

敬钊毒素-XI 与突变体 R3A-JZTX-XI 的合成、复性及其药理活性鉴定

池宇朋^{1*}, 邓梅春^{1,2*}, 吴远远¹, 罗吉¹, 容明强¹, 张亦雅¹, 张东裔², 曾雄智¹, 梁宋平¹

1 湖南师范大学 蛋白质化学与发育生物学教育部重点实验室, 长沙 410081

2 国防科学技术大学理学院 化学与生物学系生物信息研究中心, 长沙 410073

摘要: 表达于 β -胰岛细胞上的 Kv2.1 钾通道电流负责动作电位的复极化, 从而调节胰岛素的分泌, 是治疗 2 型糖尿病的有效作用靶点。敬钊毒素-XI(JZTX-XI) 是从敬钊缨毛蛛 *Chilobrachys jingzhao* 粗毒中分离纯化到的一种新型的肽类神经毒素, 能够抑制非洲爪蟾卵母细胞上表达的 Kv2.1 钾通道电流。为了研究 JZTX-XI 的结构与功能关系, 用苄甲氧羰基 (Fomc) 固相多肽合成方法合成了野生型 JZTX-XI 和突变体 R3A-JZTX-XI, 结合反相 HPLC 和质谱对不同条件下的氧化复性结果进行检测, 从而得到合成多肽的最佳氧化复性条件。复性产物经质谱测定其相对分子质量与理论分子质量相符。复性 JZTX-XI 与天然毒素等量混合后用高效液相色谱分析也只得到单一峰。膜片钳电生理活性分析结果显示, JZTX-XI 对瞬时表达于 HEK293T 细胞的钾通道亚型 hKv2.1 和钠通道亚型 hNav1.5 电流具有非常强的抑制作用, 其半数有效抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 95.8 nmol/L 和 437.1 nmol/L。当第 3 位 Arg 被 Ala 取代后, 突变体 R3A-JZTX-XI 对同样表达的 hKv2.1 和 hNav1.5 通道电流的 IC₅₀ 值分别为 1.22 μ mol/L 和 1.96 μ mol/L。以上实验结果表明突变体 R3A-JZTX-XI 对 hKv2.1 和 hNav1.5 通道的抑制活性分别比天然 JZTX-XI 降低了 12.7 倍和 4.5 倍, 说明第 3 位的 Arg 残基既是负责 JZTX-XI 与 hKv2.1 通道相互作用的关键活性残基, 也是与 hNav1.5 通道活性相关的氨基酸残基。目前的研究结果对研发胰脏钾通道 Kv2.1 的分子探针和以 Kv2.1 通道为靶点的药物设计具有借鉴作用。

关键词: 敬钊毒素-XI (JZTX-XI), 固相多肽合成, 氧化复性, 钾通道 Kv2.1, 钠通道 Nav1.5

Synthesis, refolding and identification of pharmacological activities of neurotoxin JZTX-XI and R3A-JZTX-XI

Yupeng Chi^{1*}, Meichun Deng^{1,2*}, Yuanyuan Wu¹, Ji Luo¹, Mingqiang Rong¹, Yiya Zhang¹,

Received: September 1, 2010; **Accepted:** December 1, 2010

Supported by: National Basic Research and Development Program of China (973 Program) (Nos. 2009CB526510, 2010CB529800), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA02Z141), Natural Science Foundation of Hunan Province (Nos. 07JJ3072, 07A035), Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-07-0279), National Natural Science Foundation of China (No. 30971432), Hunan Provincial Innovation Foundation for Postgraduate (No. CX2009B111).

*These authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Xiongzi Zeng. Tel: +86-731-88872556; Fax: +86-731-88861304; E-mail: xiongzizeng@yahoo.com.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (Nos. 2009CB526510, 2010CB529800), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2006AA02Z141), 湖南省自然科学基金 (Nos. 07JJ3072, 07A035), 教育部新世纪优秀人才支持计划 (No. NCET-07-0279), 国家自然科学基金 (No. 30971432), 湖南省研究生科研创新项目 (No. CX2009B111) 资助。

Dongyi Zhang², Xiongzhi Zeng¹, and Songping Liang¹

¹ Key Laboratory of Protein Chemistry and Developmental Biology of Ministry of Education, Hunan Normal University, Changsha 410081, China

² Research Center of Biological Information, Department of Chemistry and Biology, College of Science, National University of Defense Technology, Changsha 410073, China

Abstract: Kv2.1 channel currents in pancreatic β -cells are thought to contribute to action potential repolarization and thereby modulate insulin secretion. Because of its central role in this important physiological process, Kv2.1 channel is a promising target for the treatment of type 2 diabetes. Jingzhaotoxin-XI (JZTX-XI) is a novel peptide neurotoxin isolated from the venom of the spider *Chilobrachys jingzhao*. Two-microelectrode voltage clamp experiments had showed that the toxin inhibited Kv2.1 potassium currents expressed in *Xenopus Laevis* oocytes. In order to investigate the structure-function relationship of JZTX-XI, the natural toxin and a mutant of JZTX-XI in which Arg3 was replaced by Ala, were synthesized by solid-phase chemistry method with Fmoc-protected amino acids on the PS3 automated peptide synthesizer. Reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF MS) were used to monitor the oxidative refolding process of synthetic linear peptides to find the optimal renaturation conditions of these toxins. The experiments also proved that the relative molecular masses of refolded peptides were in accordance with their theoretical molecular masses. RP-HPLC chromatogram of co-injected native and refolded JZTX-XI was a single peak. Under the whole-cell patch-clamp mode, JZTX-XI could completely inhibit hKv2.1 and hNav1.5 channels currents expressed in HEK293T cells with IC_{50} values of 95.8 nmol/L and 437.1 nmol/L respectively. The mutant R3A-JZTX-XI could also inhibit hKv2.1 and hNav1.5 channel currents expressed in HEK293T cells with IC_{50} values of 1.22 μ mol/L and 1.96 μ mol/L respectively. However, the prohibitive levels of R3A-JZTX-XI on hKv2.1 and hNav1.5 channels were reduced by about 12.7 times and 4.5 times respectively, indicating that Arg3 was a key amino acid residue relative to the hKv2.1 channel activity of JZTX-XI, but it is also an amino acid residue correlated with the binding activity of JZTX-XI to hNav1.5 channel. Our findings should be helpful to develop JZTX-XI into a molecular probe and drug candidate targeting to Kv2.1 potassium channel in the pancreas.

