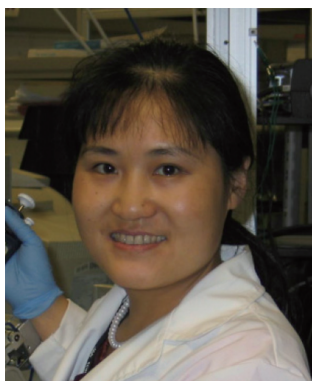


DOI: 10.13376/j.cblls/2016002

文章编号: 1004-0374(2016)01-0012-10



罗素兰, 长江学者特聘教授、亚太国际毒素学会秘书长、第19届世界毒素大会主席、中国毒理学会生物毒素专业委员会副主任委员等。中青年科技创新领军人才、“长江学者和创新团队发展计划”创新团队带头人、全国杰出专业技术人才、新世纪百千万人才工程国家级人选、全国优秀科技工作者、国务院津贴专家、教育部新世纪优秀人才、海南省515人才工程第一层次人选。现为海南大学热带生物资源教育部重点实验室主任、海口市海洋药物重点实验室主任、中共十八大代表, 中国妇女第十大、十一大代表等。曾多次在美国犹他大学、澳大利亚昆士兰大学、英国牛津大学做访问学者。

十几年来, 专注于海洋药物芋螺毒素的研究。建立了国内最大的海南产芋螺及其毒素资源库; 发现并命名了2个芋螺毒素新超家族; 筛选鉴定出6个特异阻断乙酰胆碱受体不同亚型的新颖 α^* -芋螺毒素候选新药。在*PNAS*、*J Biol Chem*、*FASEB J*、*J Med Chem*等国际著名期刊上发表论文100多篇, 申请国际PCT专利2项, 国家发明专利11项(授权5项)。

特异阻断乙酰胆碱受体的海南产 α^* -芋螺毒素的研究

长孙东亭, 吴勇, 朱晓鹏, 胡远艳, 罗素兰*

(海南大学热带生物资源教育部重点实验室-海口市海洋药物重点实验室, 海口 570228)

摘要: 国际上被誉为“海洋药物宝库”的芋螺毒素(CTx), 具有特异结合动物体内各种离子通道和受体的特殊功能。其中的 α^* -芋螺毒素(α^* -CTxs)能特异性地作用于乙酰胆碱受体(nAChRs), 对其亚型具有极高的选择性阻断活性。不同的亚基组合形成的各种乙酰胆碱受体亚型, 在正常健康状态下和多种疾病状态下起着很重要的生理和病理学功能, 这些功能至今尚不很清楚, 因而发现和开发各种亚型的选择性分子探针, 如 α^* -CTxs将有助于阐释各个亚型的精细结构和功能。深入研究特异阻断乙酰胆碱受体不同亚型的 α^* -CTxs的结构与功能, 及其与受体相互作用的机理具有重要的科学意义, 将有助于研发出与nAChRs相关的多种疑难杂症的治疗药物, 包括神经痛、癌症化疗、成瘾、痴呆、重症肌无力、精神分裂症、癫痫、乳腺癌、肺癌、脑脊髓炎, 以及其他神经疾病等。近年来, 我们实验室经过大量筛选研究, 鉴定出5个海南产新颖 α^* -芋螺毒素, 对它们的人工合成、三维结构、作用靶点、与受体相互作用机制、药理药效等进行了深入的研究。现对上述特异阻断乙酰胆碱受体不同亚型的5个海南产 α^* -芋螺毒素的研究进展和应用前景进行综述。

关键词: 海南产 α^* -芋螺毒素; 乙酰胆碱受体; 亚型; 作用靶点; 结构与功能

中图分类号: R96 **文献标志码:** A

Hainan α^* -conotoxins target nicotinic acetylcholine receptors

ZHANGSUN Dong-Ting, WU Yong, ZHU Xiao-Peng, HU Yuan-Yan, LUO Su-Lan*

(Key Laboratory of Tropical Biological Resources, Ministry of Education;

Key Laboratory for Marine Drug of Haikou, Hainan University, Haikou 570228, China)

收稿日期: 2014-11-10

基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”计划)(2012AA021706); 国家自然科学基金项目(81160503, 41366002); 国家国际科技合作专项(2011DFR31210); 海南省社会发展科技专项(SF201328); 海口市重点科技计划项目(2013-16); 长江学者和创新团队发展计划(IRT1123)

*通信作者: E-mail: luosulan2003@163.com; Tel: 0898-66289538

Abstract: Conotoxins (conopeptides, CTxs) are praised as “Marine drug mine”, which target various ion channels and receptors of animal kingdom. Among them, α^* -conotoxins (α^* -CTxs) are effective antagonists of subtypes of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) with high selectivity. Different combinations of nAChR subunits form subtypes of nAChRs that are important in normal physiology, and in a wide range of disease states. Understanding of these functions may be greatly facilitated by discovery and characterization of selective α^* -CTxs probes. Mechanistic insight into the structure, function and receptor interaction of α^* -CTxs may serve as a platform for the development of selective medications for many nAChRs-related diseases, including neuralgia, chemotherapeutics, addiction, Alzheimer’s disease (AD), myasthenia gravis, schizophrenia, epilepsy, breast and lung carcinoma, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) etc. Previously, we have identified five novel α^* -conotoxins from Hainan cone snails targeting different nAChR subtypes, of which synthesis, 3-dimensional structure, target and interaction with receptors were investigated systematically. This review will focus on their characteristics and application prospects.

Key words: Hainan α^* -conotoxins; nAChRs; subtypes; targets; structure; function

芋螺毒素 (conotoxin, conopeptide, CTx) 是热带特有药用海洋动物芋螺分泌产生的, 用于捕食和防御的神经肽, 具有特异结合动物体内各种离子通道和受体的特殊功能^[1-2]。芋螺毒素种类繁多, 结构新颖, 选择性强, 疗效确切, 且不成瘾, 在成瘾、麻醉、镇痛和研究治疗神经疾病、癌症和心脏疾病等方面具有极好的应用前景, 已成为神经科学研究和新药研发的新来源^[3-4]。在我国, 芋螺是海南特有的药用海洋生物^[5]。每种芋螺毒液中有近 2 000 种不同的毒素肽^[6], 据估计有约 5 万种海南产芋螺毒素亟待开发, 但目前国际上已研究的芋螺毒素远不足其总量的 0.1%, 但已在临床上显示出巨大效果, 因而国际上将芋螺毒素称为“海洋药物宝库”和“尚未开发的金库”^[7-9]。

