5*α* 大肠杆菌感受态细胞扩增后提取质粒, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳和超微量分光光度计对质粒进行鉴定, 结果如图 2 和表 2 所示, *α*6/*α*3 亚基单点突变体质粒浓度介于 0.20～0.31 μg·μL^{-1}, A_{260}/A_{280} 值介于 1.85～1.88, 且电泳条带清晰。DNA 测序结果表明突变位点正确且无异常突变, 可用于后续酶切和体外转录实验。

2 野生型和突变型 cRNA 的制备

使用 1% 琼脂糖凝胶电泳和超微量分光光度计对限制性内切酶酶切获得的线性化质粒进行鉴定。实验结果如图 2B、C 和表 2 所示, 线性化质粒浓度均在 0.21～0.35 μg·μL^{-1} 之间, A_{260}/A_{280} 值介于 1.85～1.88 之间, 符合体外转录实验要求。

以线性化质粒为模板, 体外转录获得野生型或突变型 nAChR 亚基的 cRNA, 并利用 1% 琼脂糖凝胶电泳和超微量分光光度计对质粒进行鉴定。结果如表 2、图 2D、E 所示, 编码野生型 *α*6/*α*3、*β*2、*β*3 和单点突变型 *α*6/*α*3 亚基 cRNA 的浓度介于 0.56～1.11 μg·μL^{-1} 之间, A_{260}/A_{280} 值介于 1.92～2.05 之间, 且电泳主条带清晰, 可用于后续显微注射和电生理药物筛选模型的建立。

3 野生型和突变型 *α*6/*α*3*β*2*β*3 nAChR 电生理药物筛选模型的建立和功能分析

将编码 *α*6/*α*3、*β*2、*β*3 亚基的 cRNA 按比例混合后注射到卵母细胞中诱导表达 4～6 天, 使用双电极电压钳检测受体在细胞膜上的表达情况。结果表明, 野生型及 7 种单点突变型 *α*6/*α*3*β*2*β*3 nAChR 在 100 μmol·L^{-1} ACh 刺激下均能正常开放并产生明显的内向电流, 表明电生理药物筛选模型成功建立 (图 3)。

使用不同浓度 ACh 刺激野生型 *α*6/*α*3*β*2*β*3 nAChR 及其单点突变体, 记录通道开放产生的内向电流值。结果表明, 野生型和突变型受体的通道开放程度随 ACh 浓度升高而不断增大 (图 4A～H)。将 ACh 浓度与电流反应率数据导入 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计与分析, 获得 ACh 激活各受体开放的浓度−反应曲线和 EC_{50} (图 4I、J, 表 3)。结果表明, ACh 激活野生型 *α*6/*α*3*β*2*β*3 nAChR 的 EC_{50} 为 18.5 μmol·L^{-1}, 而 ACh 对 7 种单点突变型受体的作用活性存在一定程度的上升, EC_{50} 降低至 2.0～9.5 μmol·L^{-1}, 分别为野生型受体

Table 2 The concentration and A_{260}/A_{280} values of plasmids, linearized products and cRNAs of WT *α*6/*α*3, *β*2 and *β*3 subunits, as well as single-point mutants of *α*6/*α*3 subunits

nAChR subtype	Concentration of plasmid/ μg·μL^{-1}	A_{260}/A_{280}	Concentration of linearized plasmid/μg·μL^{-1}	A_{260}/A_{280}	Concentration of cRNA/ μg·μL^{-1}	A_{260}/A_{280}
*α*6/*α*3	0.24	1.88	0.23	1.85	0.56	1.98
*β*2	0.26	1.85	0.29	1.87	1.11	2.01
*β*3	0.31	1.87	0.35	1.84	0.75	1.97
*α*6/*α*3[I34M]	0.28	1.86	0.28	1.85	0.62	1.99
*α*6/*α*3[C63K]	0.24	1.89	0.27	1.87	0.66	1.92
*α*6/*α*3[V112E]	0.26	1.86	0.21	1.88	0.97	1.99
*α*6/*α*3[T116I]	0.22	1.87	0.29	1.89	0.84	2.03
*α*6/*α*3[S140T]	0.25	1.86	0.26	1.86	0.78	1.98
*α*6/*α*3[T147S]	0.21	1.88	0.25	1.85	0.59	2.01
*α*6/*α*3[E152K]	0.20	1.85	0.24	1.88	0.79	2.05

