

## 烟碱型乙酰胆碱受体 $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] $\beta 4$ 突变型的构建及其功能研究

陈舒苗<sup>1</sup>, 于津鹏<sup>2</sup>, 张笑凡<sup>1</sup>, 朱晓鹏<sup>2</sup>, 罗素兰<sup>1,2\*</sup>, 长孙东亭<sup>1\*</sup>

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

2. 广西大学医学院, 广西南宁 530004)

**摘要:**  $\alpha 3\beta 4$  烟碱型乙酰胆碱受体 (nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs) 是成瘾、癌症和肥胖等重要疾病的潜在新靶点。本研究对大鼠 (rat, r)  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs 的  $\alpha 3$  亚基上的 3 个氨基酸位点同时进行突变, 将这 3 个位点分别突变为  $\alpha 6$  亚基上与  $\alpha 3$  亚基上相对应的氨基酸种类, 构建  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] $\beta 4$  三点突变型受体, 并研究其功能。利用 PCR 介导的定点突变方法构建了  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] 三点突变载体, 体外转录获得相应的 cRNA, 与野生型  $\beta 4$  亚基的 cRNA 按相同比例注射到非洲爪蟾卵母细胞中进行重组表达, 然后用双电极电压钳技术检测其受体活性和功能。测定  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs 野生型和突变型在乙酰胆碱、尼古丁和金雀花碱 3 种不同激动剂的诱导下, 其配体门控电流的大小以及门控特征, 比较野生型和突变型受体之间的功能差异。 $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] 三点突变体的功能与野生型相比存在显著差异。乙酰胆碱、尼古丁和金雀花碱对  $\alpha 3\beta 4$  nAChR 野生型的半数最大效应浓度 ( $EC_{50}$ ) 分别为 277.5、34.02 和 23.05  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 针对三点突变体, 3 种激动剂的  $EC_{50}$  分别为 170.5、26.6 和 98.45  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。3 种激动剂对突变体的  $EC_{50}$  与野生型受体的  $EC_{50}$  相比, 其活性变化分别为 0.6、0.8 和 4.3 倍。其中突变型受体对金雀花碱的活性影响最显著, 其激动剂活性下降了 77%。此外, 与 1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酰胆碱诱导的峰值电流幅度相比, 金雀花碱对野生型和突变型  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs 的最大激动效率 ( $E_{\text{max}}$ ) 从 94.12% 提升至 155.08%。 $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] $\beta 4$  三点突变型明显降低了对金雀花碱的敏感性, 但其最大激动电流幅度明显变大。三点突变型略微增强了对乙酰胆碱和尼古丁的敏感性, 说明  $\alpha 3$  亚基上的这 3 个氨基酸对  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs 的配体结合功能影响较大, 对不同激动剂的影响情况各异, 这为今后探究  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs 重要受体的精细结构和功能以及相关疾病的发病机制研究提供了很好的线索。

**关键词:** PCR 介导定点诱变;  $\alpha 3\beta 4$  烟碱型乙酰胆碱受体突变型; 电生理学功能研究; 激动剂; 通道开放分子机制  
中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)04-1054-09

## Construction and functional evaluation of an $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] $\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptor mutant

CHEN Shu-miao<sup>1</sup>, YU Jin-peng<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-fan<sup>1</sup>, ZHU Xiao-peng<sup>2</sup>,  
LUO Su-lan<sup>1,2\*</sup>, ZHANGSUN Dong-ting<sup>1\*</sup>

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

**Abstract:**  $\alpha 3\beta 4$  nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are potential therapeutic targets in diseases such as addiction, cancer, and obesity. In this study, by replacing three amino acids of the  $\alpha 3$  subunit with the corresponding positions of the  $\alpha 6$  subunit simultaneously, an  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] subunit mutant was

收稿日期: 2021-11-15; 修回日期: 2021-12-15.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (41966003).

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

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1632

constructed by PCR-mediated site-directed mutagenesis and its cRNA was obtained by *in vitro* transcription. The cRNA of mutant subunits mixed in equal molar ratios with  $\beta 4$  subunits were microinjected into *Xenopus* oocytes. The pharmacological activity and function of  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] $\beta 4$  nAChR was evaluated by a two-electrode voltage clamp electrophysiological technique. Acetylcholine, nicotine, and cytosine were used as agonists to evaluate the magnitude of ligand-gated currents and gating characteristics of wild-type and mutant  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs. The half-maximal effective concentrations ( $EC_{50}$ ) of acetylcholine, nicotine, and cytosine on wild-type  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs were 277.5, 34.02 and 23.05  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively, while their  $EC_{50}$  values with  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] $\beta 4$  nAChR were 170.5, 26.6, and 98.45  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively. Thus these  $EC_{50}$  values for the three agonists towards the mutant receptor were changed 0.6-fold, 0.8-fold, and 4.3-fold, respectively, compared with the wild-type receptor; cytosine was most strongly affected, with a 77% decrease in potency. However, the maximum agonistic efficiency ( $E_{\text{max}}$ ) of cytosine on wild-type and mutant  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs was increased from 94.12% to 155.08% relative to the peak current amplitude induced by 1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  acetylcholine. Thus, although the  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] $\beta 4$  nAChR had significantly reduced sensitivity to cytosine, the maximum current amplitude induced by cytosine was clearly increased. This mutant had slightly increased sensitivity to acetylcholine and nicotine. The results indicate that these three amino acids of the  $\alpha 3$  subunit have important and varying effects on ligand binding to the  $\alpha 3\beta 4$  nAChR, providing a basis for further structure-functional research on  $\alpha 3\beta 4$  nAChR, as well as the pathology of related diseases.

**Key words:** PCR mediated site-directed mutation; the mutant of  $\alpha 3\beta 4$  nicotinic acetylcholine receptor; electrophysiological evaluation; agonist; molecular mechanism of channel opening

烟碱型乙酰胆碱受体 (nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs) 广泛分布于中枢和外周神经系统, 属于五聚体跨膜配体门控离子通道型膜蛋白, 存在于哺乳动物身体的各个组织器官和体液中, 发挥着极其重要的生理功能<sup>[1,2]</sup>。nAChRs 激活多种神经递质的释放, 包括多巴胺、去甲肾上腺素、五羟色胺、 $\gamma$ -氨基丁酸和乙酰胆碱等; 介导众多中枢和外周神经系统的生理功能, 包括学习、记忆、应答、镇痛和运动控制等。nAChRs 因此而成为筛选、诊断和治疗很多重要疾病药物的关键靶点, 包括疼痛、成瘾、抑郁、帕金森症、痴呆、智障、癫痫、精神病、癌症、重症肌无力和前列腺肥大等疑难杂症。