α^* -芋螺毒素是目前发现的选择性最好的烟碱乙酰胆碱受体 (nAChRs) 各种亚型的特异阻断剂^[10-11]。nAChRs 是动物界普遍存在的具有重要生理作用和临床研究意义的细胞膜蛋白, 是人类最早发现的一类受体。nAChRs 是细胞膜上的变构膜蛋白, 介导众多中枢和外周神经系统的生理功能, 包括学习、记忆、成瘾、应答、镇痛和运动控制等。nAChRs 激活多巴胺、去甲肾上腺素、五羟色胺、 γ -氨基丁酸等多种神经递质的释放^[12]。已证实 nAChRs 是筛选诊断和治疗一大类重要疾病药物的关键靶点, 这些疾病包括疼痛、烟酒和毒品成瘾、智障、痴呆、精神分裂症、中枢神经紊乱、癫痫症、帕金森病、精神病、神经肌肉阻滞、重症肌无力、抑郁症、高血压、心率不齐、哮喘、肌肉松弛、中风、乳腺癌和肺癌、实验性自身免疫脑脊髓炎等^[13-17]。至今对于上述疾病还没有对症治疗的特效药物, 其发病机理尚不很清楚。

nAChRs 是由 5 个亚基组成的五聚体跨膜蛋白, 分为肌肉型和神经型两大类, 其中神经型 nAChRs 异常复杂, 它们由不同的 α 和 β 亚基组成异源或同源型的功能性受体亚型。在脊椎动物中, 至少有 12 个亚基, 即 $\alpha 2\sim\alpha 10$ 和 $\beta 2\sim\beta 4$ 。虽然这些亚型的药理学功能截然不同, 但其结构非常相似, 极难区分, 由于缺乏针对各种亚型的高选择性配体化合物, 以致各个亚型的生理功能和药理学作用至今还不是很清楚, 要研究和阐明各种各样的 nAChRs 亚型的精细结构和功能面临诸多挑战。因而, 发现和开发各个亚型的特异性分子探针, 将有利于揭示和阐释它们在生命体内的功能, 同时有可能研发出针对上述不同疾病的治疗药物^[18-20]。因此, α^* -芋螺毒素及其作用靶点 nAChRs 在多种疾病机理的研究, 以及上述相关疾病治疗新药研发方面具有极其重要的应用价值。

海南大学多年来一直从事海南产芋螺毒素药物的研发, 经过大量筛选研究, 鉴定出 5 个海南产新颖 α^* -芋螺毒素, 对它们的人工合成、三维结构、作用靶点、与受体相互作用机制、药理药效等进行了深入的研究。它们是特异阻断神经型乙酰胆碱受体不同亚型的宝贵分子探针和创新先导药物, 下面对相应的研究进展和应用前景进行综述。

1 特异阻断 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ nAChR亚型的 α -芋螺毒素TxIB

来自海南产织锦芋螺 (*Conus textile*) 的 α -芋螺毒素 TxIB(α -CTx TxIB, α -TxIB), 含有 16 个氨基酸, 两对二硫键, 相对分子质量为 1 739.6 (图 1)^[21]。 α -TxIB 是特异阻断 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ nAChRs 的高选择性强阻断剂, 其半阻断剂量仅为 28 nmol/L, 它只阻



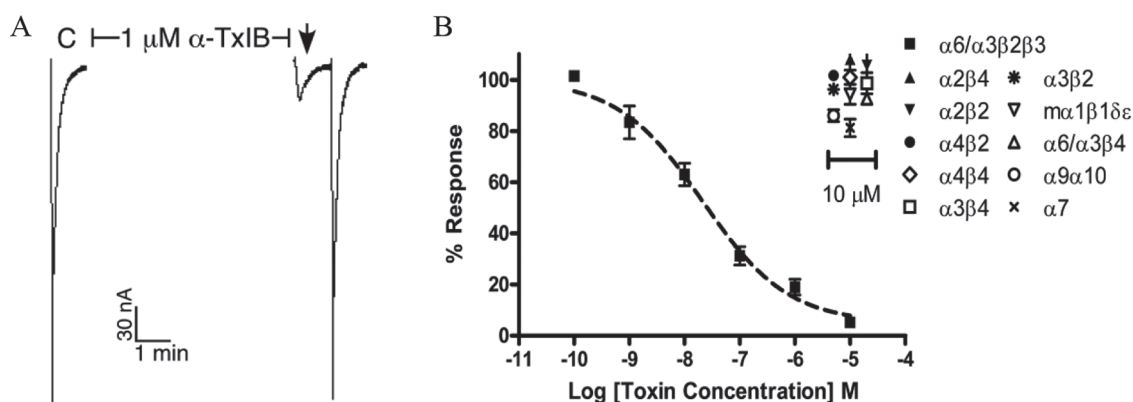
#表示C-末端酰胺化

图1 α -CTx TxIB的氨基酸序列和二硫键连接方式

断 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$, 而不阻断其他所有亚型 (图 2)。即使是与 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ 非常相似的 $\alpha 3\beta 2$ 、 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ 、 $\alpha 3\beta 4$ 三种亚型, TxIB 对它们都没有阻断活性。TxIB 的磁共振 (NMR) 三维结构已解析清楚, 如图 3 所示, 在 PDB 蛋白数据库中的保存号为 2LZ5。在 α -CTx TxIB 的二级结构中, 在第 6 位的脯氨酸到第 9 位

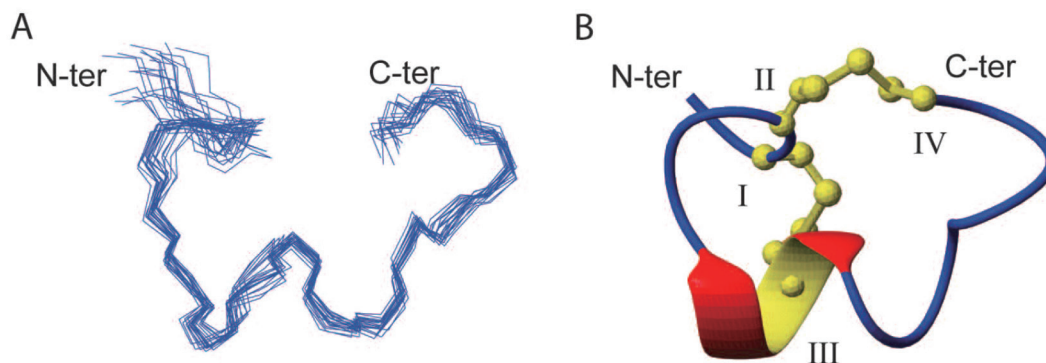
的精氨酸残基 (P^6PCR^9) 之间形成了一个 α -螺旋, 这种螺旋结构在 α -芋螺毒素中是常见的, 在维持其构象和活性稳定性方面起着很重要的作用 (图 3B)。