Keywords: Jingzhaotoxin-XI (JZTX-XI), solid-phase polypeptide synthesis, oxidative refolding, Kv2.1 channel, Nav1.5 channel

延迟整流钾通道主要负责动作电位复极化, 其中该通道 Kv2.1 亚型被发现在人等几类物种的 β -胰岛细胞上广泛存在, 有研究报道显示 Kv2.1 通道在调节 β -胰岛细胞的胰岛素分泌上发挥重要的作用^[1-4]。河豚毒素不敏感型钠通道 Nav1.5 亚型是心肌的主要钠通道并在心肌电活动中发挥重要作用, 许多心脏疾病如长 QT 综合症、心肌传导功能障碍等已经被证明是 Nav1.5 基因突变所致^[5]。敬钊毒素-XI (Jingzhaotoxin-XI, JZTX-XI) 是从我国境内新发现的珍稀蜘蛛敬钊缨毛蛛 *Chilobrachys jingzhao*^[6]粗毒中纯化得到的一种新型肽类神经毒素。该毒素由 34 个氨基酸残基组成, 分子中 6 个半胱氨酸形成 3 对二硫键。前期的研究结果显示 JZTX-XI 对大鼠背根神经节细胞膜上表达的电压门控钠通道和钙通道均没有影响, 却对非洲爪蟾卵母

细胞上表达的 Kv2.1 钾通道电流和急性分离的大鼠心肌细胞钠通道电流具有抑制作用, 并采用二维核磁共振技术解析了 JZTX-XI 的三维溶液结构, 根据该毒素的结构信息推测 JZTX-XI 的 N 端第 3 位的精氨酸残基可能是负责 JZTX-XI 与 Kv2.1 通道及 Nav1.5 通道相互结合的关键活性残基^[7]。我们正在研究通过蛋白质工程技术力争消除 JZTX-XI 对 Nav1.5 通道的抑制活性, 从而正在把 JZTX-XI 改造成为一个高效特异性的 Kv2.1 通道亚型抑制剂, 实现将该毒素开发成治疗 2 型糖尿病药物的潜在医用价值。为了深入研究其结构与功能关系, 本文用固相多肽合成的方法合成了天然 JZTX-XI 及其突变体 R3A-JZTX-XI, 并探索合成产物的氧化复性条件, 结合电生理膜片钳技术研究合成毒素对 HEK293T 细胞上瞬时转染表达的钾通道亚型 Kv2.1 和钠通道

亚型 Nav1.5 电流的抑制作用,为下一步通过蛋白质工程将 JZTX-XI 改造成一个高效特异性的 Kv2.1 通道亚型或 Nav1.5 通道亚型的抑制剂提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

9-芴甲氧羰基 (Fmoc) 氨基酸、N-甲基吗啡啉 (NMM)、哌啶 (Piperidine) 购自吉尔生化 (上海) 有限公司; Rink Resin 树脂购自天津南开和成公司; 还原型谷胱甘肽 (GSH)、氧化型谷胱甘肽 (GSSG)、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (Tris-HCL)、N-2-羟乙基哌嗪-N'-2'-乙磺酸 (HEPES)、乙二醇双 (2-氨基乙基) 四乙酸(EGTA)、N-甲基-D-葡萄糖胺 (NMG)、二巯基乙烷、苯甲硫醚、三氟乙酸 (TFA)、 α -氰基-4-羟基-肉桂酸(CCA) 等购自 Sigma 公司; 二甲基甲酰胺 (DMF) 购自美国 Tedia 公司; 3-四甲基脲六氟磷酸酯 (HCTU) 购自上海正极生物科技有限公司; 乙腈、甲醇均购自湖南化工研究院。HEK293T 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, SCN5A-pCDNA3.1^[8]和 hK2.1^[9]通道质粒分别由美国哥伦比亚大学 Robert S. Kass 教授和英国伦敦大学药学院的 Martin Stocker 教授提供。

1.2 JZTX-XI 及 R3A-JZTX-XI 的化学合成与分离纯化

采用 Fmoc-氨基酸和 HCTU 偶联的固相多肽化学合成方法^[10],在 PS3 多肽合成仪上进行多肽的固相化学合成。多肽粗品利用半制备型的反相 HPLC 进行分离纯化 (反相柱: 10 mm×250 mm Phenomenex C18 column; 洗脱液 A: 含 0.1% TFA 的水溶液; 洗脱液 B: 含 0.1% TFA 的乙腈, 洗脱梯度为 20 min 内 B 液的浓度变化为 25%~35%; 流速是 3.0 mL/min), 利用 MALDI-TOF/TOF 质谱分析各峰的质荷比, 以确定目的峰的位置, 然后收集目的峰真空冷冻干燥。再选取目的峰再用分析型的反相 HPLC (Waters Alliance) 进行分离纯化 (反相柱: Waters 4.6 mm×250 mm C18 column; 洗脱梯度同上,