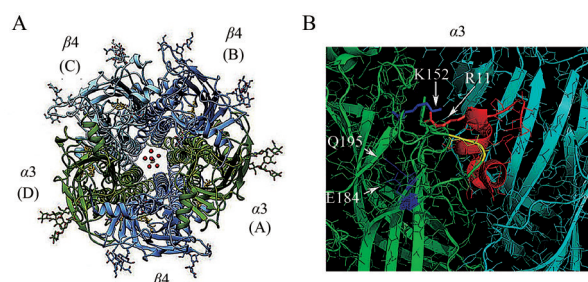
nAChRs 的结构和功能异常复杂, 由很多亚型组成。至今已发现用于构成哺乳动物 nAChRs 的亚基共 16 种: 9 种  $\alpha$  亚基 ( $\alpha 1\sim\alpha 7$ 、 $\alpha 9$ 、 $\alpha 10$ )、4 种  $\beta$  亚基 ( $\beta 1\sim\beta 4$ ) 以及  $\gamma$ 、 $\delta$  和  $\epsilon$  亚基<sup>[3]</sup>。根据组成方式的不同, nAChRs 可分为由同一种亚基组成的同源五聚体 [如 ( $\alpha 7$ )<sub>5</sub>], 以及由至少两种不同亚基组成的异源五聚体 [如肌肉型 ( $\alpha 1$ )<sub>2</sub> $\beta 1\delta\epsilon$ 、( $\alpha 3$ )<sub>3</sub>( $\beta 4$ )<sub>2</sub> 和 ( $\alpha 3$ )<sub>2</sub>( $\beta 4$ )<sub>3</sub> 等], nAChRs 的每个亚基均含有 4 个约由 20 个氨基酸构成的疏水跨膜区 (M1~M4, 呈  $\alpha$ -螺旋结构), 以及位于胞外的 N 端和 C 端结构域。nAChRs 的 N 端胞外区负责配体的识别与结合, 对受体的功能起着关键作用。

nAChRs 各个亚型的结构非常相似, 但却发挥着截然不同的药理学功能, 至今各个亚型的精细结构和生理病理学功能尚不清楚, 严重阻碍了各种 nAChRs

亚型在相关疾病发病机制的研究以及新型治疗药物的开发进程。nAChRs 受体上某个或某些氨基酸的突变, 往往导致离子通道配体门控活性的改变, 从而诱发离子通道功能异常相关疾病。因此, 研究清楚特定氨基酸对 nAChRs 功能活性的影响和作用, 对某种亚型的结构和功能之间的关系阐明具有非常重要的意义<sup>[4]</sup>。

研究发现,  $\alpha 3\beta 4$  nAChR 亚型与成瘾<sup>[5]</sup>、小细胞肺癌、宫颈癌和肺癌等癌症<sup>[6-8]</sup>以及与食欲控制有关的肥胖<sup>[9]</sup>等重要疾病密切相关, 是这些疑难杂症的潜在新靶点。nAChRs  $\alpha$  和  $\beta$  亚基  $\alpha$  的胞外配体结合区 (ligand binding domain, LBD) 是配体结合的主要区域<sup>[10]</sup>。鼠源  $\alpha 3$  和  $\alpha 6$  亚基的 LBD 具有较高的同源性 ( $\sim 67\%$ ), 是配体难于区分两种亚型的主要原因。 $\beta 4$  亚基参与组成  $\alpha 3\beta 4$  和  $\alpha 6\beta 4$  两种亚型, 如何发现配体区分两种亚型的药理机制, 确定配体结合的关键位点, 是针对两种亚型进行分子设计的关键。为了确定  $\alpha$  亚基上的这些关键位点, Azam 等<sup>[11,12]</sup>设计并制备了一系列  $\alpha 6\rightarrow\alpha 3$  亚基 LBD 的单点置换突变体, 并利用电生理技术评估了特异性配体芋螺毒素与受体结合的活性变化。结果显示,  $\alpha 6$  亚基上第 152、184、195 位氨基酸的单点突变, 会显著降低  $\alpha$ -芋螺毒素 [S4A, E11A, L15A]MII 和 [N11R]PeIA 对  $\alpha 6\beta 2\beta 3$  nAChR 亚型的阻断作用。单个氨基酸的改变使  $\alpha$ -芋螺毒素 [S4A, E11A, L15A]MII 对  $\alpha 6\beta 2\beta 3$  nAChR 的活性下降了近 90%, 而将 3 个氨基酸位点同时改变后,  $\alpha$ -芋螺毒素 [S4A, E11A, L15A]MII 对该受体的活性几乎丧失。单个氨基酸的改变影响了

拮抗剂芋螺毒素与受体的结合活性, 3个位点同时改变则起到了协同作用, 影响着拮抗剂  $\alpha$ -芋螺毒素 [S4A, E11A, L15A]MII 与受体的结合活性。3个位点的改变是否会影响激动剂对受体功能的调控, 尚未见有相关研究报道。本研究通过对大鼠 (rat, r)  $\alpha 3\beta 4$  nAChR 亚型的  $\alpha 3$  亚基上胞外区的 3 个氨基酸位点同时进行突变, 将这 3 个位点分别突变为与之最相近的  $\alpha 6$  亚基上相对应的氨基酸种类, 构建  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] $\beta 4$  三点突变型受体, 并研究其激动剂门控功能。期望获知  $\alpha 3$  亚基上这些特定氨基酸对  $\alpha 3\beta 4$  受体功能的作用和影响情况, 为今后探究  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs 这个重要亚型的精细结构和生理功能以及阐明与之相关疾病的发病机制, 提供有益的线索和研究基础。 $\alpha 3\beta 4$  nAChRs 的结构图如图 1 所示<sup>[12,13]</sup>。



**Figure 1** Structures of the  $\alpha 3\beta 4$  nicotinic acetylcholine receptor (nAChR). A: Cryo-EM structures of the  $\alpha 3\beta 4$  nAChR in lipidic and detergent environment; B: Homology binding model of  $\alpha$ -conotoxin to  $\alpha 3\beta 2$  nAChR, and the residues shown in blue are Glu184 and Gln195 of the C-loop, and Lys152 of the B-loop, shown as a stick model

### 材料与方法

**实验材料、试剂与仪器** 含有  $\alpha 3$ 、 $\beta 4$  nAChRs 亚基基因的质粒克隆, 由美国 Salk 生物研究所的 Stephen F. Heinemann 教授提供。实验用雌性非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 购自美国 Nasco 公司, 在实验室 17 °C 环境下饲养 1 个月以上。饲养用水经过滤、沉

淀处理。ND-96 缓冲液组成为 96 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>·6H<sub>2</sub>O、1.8 mmol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、5 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES, pH 7.5。OR-2 缓冲液组成为 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>·6H<sub>2</sub>O、5 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES, pH 7.5。

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞、质粒小量提取试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司); 乙酰胆碱、胶原酶 A、阿托品 (美国 Merck 公司); 金雀花碱 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司); DNA 片段纯化试剂盒 MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.4.0 [宝日医生物技术 (北京) 有限公司]; DNA 体外转录试剂盒 mMESSAGING mMACHINE SP6 Transcription Kit、RNA 纯化试剂盒 MEGA Clear Kit (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Q5 超保真聚合酶、质粒线性化所需的限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I、*Dpn* I、DL 15000 DNA Marker (宝日医工程大连有限公司); DNA marker IV [天根生化科技 (北京) 有限公司]; Ampicillin (北京索莱宝科技有限公司); HEPES、BSA [生工生物工程 (上海) 有限公司]; 其他生物试剂均为国产分析纯。突变所需引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。主要仪器包括: Digidata 1550B 数模转换器、Axon 900A 放大器 (美国 Molecular Devices 公司); Nanodrop 微量分光光度计 (美国 ThermoFisher 公司); 小型水平电泳系统 (美国 Bio-Rad 公司); FluorChem E 凝胶成像分析系统 (美国 ProteinSimple 公司); PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司); KCL-2000A 恒温恒湿培养箱 (日本 EYELA 公司)。