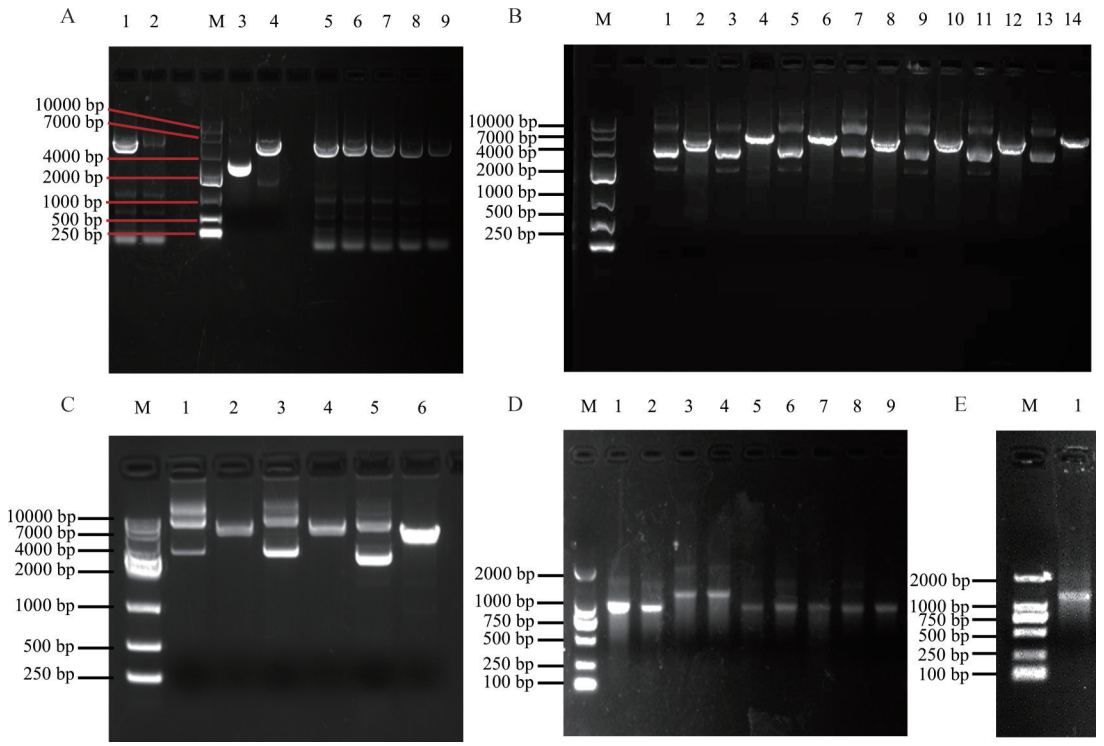


Figure 2 Agarose gel electrophoresis analysis of plasmids, linearized products and cRNAs of *α*6/*α*3, *β*2 and *β*3 nAChR subunits. A: 3: Plasmid encoding wild-type (WT) *α*6/*α*3 subunit; 4: Linearized plasmid encoding WT *α*6/*α*3 subunit; 1, 2, 5−9: PCR products of plasmids encoding *α*6/*α*3 subunit with single-point mutations of I34M, C63K, V112E, T116I, S140T, T147S, E152K respectively generated by a site-directed mutagenesis approach; B: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13: Plasmids encoding *α*6/*α*3[I34M], *α*6/*α*3[C63K], *α*6/*α*3[V112E], *α*6/*α*3[T116I], *α*6/*α*3[S140T], *α*6/*α*3[T147S] and *α*6/*α*3[E152K] subunits; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14: Linearized plasmids encoding *α*6/*α*3[I34M], *α*6/*α*3[C63K], *α*6/*α*3[V112E], *α*6/*α*3[T116I], *α*6/*α*3[S140T], *α*6/*α*3[T147S] and *α*6/*α*3[E152K] subunits with corresponding restriction enzyme; C: 1, 3, 5: Plasmids of WT *α*6/*α*3, *β*2 and *β*3 subunits; 2, 4, 6: Linearized plasmids of WT *α*6/*α*3, *β*2, *β*3 with corresponding restriction enzyme; D: 1, 3, 4: cRNAs of WT *α*6/*α*3, *β*2 and *β*3 subunits; 2, 5−9: cRNAs of *α*6/*α*3[I34M], *α*6/*α*3[C63K], *α*6/*α*3[V112E], *α*6/*α*3[T116I], *α*6/*α*3[S140T], *α*6/*α*3[T147S] subunits; E: 1: cRNA of *α*6/*α*3[E152K] subunits; M: DL 10 000 DNA marker