对 TxIB 高选择性的分子机理进行了深入的研究, 发现 TxIB 与以往发现的类似 α -芋螺毒素 MII^[22]、PIA^[23]、BuIA^[24]、GIC^[25] 的表面特征很不相同, TxIB 表面氨基酸残基的电荷数、极性, 以及疏水侧链的特征等都不同 (图 4), 最明显的是 TxIB 的疏水片区比其余的 MII、PIA 或 BuIA 都要小, 与 GIC 相比不同的是, TxIB 疏水片区的两侧有 2 个正电荷出现。可以看出, 小的疏水片区与两侧带正电荷的氨基酸残基同时存在时, 有利于增强 TxIB 的高选择性^[21]。



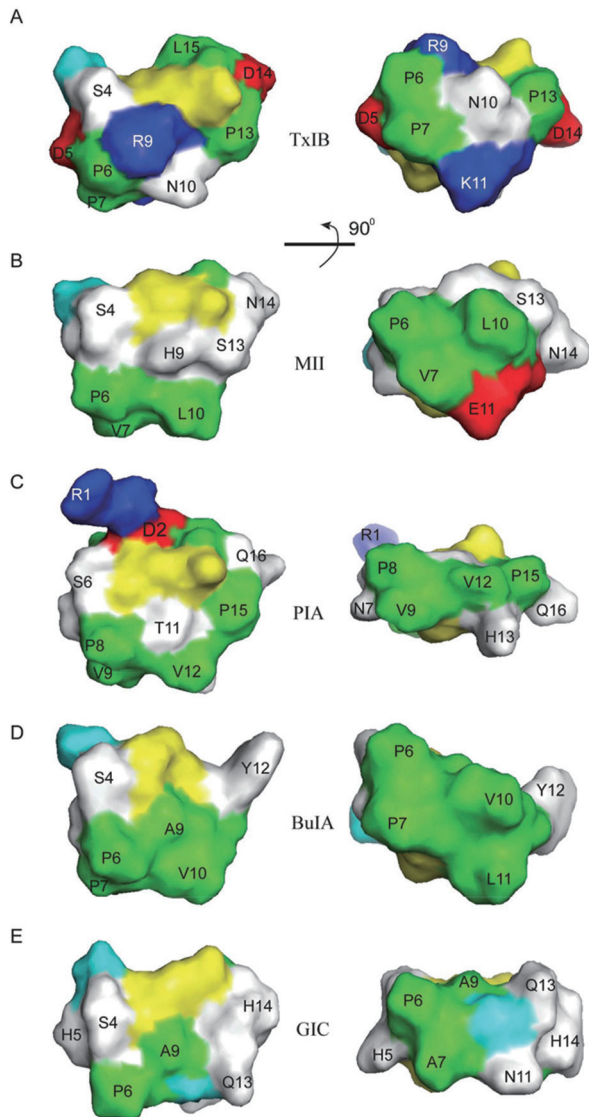
(A) 1 $\mu\text{mol/L}$ α -TxIB 对 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ nAChR 的电流影响情况。图 A 中“C”是指对照电流, 箭头所指的是 1 $\mu\text{mol/L}$ α -TxIB 温育 5 h 后, 第一个 Ach 脉冲形成的电流轨迹 (~ 0 nA)。(B) α -TxIB 对 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ nAChR 和其他所有亚型的浓度剂量反应曲线, 图中横坐标为所用 α -TxIB 摩尔浓度 (M) 的对数值 ($\text{Log}[\text{TxIB}]/\text{M}$); 纵坐标为剂量反应百分数, 是相应浓度的毒素作用下乙酰胆碱受体电流与对照电流的比值百分数。图 B 中各个数值是取自 3~5 个非洲爪蟾卵母细胞的电流平均值。

图2 α -CTx TxIB是 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ nAChR的高选择性强阻断剂



(A) TxIB 的 20 个能量最低的、重叠度较高的立体结构。(B) TxIB 的三维结构的飘带 (彩带) 图。图示从 N-端到 C-端, 红黄色彩带部分是从第 6~9 位氨基酸残基之间形成的 α -螺旋区域, 黄色的球-棒状部分是形成的 2 对二硫键。

图3 α -CTx TxIB的三维结构



(A)CTx TxIB (PDB ID 2LZ5); (B)CTx PIA (PDB ID 1ZLC); (C)CTx BuIA (PDB ID 2I28); (D)CTx GIC (PDB ID 1UL2); (E)CTx MII (PDB ID 1MII)。正电荷氨基酸残基(Arg和Lys)用蓝色显示, 负电荷氨基酸残基(Asp和Glu)用红色显示; 极性氨基酸残基(Asn、Gln、His、Ser、Thr、Tyr)用白色显示; 疏水性氨基酸残基(Ala、Ile、Leu、Pro、Val)用绿色显示; 半胱氨酸残基(Cys)用黄色显示; 甘氨酸残基(Gly)用青色显示。

图4 α -CTx TxIB与其他 α -芋螺毒素表面特征比较

基于以上对 TxIB 的结构与功能研究结果可以说, TxIB 是本实验室发现的目前国际上唯一能将 $\alpha_6/\alpha_3\beta_2\beta_3$ 亚型与其他所有 nAChRs 亚型区分开的配体物质和新化合物^[21]。尤其是 TxIB 能将过去无法区分的 $\alpha_6/\alpha_3\beta_2\beta_3$ 与 $\alpha_3\beta_2$ 亚型区分开。这在神经科学以及神经疾病的研究、诊断和治疗领域具有非常重要的意义。

研究表明, 哺乳动物脑中纹状体上的 $\alpha_6\beta_2^*$ -nAChRs 亚型被认为是治疗烟瘾和毒瘾的药物作用靶点。 α_6 亚基在脑中并不是广泛分布的, 但却在中脑部分的多巴胺能神经元区域富集表达, 这个区域是与愉快、奖赏与心情控制密切相关的区域^[26-28], 这意味着 α_6^* nAChRs 在药物引起的成瘾与情绪控制等的调控中起关键作用^[29-31]。

α_6^* nAChRs 也表达在儿茶酚胺能神经元与视网膜上^[32-33]。 $\alpha_6\beta_2^*$ nAChRs 表现出具有调控多巴胺释放的功能, 在灵长类的 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶动物模型与人类帕金森症疾病模型上, $\alpha_6\beta_2^*$ nAChRs 的数量明显降低^[34-36]。因而, $\alpha_6/\alpha_3\beta_2\beta_3$ nAChRs 的特异阻断剂是研究解释不同组织中存在的 α_6^* nAChRs 生理功能的有价值的工具, 以及与之有关的, 如成瘾等疾病的治疗药物。 $\alpha_6/\alpha_3\beta_2\beta_3$ nAChR 是治疗神经精神疾病, 如烟碱、吗啡与可卡因等的成瘾、帕金森病等的药物作用靶点^[37-39]。因此, 所发现的新 α -芋螺毒素 TxIB 在上述疾病的机理研究、诊断、治疗方面具有极高的应用价值。