**突变体引物的设计** 对比  $\alpha 3$  和  $\alpha 6$  亚基的胞外 N-端配体结合区域 (ligand binding domain, LBD) 的氨基酸序列 (图 2), 确定对应位点氨基酸的差异。 $\alpha 3$  和  $\alpha 6$  亚基的氨基酸序列同源性最高, 相似度最大, 极难区分。图 2 有差异的氨基酸位置用粉红色高亮显示。根据编码拟突变位点氨基酸的密码子信息, 采用 Primer Premier 5.0 软件, 设计制备  $\alpha 3$  亚基点突变体的上下游

		20		40		60																																																								
R $\alpha$ 3	E	H	R	L	F	Q	Y	L	F	E	D	Y	N	E	I	R	P	V	A	N	V	S	H	P	V	I	I	Q	F	E	V	S	M	S	Q	L	V	K	V	D	E	V	N	Q	I	M	E	T	N	L	W	L	K	Q	I	W	N	D	Y	60		
R $\alpha$ 6	E	E	Q	L	F	H	T	L	F	A	H	Y	N	R	F	I	R	P	V	E	N	V	S	D	P	V	T	V	H	F	E	L	A	I	T	Q	L	A	N	V	D	E	V	N	Q	I	M	E	T	N	L	W	L	R	H	V	W	K	D	Y	60	
		80		100		120																																																								
R $\alpha$ 3	K	L	K	W	K	P	S	D	Y	Q	G	V	E	F	M	R	V	P	A	E	K	I	W	K	P	D	I	V	L	Y	N	N	A	D	G	D	F	Q	V	D	D	K	T	K	A	L	L	K	Y	T	G	E	V	T	W	I	P	P	A	I	120	
R $\alpha$ 6	R	L	C	W	D	P	T	E	Y	D	G	I	E	T	L	R	V	P	A	D	N	I	W	K	P	D	I	V	L	Y	N	N	A	V	G	D	F	Q	V	E	G	K	T	K	A	L	L	K	Y	D	G	V	I	T	W	I	P	P	A	I	120	
		140		160		180																																																								
R $\alpha$ 3	F	K	S	S	C	K	I	D	V	T	Y	F	P	F	D	Y	Q	N	C	T	M	K	F	G	S	W	S	Y	D	K	A	K	I	D	L	V	L	I	G	S	S	M	N	L	K	D	Y	W	E	S	G	E	W	A	I	I	K	A	P	G	180	
R $\alpha$ 6	F	K	S	S	C	P	M	D	I	T	F	F	P	F	D	H	Q	N	C	S	L	K	F	G	S	W	T	Y	D	K	A	E	I	D	L	L	I	I	G	S	K	V	D	M	N	D	E	F	W	E	N	S	E	W	E	I	V	D	A	S	G	180
		200		207		207																																																								
R $\alpha$ 3	Y	K	H	E	I	K	Y	N	C	C	E	E	I	Y	Q	D	I	T	Y	S	I	Y	I	R	R	L	P	207																																		
R $\alpha$ 6	Y	K	H	D	I	K	Y	N	C	C	E	E	I	Y	T	D	I	T	Y	S	F	Y	I	R	R	L	P	207																																		

**Figure 2** The amino acid sequence comparison of ligand binding domain between rat (r) $\alpha 3$  and  $\alpha 6$  nAChR subunits

引物(表1)。采用分步突变的方法,将 $\alpha 3$ 亚基胞外N-端LBD区第152位的赖氨酸(lysine, Lys)、第184位的谷氨酸(glutamic acid, Glu)、第195位的谷氨酰胺(glutamine, Gln)按顺序突变为 $\alpha 6$ 亚基上的对应氨基酸残基,构建 $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T]三点突变体亚基的质粒载体。

**PCR介导的定点突变** 以包含 $\alpha 3$ 亚基序列的质粒为模板,对 $\alpha 3$ 亚基上第152位氨基酸进行定点突变,突变引物序列见表1。在PCR反应体系中,依次加入模板100 ng,正向引物125 ng,反向引物125 ng, Q5聚合酶预混液( $2\times$  mix) 25  $\mu\text{L}$ ,最后用超纯水(ddH<sub>2</sub>O)补足至总体积50  $\mu\text{L}$ 。PCR反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min;95  $^{\circ}\text{C}$ 变性20 s,60  $^{\circ}\text{C}$ 退火10 s,68  $^{\circ}\text{C}$ 延伸3 min,18个循环;末次循环68  $^{\circ}\text{C}$ 再延伸5 min。反应结束后,向反应体系中加入1  $\mu\text{L}$  Dpn I,37  $^{\circ}\text{C}$ 反应2 h,以去除甲基化模板。将PCR产物转入DH5 $\alpha$ 感受态细胞后,涂布于含氨苄青霉素抗性的LB平板上,37  $^{\circ}\text{C}$ 培养14~16 h,选取单克隆菌落,提取质粒并送生工生物工程(上海)有限公司测序,确定目标位点是否突变正确。三点突变亚基的质粒通过DNA测序验证无误后,进行后续实验。

以测序正确的、包含 $\alpha 3$ [K152E]单点突变亚基的质粒为模板,使用上述方法按顺序分别对第184和195位的氨基酸差异位点进行突变,最终获得包含 $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T]三点突变亚基的重组质粒。大量培养含三点突变亚基的重组菌,扩增目的质粒并提取纯化,然后用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳分别检测目的质粒的浓度和纯度。

**$\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T]三点突变亚基 cRNA (体外转录的 mRNA) 的制备** 使用限制性内切酶EcoR I切割 $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T]突变体亚基质粒,使其线性化,用试剂盒MiniBEST DNA Fragment Purification Kit回收线性化产物。然后用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测其纯度和浓度后,用作体外转录的线性化DNA模板。根据试剂盒mMESSAGE mMACHINE SP6 Transcription Kit说明书,构建20  $\mu\text{L}$ 体外转录反应体系:模板(1~1.5)  $\mu\text{g}$ , $10\times$  Reaction Buffer 2  $\mu\text{L}$ , $2\times$  dNTP 10  $\mu\text{L}$ , Enzyme Mix 2  $\mu\text{L}$ ,用

ddH<sub>2</sub>O补足至总体积20  $\mu\text{L}$ 。37  $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下反应6 h后,向转录产物加入2  $\mu\text{L}$  Turbo DNase,继续反应60 min水解质粒模板。体外转录合成的终产物cRNA,经MEGA Clear Kit纯化后,利用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测cRNA的浓度和纯度。将制备好的cRNA分装成小份,并于-70  $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。用类似的方法,制备了 $\alpha 3$ 、 $\beta 4$ 亚基的cRNA。

**非洲爪蟾卵母细胞的分离和显微注射** 选取性成熟的非洲爪蟾,冰浴麻醉60 min,待其完全麻醉后做手术,在其下腹部一侧距中线1~2 cm处切开,小心取出部分成团卵母细胞,然后缝好伤口让其静养。将成团卵母细胞剪成小团块,置于OR-2溶液中冲洗至澄清,随后转入含0.5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 胶原酶的OR-2溶液中,于室温下100  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡消化约20~40 min,直至大部分呈单个分离细胞状态,使用OR-2溶液洗去酶液。在显微镜下挑选状态良好、动植物极分明的卵母细胞进行显微注射。野生型或突变型 $\alpha 3$ 分别与 $\beta 4$ 亚基的cRNA按照1:1的质量进行混合,混匀后注射到非洲爪蟾卵母细胞质中,每个卵母细胞注射55.2 nL cRNA混合液。