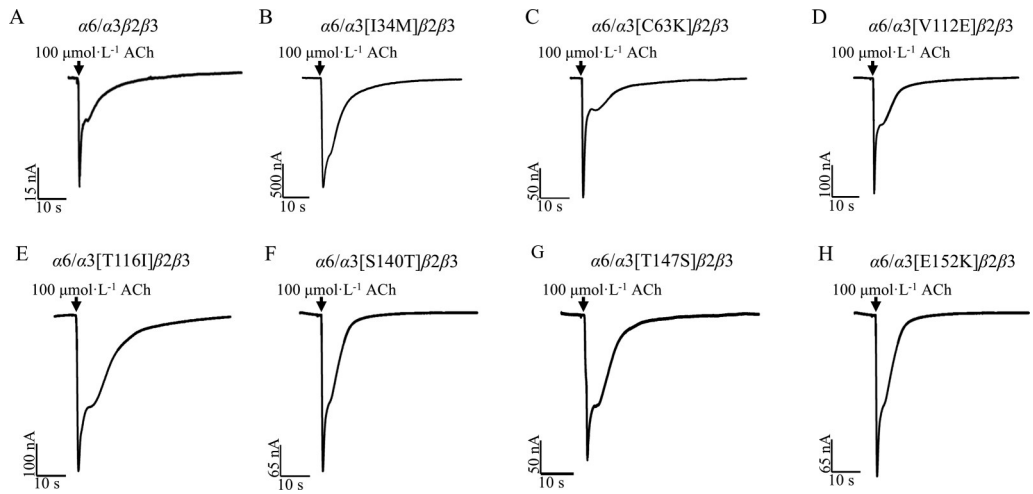


Figure 3 Current traces of WT *α*6/*α*3*β*2*β*3 nAChR (A) evoked by 100 μmol·L^{-1} ACh, as well as its single-point mutants *α*6/*α*3[I34M]*β*2*β*3 (B), *α*6/*α*3[C63K]*β*2*β*3 (C), *α*6/*α*3[V112E]*β*2*β*3 (D), *α*6/*α*3[T116I]*β*2*β*3 (E), *α*6/*α*3[S140T]*β*2*β*3 (F), *α*6/*α*3[T147S]*β*2*β*3 (G), *α*6/*α*3[E152K]*β*2*β*3 (H), respectively

的0.1～0.5倍, 浓度−反应曲线发生明显左移, 说明这7个位点上氨基酸的置换对*α*6/*α*3*β*2*β*3 nAChR上ACh结合区域的结构均产生一定影响, 导致ACh结合受体的活性发生较明显的变化 (图4, 表3)。

