

## 钠离子通道疾病及其抑制剂生物学功能研究进展

王红艳, 勾萌, 肖蓉, 李庆伟

辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁 大连 116081

王红艳, 勾萌, 肖蓉, 等. 钠离子通道疾病及其抑制剂生物学功能研究进展. 生物工程学报, 2014, 30(6): 875-890.

Wang HY, Gou M, Xiao R, et al. Progress in the sodium channelopathies and the biological functions of voltage-gated sodium channel blockers. Chin J Biotech, 2014, 30(6): 875-890.

**摘要:** 电压门控型钠离子通道 (Voltage-gated sodium channel, VGSC) 广泛分布于兴奋性细胞, 是电信号扩大和传导的主要介质, 在神经细胞以及心肌细胞兴奋传导等方面发挥重要作用。钠离子通道结构和功能的异常会改变细胞的兴奋性, 从而导致多种疾病的发生, 如神经性疼痛、癫痫, 以及心律失常等。目前临床上多采用钠离子通道抑制剂治疗上述疾病。近些年, 研究人员陆续从动物的毒液中分离纯化出具有调控钠离子通道功能的神经毒素。这些神经毒素多为化合物或小分子多肽。现已有医药研发公司将这些天然的神经毒素进行定向设计改造成钠离子通道靶向药物用于临床疾病的治疗。此外, 来源于七鳃鳗 *Lampetra japonica* 口腔腺的富含半胱氨酸分泌蛋白 (Cysteine-rich buccal gland protein, CRBGP) 也首次被证明能够抑制海马神经元和背根神经元的钠离子电流。以下针对钠离子通道疾病及其抑制剂生物学功能的最新研究进展进行分析归纳。

**关键词:** 电压门控型钠离子通道, 钠离子通道疾病, 钠离子通道抑制剂, 神经毒素, 富含半胱氨酸分泌蛋白质, 七鳃鳗

**Received:** October 8, 2013; **Accepted:** December 5, 2013

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31301880), China Postdoctoral Science Foundation (No. 2013M541246), New Teacher of Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (No. 20112136120002), Scientific Research Fund of Liaoning Provincial Education Department (No. L2011187), Scientific and Technological Research Projects of Dalian (No. 2011J21DW014).

**Corresponding author:** Rong Xiao. Tel: +86-411-85827098; E-mail: xiaorong\_lnu@126.com

Qingwei Li. Tel/Fax: +86-411-85827799; E-mail: liqw@263.net

国家自然科学基金 (No. 31301880), 中国博士后科学基金第 54 批面上资助项目 (No. 2013M541246), 高等学校博士学科点专项科研基金新教师类资助课题 (No. 20112136120002), 辽宁省教育厅科学研究一般项目 (No. L2011187), 大连市科学技术基金 (No. 2011J21DW014) 资助。

网络出版时间: 2014-02-17

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.130507.html>

# Progress in sodium channelopathies and biological functions of voltage-gated sodium channel blockers

Hongyan Wang, Meng Gou, Rong Xiao, and Qingwei Li

College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116081, Liaoning, China

**Abstract:** Voltage-gated sodium channels (VGSCs), which are widely distributed in the excitable cells, are the primary mediators of electrical signal amplification and propagation. They play important roles in the excitative conduction of the neurons and cardiac muscle cells. The abnormalities of the structures and functions of VGSCs can change the excitability of the cells, resulting in a variety of diseases such as neuropathic pain, epilepsy and arrhythmia. At present, some voltage-gated sodium channel blockers are used for treating those diseases. In the recent years, several neurotoxins have been purified from the venom of the animals, which could inhibit the current of the voltage-gated sodium channels. Usually, these neurotoxins are compounds or small peptides that have been further designed and modified for targeted drugs of sodium channelopathies in the clinical treatment. In addition, a novel cysteine-rich secretory protein (CRBGP) has been isolated and purified from the buccal gland of the lampreys (*Lampetra japonica*), and it could inhibit the  $\text{Na}^+$  current of the hippocampus and dorsal root neurons for the first time. In the present study, the progress of the sodium channelopathies and the biological functions of voltage-gated sodium channel blockers are analyzed and summarized.