**$\alpha 3\beta 4$  nAChRs野生型及其三点突变型的表达与电生理学检测** 将注射后的卵母细胞置于含抗生素的ND-96培养液中,所含抗生素的种类和浓度分别为青霉素10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、链霉素10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、庆大霉素100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。17  $^{\circ}\text{C}$ 下培养48 h以上,让受体进行充分表达,用于下一步的电生理学活性检测。将已注射cRNA、培养过的非洲爪蟾卵母细胞置于容积为50  $\mu\text{L}$ 的细胞槽中,用含有0.1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  BSA的ND-96溶液灌流,流速为2~4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。每1 min的灌流时间内,首先给予卵母细胞2 s的激动剂脉冲刺激,使其膜上通道开放产生内向电流,随后58 s用ND-96冲洗。反复进行此过程,用双电极电压钳电生理学技术,记录不同浓度的激动剂诱导 $\alpha 3\beta 4$  nAChRs野生型及其三点突变型的电流大小。电流记录采用Clampfit 11.3软件,每个浓度针对每个受体,记录6~8个卵母细胞的电流数据。

**统计学分析** 以1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)或金雀花碱(cytisine, Cyt)诱导产生的电流为受体通道开放最大电流,按100%计算。对于尼古丁

**Table 1** The primer sequences for mutations at position 152, 184 and 195 of  $\alpha 3$  nAChR subunit

Mutant primer	Sequence of bases (5'→3')
K152E FM	GAGGACCAGGTTCGATTCTGCCTTGTCTAGGACC
K152E RM	GGTCTACGACAAGGCAGAAATCGACCTGGTCCTC
E184D FM	CCTCACAGCAGTTGACTTGATGTCAITTTGTAGCCC
E184D RM	CCTCACAGCAGTTGACTTGATGTCAITTTGTAGCCC
Q195T FM	CAGCGAGTACGTGATGTCTGTGTAGATCTCCTCACAGC
Q195T RM	GCTGTGAGGAGATCTACACAGACATCACGTACTCGCTG

(nicotine, Nic) 激动剂, 以  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  诱导产生的峰值电流作为 100%。用不同浓度的激动剂对相应受体产生的门控电流, 除以受体通道开放最大电流, 所得的百分比为该浓度的电流反应率, 即 Response%。不同浓度激动剂的范围在  $1\sim 1\,000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  之间。

将激动剂诱导通道开放的电流反应率导入 Graph-Pad Prism7.0 软件 (美国 GraphPad Software) 进行统计分析。采用非线性方程  $\text{Response}\% = 100/[1 + (\text{EC}_{50}/[\text{agonist}])^n]$  (其中 nH 代表 Hill 系数), 计算激动剂对  $\alpha 3\beta 4$  nAChR 及其突变体的半数最大效应浓度 (half maximum effect concentration,  $\text{EC}_{50}$ ); 浓度反应曲线图中 Response% 为平均数  $\pm$  标准误 (mean  $\pm$  SEM)。组间数据比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结果

### 1 $\alpha 3$ 亚基基因的定点突变

以载有野生型  $\alpha 3$  亚基基因的质粒为模板, 通过 PCR 介导的定点突变技术分步制备  $\alpha 3[\text{K152E}, \text{E184D}, \text{Q195T}]$  突变型亚基基因。将 PCR 产物用 *Dpn* I 酶消化后, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 (图 3), 突变体的 PCR 产物大小均为 5 000 bp 左右。经过 DNA 测序验证,  $\alpha 3$  三点突变体基因的序列完全正确, 突变型亚基

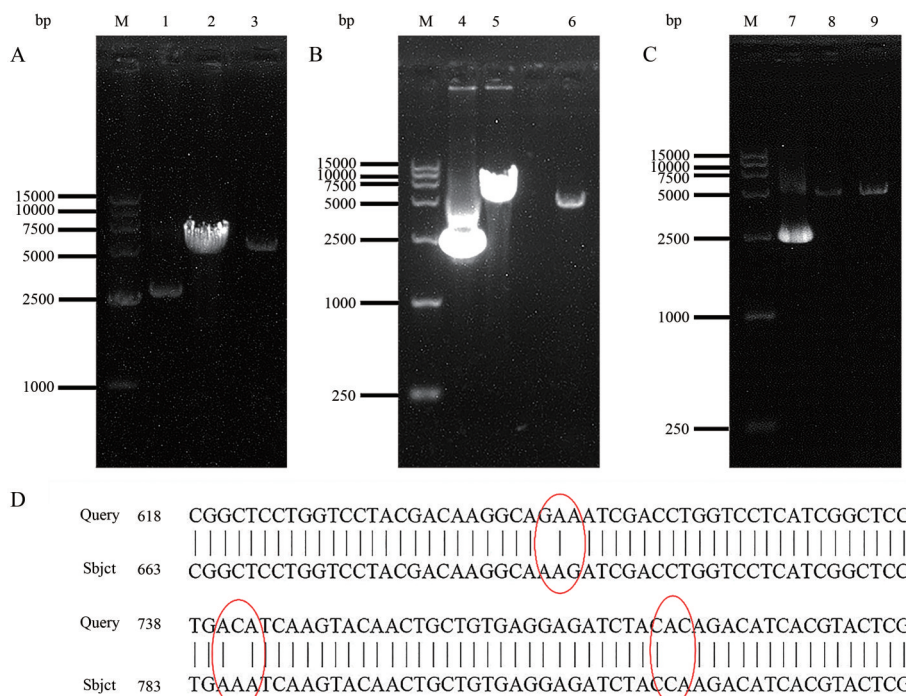
基因的重载载体构建成功 (图 3D)。

### 2 野生型和突变型 $\alpha 3$ 亚基质粒的提取和酶切线性化

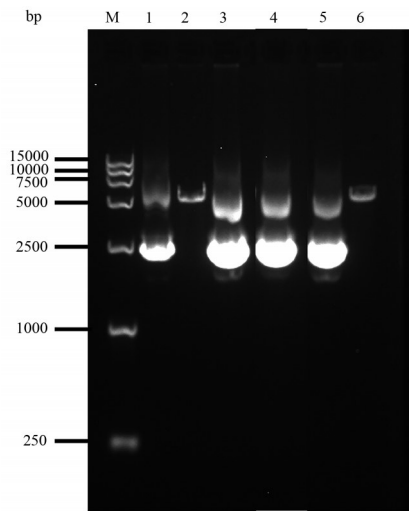
大量提取测序正确的野生型  $\alpha 3$  和突变型  $\alpha 3[\text{K152E}, \text{E184D}, \text{Q195T}]$  亚基基因的质粒, 并用 *Eco*R I 酶切使之线性化。取野生型和突变型  $\alpha 3$  亚基基因质粒及对应酶切产物各  $3 \mu\text{L}$ , 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 (图 4)。结果显示, 突变型  $\alpha 3$  亚基基因质粒大小为 2 500 bp 左右, 酶切线性化后为单一条带, 说明酶切线性化彻底。线性化质粒 (图 4 中的第 2 和第 6 泳道) 在电泳图上运动速度比螺旋结构的环状质粒要慢。紫外分光光度计测定了野生型和突变型质粒以及线性化 DNA 的浓度和  $A_{260}/A_{280}$  比值。这些 DNA 的浓度在  $(0.2\sim 0.3) \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ,  $A_{260}/A_{280}$  比值在 1.86~1.88 之间, 其质量和纯度符合要求。