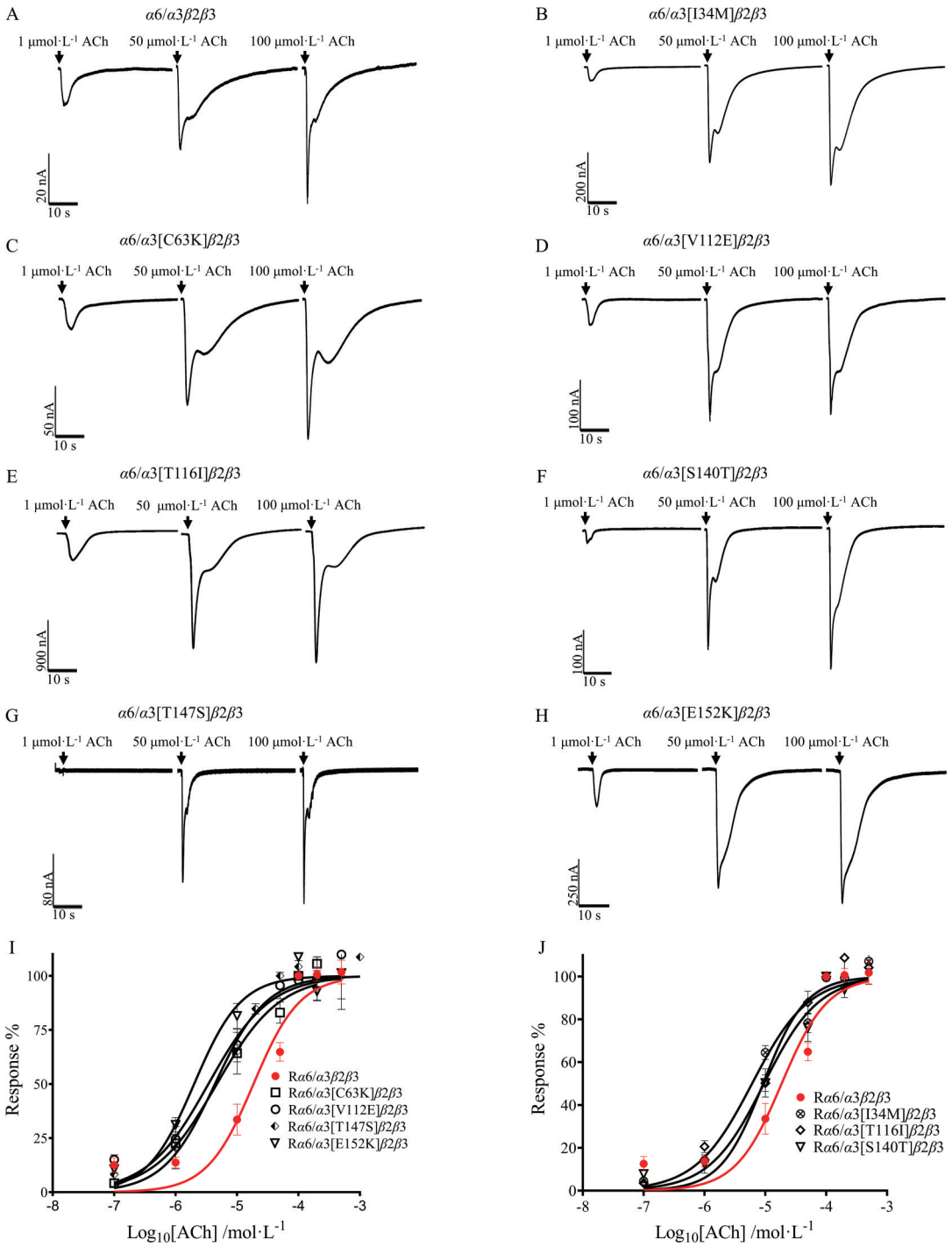


Figure 4 ACh differentially activating WT *α6/α3β2β3* nAChR and its single-point mutants. A−H: Current traces of WT *α6/α3β2β3* nAChR (A) evoked by 1, 50 and 100 μmol·L^{-1} ACh, respectively, as well as its single-point mutants *α6/α3*[I34M]*β2β3* (B), *α6/α3*[C63K]*β2β3* (C), *α6/α3*[V112E]*β2β3* (D), *α6/α3*[T116I]*β2β3* (E), *α6/α3*[S140T]*β2β3* (F), *α6/α3*[T147S]*β2β3* (G), *α6/α3*[E152K]*β2β3* (H). I, J: Dose-response curves for the activation of WT *α6/α3β2β3* nAChR and its single-point mutants by ACh. n= 5−12, $\bar{x} \pm$ SEM

讨论

α6/α3β2β3 nAChR在中脑边缘多巴胺能神经元通路中特异性表达, 通过调控多巴胺能神经递质释放介导奖赏刺激行为反应, 因而成为尼古丁成瘾机制研究和帕金森病治疗的重要靶点[10,34]。然而, 目前稳定的*α6/α3β2β3* nAChRs的药物筛选模型较少, 异源表达检测体系的建立依然面临较大挑战和困难, 仍存在异源表达效率低下、检测难度大等问题, 且缺乏可用的配体特异性作用机制研究方法, 严重阻碍了配体−受体选择性结合的分子机制、*α6/α3β2β3* nAChR相关的生理