2 对 $\alpha_3\beta_2$ 和 $\alpha_6\beta_2^*$ nAChRs相似亚型区分度最好的 α -芋螺毒素LvIA

来自海南产疣缢芋螺 (*Conus lividus*) 的 α -芋螺毒素 LvIA^[40], 含有 16 个氨基酸, 相对分子质量为 1 678.8 (图 5), 是 $\alpha_3\beta_2$ 乙酰胆碱受体亚型的强阻断剂, 其半阻断剂量为 8.7 nmol/L。LvIA 能区分 $\alpha_3\beta_2$ 及其非常接近的 $\alpha_6/\alpha_3\beta_2\beta_3$ ($\alpha_6\beta_2^*$) 亚型 (图 6), LvIA 对大鼠 $\alpha_3\beta_2$ 的阻断活性是对 $\alpha_6\beta_2^*$ 亚型的 13 倍 (图 6A), LvIA 对人源乙酰胆碱受体相似亚型 $\alpha_3\beta_2$ 和 $\alpha_6\beta_2^*$ nAChRs 区分度更高, 达到 305 倍 (图 6B), 是至今对 $\alpha_3\beta_2$ 和 $\alpha_6\beta_2^*$ nAChRs 区分度最好的配体。之前, 国际上所有已发现的 $\alpha_3\beta_2$ nAChRs 阻断剂, 都同时阻断 $\alpha_6/\alpha_3\beta_2\beta_3$ 亚型, 如 α -芋螺毒素 PeIA^[41-42] 和 MII^[22] 等。LvIA 是从疣缢芋螺中发现的第一个 α -芋螺毒素。对 LvIA 与 $\alpha_3\beta_2$ 、 $\alpha_6\beta_2^*$ 、 $\alpha_3\beta_4$ 、 $\alpha_6\beta_4^*$ 、 $\alpha_9\alpha_{10}$ nAChRs 亚型之间的相互作用



#表示C-末端酰胺化

图5 α -CTx LvIA的氨基酸序列和二硫键连接方式

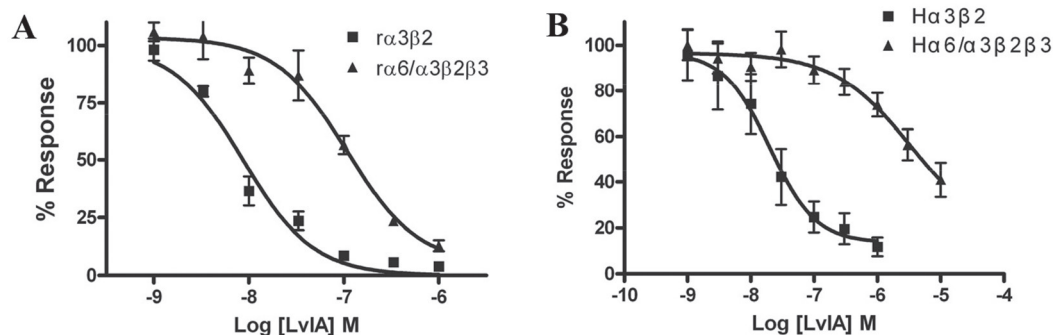


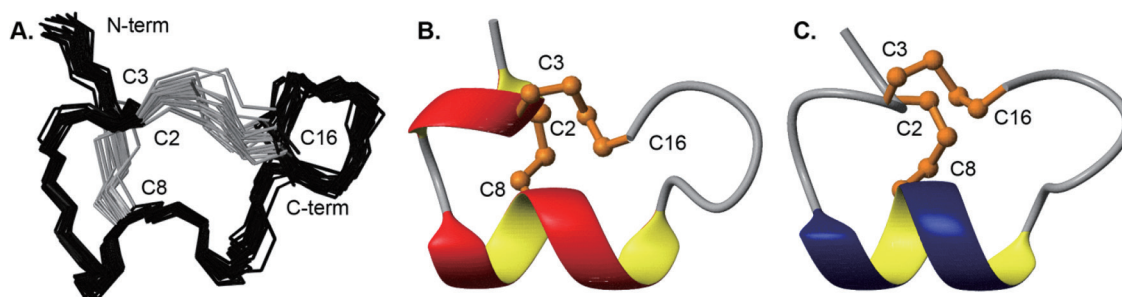
图6 α -CTx LvIA对大鼠(A)、人类(B) α 3 β 2和 α 6/ α 3 β 2 β 3 nAChR 2个相似亚型的浓度剂量反应曲线

进行了研究, 阐明了 LvIA 这种独特的区分 α 3 β 2 和 α 6 β 2* nAChRs 能力的分子机理。

LvIA 的 NMR 三维结构 (PDB ID: 2MDQ) 已解析 (图 7A-B), 对其在溶液中的 2 种构象进行了深入研究, 过去罕见报道第 2 个构象异构体, 主要是由于 α - 芋螺毒素中的脯氨酸顺反异构促使形成了构象异构体^[43-44]。LvIA 异构体 1 的结构紧密, 与以往发现的 4/7 型 α - 芋螺毒素的结构相似, 特别是与 II 期临床试验的芋螺毒素 Vc1.1 空间结构非常相似, 但其序列不同 (图 7C)。LvIA 分子从第 6 位的脯氨酸到第 10 位的缬氨酸 (Pro6-Val10) 之间形成了一个 α - 螺旋, 比 α -CTx Vc1.1 的 α - 螺旋稍微短一点^[45], 但在 LvIA 的第 2 位半胱氨酸和第 4 位丝氨酸 (Cys2-Ser4) 之间, 又形成了一个 α - 螺旋结构 (图 7B)。球形二硫键连接方式使得 α - 芋螺毒素的结构更加密实。第 2 位和第 8 位的 2 个半胱氨酸 (Cys2-Cys8) 之间形成的二硫键, 将 α - 螺旋拉向 N- 末端。第 3 位和第 16 位的 2 个半胱氨酸 (Cys3-Cys16) 之间形成的二硫键, 将 N- 末端和 C- 末端拉得很近。C-

末端被拉向靠近 α - 螺旋, 更加增强了 LvIA 空间结构的致密性。高度保守的 LvIA 骨架结构加固了有侧链氨基酸残基与 nAChR 受体结合口袋之间的核心相互作用, 从而赋予 LvIA 的特殊亚型选择性^[40]。