### 3 野生型和突变型 $\alpha 3$ 亚基 cRNA 的制备

以酶切纯化后的线性 DNA 分子作为模板, 以 SP6 为启动子, 在体外转录人工合成了野生型  $\alpha 3$  和突变型  $\alpha 3[\text{K152E}, \text{E184D}, \text{Q195T}]$  亚基的 mRNA, 简称 cRNA。 $\alpha 3$  cRNA 的浓度较高, 为  $0.8 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。 $\alpha 3[\text{K152E}, \text{E184D}, \text{Q195T}]$  cRNA 的浓度稍低, 为  $0.43 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。用相同的方法制备了  $\alpha 3[\text{K152E}]$ 、 $\alpha 3[\text{E184D}]$ 、 $\alpha 3[\text{Q195T}]$  和  $\beta 4$  亚基的 cRNA。这些 cRNA 的  $A_{260}/A_{280}$  比值  $> 2$ , 在 2.08~2.1 之间。所获得的 cRNA 的浓度和纯度均符合要求,



**Figure 3** The agarose gel electrophoresis of  $\alpha 3$  subunit mutants. A-C: The agarose gel electrophoresis. M: DNA marker; 1, 4, 7:  $\alpha 3$  subunit plasmid; 2, 5, 8:  $\alpha 3$  subunit linear DNA; 3:  $\alpha 3[\text{K152E}]$  subunit PCR product; 6:  $\alpha 3[\text{K152E}, \text{E184D}]$  subunit PCR product; 9:  $\alpha 3[\text{K152E}, \text{E184D}, \text{Q195T}]$  subunit PCR product; D: Sequence alignment of  $\alpha 3$  subunit and its mutant. Query is the gene sequence after mutation, Sbjct is the wild type gene sequence, and the red box is the mutated region successfully



**Figure 4** The agarose gel electrophoresis of  $\alpha 3$  subunit and linearized DNA. M: DNA marker; 1:  $\alpha 3$  subunit plasmid; 2:  $\alpha 3$  subunit linear DNA; 3:  $\alpha 3$ [K152E] subunit plasmid; 4:  $\alpha 3$ [K152E, E184D] subunit plasmid; 5:  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] subunit plasmid; 6:  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] subunit linear DNA

可用于卵母细胞显微注射表达相应的受体。

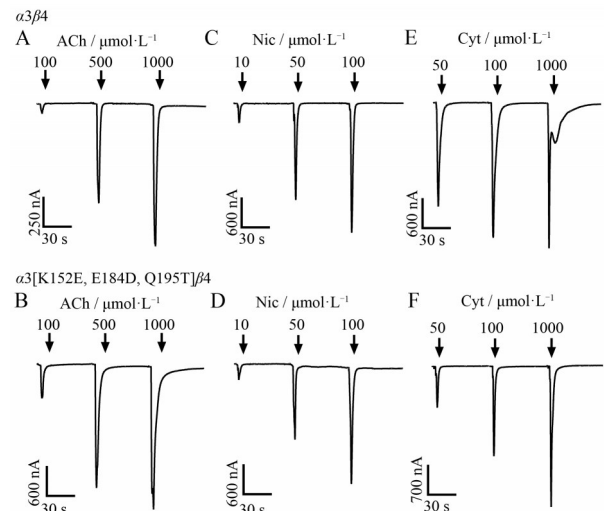
#### 4 激动剂 ACh 对 $\alpha 3\beta 4$ nAChR 及其突变体的活性分析

分别将野生型  $\alpha 3$  或三点突变型  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] 亚基的 cRNA 与  $\beta 4$  亚基的 cRNA, 按 1:1 的比例混合后, 显微注射入非洲爪蟾卵母细胞中分别表达野生型  $\alpha 3\beta 4$  与突变型  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] $\beta 4$  nAChRs, 构建电生理学活性检测实验模型。利用不同浓度的 ACh 刺激  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs 及三点突变体, 都能够诱导离子通道的正常开放, 并产生内向电流, 电流大小与 ACh 浓度呈正相关 (图 5、6)。结果表明, 相同浓度的 ACh 对野生型  $\alpha 3\beta 4$  受体产生的配体门控电流明显低于  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] $\beta 4$  突变型受体产生的电流 (图 5A、B)。ACh 激动野生型  $\alpha 3\beta 4$  和突变型  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] $\beta 4$  受体的  $EC_{50}$  分别为 277.5 (258.6~297) 和 170.5 (157.8~184.2)  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 二者相

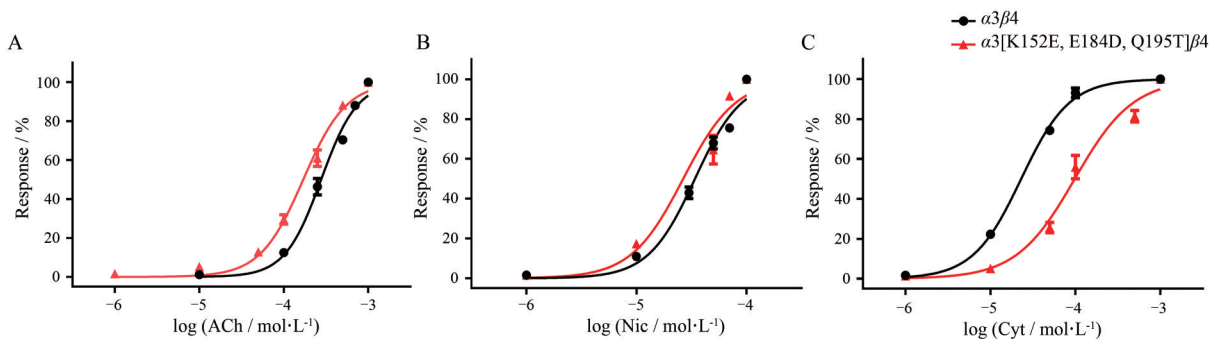
差 1.6 倍。3 个位点突变后  $EC_{50}$  降低约 40%, 说明 ACh 对突变型受体的激动活性增强了约 40%, 突变型对 ACh 的敏感性增加。在 1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ACh 的刺激条件下, 二者都达到了其最大电流开放度 (图 6A)。

#### 5 激动剂 Nic 对 $\alpha 3\beta 4$ nAChR 及其突变体的活性分析

利用不同浓度的 Nic 刺激  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs 及三点突变体, 照样能够诱导离子通道的正常开放, 并产生内向电流, 电流大小与 Nic 浓度呈正相关 (图 5、6)。结果表明, 相同浓度的 Nic 对野生型  $\alpha 3\beta 4$  受体产生的配体门控电流与  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] $\beta 4$  突变型受体产生的电流大小很接近 (图 5C、D)。Nic 激动野生型  $\alpha 3\beta 4$  和突变型  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] $\beta 4$  受体的  $EC_{50}$  大小相当, 分别为 34.02 (30.69~39.39) 和 26.6 (20.92~35.24)  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 二者相差仅 1.3 倍。3 个位点突变后  $EC_{50}$  降低约 20%, 即 Nic 对突变型受体的激动活性略有增强 (图 6B)。与 ACh 不同的是, Nic 在较低浓度 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的刺激条件下, 野生型  $\alpha 3\beta 4$  和突变型受体就可达到其最大电流开放度, 说明这两个受体对 Nic 的敏感性比对乙酰胆碱的门控反应更灵敏。



**Figure 5** The current traces of wide-type and mutant  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs evoked by different concentrations of different agonists. A, B: Acetylcholine (ACh); C, D: Nicotine (Nic); E, F: Cytisine (Cyt)



**Figure 6** Concentration response curves of wide-type and mutant  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs gated by 3 agonists. A: ACh; B: Nic; C: Cyt