Table 3 The EC_{50} values for ACh activating WT α6/α3β2β3 nAChR and its single-point mutants. [a]The 95% confidence intervals for the EC_{50} values

nAChR	EC_{50}/μmol·L^{-1} [a]	Hill slope [a]	Ratio (mutant WT α6/α3β2β3)
α6/α3β2β3	18.5 (13.3−25.8)	1.1 (0.8−1.5)	1.0
α6/α3[I34M]β2β3	6.0 (4.8−7.6)	0.9 (0.8−1.1)	0.3
α6/α3[C63K]β2β3	4.7 (3.6−6.1)	0.8 (0.7−1.0)	0.3
α6/α3[V112E]β2β3	3.5 (2.5−4.7)	0.9 (0.7−1.1)	0.2
α6/α3[T116I]β2β3	9.2 (6.8−12.4)	1.4 (0.8−1.7)	0.5
α6/α3[S140T]β2β3	9.5 (6.6−13.6)	1.0 (0.7−1.2)	0.5
α6/α3[T147S]β2β3	4.4 (2.5−7.5)	1.0 (0.6−1.5)	0.2
α6/α3[E152K]β2β3	2.0 (1.3−3.1)	1.1 (0.7−1.6)	0.1

病理功能及靶向药物改造与开发应用等方面的深入研究。

非洲爪蟾卵母细胞是一种较为理想的膜蛋白体外表达分析系统, 其直径约为 1.0～1.2 mm, 遗传背景清晰, 易于获取和进行 RNA 注射、目的基因诱导表达及多种膜蛋白功能活性检测相关实验操作 (如电生理检测等)。该细胞中含有丰富的 rRNA、tRNA 及多种内源性信号转导因子, 能够保证外源 mRNA 的高效表达。与哺乳动物表达系统 (如 HEK239 细胞) 相比, 非洲爪蟾卵母细胞不仅坚韧耐用, 还可通过精确控制外源 mRNA 的显微注射量和组合方式, 在较宽范围内实现蛋白表达水平的可控变化。此外, 非洲爪蟾卵母细胞的膜上离子通道表达水平较哺乳动物细胞也有大幅提升, 通常在诱导表达 3～5 天后即可获得 μA 级电流[18,19,35]。综上, 非洲爪蟾卵母细胞已作为常用的高效体外表达系统应用于野生型和突变型 nAChRs 电生理药物筛选模型的建立、特异性靶向药物的筛选及配体−受体相互作用机制研究。

Kuryatov 等[36]的研究表明, 野生型 α6 与 β4 亚基能够在非洲爪蟾卵母细胞表达体系中组合形成功能性离子通道型受体, 但与 β2 和 β3 共表达时易形成胞内非功能性亚基聚集体, 而非在细胞膜上形成功能性受体, 因此难以用电生理方式检测通道开放产生的内向电流情况。为了在非洲爪蟾卵母细胞中建立功能性 α6β2 nAChRs 电生理活性筛选模型并进一步探究受体功能, 他们构建了 α6/α3 和 α6/α4 嵌合体亚基的编码基因, 以编码 α6 亚基胞外 N-端结构域 (参与胞外配体结合区的形成) 的 cDNA 序列分别替换 α3 和 α4 亚基的对应区域编码序列。检测结果表明, α6/α3 和 α6/α4 嵌合体亚基参与 nAChR 五聚体组装并形成功能性受体的水平显著提升, 同时与配体选择性结合的能力基本与野生型 α6* 受体相一致[37]。此外, 多个团队研究发现, β3 亚基参与哺乳动物细胞中 α6/α3β2β3 nAChR 的形成, 作为辅助亚基对受体的正确组装具有重要影响。在非洲爪蟾卵母细胞中建立体外药物筛选模型的过程中, 常将 β3 亚基与 α6/α3 和 β2 亚基共表达以期提高 α6/α3β2β3 nAChR 的表达水平[36-38]。本研究利用关键位点定向诱变方式, 深入探究影响受体功能活性的关键位点, 以期提高 α6β2β3 受体表达效率, 为后续靶向该受体亚型的专一性配体筛选和改造提供模型。