LvIA 是非常难得的能区分 α 3 β 2 和 α 6 β 2* 这两个相似受体亚型的有效工具药和分子探针。在哺乳动物神经系统中, α 3 β 2 和 α 6 β 2* 两个亚型总是伴随表达, 且极其相似, 由于缺乏这 2 个亚型的特异性分子探针而无法区分^[46]。例如, 在多巴胺能神经元区域, α 6 β 2* nAChR 起主导作用。有关这个重要区域的受体组成、特性和生理功能的了解, 均是基于 α - 芋螺毒素 MII 的使用获得的, 但 MII 对 α 3 β 2 和 α 6 β 2* 两个亚型均有很强的阻断活性, 无法区分它们, 或者是用 α 6 β 2* 选择性探针来研究^[22-23]。但是, α 3 β 2 的表达往往覆盖了 α 6 β 2* 的信号。研究表明, 脊髓神经上的 α 3 β 2 nAChR 参与疼痛刺激信号传递, 阻断该受体, 可通过抑制 C- 神经纤维释放谷氨酸进行疼痛信号的传递, 从而产生镇痛效应, 阻断 α 3 β 2 nAChR 的 α - 芋螺毒素在临床前多种顽固性疼



(A)LvIA的20个能量最低的立体结构; (B)LvIA的三维结构的飘带(彩带)图; (C) Vc1.1的三维结构的飘带(彩带)图, 蓝黄色彩带部分是 α -螺旋区域。图示从N-端到C-端, 红黄色彩带部分是第2~4位、第6~9位氨基酸残基之间形成的2个 α -螺旋区域; 橙色的球-棒状部分是形成的2对二硫键。

图7 α -CTx LvIA的三维结构(PDB ID: 2MDQ)及其与Vc1.1结构(PDB ID: 2H8S)的比较

痛模型上显示出很好的镇痛活性^[47]。因而, LvIA既是宝贵的工具药, 又是很好的创新候选药物, 在神经痛药物研发领域具有很好的应用前景。

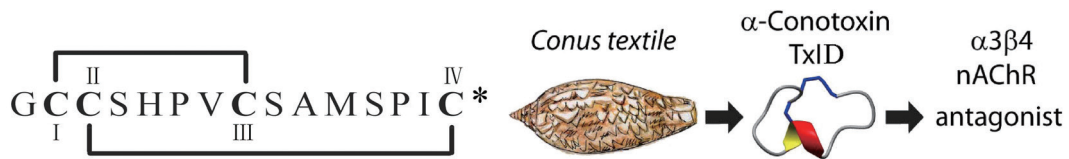
3 特异阻断 $\alpha 3\beta 4$ nAChR亚型的 α -芋螺毒素 TxID

新型 α -芋螺毒素 TxID^[48]来自海南产织锦芋螺 (*Conus textile*), 含有 15 个氨基酸, 2 对二硫键, 相对分子质量为 1 489.5(图 8)。

TxID 是 $\alpha 3\beta 4$ 乙酰胆碱受体 (nAChRs) 亚型的选择性阻断剂, 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 TxID 可完全阻断 $\alpha 3\beta 4$ nAChR 的电流 (图 9A), 而 10 $\mu\text{mol/L}$ 的高浓度 TxID 完全不能阻断 $\alpha 4\beta 4$ 、 $\alpha 3\beta 2$ 、 $\alpha 7$ nAChR 三个亚型的电流 (图 9B-D)。TxID 对 $\alpha 3\beta 4$ nAChR 的选择性和阻断活性都很强 (图 9E), 其半阻断剂量只有 12.5 nmol/L, 它的活性比另一个已知的 $\alpha 3\beta 4$ nAChR

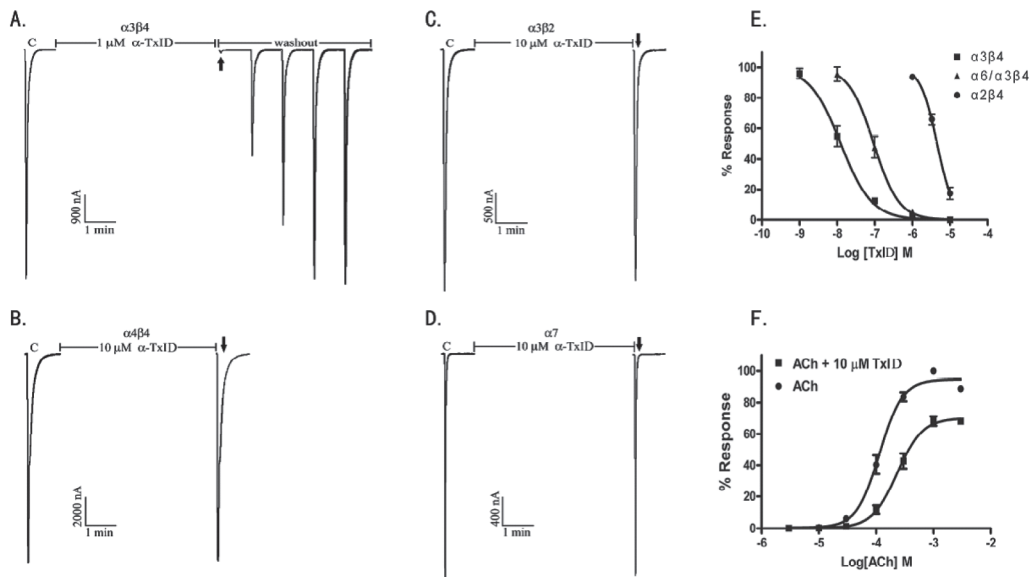
阻断剂 AuIB 的活性要强 60 倍^[49]。经对比配体开放剂 ACh 对 $\alpha 3\beta 4$ nAChR 的浓度反应曲线与 (ACh+TxID) 的反应曲线, 添加有毒素 TxID 的曲线的最大 ACh 反应减少, 说明 TxID 与 $\alpha 3\beta 4$ nAChR 的结合是非竞争性的阻断 (图 9F)。TxID 是迄今为止国际上发现的活性最强的 $\alpha 3\beta 4$ 乙酰胆碱受体 (nAChRs) 亚型的选择性阻断剂。TxID 的 NMR 三维结构已解析 (图 8), 发现 TxID 在溶液中存在 2 种主要的构象异构体, 联合使用 600 MHz 和 900 MHz 的磁共振仪, 首次成功解析出 α -芋螺毒素的 2 个构象异构体立体结构, 并对其结构表面特征和受体选择性的机理进行了深入的研究, TxID 的第 14 位疏水性异亮氨酸 (Ile) 对于与 $\alpha 3\beta 4$ nAChR 的高亲和力结合具有很关键的作用。