### 6 激动剂 Cyt 对 $\alpha 3\beta 4$ nAChR 及其突变体的活性分析

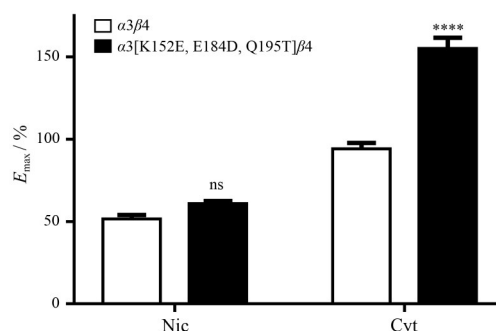
不同浓度的 Cyt 刺激  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs 及三点突变体, 配体门控离子通道开放产生的内向电流变化趋势与上述 ACh 和 Nic 都不相同 (图 5、6)。结果显示, 相同浓度的 Cyt, 对野生型  $\alpha 3\beta 4$  受体产生的配体门控电流, 比  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] $\beta 4$  突变型受体产生的电流明显大很多 (图 5E、F)。野生型受体在 Cyt 50、100、1 000  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  3 个浓度下, 其门控电流增长幅度较小, 即 3 个电流峰值差异较小, 随 Cyt 浓度增长电流增大缓慢; 而三点突变型受体在这 3 个 Cyt 浓度下, 其门控电流增长幅度较大, 即 3 个电流峰值差异较大, 随 Cyt 浓度增长电流增大较快。Cyt 在浓度 1 000  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的刺激条件下, 野生型  $\alpha 3\beta 4$  和突变型受体均可达到其最大电流开放度。

Cyt 激动野生型  $\alpha 3\beta 4$  和突变型  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] $\beta 4$  受体的  $\text{EC}_{50}$  大小变化非常显著, 分别为 23.05 (21.12~25.15) 和 98.45 (82.18~119.1)  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 二者相差 4.3 倍。即 3 个位点突变后  $\text{EC}_{50}$  增加了 4.3 倍, 也就是说 Cyt 对突变型受体的激动活性明显下降, 突变型对 Cyt 的敏感性大大降低 (图 6C)。突变型的 Cyt 浓度反应曲线与野生型的曲线相比, 明显向右下方偏移, 两条曲线之间的距离较远。这与 ACh 对突变型受体敏感性增强的结果是相反的。突变型的 ACh 浓度反应曲线与野生型的曲线相比, 向左上方偏移。突变型的 Nic 浓度反应曲线与野生型的曲线相比, 向左上方稍有偏移, 且两条曲线之间的距离很近。

### 7 三种激动剂对 $\alpha 3\beta 4$ 野生型及其突变型受体激发产生的最大门控电流比较

以 1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ACh 诱导产生的电流  $I_{\text{max}}$  作为受体全开放基准, 计为 100%。分别检测并计算 Nic 和 Cyt 对  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs 及其突变体的最大激动效率  $E_{\text{max}}$ , 计算公式为:  $I_{\text{max}}(\text{Nic})/I_{\text{max}}(\text{ACh})$  或  $I_{\text{max}}(\text{Cyt})/I_{\text{max}}(\text{ACh})$ 。电生理结果显示 (图 7、8),  $\alpha 3$  亚基突变后, Nic 和 Cyt 对野生型和突变型  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs 的最大激动浓度不变, 分别为 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和 1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。Nic 对野生型和突变型

$\alpha 3\beta 4$  nAChRs 的  $E_{\text{max}}$  无明显差异, 分别为  $51.55\% \pm 4.25\%$ 、 $60.91\% \pm 2.2\%$ 。而 Cyt 对突变型  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs 的  $E_{\text{max}}$  由对野生型的  $94.12\% \pm 3.71\%$  提高到  $155.08\% \pm 9.34\%$ , 通道开放效率提高了 1/2 以上,  $E_{\text{max}}$  有极显著差异 ( $P < 0.000 1$ )。



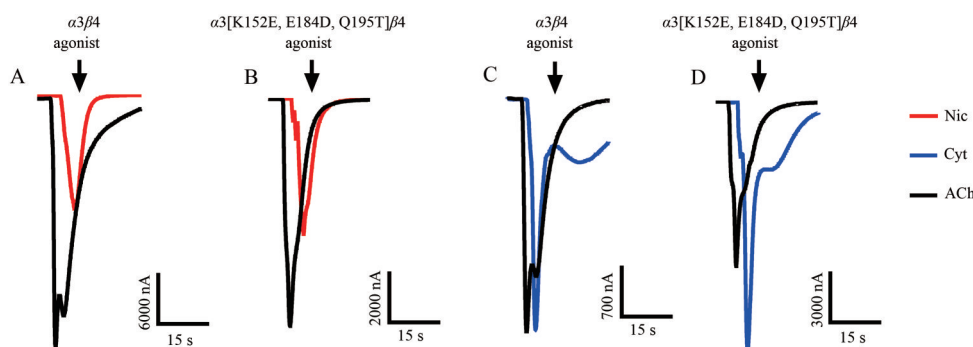
**Figure 8** The  $E_{\text{max}}$  of wild type and mutant  $\alpha 3\beta 4$  nAChR evoked by Nic and Cyt compare to ACh as 100%.  $n = 5$ , mean  $\pm$  SEM. \*\*\*\* $P < 0.000 1$  vs wild type  $\alpha 3\beta 4$ . ns: No significance

### 8 三种激动剂对 $\alpha 3\beta 4$ nAChR 的单点突变体的活性分析

ACh 对野生型  $\alpha 3\beta 4$  和 3 个单点突变型  $\alpha 3$ [K152E] $\beta 4$ 、 $\alpha 3$ [E184D] $\beta 4$ 、 $\alpha 3$ [Q195T] $\beta 4$  受体的  $\text{EC}_{50}$  分别为 277.5、39.01、53.99 和 43.34  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 与野生型相比突变体对激动剂 ACh 的激动活性分别增强了约 7、5 和 6 倍。而 ACh 对三点突变型的  $\text{EC}_{50}$  为 170.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 较野生型变化了 1.6 倍。改变了  $\alpha 3$  亚基的第 152 位氨基酸位点, 使 Nic 对  $\alpha 3\beta 4$  nAChR 的敏感性降低 57% 而对另外两个突变型  $\alpha 3$ [E184D] $\beta 4$  和  $\alpha 3$ [Q195T] $\beta 4$  的激动活性与三点突变型一致, 增强了约 20%。Cyt 激动单点突变型  $\alpha 3$ [K152E] $\beta 4$ 、 $\alpha 3$ [E184D] $\beta 4$  和  $\alpha 3$ [Q195T] $\beta 4$  受体的活性较野生型  $\alpha 3\beta 4$  受体相比下降了约 60%, 而 3 个位点突变后激动活性下降了 77% (表 2)。

### 讨论

哺乳动物 nAChRs 的  $\alpha 3$  与  $\beta 4$  亚基组合, 形成  $\alpha 3\beta 4$



**Figure 7** The maximum current traces of wild-type (A, C) and mutant  $\alpha 3\beta 4$  (B, D) nAChRs induced by ACh, Nic and Cyt

**Table 2**  $EC_{50}$  and hillslope values of 3 agonists for wide-type and mutant  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs. <sup>b</sup> $EC_{50}$  mutant /  $\alpha 3\beta 4$ 