利用定向诱变方法对亚基上的关键氨基酸位点的功能进行探究, 目前已成为该领域常用的研究方法之一。Boorman 及 Capelli 等[39,40]通过在 β3 亚基跨膜区的 9'位点引入单点突变, 将疏水的缬氨酸置换为亲水的丝氨酸 (V273S), 提高了 α6/α3β2β3 在 HEK293 细胞系中的表达水平, 成功建立了稳定表达 α6/α3β2β3 [V273S] nAChR 的哺乳动物细胞系。Hone 等[41]通过定点诱变研究表明, β4 亚基 119 位氨基酸突变导致 α6/α3β4 nAChRs 对 PeIA 的敏感性发生不同程度的变化。以上研究结果表明, nAChRs 亚基的某个或某些氨基酸对于配体的选择性结合至关重要, 对其进行有目的的定向突变可使其疏水性、带电性、空间位阻发生改变, 进而影响胞外配体结合区的空间结构, 导致配体结合特性发生变化。

本研究通过对比 α6/α3 和 α3 亚基间胞外 N-端氨基酸序列, 确定关键位点差异及其对离子通道和受体功能的影响。利用 PCR 介导的定点诱变技术对 α6/α3 亚基上指定位点进行定向置换, 构建了 7 个单点突变型 α6/α3 亚基编码基因, 并通过体外转录、显微注射等技术进一步在非洲爪蟾卵母细胞中建立了野生型 α6/α3β2β3 及其单点突变体的药物筛选模型。电生理结果表明, α6/α3 亚基上的 7 个氨基酸突变均在一定程度上降低了 ACh 作用于 α6/α3β2β3 nAChR 的 EC_{50}, 其中第 112、147、152 位突变对 ACh 结合敏感性的影响最为显著, 相较于本体提高约 4～10 倍, 表明这些位点可能在 ACh 结合口袋的空间结构形成中发挥重要作用; I34M 和 T116I 突变导致 α6/α3β2β3 nAChR 在被 ACh 激活开放时产生的电流幅度显著增加, 表明突变对受体的结构与功能产生了一定程度影响, 使其对离子通透的能力有所提升。此外, 受体关键位点的定向置换也可能

对除ACh之外的激动剂活性产生明显影响。Chen等[33]使用ACh、金雀花碱、尼古丁3种激动剂对$\alpha3\beta4$ nAChRs及其三点突变体$\alpha3$[K152E, E184D, Q195T]$\beta4$进行功能评估研究，结果表明，[K152E, E184D, Q195T]三点联合突变明显降低了受体对金雀花碱的敏感性，同时使ACh和尼古丁的结合能力有所提高，说明同一突变对激动剂结合活性的影响可能存在差别。针对本研究建立的突变型$\alpha6/\alpha3\beta2\beta3$ nAChRs电生理筛选模型，多种激动剂可能表现出不同的药理学活性变化，如敏感性上升或下降等，相关结果需后续实验加以验证。

本研究在非洲爪蟾卵母细胞中成功建立了野生型$\alpha6/\alpha3\beta2\beta3$ nAChR及其7种单点突变体的电生理药物筛选模型，并进一步评估了激动剂ACh作用于野生型和突变型受体的EC_{50}变化，初步揭示了$\alpha6/\alpha3$亚基关键氨基酸位点对$\alpha6/\alpha3\beta2\beta3$ nAChR功能的影响和调控作用，建立了功能增强且可用于药物筛选的模型。后续可结合分子动力学模拟、冷冻电镜和晶体结构解析等技术对配体选择性作用于$\alpha6/\alpha3\beta2\beta3$ nAChR的分子机制进行更深入的探索。相关结果为靶向$\alpha6/\alpha3\beta2\beta3$ nAChRs的药物筛选和作用机制分析提供了模型，也为相关药物的专一性改造优化和开发应用提供了理论基础。

作者贡献：唐则佩负责质粒突变体构建、cRNA制备、电生理检测、数据分析、论文撰写；周煊、安佰雪负责质粒提取；于津鹏、罗素兰、长孙东亭负责实验设计、实验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] Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology [J]. Prog Neurobiol, 2004, 74: 363-396.

[2] Giastas P, Zouridakis M, Tzartos SJ, et al. Understanding structure-function relationships of the human neuronal acetylcholine receptor: insights from the first crystal structures of neuronal subunits [J]. Br J Pharmacol, 2018, 175: 1880-1891.