**Keywords:** voltage-gated sodium channel, sodium channelopathies, voltage-gated sodium channel blockers, neurotoxins, cysteine-rich secretory proteins, lampreys

细胞电活动是生命现象的基本特征之一，离子通道是其结构和功能的基础。多种神经系统和心血管疾病，如癫痫、脑溢血、神经痛、进行性心脏传导缺陷和原发性心室纤颤等都与钠离子通道氨基酸序列和结构的改变有关。Colombo 等报道持续的钠离子电流是这些疾病产生的主要原因。由于钠离子通道抑制剂能够阻断钠离子电流，因此临床上多利用其治疗因钠离子通道异常放电而引起的疾病<sup>[1]</sup>。本文即对钠离子通道的结构、相关疾病、抑制剂及其应用进行了归纳分析。

## 1 钠离子通道的结构和功能

钠离子通道基因家族包含 11 个成员 (Voltage-gated sodium channel  $\alpha$ -subunit genes *SCN1A-SCN11A*)，可编码 10 种不同的钠离子通道

(Nav1.1-Nav1.9和Nax)。钠离子通道是一种跨膜糖蛋白，主要由形成离子孔道的 $\alpha$ -亚基 ( $\alpha$ -subunit, 240-260 kDa) 和一个或几个辅助性 $\beta$ -亚基 ( $\beta$ -subunit, 33-36 kDa) 构成 (图1)<sup>[2]</sup>。 $\alpha$ -亚基含有 4 个同源重复结构域 (Domain I - Domain IV, DI-DIV)，且每个结构域都包含 6 个螺旋跨膜片段 (Segments 1-6, S1-S6)。这 6 个跨膜片段可根据功能的不同被分成两类：S1-S4 为电压传感器；S5 和 S6 可形成选择性运输钠离子的孔道。单独的  $\alpha$ -亚基本身就具有钠离子通道的功能。 $\beta$ -亚基 ( $\beta 1-\beta 4$ ) 为单次跨膜蛋白，可通过调节细胞表面钠离子通道的表达，从而改变钠离子通道的密度和细胞的兴奋性。此外， $\beta$ -亚基还能调节胞内  $\alpha$ -亚基的运输和细胞的粘附等。2011 年 Payandeh 等报道了布氏弓形菌 *Arcobacter butzleri* 的钠离子通道的晶体结构。他们根据得到的钠离子通道

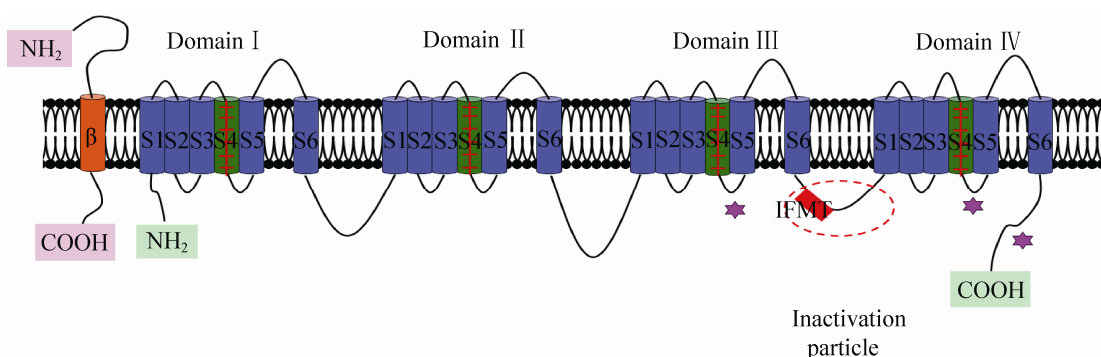


图1 电压门控型钠离子通道  $\alpha$ -和  $\beta$ -亚基示意图<sup>[2]</sup>

Fig. 1 Schematic representation of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of the VGSC<sup>[2]</sup>.

晶体结构推测钠离子通道的运作机制是：钠离子通道被激活时，细胞发生去极化，细胞膜两侧的电场发生改变，从而导致DI-DIII中带有正电荷的电压感受器S4迅速向外移动。然后，向外移动的S4与S4-S5间的连接器(Linker)(图2)<sup>[3]</sup>作为一个结构单位将S5-S6向外推。在这期间，S5-S6始终保持一个紧密的耦合结构，这就迫使S5-S6及其周围的亚基移动，最终导致孔道打开<sup>[4]</sup>。钠离子通道在开放后的数毫秒内就会发生失活，这主要是由于DIV电压感受器运动变慢最终导致钠离子通道的关闭。钠离子通道的电子密度图结果显示：当通道处于关闭状态时，S6叠加于孔道周围处于闭合状态的结构上。通常，钠离子通道会保持在一个失活的状态直至细胞膜电位再次发生去极化<sup>[2]</sup>。