Agonist	nAChR	$EC_{50}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 95% CI)	Hillslope	<sup>b</sup> Ratio
ACh	$\alpha 3\beta 4$	277.50 (258.6–297)	2.0 (1.8–2.3)	1
	$\alpha 3$ [K152E] $\beta 4$	39.01 (34.86–43.52)	1.4 (1.3–1.6)	0.14
	$\alpha 3$ [E184D] $\beta 4$	53.99 (41.25–69.98)	0.9 (0.8–1.1)	0.2
	$\alpha 3$ [Q195T] $\beta 4$	43.34 (31.13–59.61)	0.9 (0.7–1.1)	0.16
Nic	$\alpha 3\beta 4$	34.02 (30.69–39.39)	2.0 (1.7–2.5)	1
	$\alpha 3$ [K152E] $\beta 4$	79.15 (69.47–90.42)	1.3 (1.1–1.7)	2.3
	$\alpha 3$ [E184D] $\beta 4$	27.90 (13.69–28.32)	1.8 (1.4–2.8)	0.8
	$\alpha 3$ [Q195T] $\beta 4$	28.60 (22.52–36.2)	1.6 (1.3–2.3)	0.8
Cyt	$\alpha 3\beta 4$	23.05 (21.12–25.15)	1.5 (1.4–1.7)	1
	$\alpha 3$ [K152E] $\beta 4$	67.28 (59.93–75.78)	2.0 (1.4–2.8)	2.9
	$\alpha 3$ [E184D] $\beta 4$	53.91 (48.18–59.94)	1.4 (1.2–1.7)	2.3
	$\alpha 3$ [Q195T] $\beta 4$	57.91 (52.87–63.15)	1.5 (1.3–1.7)	2.5

功能性受体亚型。该亚型主要分布于周围神经系统和中枢神经系统的部分区域, 在某些神经递质的突触释放调节中起着非常重要的作用<sup>[14]</sup>。研究表明, 在内侧缰核 (medial habenula, MHb)-脚间核 (interpeduncular nucleus, IPN) 通路中,  $\alpha 3\beta 4$  nAChR 对尼古丁奖赏和戒断作用的调节过程具有重要影响; Park 等<sup>[15]</sup>研究证明,  $\alpha 3\beta 4$  nAChR 是尼古丁衍生物新烟碱类杀虫剂的作用靶点, 可能会导致哺乳动物的血压升高; 此外, 位于下丘脑的  $\alpha 3\beta 4$  nAChR 参与尼古丁介导的食欲降低过程<sup>[16]</sup>。 $\alpha 3$  亚基在中枢神经系统中还扮演着重要角色, 可参与调控机体器官的自我平衡, 但  $\alpha 3$  亚基参与调控的神经和病理机制目前尚不清楚。最新研究表明,  $\alpha 3\beta 4$  nAChR 可能是治疗酒精成瘾的一个重要靶点<sup>[17]</sup>, 足见  $\alpha 3\beta 4$  nAChR 的重要性。 $\alpha 3\beta 4$  nAChR 在成瘾、癌症和肥胖等许多重大疾病的发生、发展过程中起着很重要的作用, 但其相关病理生理机制尚不清楚。

本研究利用 PCR 介导的定点突变技术, 构建了  $\alpha 3$  亚基的三点突变型  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T], 并与野生型的  $\beta 4$  亚基组合, 在非洲爪蟾卵母细胞膜上成功表达。以前的研究结果显示, loop B 和 loop C 环为  $\alpha$  亚基 N-端胞外配体结合区上, 影响配体选择性结合的关键区域<sup>[18]</sup>, 而第 152 位氨基酸位于 loop B 中, 第 184、195 位氨基酸位于 loop C 中, 它们主要影响激动剂的效能<sup>[19]</sup>。基于以上研究基础, 本研究将  $\alpha 3$  亚基上第 152、184 和 195 位的 3 个氨基酸位点作为研究  $\alpha 3$ - $\alpha 6$  亚基特异性的关键位点, 将以上 3 个位点同时进行定向突变, 构建了三点突变体亚基  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T], 并进一步利用电生理技术建立了  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] $\beta 4$  活性检测模型, 可用于研究  $\alpha 3\beta 4$  nAChR 组成中  $\alpha 3$  亚基与配体相互作用的特异性关键氨基酸位点, 阐明配体和  $\alpha 3\beta 4$  nAChR 相互作用的分子机制, 进而可指导配体药物的设计与结构研究<sup>[19]</sup>。

$\alpha 3\beta 4$  nAChR 是调节自主神经系统胆碱能作用最丰富的受体, 迄今为止尚不清楚它与激动剂结合的分子机制<sup>[20]</sup>。前期研究表明, 不同激动剂对受体的选择性结合方式和亲和力存在差异<sup>[21]</sup>; Lindovsky 等<sup>[22]</sup>构建了双点突变体  $\alpha 3\beta 4$ [D191N, D192N], 发现突变后激动剂 Nic 只能在  $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的浓度下诱导受体开放, 而激动剂地棘蛙素对受体的激动效果变化不大; 当  $\alpha 3$  亚基上的 Phe 和 Tyr 改变, 受体对 ACh 和 Nic 的  $EC_{50}$  未变化, 但是对二甲基丙酸盐的  $EC_{50}$  却均有下降<sup>[23]</sup>。且 Costa 等<sup>[20]</sup>通过分子建模, 推测出激动剂 ACh、Nic、Cyt 与  $\alpha 3\beta 4$  nAChR 中  $\alpha 3$  亚基上的 loop B 和 loop C 的氨基酸位点有高亲和力的结合。因此, 本文利用 PCR 介导的受体定点诱变技术, 研究特定位置氨基酸种类的变化对不同激动剂的结合活性的影响。 $\alpha 3$  亚基上 152、184 和 195 三个位点的突变使  $\alpha 3\beta 4$  nAChR 对不同激动剂的敏感性发生变化。与野生型受体相比, 突变后的  $\alpha 3\beta 4$  nAChR 对激动剂 ACh 的敏感性增强, 且  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Nic 激动突变体  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] $\beta 4$  产生的内向电流反应率变大, 推测是由于位点的改变导致受体 LBD 区更有利于 Nic 的识别与结合, 通道的敏感性增加, 同时开放程度增大。

此外, 相比于野生型, 突变体  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] $\beta 4$  nAChR 对 Cyt 敏感性减弱,  $EC_{50}$  为野生型受体的 4.3 倍。在  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cyt 刺激野生型受体产生的激发电流值与  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ACh 刺激产生的电流值相似, 与先前关于 Cyt 可作为  $\beta 4^*$  nAChRs 完全激动剂的研究结果一致<sup>[10]</sup>。但是, 突变体  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] $\beta 4$  在  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cyt 激动下产生的电流值约为  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ACh 刺激产生电流值的 1.5 倍。综上,  $\alpha 3$  亚基这 3 个位点的氨基酸残基可能是激动剂 Cyt 与  $\alpha 3\beta 4$  nAChR 结合的关键位点, 变化后造成配体与受体结合力减弱, 进而表现为受体电流变化。

单个氨基酸位点的突变也会改变受体在激动剂诱导下的活性和功能。单点突变体  $\alpha 3$ [K152E] $\beta 4$ 、 $\alpha 3$ [E184D] $\beta 4$  和  $\alpha 3$ [Q195T] $\beta 4$  对 ACh 的敏感性增强了 5~10 倍, 而三点同时突变后会相互冲突, 受体敏感性不如单点突变体强。针对激动剂 Cyt, 三点同时突变与单个突变相比, 对  $\alpha 3\beta 4$  nAChR 的结合活性起到了协同减弱作用。前期研究表明, nAChRs 亚基中的氨基酸突变会影响亚基的折叠和空间结构<sup>[24]</sup>, 综合本文研究结果, 推断三点突变对  $\alpha 3$  亚基的空间结构和折叠方式产生影响, 促使其空间构象发生变化, 从而使激动剂与三点突变体的结合活性较单点突变体产生差异, 其分子机制尚有待进一步探讨。