研究表明, $\alpha 3\beta 4$ nAChRs 亚型主要表达在外周神经系统的感觉神经和自律神经中枢细胞上, 以及



TxID的氨基酸序列和二硫键连接方式, 其中*表示C-末端酰胺化

图8 α -CTx TxID的氨基酸序列(左)和结构与功能(右)



α -CTx TxID是 $\alpha 3\beta 4$ nAChRs的高选择性强阻断剂, 且是非竞争性阻断。TxID特异性阻断 $\alpha 3\beta 4$ nAChR(A), 而不阻断 $\alpha 4\beta 4$ (B)、 $\alpha 3\beta 2$ (C)和 $\alpha 7$ (D)亚型。(E)TxID对 $\alpha 3\beta 4$ 、 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ 、 $\alpha 2\beta 4$ nAChRs亚型的浓度剂量反应曲线。(F)在存在或不存在 10 $\mu\text{mol/L}$ α -CTx TxID 情况下, ACh-浓度剂量反应曲线, 1 mmol/L ACh 的电流反应值定义为 100%。

图9 TxID特异性强阻断 $\alpha 3\beta 4$ nAChRs



在第1个环内的氨基酸用底纹显示, 没有以往发现的在第1个环内具有的保守性的(丝氨酸-可变氨基酸-脯氨酸-可变氨基酸)基序(Ser-X-Pro-X), 其中*表示C-末端酰胺化

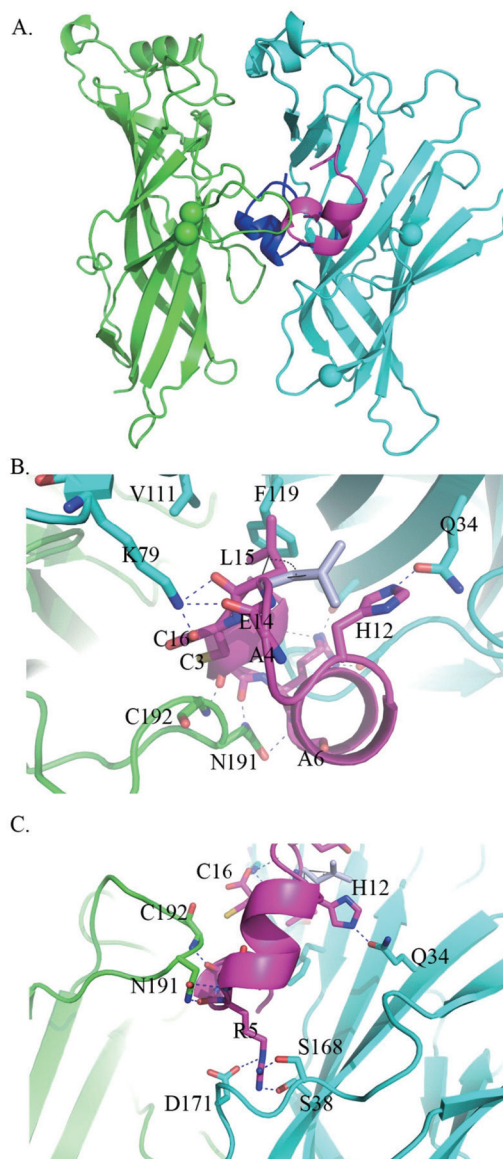
图11 α -CTx LvIA的氨基酸序列和二硫键连接方式

的半阻断剂量为 (IC_{50})9.8 nmol/L。

为进一步研究 LtIA 的第 1 个环内的序列是否影响其受体结合活性, 又合成了两个突变体 LtIA [A4S] 和 LtIA[A4S;A6P], 引入了保守性的 (Ser-X-Pro) 基序, 经活性检测, 这 2 个突变体也是 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs 的有效阻断剂, 其 IC_{50} 分别为 29.1 nmol/L 和 23.1 nmol/L, 比 LtIA 的活性弱 2~3 倍。竞争性实验结果证明, LtIA 可有效阻止 α -CTX MII 对 $\alpha 3\beta 2$ nAChR 的阻断作用, α -CTX LtIA 与 MII 对 $\alpha 3\beta 2$ nAChR 的阻断结合位点有重叠。经分子对接分析和实验证明, LtIA 作用于 $\alpha 3\beta 2$ nAChR 的一个新的微位点, 与 MII 的结合位点不同 (图 12), 是具有重要临床意义的 $\alpha 3\beta 2$ nAChR 的新的分子探针。

因此, LtIA 的结构与功能的研究, 为洞察 α -芋螺毒素与 nAChRs 之间相互作用的机制奠定了重要的基础, 提供了很好的工具与模型。 α -芋螺毒素 LtIA 已被以色列 Alomone Labs Ltd 公司开发为工具药, 用于神经科学和疾病机理研究, 以及药物筛选等领域。

每种芋螺毒液中有约 1 000 种不同的动物神经肽毒素, 且互不相同^[6]。全球有约 50 万种芋螺毒肽具有调节各种离子通道的特殊功能, 是一个巨大的药源宝库^[3-4]。在我国, 芋螺是海南特有的药用海洋生物资源, 有约 5 万种海南产芋螺毒素药源。其中的 α^* -芋螺毒素 (α -CTxs), 对 nAChRs 各种亚型具有空前的高选择性特异结合能力, 具有巨大的药物开发潜力^[12-13], 但至今已涉及研究的 α -CTxs 不到其总量的 0.1%, 尤其是海南产芋螺中的 α^* -芋螺毒素的研发才起步。因而, 大力发掘海南产 α^* -芋螺毒素功能多肽, 开发其医药用途, 具有非常重要的理论和实际意义。本实验室发现的上述特异阻断 nAChRs 不同亚型的新型 α^* -芋螺毒素, 作用靶点清楚, 是非成瘾性的、新型镇痛或戒烟戒毒等的潜在药物。它们不仅是很好的工具药, 也是很难得的海洋原创候选新药或先导药物, 拥有自主知识产权, 蕴涵着巨大的经济价值, 在神经精神疾病机理



(A)受体 $\alpha 3\beta 2$ 是绿色和蓝绿色(青色); LtIA是紫红色; MII是蓝色。相互作用的氨基酸残基用棒状表示, 形成的氢键用蓝色虚线表示, $\alpha 3\beta 2$ nAChR受体的C-环(C-loop)和F-环(F-loop)分别位于2个绿色和青色球体之间。LtIA与受体之间是一种新的结合模式, 但和MIII的结合位点有部分交叠。(B)LtIA-L15的侧链与受体 $\beta 2$ -F119之间形成了能量最低的疏水交互作用。(C)LtIA-R5与受体 $\beta 2$ 的F-loop之间的结合最显著, 就象锚一样, 阻止了LtIA向更深的活性位点去结合。