钠离子通道的主要功能是调节神经元的兴奋性，其分布、密度、运输、激活阈值以及重新激活等固有属性能够在很大程度上影响神经元的电活动。此外，电生理实验结果表明钠离子通道在痛觉的产生及传递过程中发挥重要作用。近年来，Vastani等深入研究了钠离子通道

在慢性疼痛和神经疼痛等方面的作用，并指出在采用局部麻醉和神经电调节技术治疗疼痛时，电压门控型钠离子通道的构象是影响其疗效的一个重要因素<sup>[5]</sup>。因此，临床上现多利用钠离子通道抑制剂通过阻滞持续的钠离子电流从而抑制神经元的电兴奋性，最终达到镇痛的目的。

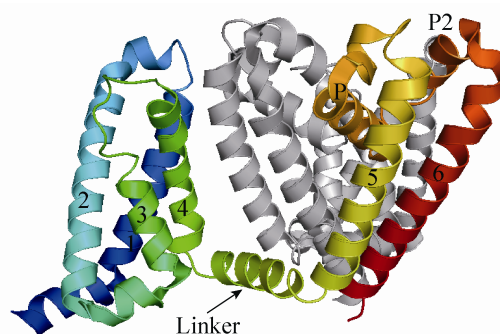


图2 布氏弓形菌 *Arcobacter butzleri* 电压门控钠离子通道的结构要素<sup>[3]</sup>

Fig. 2 Structural elements of VGSC of *Arcobacter butzleri*. One subunit is highlighted (1-6, transmembrane segments S1-S6)<sup>[3]</sup>.

## 2 钠离子通道疾病 (Sodium Channelopathies)

编码钠离子通道  $\alpha$ -和  $\beta$ -亚基的基因发生突变后, 钠离子通道的结构和生物物理属性会受到影响, 最终形成钠离子通道疾病。钠离子通道疾病可根据其涉及的器官被分为 4 种类型: 外周神经钠离子通道疾病 (Peripheral Nerve Sodium Channelopathies)、脑钠离子通道疾病 (Brain Sodium Channelopathies)、骨骼肌钠离子通道疾病 (Skeletal Muscle Sodium Channelopathies)、心脏钠离子通道疾病 (Cardiac Sodium Channelopathies)<sup>[2]</sup>。

### 2.1 外周神经钠离子通道疾病

外周神经钠离子通道疾病主要是外周神经疼痛综合症, 包括神经疼痛和炎性疼痛。典型的病例有糖尿病神经病变、幻肢痛、脊髓损伤疼痛等。其发病机制是神经受到损伤后, 钠离子通道的运输、基因表达, 以及动力学等方面会受到影响, 最终导致与神经性疼痛有关的神经膜重塑和神经元超兴奋性的发生。由于 Nav1.7 (基因是 *SCN9A*)、Nav1.8 (基因是 *SCN10A*) 和 Nav1.9 (基因是 *SCN11A*) 主要表达于外周神经元和背根神经元, 且对神经疼痛的发生起着非常重要的作用, 因此这些通道尤其 Nav1.7 被认为是外周神经疼痛综合症的止痛靶点。近年来, 陆续有研究报道编码 Nav1.7 的基因 *SCN9A* 与继承红斑性肢痛病、阵发性剧痛症和先天性无痛症的发病密切相关<sup>[6]</sup>。此外, Nav1.8 也被证实有关节疼痛和其他疼痛综合症中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。1999 年 Porreca 等通过体内注射 Nav1.8 的反义寡核苷酸从而减弱大鼠的神经疼痛。此外, 小鼠敲除 *SCN11* 基因后, 可

明显表现出对疼痛刺激不敏感。因此, 通过抑制 Nav1.7、Nav1.8 或 Nav1.9, 从而降低神经元超兴奋性的发生, 可最终抑制外周神经疼痛的产生。

### 2.2 脑钠离子通道疾病

脑钠离子通道疾病是编码钠离子通道的 *SCN1A* (Nav1.1)、*SCN2A* (Nav1.2)、*SCN3A* (Nav1.3) 或 *SCN8A* 基因 (Nav1.6) 发生突变所致。其中 *SCN1A* 在大多数的脑部神经元中表达, 且最易发生突变。2002 年 Lossin 等报道: *SCN1A* 基因的突变会诱发癫痫。这主要是由于突变后, 钠离子通道的失活受阻, 导致持续的钠离子内流和神经元膜发生持续的去极化, 从而使神经元的兴奋性增强, 最终引发癫痫<sup>[8]</sup>。近年来, Liao 等研究发现 *SCN2A* 突变后, 钠离子通道的门控等特性可发生显著性的变化, 如持续性钠离子电流的增强、失活钠离子通道的加速复苏, 以及电压依赖型钠离子通道稳态激活的改变等<sup>[9]</sup>。2008 年, Holland 等首次证实癫痫病人的 *SCN3A* 发生突变。尽管电生理实验结果表明 *SCN3A* 的突变可引起钠离子电流的增强, 但是其具体的致病机理仍在讨论中。2006 年 Levin 等敲除大鼠浦肯野神经元和颗粒细胞中的 *SCN8A* 后, 大鼠表现为共济失调。人类 *SCN8A* 发生移码突变后, 可引起钠离子通道 DIV 结构域缩短, 导致钠离子通道失去功能, 最终表现为共济失调<sup>[10]</sup>。