[3] Wang J, Lindstrom J. Orthosteric and allosteric potentiation of heteromeric neuronal nicotinic acetylcholine receptors [J]. Br J Pharmacol, 2018, 175: 1805-1821.

[4] Zoli M, Pistillo F, Gotti C, et al. Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain [J]. Neuropharmacology, 2015, 96: 302-311.

[5] Antolin-Fontes B, Ables JL, Görlich A, et al. The habenulo-interpeduncular pathway in nicotine aversion and withdrawal [J]. Neuropharmacology, 2015, 96: 213-222.

[6] Fucile S, Matter JM, Erkman L, et al. The neuronal alpha6 subunit forms functional heteromeric acetylcholine receptors in human transfected cells [J]. Eur J Neurosci, 1998, 10: 172-178.

[7] Champtiaux N, Han ZY, Bessis A, et al. Distribution and pharmacology of alpha6-containing nicotinic acetylcholine receptors analyzed with mutant mice [J]. J Neurosci, 2002, 22: 1208-1217.

[8] Azam L, Winzer-Serhan UH, Chen Y, et al. Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within midbrain dopamine neurons [J]. J Comp Neurol, 2002, 444: 260-274.

[9] Pons S, Fattore L, Cossu G, et al. Crucial role of alpha4 and alpha6 nicotinic acetylcholine receptor subunits from ventral tegmental area in systemic nicotine self-administration [J]. J Neurosci, 2008, 28: 12318-12327.

[10] Quik M, Perez XA, Grady SR, et al. Role of $\alpha6$ nicotinic receptors in CNS dopaminergic function: relevance to addiction and neurological disorders [J]. Biochem Pharmacol, 2011, 82: 873-882.

[11] Champtiaux N, Gotti C, Cordero-Erausquin M, et al. Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice [J]. J Neurosci, 2003, 23: 7820-7829.

[12] Han ZY, Novère NL, Zoli M, et al. Localization of nAChR subunit mRNAs in the brain of *Macaca mulatta* [J]. Eur J Neurosci, 2000, 12: 3664-3674.

[13] Quik M, Polonskaya Y, Gillespie A, et al. Localization of nicotinic receptor subunit mRNAs in monkey brain by *in situ* hybridization [J]. J Comp Neurol, 2000, 425: 58-69.

[14] Wang J, Kuryatov A, Lindstrom J. Expression of cloned $\alpha6^*$ nicotinic acetylcholine receptors [J]. Neuropharmacology, 2015, 96: 194-204.

[15] Biasi MD, Dani JA. Reward, addiction, withdrawal to nicotine [J]. Annu Rev Neurosci, 2011, 34: 105-130.

[16] Letchworth SR, Whiteaker P. Progress and challenges in the study of $\alpha6$-containing nicotinic acetylcholine receptors [J]. Biochem Pharmacol, 2011, 82: 862-872.

[17] Novère NL, Zoli M, Changeux JP, et al. Neuronal nicotinic receptor alpha6 subunit mRNA is selectively concentrated in catecholaminergic nuclei of the rat brain [J]. Eur J Neurosci, 1996, 8: 2428-2439.

[18] 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.

[19] McIntosh JM, Azam L, Staheli S, et al. Analogs of alpha-conotoxin MII are selective for alpha6-containing nicotinic acetylcholine receptors [J]. Mol Pharmacol, 2004, 65: 944-952.

[20] Cuny H, Yu R, Tae HS, et al. α -Conotoxins active at $\alpha3$-containing nicotinic acetylcholine receptors and their molecular determinants for selective inhibition [J]. Br J Pharmacol, 2018, 175: 1855-1868.

[21] Drenan RM, Grady SR, Whiteaker P, et al. *In vivo* activation of midbrain dopamine neurons *via* sensitized, high-affinity alpha 6 nicotinic acetylcholine receptors [J]. Neuron, 2008, 60: 123-136.

[22] Turner M, Eidemiller S, Martin B, et al. Structural basis for alpha-conotoxin potency and selectivity [J]. Bioorg Med Chem, 2009, 17: 5894-5899.

[23] Harvey SC, Mcintosh JM, Cartier GE, et al. Determinants of specificity for alpha-conotoxin MII on alpha3beta2 neuronal nicotinic receptors [J]. Mol Pharmacol, 1997, 51: 336-342.