流速为 1.0 mL/min), 通过上述 2 次分离纯化确保合成产品纯度达到 95%以上, 然后冻干备用。

1.3 JZTX-XI 及 R3A-JZTX-XI 的氧化还原复性

参照文献^[10]的方法, 每次各取 0.1 mg 纯化的合成的 JZTX-XI 粗样在 1 mL 0.1 mol/L Tris-HCl、一定比例浓度的 GSH/GSSG、不同 pH 值的缓冲液中进行氧化复性。对于每个复性条件都在不同的时间间隔取出 100 μ L 反应液, 加 10 μ L 50% TFA 水溶液终止反应后, 用分析型反相 HPLC 进行氧化复性的实时监测 (反相柱: Waters 4.6 mm×250 mm C18 column, 洗脱液 A: 含 0.1% TFA 的水溶液; 洗脱液 B: 含 0.1% TFA 的乙腈, 洗脱梯度为 20 min 内 B 液的浓度变化为 25%~35%, 流速为 1.0 mL/min), 对收集洗脱峰进行质谱分析来确定合适的复性时间和 pH 值。根据实验结果, 再采用最优条件对天然毒素和突变体 R3A-JZTX-XI 进行氧化复性。

1.4 氧化复性产物与天然 JZTX-XI 共洗脱实验

将氧化复性 JZTX-XI 与天然 JZTX-XI 等量混合后, 在反相 HPLC (Waters Alliance) 上进行共洗脱实验 (色谱条件同 1.3)。

1.5 人胚肾细胞 (Human embryonic kidney 293T, HEK293T) 的培养与转染

HEK293T 细胞的培养按照标准的组织培养条件 (37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、15%的相对湿度), 在培养箱中用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养。Nav1.5 和 K2.1 通道质粒与 HEK293T 细胞的瞬时转染是采用美国 Invitrogen 公司的脂质体 2000 按照用户手册进行。先将 Nav1.5 或 K2.1 通道质粒与脂质体 2000 和绿色荧光蛋白 GFP 报告质粒复合物滴加进入盛有 HEK293T 细胞的培养皿中, 轻轻混匀后孵育 4~6 h, 再换新鲜的培养液培养。瞬时转染后 24~72 h 内均可挑选显示绿色荧光的细胞进行膜片钳实验^[11]。

1.6 瞬时表达于 HEK293T 细胞的 hKv2.1 和 hNav1.5 通道电流的记录

室温 (25 \pm 1) $^{\circ}$ C 下采用全细胞膜片钳技术进行

实验。电流记录利用 EPC9 放大器 (HEKA 公司, German) 在电脑上进行, 记录和分析系统采用 Pulse+Pulsefit 8.0 软件。玻璃管为 100 μL (VWR micropipettes, VWR Company) 的硼硅酸盐玻璃毛细管。玻璃电极经两步拉制而成, 充灌电极液后电极电阻一般为 2~3 M Ω 。测定钠电流的细胞外液为 (mmol/L): NaCl 140、KCl 3、MgCl₂ 1、CaCl₂ 1 和 HEPES 10, 调 pH 值为 7.3; 细胞内液为 (mmol/L): CsF 140、EGTA 1、NaCl 10 和 HEPES 10, pH 7.3。测定钾通道电流的细胞外液为 (mmol/L): Choline chloride 130、D-glucose 12、MgCl₂ 2、CaCl₂ 2 和 HEPES 10, pH 7.2。细胞内液为 (mmol/L): KF 120、NMG 20、HEPES 10、EGTA 10、MgATP 2 和 Li₂GTP 0.5, pH 7.2。细胞外液和细胞内液均用 0.22 μm 滤膜过滤。

2 结果与分析

2.1 JZTX-XI 与 R3A-JZTX-XI 的固相化学合成

合成的 JZTX-XI 粗品经真空冷冻干燥后为白色粉末, 采用 RP-HPLC 分离纯化 2 次, 收集洗脱峰经 MALDI-TOF/TOF 质谱仪鉴定, 其中保留时间为 15.1 min 的单一峰相对分子量 (MH⁺) 为 3 734.041 (图 1A), 与 JZTX-XI (线性) 理论分子量 3 733.358 相符; 保留时间为 17.0 min 的单一峰相对分子量

(MH⁺) 为 3 649.012 (图 1B), 与 R3A-JZTX-XI (线性) 理论分子量 3 648.250 相符, 提示固相多肽合成是成功的。

2.2 JZTX-XI 及 R3A-JZTX-XI 的氧化还原复性

化学合成的多肽由于是线性分子, 没有生物学活性, 所以检测活性前需要进行氧化复性, 使其形成正确的空间结构和二硫键配对, 但氧化还原复性的过程常受多种因素的影响。因此在大量合成多肽进行复性前, 需要探索其最佳氧化复性条件。根据实验室以往的复性研究结果, 确定样品浓度为 0.05 g/L 较好, 然后比较采用不同比例浓度的谷胱甘肽组合 GSH/GSSG (5 mmol/L : 0.5 mmol/L, 2 mmol/L : 0.2 mmol/L, 1.0 mmol/L : 0.1 mmol/L) 和不同 pH 值 (7.0、7.5、8.0) 缓冲溶液条件下复性产物峰面积的大小, 从而确认 JZTX-XI 的最佳氧化复性条件为: 含 1.0 mmol/L GSH、0.1 mmol/L GSSG、pH 为 8.0、浓度为 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液, 样品质量浓度为 0.05 g/L, 复性温度为 4 $^{\circ}\text{C}$ 。图 2A 展示了线性 JZTX-XI 氧化复性动态变化情况。随着复性时间的延长, 复性目的峰形逐渐变大, 峰面积逐渐增加。当复性进行至 12 h 以后, 峰形在 48 h 之内都能够保持相对稳定, 单一主峰明显, 提示该毒素分子的复性在 12 h 内已经基本完成。复性产物经 MALDI-TOF/TOF 质谱仪鉴定, 相对分子