### 2.3 骨骼肌钠离子通道疾病

Nav1.4 能通过产生和传播动作电位而引起肌肉收缩, 其编码基因 *SCN4A* 发生突变后可导致骨骼肌钠离子通道疾病。目前已发现高钾型周期性麻痹、低钾型周期性麻痹、先天强直肌性肌痉挛、钾加重肌强直和先天性肌无力综合症, 这 5 种遗传性骨骼肌钠离子通道疾病均与

Nav1.4 的突变有关。几乎所有 *SCN4A* 的突变都与 3 个碱基对的异常缺失相关<sup>[11]</sup>。1993 年 Lerche 通过电生理实验检测肌强直病人的肌肉样本发现：*SCN4A* 突变后，其编码的钠离子通道在开放后可快速失活，并在通道开放后期向内增加了稳定的电流、从而导致肌肉持续的去极化和肌肉纤维兴奋过度，最终形成肌强直、肌无力综合症以及瘫痪等疾病<sup>[12]</sup>。

## 2.4 心脏钠离子通道疾病

心脏钠离子通道疾病主要是由 *SCN5A* (Nav1.5) 和 *SCN10A* (Nav1.8) 基因发生突变所致。*SCN5A* 突变后会改变心脏亚型钠离子通道 Nav1.5  $\alpha$ -亚基的功能，能够通过破坏钠离子通道的快速失活，从而导致心律失常。与 *SCN5A* 突变相关的疾病主要有进行性心脏传导疾病、窦房结功能障碍、心房停滞以及扩张性心肌病等，且这些疾病具有心源性猝死的风险<sup>[2]</sup>。近年来，Facer 等研究发现 *SCN10A* 能够在心室中调节心律，其突变后会遗传性变异并导致心律失常。与 *SCN10A* 突变相关的疾病主要有心肌梗死、心室纤维性颤动等<sup>[13]</sup>。

## 3 钠离子通道抑制剂

近年来，大量文献报道自然界中的某些天然小分子化合物类神经毒素和多肽类神经毒素等能够通过抑制钠离子电流从而阻滞神经传导。因此，越来越多的医药研发公司将这些天然的钠离子通道抑制剂研制成靶向钠离子通道药物用于临床疾病的治疗。

### 3.1 化合物类神经毒素及其化学合成药物

河豚毒素 (Tetrodotoxin, TTX) 和石房蛤毒素 (Saxitoxin, STX) 是两个研究较为深入的化合物类神经毒素，分子式分别为  $C_{11}H_{17}N_3O_8$  和

$C_{10}H_{17}N_7O_4$ ，化学结构如图 3 所示。TTX 和 STX 的毒性都很强，人误食后首先是感觉神经麻痹，继而是运动神经麻痹，最终导致肢体无力甚至不能运动。这主要是由于二者都是钠离子通道抑制剂，能够与钠离子通道上神经毒素结合位点 1 (位于 DI-DIV 中 S5 和 S6 之间形成的环上<sup>[14]</sup>) 发生特异结合，从而抑制神经传导，最终导致肢体麻痹。因此，TTX 和 STX 常作为潜在的镇痛药物和局部麻醉剂而被广泛研究。