本研究建立了  $\alpha 3$ [K152E, E184D, Q195T] $\beta 4$  nAChR

突变受体模型,这不仅有了解配体与受体相互作用的分子机制<sup>[25]</sup>,也为研发与 $\alpha 3\beta 4$  nAChR亚型相关的疾病诊疗药物提供研究基础,将为以 $\alpha 3\beta 4$  nAChR为靶点的新药设计和开发提供新的理论支持。本研究利用3种配体门控激动剂(ACh、Nic和Cyt),测定了其对于 $\alpha 3\beta 4$ 野生型和三点突变型受体的结合活性,研究突变型受体的功能变化,阐明了突变位点氨基酸种类与受体功能之间的相互关系,将为后续研究 $\alpha 3\beta 4$  nAChR精细结构和功能以及揭示相关疾病发病机制提供重要线索。

**作者贡献:** 陈舒苗负责突变体RNA的构建、活性测定与稿件撰写;张笑凡负责突变体质粒的提取;于津鹏、朱晓鹏、长孙东亭和罗素兰负责实验设计、过程指导、稿件撰写与修改。

**利益冲突:** 本文作者声明无任何利益冲突。

## References

- [1] Li X, You S, Xiong J, et al.  $\alpha$ -Conotoxin TxID and [S9K]TxID,  $\alpha 3\beta 4$  nAChR antagonists, attenuate expression and reinstatement of nicotine-induced conditioned place preference in mice [J]. Mar Drugs, 2020, 18: 646.
- [2] Deshpande A, Vinayakamoorthy RM, Garg BK, et al. Why does knocking out NACHO, but not RIC3, completely block expression of  $\alpha 7$  nicotinic receptors in mouse brain? [J]. Biomolecules, 2020, 10: 470.
- [3] Elayouby KS, Ishikawa M, Dukes AJ, et al.  $\alpha 3^*$  nicotinic acetylcholine receptors in the habenula-interpeduncular nucleus circuit regulate nicotine intake [J]. J Neurosci, 2021, 41: 1779-1787.
- [4] Yang T, Xiao T, Sun Q, et al. The current agonists and positive allosteric modulators of  $\alpha 7$  nAChR for CNS indications in clinical trials [J]. Acta Pharm Sin B, 2017, 7: 611-622.
- [5] Cooper SY, Henderson BJ. The impact of electronic nicotine delivery system (ENDS) flavors on nicotinic acetylcholine receptors and nicotine addiction-related behaviors [J]. Molecules, 2020, 25: 4223.
- [6] Salas R, Cook KD, Bassetto L, et al. The  $\alpha 3$  and  $\beta 4$  nicotinic acetylcholine receptor subunits are necessary for nicotine-induced seizures and hypolocomotion in mice [J]. Neuropharmacology, 2004, 47: 401-407.
- [7] Liu Y, Qian J, Sun Z, et al. Cervical cancer correlates with the differential expression of nicotinic acetylcholine receptors and reveals therapeutic targets [J]. Mar Drugs, 2019, 17: 256.
- [8] Schaal C, Chellappan SP. Nicotine-mediated cell proliferation and tumor progression in smoking-related cancers [J]. Mol Cancer Res, 2014, 12: 14-23.
- [9] Mineur YS, Abizaid A, Rao Y, et al. Nicotine decreases food intake through activation of POMC neurons [J]. Science, 2011, 332: 1330-1332.
- [10] Harpoe K, Hald H, Timmermann DB, et al. Molecular determinants of subtype-selective efficacies of cytosine and the novel compound NS3861 at heteromeric nicotinic acetylcholine receptors [J]. J Biol Chem, 2013, 288: 2559-2570.
- [11] Azam L, Yoshikami D, McIntosh JM. Amino acid residues that confer high selectivity of the  $\alpha 6$  nicotinic acetylcholine receptor subunit to  $\alpha$ -conotoxin MII [S4A, E11A, L15A] [J]. J Biol Chem, 2008, 283: 11625-11632.
- [12] Hone AJ, Ruiz M, Scadden M, et al. Positional scanning mutagenesis of  $\alpha$ -conotoxin PeIA identifies critical residues that confer potency and selectivity for  $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$  and  $\alpha 3\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptors [J]. J Biol Chem, 2013, 288: 25428-25439.
- [13] Gharpure A, Teng J, Zhuang Y, et al. Agonist selectivity and ion permeation in the  $\alpha 3\beta 4$  ganglionic nicotinic receptor [J]. Neuron, 2019, 104: 501-511.
- [14] Arroyo S, Bennett C, Aziz D, et al. Prolonged disynaptic inhibition in the cortex mediated by slow, non- $\alpha 7$  nicotinic excitation of a specific subset of cortical interneurons [J]. J Neurosci, 2012, 32: 3859-3864.
- [15] Park J, Taly A, Bourreau J, et al. Partial agonist activity of non-nicotinoids on rat nicotinic receptors: consequences over epinephrine secretion and *in vivo* blood pressure [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22: 5106.
- [16] Hone AJ, McIntosh JM. Nicotinic acetylcholine receptors in neuropathic and inflammatory pain [J]. FEBS Lett, 2018, 592: 1045-1062.
- [17] Abburi C, Mcdaid J. Ethanol interaction with  $\alpha 3\beta 4$  nicotinic acetylcholine receptors in neurons of the laterodorsal tegmentum [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2021, 45: 2495-2505.
- [18] Terry AV, Callahan PM. Nicotinic acetylcholine receptor ligands, cognitive function, and preclinical approaches to drug discovery [J]. Nicotine Tob Res, 2019, 21: 383-394.
- [19] Kuryatov A, Luo J, Cooper J, et al. Nicotine acts as a pharmacological chaperone to up-regulate human  $\alpha 4\beta 2$  acetylcholine receptors [J]. Mol Pharmacol, 2005, 68: 1839-1851.
- [20] Costa V, Nistri A, Cavalli A, et al. A structural model of agonist binding to the  $\alpha 3\beta 4$  neuronal nicotinic receptor [J]. Br J Pharmacol, 2003, 140: 921-931.
- [21] Grady S, Marks MJ, Wonnacott S, et al. Characterization of nicotinic receptor-mediated [<sup>3</sup>H]dopamine release from synaptosomes prepared from mouse striatum [J]. J Neurochem, 1992, 59: 848-856.
- [22] Lindovsky J, Kaniakova M, Svobodova L, et al. Role of negatively charged amino acids in  $\beta 4$  F-loop in activation and desensitization of  $\alpha 3\beta 4$  rat neuronal nicotinic receptors [J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1778: 864-871.
- [23] Nieves-Cintrón M, Caballero-Rivera D, Silva WI, et al. Functional contribution of  $\alpha 3L8'$  to the neuronal nicotinic  $\alpha 3$  receptor [J]. J Neurosci Res, 2008, 86: 2884-2894.
- [24] Walsh RM, Roh SH, Gharpure A, et al. Structural principles of distinct assemblies of the human  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptor [J]. Nature, 2018, 557: 261-265.
- [25] Chen JH, Bai DL. Advances in the research on nicotinic acetylcholine receptors agonists [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2002, 37: 309-315.