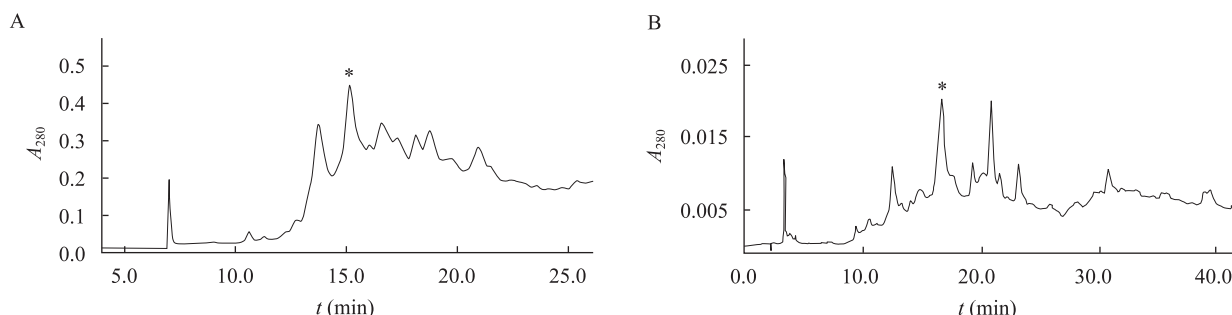


图 1 JZTX-XI 和 R3A-JZTX-XI 的合成 RP-HPLC 分析图

Fig. 1 Identification of synthetic JZTX-XI and R3A-JZTX-XI by RP-HPLC. (A) JZTX-XI. (B) R3A-JZTX-XI. The synthetic JZTX-XI and R3A-JZTX-XI were applied to a phenomenex C₁₈ column (10 mm \times 250 mm) pre-equilibrated with 0.1% TFA. Elution was performed with a linear gradient of 25%–35% acetonitrile over 20 min at a flow rate 3.0 mL/min at 40 $^{\circ}\text{C}$. Asterisks indicated the fractions of interest.

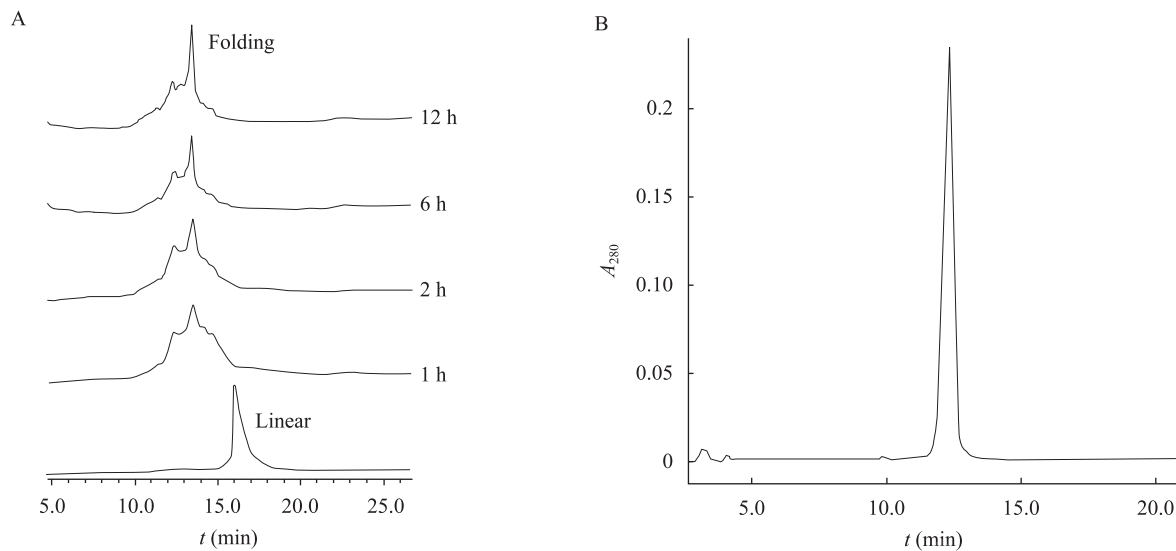


图2 JZTX-XI的反相色谱图

Fig. 2 RP-HPLC chromatograms of sJZTX-XI. (A) HPLC chromatograms in refolding process of synthetic JZTX-XI. (B) HPLC chromatogram of co-injected native and refolded JZTX-XI in refolding process.