临床研究结果表明 TTX 的镇痛效果是吗啡的 3 200 倍；局部麻醉作用是盐酸普鲁卡因的 4 000 倍。在加拿大，利用 TTX (配方名为 Tecti) 对慢性癌症患者进行镇痛治疗的研究已经进入三期临床试验阶段，其中皮下注射 TTX 的浓度为 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。早在 1975 年 Southcott 就已经证明了 STX 能长时间的抑制神经传导<sup>[15]</sup>，其局部麻醉作用是普鲁卡因的 10 万倍<sup>[16]</sup>。不过，TTX 和 STX 的毒性都较大，超过一定剂量会产生毒副作用。2011 年，Berde 等将 Tectin 与市售丁哌卡因 (浓度为 0.25%) 和肾上腺素 (浓度为 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 联合使用后，局部麻醉的持续时间可延长。因此，单次注射药物就能长期缓解疼痛，最终减少患者术后对上瘾性药物如阿片类药物的需求<sup>[17]</sup>。2013 年 Sahadev 等也将 STX 和糖皮质激素地塞米松一同包裹到脂质体中，经皮下注射到因坐骨神经损伤而导致机械性疼痛的大鼠体内。试验结果显示单次注射脂质体后，大鼠的热痛觉阻滞时间持续了(6.9 $\pm$ 1.2) d；若在大鼠损伤后的第 0、5 和 12 天时分别注射脂质体，其阻滞时间可持续到(18.1 $\pm$ 3.4) d<sup>[18]</sup>。因此，将 TTX 或 STX 与其他麻醉性镇痛药物 (吗啡、可卡因、丁哌卡因、地塞米松等) 联合应用后，不仅镇痛持续时间延长，还能因降低剂量而降低毒副作用。

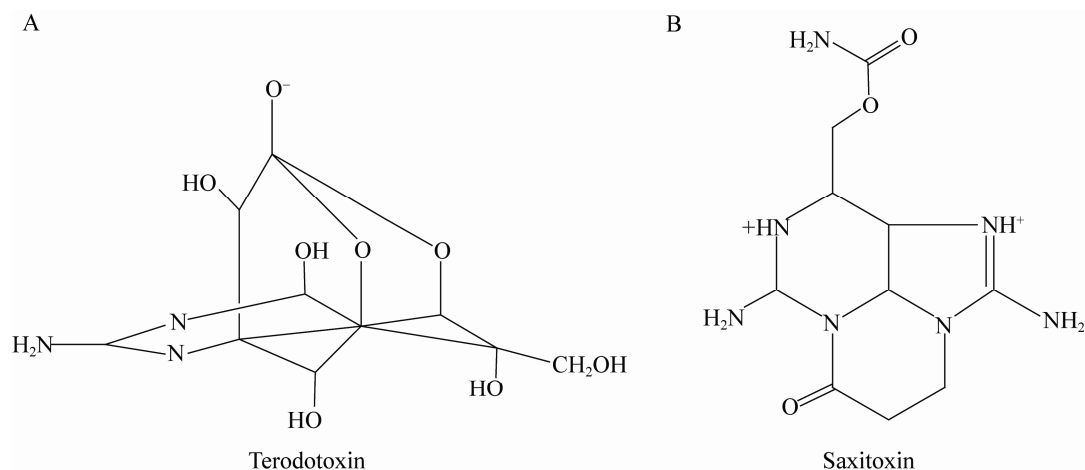


图3 河豚毒素 (A) 和石房蛤毒素 (B) 的化学结构  
Fig. 3 Chemical structures of tetrodotoxin (A) and saxitoxin (B).

市场上流通的某些局部麻醉剂和镇痛药物是含有与河豚毒素和石房蛤毒素类似的芳香基团的胺类化合物。目前最普遍使用的有利多卡因 ( $C_{14}H_{22}N_2O$ ) 等, 其化学结构如图 4A 所示。它能够在浓度很低的情况下抑制或减轻疼痛, 对神经疼痛的治疗有很好的效果。利多卡因能与钠离子通道的局部麻醉剂结合位点 (位于 DIV S6 上的 Phe<sup>1764</sup> 和 Tyr<sup>1771</sup>) 发生结合, 通过抑制 DIII 和 DIV 结构域中 S4 的运动从而阻止门控电荷的流入。电生理实验结果表明, 当钠离子通道与利多卡因结合时, 其门控电荷减少了 38% 左右<sup>[19]</sup>。此外, 利多卡因还广泛应用于治疗其他钠离子通道疾病, 如疼痛和癫痫等。

阳离子利多卡因衍生物 QX-314 ( $C_{16}H_{27}N_2O$ ) 是钠离子通道抑制剂, 其化学结构如图 4B 所示。在细胞外时, QX-314 的钠离子通道调控活性较弱; 而在细胞内时, 其活性较强。2007 年 Binshtok 等研究发现, 联合应用 QX-314/辣椒素后表达有 Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) 的外周神经元上