图12 α -CTx LtIA与 $\alpha 3\beta 2$ nAChR受体之间的相互作用, LtIA作用于 $\alpha 3\beta 2$ nAChR的一个新的微位点

的研究, 以及镇痛、戒烟戒毒、帕金森症、乳腺癌、肺癌等新药研发领域具有非常好的应用前景。

[参 考 文 献]

[1] Terlau H, Olivera BM. *Conus venoms: a rich source of*

- novel ion channel-targeted peptides. *Physiol Rev*, 2004, 84: 41-68
- [2] Schroeder CI, Craik DJ. Therapeutic potential of conopeptides. *Future Med Chem* 2012, 4: 1243-55
- [3] Lewis RJ, Dutertre S, Vetter I, Christie MJ. Conus venom peptide pharmacology. *Pharmacol Rev*, 2012, 64: 259-98
- [4] Essack M, Bajic VB, Archer JA. Conotoxins that confer therapeutic possibilities. *Mar Drugs*, 2012, 10: 1244-65
- [5] 罗素兰, 长孙东亭, 张本. 海南特有药用海洋生物芋螺资源的开发前景: 后基因组时代的新药发现[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2004: 189-95
- [6] Davis J, Jones A, Lewis RJ. Remarkable inter- and intra-species complexity of conotoxins revealed by LC/MS. *Peptides*, 2009, 30: 1222-7
- [7] Han TS, Teichert RW, Olivera BM, et al. Conus venoms - a rich source of peptide-based therapeutics. *Curr Pharm Des*, 2008, 14: 2462-79
- [8] Jin AH, Dutertre S, Kaas Q, et al. Transcriptomic messiness in the venom duct of *Conus miles* contributes to conotoxin diversity. *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12: 3824-33
- [9] Dutertre S, Jin AH, Kaas Q, et al. Deep venomomics reveals the mechanism for expanded peptide diversity in cone snail venom. *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12: 312-29
- [10] Azam L, McIntosh JM. α -conotoxins as pharmacological probes of nicotinic acetylcholine receptors. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30: 771-83
- [11] Olivera BM, Quik M, Vincler M, et al. Subtype-selective conopeptides targeted to nicotinic receptors: concerted discovery and biomedical applications. *Channels*, 2008, 2: 143-52
- [12] Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol*, 2004, 74: 363-96
- [13] Gotti C, Moretti M, Bohr I, et al. Selective nicotinic acetylcholine receptor subunit deficits identified in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies by immunoprecipitation. *Neurobiol Dis*, 2006, 23: 481-9
- [14] Lee CH, Huang CS, Chen CS, et al. Overexpression and activation of the $\alpha 9$ -nicotinic receptor during tumorigenesis in human breast epithelial cells. *J Natl Cancer Inst*, 2010, 102: 1322-35
- [15] Lee CH, Chang YC, Chen CS, et al. Crosstalk between nicotine and estrogen-induced estrogen receptor activation induces $\alpha 9$ -nicotinic acetylcholine receptor expression in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 129: 331-45
- [16] Improgo MR, Soll LG, Tapper AR, et al. Nicotinic acetylcholine receptors mediate lung cancer growth. *Front Physiol*, 2013, 4: 251
- [17] Simard AR, Gan Y, St-Pierre S, et al. Differential modulation of EAE by $\alpha 9^*$ - and $\beta 2^*$ -nicotinic acetylcholine receptors. *Immunol Cell Biol*, 2013, 91: 195-200
- [18] Livett BG, Sandall DW, Keays D, et al. Therapeutic applications of conotoxins that target the neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Toxicon*, 2006, 48: 810-29
- [19] Nicke A, Wonnacott S, Lewis RJ. α -conotoxins as tools for the elucidation of structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Eur J Biochem*, 2004, 271: 2305-19
- [20] Dani JA, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007, 47: 699-729
- [21] Luo S, Zhangsun D, Wu Y, et al. Characterization of a novel α -conotoxin from *Conus textile* that selectively targets $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem*, 2013, 288: 894-902
- [22] McIntosh JM, Azam L, Staheli S, et al. Analogs of α -conotoxin MII are selective for $\alpha 6$ -containing nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*, 2004, 65: 944-52
- [23] Dowell C, Olivera BM, Garrett JE, et al. α -conotoxin PIA is selective for $\alpha 6$ subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci*, 2003, 23: 8445-52
- [24] Azam L, Dowell C, Watkins M, et al. α -conotoxin BuIA, a novel peptide from *Conus bullatus*, distinguishes among neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem*, 2005, 280: 80-7
- [25] McIntosh JM, Dowell C, Watkins M, et al. α -conotoxin GIC from *Conus geographus*, a novel peptide antagonist of nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem*, 2002, 277: 33610-5
- [26] Klink R, de Kerchove d'Exaerde A, Zoli M, et al. Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *J Neurosci*, 2001, 21: 1452-63
- [27] Azam L, Winzer-Serhan UH, Chen Y, et al. Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within midbrain dopamine neurons. *J Comp Neurol*, 2002, 444: 260-74
- [28] Champtiaux N, Gotti C, Cordero-Erausquin M, et al. Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *J Neurosci*, 2003, 23: 7820-9
- [29] Pons S, Fattore L, Cossu G, et al. Crucial role of $\alpha 4$ and $\alpha 6$ nicotinic acetylcholine receptor subunits from ventral tegmental area in systemic nicotine self-administration. *J Neurosci*, 2008, 28: 12318-27
- [30] Yang KC, Jin GZ, Wu J. Mysterious $\alpha 6$ -containing nAChRs: function, pharmacology, and pathophysiology. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30: 740-51
- [31] Exley R, Clements MA, Hartung H, et al. $\alpha 6$ -containing nicotinic acetylcholine receptors dominate the nicotine control of dopamine neurotransmission in nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology*, 2008, 33: 2158-66
- [32] Le Novère N, Zoli M, Changeux JP. Neuronal nicotinic receptor $\alpha 6$ subunit mRNA is selectively concentrated in catecholaminergic nuclei of the rat brain. *Eur J Neurosci*, 1996, 8: 2428-39
- [33] Vailati S, Hanke W, Bejan A, et al. Functional $\alpha 6$ -containing nicotinic receptors are present in chick retina. *Mol Pharmacol*, 1999, 56: 11-9
- [34] Champtiaux N, Han ZY, Bessis A, et al. Distribution and pharmacology of $\alpha 6$ -containing nicotinic acetylcholine