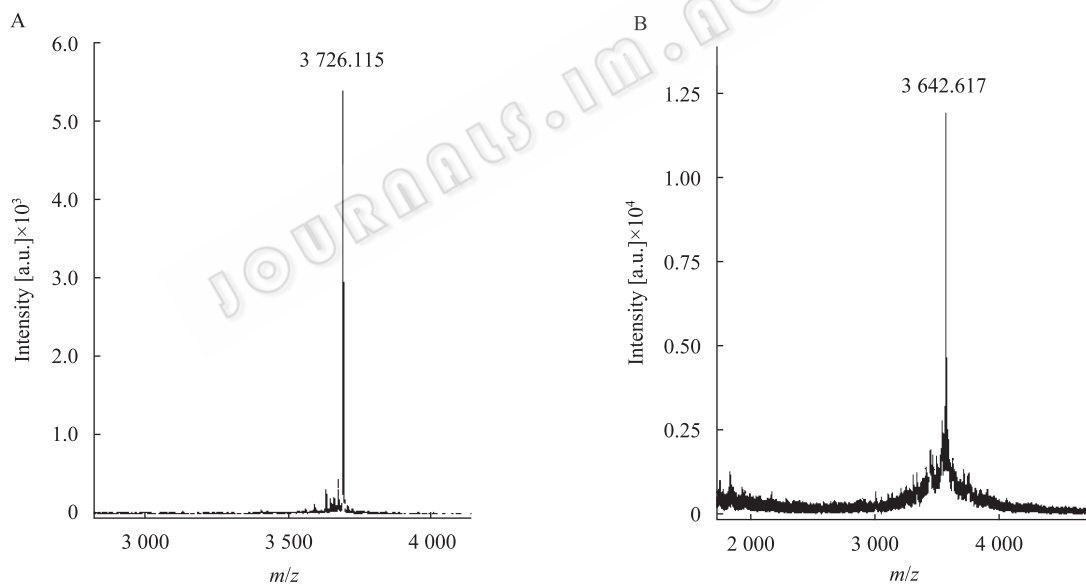


图3 sJZTX-XI和R3A-JZTX-XI复性产物的质谱图谱

Fig. 3 Mass spectra of refolded sJZTX-XI and R3A-JZTX-XI. (A) sJZTX-XI. (B) R3A-JZTX-XI.

质量为3726.115(图3A),比线性JZTX-XI的分子质量减少了6,提示复性后的JZTX-XI形成了3对二硫键。将复性产物与天然JZTX-XI等量混合后进行共洗脱实验只得到单一峰(图2B),推断复性产物的二硫键配对方式正确,合成毒素与天然毒素在结构上具有一致性。突变体R3A-JZTX-XI的合成、分

离和复性方法均同上。复性产物经MALDI-TOF/TOF质谱仪鉴定,其相对分子质量为3642.617(图3B),形成了3对二硫键,与预期一致。

2.3 JZTX-XI和R3A-JZTX-XI对瞬时表达于HEK293T细胞的hNav1.5钠通道活性的影响

前期的研究显示JZTX-XI可以抑制大鼠心肌细

胞上的钠通道电流, 其 K_d 为 $0.74 \mu\text{mol/L}$ ^[7]。然而, JZTX-XI 对电压门控钠通道亚型的作用却还不清楚。本文运用全细胞膜片钳技术研究了 JZTX-XI 对瞬时表达于 HEK293T 细胞的钠通道亚型 hNav1.5 的影响。电流去极化诱导方式: 细胞膜电位钳制 -80 mV , 以 50 ms 的时程给予一测试电压 -10 mV , 每隔 5 s 重复 1 次。膜片钳电生理实验表明, $1.0 \mu\text{mol/L}$ 的天然 JZTX-XI (nJZTX-XI) 和合成 JZTX-XI (sJZTX-XI) 分别能抑制 $(70.4 \pm 3.1)\%$ (图 4A, $n=5$) 与 $(67.5 \pm 4.2)\%$ (图 4B, $n=5$) 的 hNav1.5 通道电流, 表明合成 JZTX-XI 与天然 JZTX-XI 对 hNav1.5 通道电流的抑制作用的大小非常接近, 进一

步证实合成 JZTX-XI 与天然 JZTX-XI 在结构与活性性上具有一致性。同时实验结果表明合成 JZTX-XI 对 hNav1.5 通道的抑制作用具有明显的浓度依从性, 其半数有效抑制浓度 (IC_{50}) 为 437.12 nmol/L 。然而 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 的合成突变体 R3A-JZTX-XI 却只能抑制同样转染表达的钠通道 hNav1.5 电流的 $(35.7 \pm 4.1)\%$ (图 4C, $n=4$), 其半数有效抑制浓度 (IC_{50}) 为 $1.96 \mu\text{mol/L}$ (图 4D)。比较上述研究结果发现突变体 R3A-JZTX-XI 对钠通道亚型 hNav1.5 的抑制活性比天然 nJZTX-XI 降低了约 4.5 倍, 表明 JZTX-XI 分子中第 3 位的精氨酸残基是与 Nav1.5 通道结合活性相关的氨基酸残基。