的 TRPV1 通道被打开, 从而导致 QX-314 进入到外周神经元胞体内持久的抑制钠离子电流<sup>[20]</sup>。2012 年 Shen 等研究发现: 大鼠经慢性压迫性神经损伤后可诱发神经疼痛。经 QX-314/辣椒素注射后, 其神经性疼痛和痛觉过敏的症状能被有效的缓解<sup>[21]</sup>。最新临床研究结果表明联合使用辣椒素和 QX-314 这 2 种药物可较显著地抑制患者的疼痛反应。

A-803467 ( $C_{19}H_{16}ClNO_4$ ) 是 Nav1.8 的选择性抑制剂, 化学结构如图 4C 所示, 其在缓解机械疼痛、炎性热痛和神经性痛等方面具有明显的功效。2008 年, McGaraughty 等通过测痛仪检测了 A-803467 对产生慢性疼痛大鼠的疼痛行为的影响。实验结果显示, 大鼠的机械触刺激诱发痛症状明显减少, 这就强有力地证明了 A-803467 作为钠离子通道抑制剂具有镇痛的功能<sup>[22]</sup>。随后, Abbott 实验室对 A-803467 进行了改造。改造后的 A-803467 对神经痛动物模型具有镇痛作用, 且比临床上常用的钠离子通道抑制剂药物美西律和拉莫三嗪更安全有效<sup>[23]</sup>。

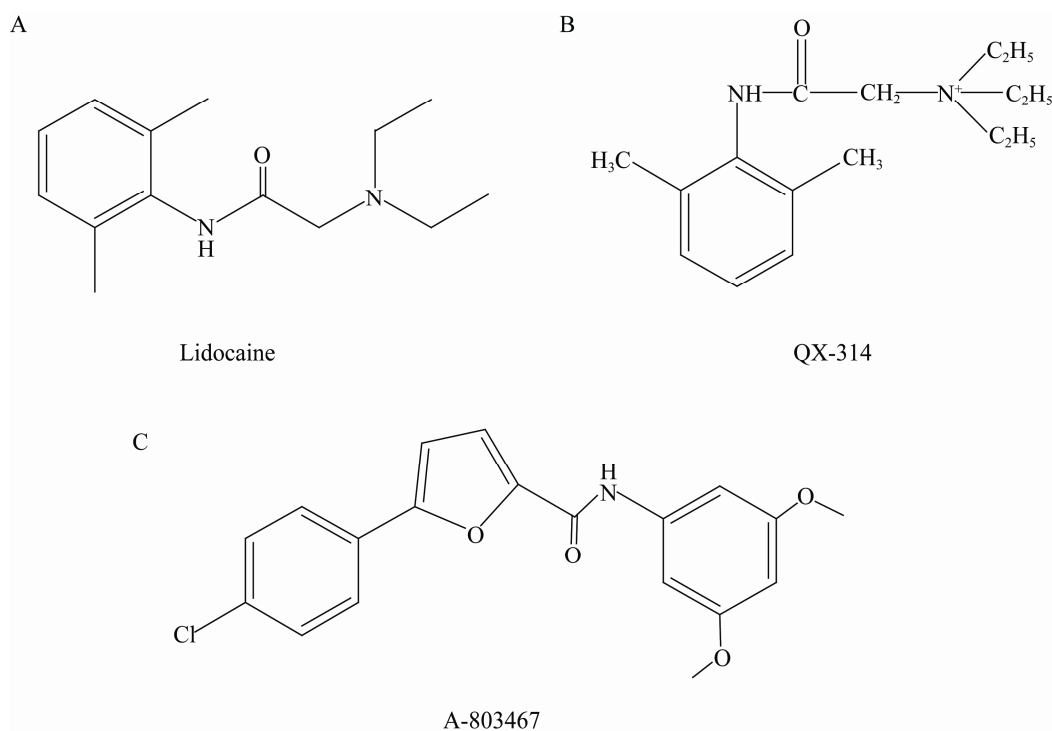


图4 化学合成药物利多卡因 (A) QX-314 (B) 和 A-803467 (C) 的化学结构  
Fig. 4 Chemical structures of Lidocaine (A), QX-314 (B) and A-803467 (C).