[24] Luo S, Zhangsun DT, Wu Y, et al. Characterization of a novel α-conotoxin from conus textile that selectively targets $\alpha6/\alpha3\beta2\beta3$ nicotinic acetylcholine receptors [J]. J Biol Chem, 2013, 288: 894-902.

[25] Luo S, Zhangsun DT, Schroeder CI, et al. A novel $\alpha4/7$-conotoxin LvIA from *Conus lividus* that selectively blocks $\alpha3\beta2$ *vs* $\alpha6/\alpha3\beta2\beta3$ nicotinic acetylcholine receptors [J]. FASEB J, 2014, 28: 1842-1853.

[26] Chrestia JF, Turani O, Araujo NR, et al. Regulation of nicotinic acetylcholine receptors by post-translational modifications [J]. Pharmacol Res, 2023, 190: 106712.

[27] Dash B, Bhakta M, Chang Y, et al. Identification of N-terminal extracellular domain determinants in nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) $\alpha6$ subunits that influence effects of wild-type or mutant $\beta3$ subunits on function of $\alpha6\beta2^*$- or $\alpha6\beta4^*$-nAChR [J]. J Biol Chem, 2011, 286: 37976-37989.

[28] Gerzanich V, Kuryatov A, Anand R, et al. "Orphan" alpha6 nicotinic AChR subunit can form a functional heteromeric acetylcholine receptor [J]. Mol Pharmacol, 1997, 51: 320-327.

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

[30] Xie T, Qin Y, Zhao J, et al. Molecular determinants of species specificity of α-conotoxin TxIB towards rat and human $\alpha6/\alpha3\beta4$ nicotinic acetylcholine receptors [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24: 8618.

[31] Dong J, Zhang P, Xie J, et al. Loop2 size modification reveals significant impacts on the potency of α-conotoxin TxID [J]. Mar Drugs, 2023, 21: 286.

[32] Almouzni G, Wolffe AP. Nuclear assembly, structure, and function: the use of *Xenopus in vitro* systems [J]. Exp Cell Res, 1993, 205: 1-15.

[33] Chen SM, Yu JP, Zhang XF, et al. Construction and functional evaluation of an $\alpha3$[K152E, E184D, Q195T]$\beta4$ nicotinic acetylcholine receptor mutant [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2022, 57: 1054-1062.

[34] Yang K, Hu J, Lucero L, et al. Distinctive nicotinic acetylcholine receptor functional phenotypes of rat ventral tegmental area dopaminergic neurons [J]. J Physiol, 2009, 587: 345-361.

[35] Dascal N. Voltage clamp recordings from *Xenopus* oocytes [J]. Curr Protoc Neurosci, 2001, Chapter 6: Unit 6.12.

[36] Kuryatov A, Olale F, Cooper J, et al. Human alpha6 AChR subtypes: subunit composition, assembly, and pharmacological responses [J]. Neuropharmacology, 2000, 39: 2570-2590.

[37] Tumkosit P, Kuryatov A, Luo J, et al. Beta3 subunits promote expression and nicotine-induced up-regulation of human nicotinic alpha6* nicotinic acetylcholine receptors expressed in transfected cell lines [J]. Mol Pharmacol, 2006, 70: 1358-1368.

[38] Dash B, Lukas RJ. Modulation of gain-of-function $\alpha6^*$-nicotinic acetylcholine receptor by $\beta3$ subunits [J]. J Biol Chem, 2012, 287: 14259-14269.

[39] Boorman JP, Groot-Kormelink PJ, Sivilotti LG, et al. Stoichiometry of human recombinant neuronal nicotinic receptors containing the b3 subunit expressed in *Xenopus* oocytes [J]. J Physiol, 2000, 529 Pt 3: 565-577.

[40] Capelli AM, Castelletti L, Chen YH, et al. Stable expression and functional characterization of a human nicotinic acetylcholine receptor with $\alpha6\beta2$ properties: discovery of selective antagonists [J]. Br J Pharmacol, 2011, 163: 313-329.

[41] Hone AJ, Talley TT, Bobango J, et al. Molecular determinants of α -conotoxin potency for inhibition of human and rat $\alpha6\beta4$ nicotinic acetylcholine receptors [J]. J Biol Chem, 2018, 293: 17838-17852.