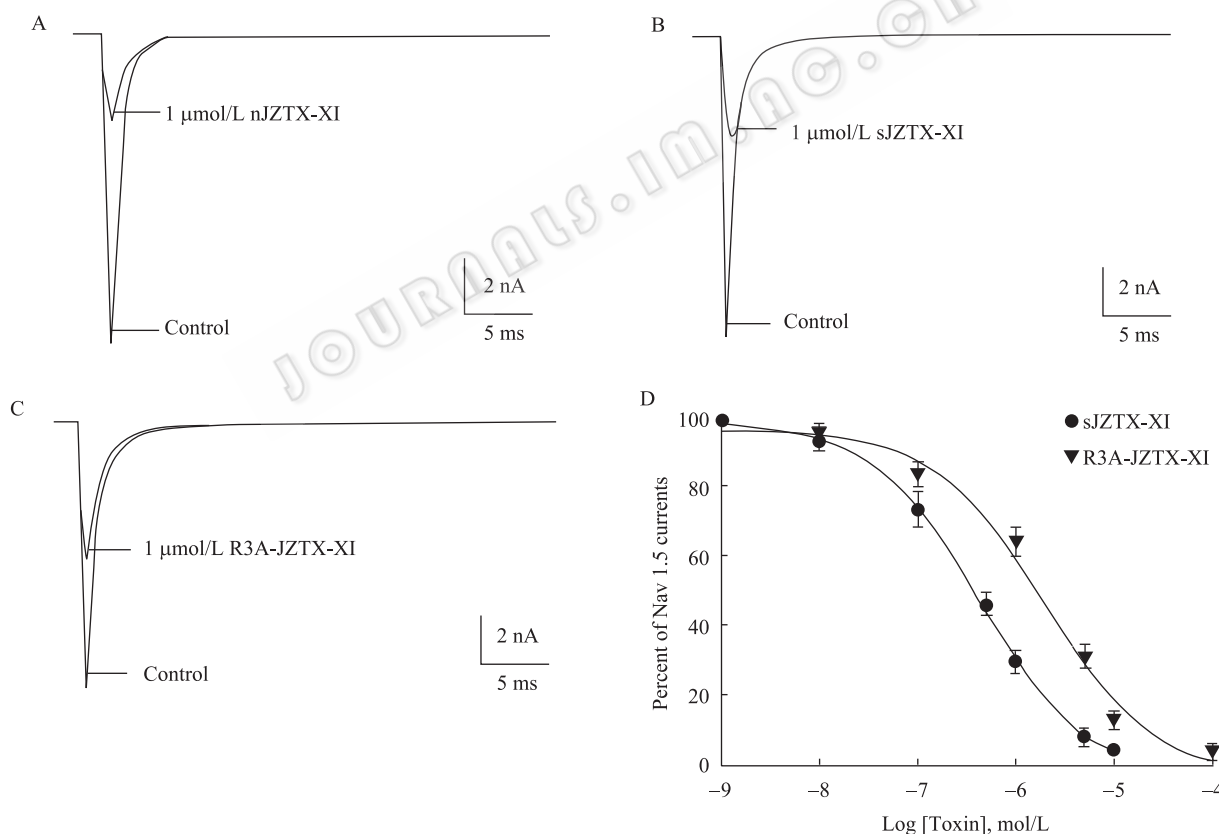


图 4 JZTX-XI 与突变体 R3A-JZTX-XI 对表达于 HEK293T 细胞 hNav1.5 通道电流的抑制作用

Fig. 4 Effects of nJZTX-XI, sJZTX-XI and R3A-JZTX-XI on hNav1.5 channel currents expressed in HEK293T cells. Nav1.5 currents traces were evoked by a 50 ms depolarization to -10 mV from a holding potential of -80 mV . Every data point ($\bar{x} \pm s$) came from 3–5 separated experimental cells. A, B and C showed that $1.0 \mu\text{mol/L}$ nJZTX-XI, sJZTX-XI and R3A-JZTX-XI could inhibit hNav1.5 channel currents expressed in HEK293T cells, and they reduced Nav1.5 currents by $(70.4 \pm 3.1)\%$ ($n=5$), $(67.5 \pm 4.2)\%$ ($n=5$) and $(35.7 \pm 4.1)\%$ ($n=4$), respectively. D showed that the IC_{50} values of sJZTX-XI and R3A-JZTX-XI were 437.12 nmol/L and $1.96 \mu\text{mol/L}$, respectively.

2.4 JZTX-XI 和 R3A-JZTX-XI 对瞬时表达于 HEK293T 细胞的 hKv2.1 通道活性的影响

进一步研究了天然 JZTX-XI 及其突变体 R3A-JZTX-XI 对瞬时表达于 HEK293T 细胞上的电压门控钾通道亚型 hKv2.1 的抑制作用。电流去极化诱导方式：细胞膜电位钳制 -80 mV，以 300 ms 的时程给予一测试电压 +30 mV，每隔 5 s 重复 1 次。膜片钳实验表明，100 nmol/L 天然 JZTX-XI (nJZTX-XI)、合成 JZTX-XI (sJZTX-XI) 和突变体 R3A-JZTX-XI 对 hKv2.1 钾通道电流的抑制程度分别

为 (53.9±7.8)% (图 5A, $n=5$)、(51.2±5.4)% (图 5B, $n=5$) 和 (5.7±3.1)% (图 5C, $n=4$)。如图 5D 所示，sJZTX-XI 和 R3A-JZTX-XI 对 hKv2.1 钾电流的抑制作用随浓度的增大而增强，具有明显的浓度依从性，其半数有效抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 95.8 nmol/L 和 1.22 μ mol/L。比较上述研究结果发现突变体 R3A-JZTX-XI 对 hKv2.1 钾通道的抑制活性比天然 JZTX-XI 降低了约 12.4 倍，说明第 3 位的精氨酸残基是负责 JZTX-XI 与 Kv2.1 通道结合的关键活性残基。