### 3.2 多肽类神经毒素及其药物制剂

多肽类神经毒素是由某些动物分泌的对神经组织具有毒性的内毒素,能够麻痹“食物”或天敌以达到捕食或防御的目的。通常这类毒素能够与离子通道相应的位点结合,通过阻塞通道孔隙或改变门控从而抑制细胞的活动。这些多肽类神经毒素有其典型的特征:都是分子量相对较小的多肽、一级结构中都含有非常保守的半胱氨酸残基,且形成了对多肽空间结构非常重要的二硫键<sup>[24]</sup>。目前研究较为深入的多肽类神经毒素主要有芋螺毒素 (Conotoxins) 和蜘蛛毒素等。

#### 3.2.1 芋螺毒素

芋螺捕食时会释放毒液到被捕食者体内使

其麻痹不能运动。芋螺毒素就是毒液中的一些富含二硫键的小环肽<sup>[25]</sup>,其作用靶点为离子通道。迄今为止,已有4种芋螺毒素超家族成员( $\mu$ -、 $\mu$ O-、 $\delta$ -、和  $\epsilon$ -conotoxins)被确定是以钠离子通道为靶点,其中 $\mu$ -Conotoxins和 $\mu$ O-conotoxins为钠离子通道抑制剂。芋螺毒素具有非常广泛的药理学功效,在治疗镇痛和癫痫等方面具有潜在的应用前景。

$\mu$ -Conotoxins家族成员由16-26个氨基酸残基组成,含有6个半胱氨酸。到目前为止,已有文献报道多种 $\mu$ -Conotoxins具有钠离子通道抑制剂活性,能够抑制与疼痛有关的钠离子通道亚型Nav.1.3、Nav.1.7和Nav.1.8(表1)。1998年,Shon等在 $\mu$ -Conotoxins家族中首次发现了

表 1  $\mu$ -芋螺毒素钠离子通道抑制剂Table 1 Sodium channel blockers of  $\mu$ -conotoxins

$\mu$ -conotoxins	Residue number	VGSC subtypes ( $IC_{50}$ )	Amino acid sequence of $\mu$ -conotoxins
PIIIA	22	Nav.1.3 (3.2 $\mu$ mol/L)	ZRL <u>C</u> C <u>G</u> FOK <u>S</u> C <u>R</u> SRQ <u>C</u> KOHR <u>C</u> C
		Nav.1.7 (3.1–6.2 $\mu$ mol/L)	
TIIIA	22	Nav.1.3 (50.0 nmol/L)	RHG <u>C</u> C <u>K</u> GPK <u>G</u> C <u>S</u> SRE <u>C</u> RPQH <u>C</u> C
		Nav.1.7 (Insensitive to 3.0 $\mu$ mol/L)	
GIIIA	22	Nav.1.8 (Insensitive to 3.0 $\mu$ mol/L)	
		N.D.	RD <u>C</u> C <u>T</u> OOK <u>K</u> C <u>K</u> DRQ <u>C</u> KOQR <u>C</u> CA
KIIIA	16	Nav.1.3 (8.0 $\mu$ mol/L)	<u>C</u> C <u>N</u> C <u>S</u> SK <u>W</u> C <u>R</u> DHSR <u>C</u> C <u>X</u>
		Nav.1.7 (100.0–290.0 nmol/L)	
SIIIA	20	Nav.1.3 (11.0 $\mu$ mol/L)	ZN <u>C</u> C <u>N</u> GG <u>C</u> SSK <u>W</u> C <u>R</u> DHAR <u>C</u> C
		Nav.1.7 (65.0 $\mu$ mol/L)	
SmIIIA	22	Nav.1.8 (insensitive to 10.0 $\mu$ mol/L)	
		Nav.1.3 (40.0 nmol/L)	ZR <u>C</u> C <u>N</u> GRR <u>G</u> C <u>S</u> SRW <u>C</u> RDHSR <u>C</u> C
CIIIA	22	Nav.1.7 (1.3 $\mu$ mol/L)	
		N.D.	GR <u>C</u> C <u>E</u> GPNG <u>C</u> SSRW <u>C</u> KDHAR <u>C</u> C
MIIIA	22	Nav.1.3 (7.7 nmol/L)	QG <u>C</u> C <u>N</u> VPNG <u>C</u> SGRW <u>C</u> RDHAQ <u>C</u> C
		Nav.1.7 (97.0 $\mu$ mol/L)	
CnIIIA	22	Nav.1.3 (11.0 $\mu$ mol/L)	GR <u>C</u> C <u>D</u> VPNAC <u>S</u> GRW <u>C</u> RDHAQ <u>C</u> C
		Nav.1.7 (N.D.)	
CnIIIB	25	Nav.1.8 (N.D.)	
		Nav.1.3 (N.D.)	QG <u>C</u> C <u>G</u> EPNL <u>C</u> FTRW <u>C</u> RNNAR <u>C</u> CROQ
SIIIB	20	Nav.1.7 (N.D.)	
		Nav.1.8 (N.D.)	QN <u>C</u> C <u>N</u> GG <u>C</u> SSK <u>W</u> C <u>K</u> GHR <u>C</u> C
GIIIB	22	Nav.1.3 (N.D.)	
		Nav.1.7 (N.D.)	RD <u>C</u> C <u>T</u> OOR <u>K</u> C <u>K</u> DRR <u>C</u> KOMK <u>C</u> CA
GIIC	22	Nav.1.8 (N.D.)	
		N.D.	RD <u>C</u> C <u>T</u> OOK <u>K</u> C <u>K</u> DRR <u>C</u> KOLK <u>C</u> CA
CnIIIC	22	Nav.1.3 (N.D.)	
		Nav.1.7 (489.0 nmol/L)	QG <u>C</u> C <u>N</u> GPK <u>G</u> C <u>S</u> SK <u>W</u> C <u>R</u> DHAR <u>C</u> C
		Nav.1.8 (Insensitive to 1.0 $\mu$ mol/L)	