- receptors analyzed with mutant mice. *J Neurosci*, 2002, 22: 1208-17
- [35] Quik M, Polonskaya Y, Kulak JM, et al. Vulnerability of 125I- α -conotoxin MII binding sites to nigrostriatal damage in monkey. *J Neurosci*, 2001, 21: 5494-500
- [36] Quik M, Bordia T, Forno L, et al. Loss of α -conotoxin MII- and A85380-sensitive nicotinic receptors in Parkinson's disease striatum. *J Neurochem*, 2004, 88: 668-79
- [37] Jackson KJ, McIntosh JM, Brunzell DH, et al. The role of $\alpha 6$ -containing nicotinic acetylcholine receptors in nicotine reward and withdrawal. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 331: 547-54
- [38] Brunzell DH, Boschen KE, Hendrick ES, et al. α -conotoxin MII-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in the nucleus accumbens shell regulate progressive ratio responding maintained by nicotine. *Neuropsychopharmacology*, 2010, 35: 665-73
- [39] Lof E, Olausson P, deBejczy A, et al. Nicotinic acetylcholine receptors in the ventral tegmental area mediate the dopamine activating and reinforcing properties of ethanol cues. *Psychopharmacology*, 2007, 195: 333-43
- [40] Luo S, Zhangsun D, Schroeder CI, et al. A novel $\alpha 4/7$ -conotoxin LvIA from *Conus lividus* that selectively blocks $\alpha 3\beta 2$ vs. $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ nicotinic acetylcholine receptors. *FASEB J*, 2014, 28: 1842-1853
- [41] McIntosh JM, Plazas PV, Watkins M, et al. A novel α -conotoxin, PeIA, cloned from *Conus pergrandis*, discriminates between rat $\alpha 9$, $\alpha 10$ and $\alpha 7$ nicotinic cholinergic receptors. *J Biol Chem*, 2005, 280: 30107-12
- [42] Hone AJ, Scadden M, Gajewiak J, et al. α -Conotoxin PeIA[S9H,V10A,E14N] Potently and selectively blocks $\alpha 6\beta 2\beta 3$ versus $\alpha 6\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*, 2012, 82: 972-82
- [43] Jin AH, Brandstaetter H, Nevin ST, et al. Structure of α -conotoxin BuIA: influences of disulfide connectivity on structural dynamics. *BMC Struct Biol*, 2007, 7: 28-40
- [44] Nielsen KJ, Watson M, Adams DJ, et al. Solution structure of mu-conotoxin PIIIA, a preferential inhibitor of persistent tetrodotoxin-sensitive sodium channels. *J Biol Chem*, 2002, 277: 27247-55
- [45] Clark RJ, Fischer H, Nevin ST, et al. The synthesis, structural characterization, and receptor specificity of the α -conotoxin Vc1.1. *J Biol Chem*, 2006, 281: 23254-63
- [46] Letchworth SR, Whiteaker P. Progress and challenges in the study of $\alpha 6$ -containing nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol*, 2011, 82: 862-72
- [47] Young T, Wittenauer S, McIntosh JM, et al. Spinal $\alpha 3\beta 2^*$ nicotinic acetylcholine receptors tonically inhibit the transmission of nociceptive mechanical stimuli. *Brain Res*, 2008, 1229: 118-24
- [48] Luo S, Zhangsun D, Zhu X, et al. Characterization of a novel α -conotoxin TxID from *Conus textile* that potently blocks rat $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors. *J Med Chem*, 2013, 56: 9655-63
- [49] Luo S, Kulak JM, Cartier GE, et al. α -conotoxin AuIB selectively blocks $\alpha 3\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors and nicotine-evoked norepinephrine release. *J Neurosci*, 1998, 18: 8571-9
- [50] Sharma G. The dominant functional nicotinic receptor in progenitor cells in the rostral migratory stream is the $\alpha 3\beta 4$ subtype. *J Neurophysiol*, 2013, 109: 867-72
- [51] D'Souza RD, Vijayaraghavan S. Nicotinic receptor-mediated filtering of mitral cell responses to olfactory nerve inputs involves the $\alpha 3\beta 4$ subtype. *J Neurosci*, 2012, 32: 3261-6
- [52] Grady SR, Moretti M, Zoli M, et al. Rodent habenulo-interpeduncular pathway expresses a large variety of uncommon nAChR subtypes, but only the $\alpha 3\beta 4^*$ and $\alpha 3\beta 3\beta 4^*$ subtypes mediate acetylcholine release. *J Neurosci*, 2009, 29: 2272-82
- [53] McCallum SE, Cowe MA, Lewis SW, et al. $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors in the medial habenula modulate the mesolimbic dopaminergic response to acute nicotine *in vivo*. *Neuropharmacology*, 2012, 63: 434-40
- [54] Napier IA, Klimis H, Rycroft BK, et al. Intrathecal α -conotoxins Vc1.1, AuIB and MII acting on distinct nicotinic receptor subtypes reverse signs of neuropathic pain. *Neuropharmacology*, 2012, 62: 2202-7
- [55] Luo S, Christensen S, Zhangsun D, et al. A novel inhibitor of $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors from *Conus vexillum* delineates a new conotoxin superfamily. *PLoS One*, 2013, 8: e54648
- [56] McIntosh JM, Absalom N, Chebib M, et al. $\alpha 9$ nicotinic acetylcholine receptors and the treatment of pain. *Biochem Pharmacol*, 2009, 78: 693-702
- [57] Chernyavsky AI, Arredondo J, Vetter DE, et al. Central role of $\alpha 9$ acetylcholine receptor in coordinating keratinocyte adhesion and motility at the initiation of epithelialization. *Exp Cell Res*, 2007, 313: 3542-55
- [58] Chen CS, Lee CH, Hsieh CD, et al. Nicotine-induced human breast cancer cell proliferation attenuated by g Garcinol through down-regulation of the nicotinic receptor and cyclin D3 proteins. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 125(1): 73-87
- [59] Chikova A, Grando SA. Naturally occurring variants of human $\alpha 9$ nicotinic receptor differentially affect bronchial cell proliferation and transformation. *PLoS One*, 2011, 6: e27978
- [60] Vincler M, Wittenauer S, Parker R, et al. Molecular mechanism for analgesia involving specific antagonism of $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 17880-4
- [61] Sanford M. Intrathecal ziconotide: a review of its use in patients with chronic pain refractory to other systemic or intrathecal analgesics. *CNS Drugs*, 2013, 27: 989-1002
- [62] Luo S, Akondi KB, Zhangsun D, et al. Atypical α -conotoxin LtIA from *Conus litteratus* targets a novel microsite of the $\alpha 3\beta 2$ nicotinic receptor. *J Biol Chem*, 2010, 285: 12355-66