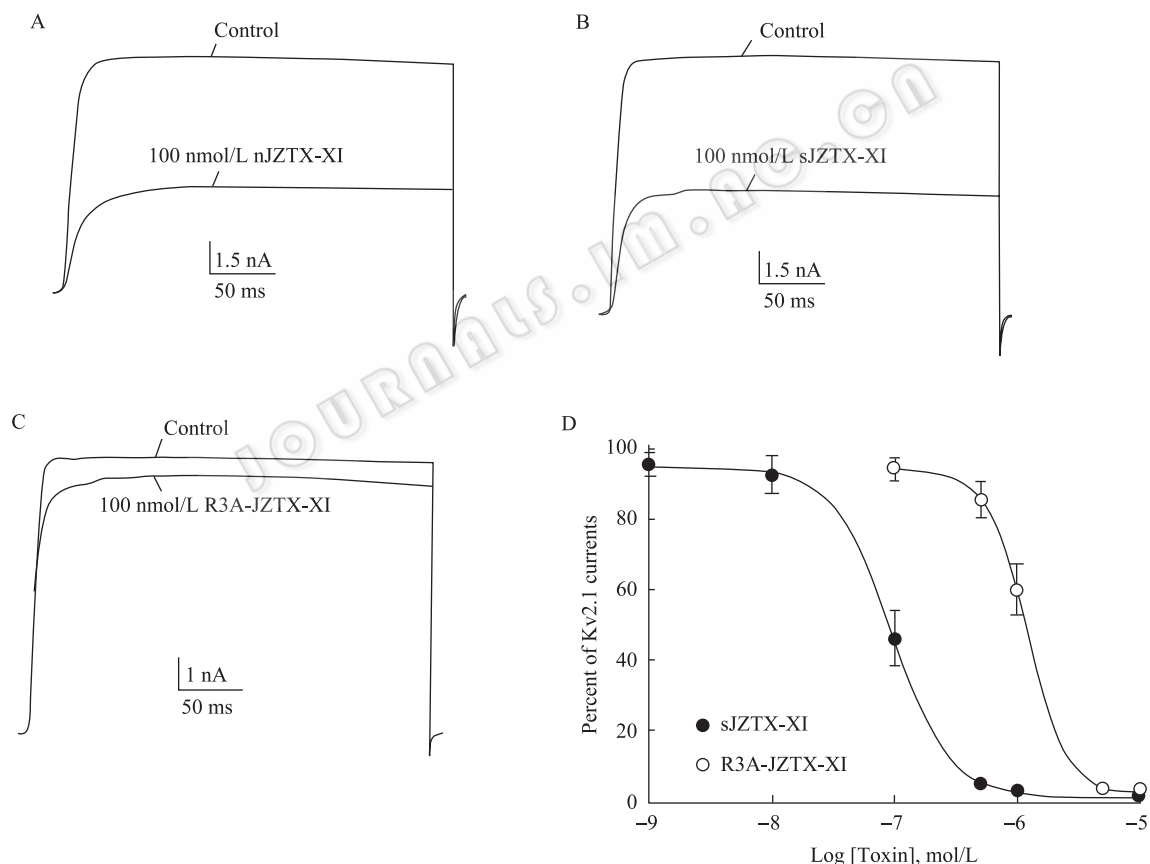


图 5 JZTX-XI 与突变体 R3A-JZTX-XI 对表达于 HEK293T 细胞 hKv2.1 通道电流的抑制作用

Fig. 5 Effects of nJZTX-XI, sJZTX-XI and R3A-JZTX-XI on hKv2.1 channel currents expressed in HEK293T cells. hKv2.1 currents traces were evoked by a 300 ms depolarization to +30 mV from a holding potential of -80 mV. Every data point ($\bar{x} \pm s$) came from 3–5 separated experimental cells. A, B and C showed that 100 nmol/L nJZTX-XI, sJZTX-XI and R3A-JZTX-XI could inhibit hKv2.1 channels currents expressed in HEK293T cells, and they reduced hKv2.1 currents by (53.9±7.8)% ($n=5$), (51.2±5.4)% ($n=5$) and (5.7±3.1)% ($n=4$), respectively. D showed that the IC_{50} values of sJZTX-XI and R3A-JZTX-XI were 95.8 nmol/L and 1.22 μ mol/L, respectively.

3 讨论

Kv2.1 钾离子通道是一种延迟整流型钾通道, 广泛分布于胰岛 β 细胞、大脑海马和皮层神经元细胞上, 在调控胰岛素分泌和脑缺血介导的细胞损伤过程中发挥一定作用^[12-13], 但目前人们对于 Kv2.1 通道在细胞生命活动过程中具体功能依然不是十分清楚, 而蜘蛛毒素中存在的 Kv2.1 通道抑制剂为该研究提供了合适的药理学工具, 如著名的蜘蛛毒素 Hanatoxin1 就是一种常用的研究 Kv2.1 通道的工具试剂, 但是该毒素因为其复性产率太低很难通过合成的方法大量获得该毒素而限制了其应用^[14]。另外一个 Kv2.1 钾离子通道抑制毒素是 SGTx1, 该毒素可以化学合成, 通过丙氨酸扫描突变研究确定了其与 Kv2.1 通道发生作用的关键活性残基^[15]。目前 Hanatoxin1、SGTx1 和 JZTX-XI 的三维溶液结构都已经得到解析, 单从氨基酸序列上看这 3 个毒素第 3 位都是精氨酸残基, 而且已有研究显示 SGTx1 第 3 位的精氨酸残基是一个关键氨基酸残基。本文成功合成了野生型 JZTX-XI 和该毒素的突变体 R3A-JZTX-XI, 通过高效液相色谱与生物质谱分析显示合成产物能够较好的折叠复性并形成 3 对二硫键。电生理实验结果显示突变体 R3A-JZTX-XI 对瞬时表达于 HEK293T 细胞的钾通道 hKv2.1 电流的抑制活性比野生型毒素降低了约 12.4 倍, 说明 Arg3 是负责 JZTX-XI 与 hKv2.1 通道结合的关键活性残基, 进一步通过三维结构分析发现 Hanatoxin1、SGTx1 和 JZTX-XI 毒素第 3 位的精氨酸残在空间结构上具有保守性, 提示这 3 个毒素分子在 hKv2.1 通道上可能具有相同的结合位点。

Nav1.5 通道是一种河豚毒素不敏感型钠离子通道, 主要分布于心肌细胞上, 近年来也发现在神经母细胞瘤细胞和脑组织中高度表达。已有的研究结果表明一些心血管、肿瘤和癫痫等疾病的发生也与 Nav1.5 通道有关^[5]。敬钊缨毛蛛毒素-III (JZTX-III) 是已经报道过的心肌细胞钠通道抑制剂, 其半数

有效抑制浓度为 380 nmol/L^[16], 但是该毒素第 3 位是谷氨酸残基, JZTX-XI 与 JZTX-III 在 Nav1.5 通道上是否有相同的作用位点还有待进一步研究证明。

总之, 敬钊毒素-XI 是一种新型 Kv2.1 和 Nav1.5 交叉通道活性抑制剂, 开展其结构与功能关系研究可以为深入阐明该毒素与通道相互作用的分子机制提供实验依据, 并为将来通过蛋白质工程手段移除该毒素 Nav1.5 通道的相关活性, 使其改造成为研究胰脏钾通道 Kv2.1 的分子探针, 设计开发以 Kv2.1 通道为靶点相关的药物研究提供新的思路。

REFERENCES

- [1] MacDonald PE, Sewing S, Wang J, et al. Inhibition of Kv2.1 voltage-dependent K⁺ channels in pancreatic beta-cells enhances glucose-dependent insulin secretion. *J Biol Chem*, 2002, 277(47): 44938-44945.
- [2] Herrington J, Sanchez M, Wunderler D, et al. Biophysical and pharmacological properties of the voltage-gated potassium current of human pancreatic β -cells. *J Physiol*, 2005, 567(1): 159-175.
- [3] MacDonald PE, Ha XF, Wang J, et al. Members of the Kv1 and Kv2 voltage-dependent K⁺ channel families regulate insulin secretion. *Mol Endocrinol*, 2001, 15(8): 1423-1435.
- [4] Herrington J, Zhou YP, Bugianesi RM, et al. Blockers of the delayed-rectifier potassium current in pancreatic β -cells enhance glucose-dependent insulin secretion. *Diabetes*, 2006, 55(6): 1034-1042.
- [5] Wang J, Ou SW, Wang YJ, et al. Progress in voltage-gated sodium channel α -subunit Nav1.5. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2008, 24(4): 287-294.
王军, 欧绍武, 王运杰, 等. 电压-门控 Na⁺通道 α 亚单位 Nav1.5. *中国生物化学与分子生物学报*, 2008, 24(4): 287-294.
- [6] Zhu MS, Song DX, Li TH. A new species of the family Theraphosidae, with taxonomic study on the species *Selenocosmia hainana* (Arachnida: Araneae). *J Baoding Teach Coll*, 2001, 14(2): 1-6.
朱明生, 宋大祥, 李廷辉. 我国狒蛛科一新种及海南捕鸟蛛的分类研究 (蛛形纲: 蜘蛛目). *保定师专学报*,

- 2001, 14(2): 1–6.
- [7] Liao Z, Yuan CH, Deng MC, et al. Solution structure and functional characterization of Jingzhaotoxin-XI: a novel gating modifier of both potassium and sodium channels. *Biochemistry*, 2006, 45(51): 15591–15600.
- [8] Splawski I, Timothy KW, Tatemura M, et al. Variant of SCN5A sodium channel implicated in risk of cardiac arrhythmia. *Science*, 2002, 297(5585):1333–1336.
- [9] Kerschensteiner D, Monje F, Stocker M. Structural determinants of the regulation of the voltage-gated potassium channel Kv2.1 by the modulatory α -subunit Kv9.3. *J Biol Chem*, 2003, 278(20): 18154–18161.
- [10] Zeng XZ, Deng MC, Pi JH, et al. Effects of Arg20 mutation on sodium channels activity of JZTX-V. *Chin J Biotech*, 2008, 24(7): 1228–1232.
曾雄智, 邓梅春, 皮建辉, 等. Arg20 突变对敬钊缨毛蛛毒素-V 钠通道活性的影响. *生物工程学报*, 2008, 24(7): 1228–1232.
- [11] [11] Deng MC, Kuang F, Sun ZH, et al. Jingzhaotoxin-IX, a novel gating modifier of both sodium and potassium channels from Chinese tarantula *Chilobrachys jingzhao*. *Neuropharmacology*, 2009, 57(2): 77–87.
- [12] Yuan H, Wang WP, Ma SP, et al. Potential pharmacologic role of Kv2.1 potassium channel in ischemic neuron injury. *Chin Pharm J*, 2009, 44(6): 436–439.
袁辉, 王伟平, 马士平, 等. Kv2.1 钾通道在神经元缺氧损伤中的潜在药理学作用. *中国药理学杂志*, 2009, 44(6): 436–439.
- [13] Herrington J. Gating modifier peptides as probes of pancreatic β -cell physiology. *Toxicon*, 2007, 49(2): 231–238.
- [14] Takahashi H, Kim JI, Min HJ, et al. Solution structure of hanatoxin1, a gating modifier of voltage-dependent K^+ channels: common surface features of gating modifier toxins. *J Mol Biol*, 2000, 297(3): 771–780.
- [15] Lee CW, Kim S, Roh SH, et al. Solution structure and functional characterization of SGTx1, a modifier of Kv2.1 channel gating. *Biochemistry*, 2004, 43(3): 890–897.
- [16] Xiao YC, Tang JZ, Yang YJ, et al. Jingzhaotoxin-III, a novel spider toxin inhibiting activation of voltage-gated sodium channel in rat cardiac mvoevtes. *J Biol Chem*, 2004, 279(25): 26220–26226.



本 期 广 告 索 引

企 业	版 位	企 业	版 位
GE Healthcare 公司	封 底	生物谷网站	内 页
宝生物工程 (大连) 有限公司	封 二	镇江东方生物工程公司	内 页
北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司	内 页	安琪酵母股份有限公司	内 页