N.D.: not determined. The cysteins that form disulfide bridges are bold and marked with different underlines.

具有钠离子通道抑制剂属性的 PIIIA (来源于紫金芋螺, *Conus purpurascens*)。电生理实验结果表明它能够抑制北美豹蛙 *Rana pipiens* 表皮肌肉细胞和 Wistar 大鼠 *Wistar rats* 外周神经元中的钠离子电流<sup>[26-27]</sup>。2007 年 Lewis 等研究发现 TIIIA (来源于郁金香芋螺, *Conus tulipa*) 和 GIIA (来源于地纹芋螺, *Conus geographus*) 对大鼠背根

神经元中的河豚毒素敏感型 (TTX-S) 和不敏感型 (TTX-R) 钠离子通道均具有阻断作用<sup>[28]</sup>。2011 年 Wilson 等指出 KIIIA (来源于木下芋螺, *Conus kinoshitai*)、SIIIA (来源于细线芋螺, *Conus striatus*)、SmIIIA (来源于飞蝇芋螺, *Conus stercusmuscarum*)、CIIIA (来源于猫芋螺, *Conus cactus*)、MIIIA (来源于僧袍芋螺, *Conus magus*)



和 CnIIIA/B (来源于耸肩芋螺, *Conus consors*) 均能够有效抑制北美豹蛙背根神经元中 TTX-R 型钠离子通道中的电流。其中,小鼠炎性疼痛试验结果显示 KIIIA 和 SIIIA 具有镇痛功能,且 SIIIA 已进入临床前研究阶段,商业名称为 PEG-SIIIA<sup>[29]</sup>。序列分析结果显示 KIIIA 的 N-末端序列比其他多肽少了 1-4 个氨基酸残基(表 1),这意味着  $\mu$ -Conotoxins 家族成员 C-末端的结构对其与钠离子通道的结合较为重要。现已有越来越多的研究团队关注于去除 N-末端残基后的  $\mu$ -Conotoxins 的药效。此外,2012 年 Schroeder 等在 SIIIA 和 SIIIB 的 N-末端添加了一些氨基酸残基。电生理实验结果表明:改造前的 SIIIA 和 SIIIB 对 Nav1.4 (骨骼肌钠离子通道亚型)的抑制作用优先于 Nav1.2 (神经元钠离子通道亚型);改造后是对 Nav1.2 的抑制作用优先于 Nav1.4。因此,芋螺毒素的 C-末端是其与钠离子通道结合的部位,而 N-末端则能选择其作用钠离子通道的类型<sup>[30]</sup>。

$\mu$ O-conotoxins 家族成员由 28-32 个氨基酸残基组成,含有 6 个半胱氨酸。到目前为止,已有 5 种  $\mu$ O-conotoxins (MrVIA、MrVIB、MfVIA、LtVIA 和 LtVIC) 被确定是钠离子通道抑制剂(表 2)。来源于大理石芋螺 *Conus marmoreus* 的 MrVIA 和 MrVIB 有很高的同源性,它们对 TTX-R 型钠离子通道 (Nav1.8) 的抑制作用高于 TTX-S 型。因此,MrVIA 和 MrVIB 在很多动物疼痛模型中表现出了良好的镇痛活性。对于触诱发痛和痛觉过敏,鞘内注射 MrVIB 的镇痛效果是利多卡因的 30 倍,且副作用很小<sup>[31]</sup>。MrVIB 现已进入临床前研究阶段,其商业名称为 CGX-1002。来源于美华芋螺 *Conus magnificus* 的 MfVIA 与 MrVIB 的序列同源性最高,其对大鼠背根神经元中的 TTX-R 型和 TTX-S 型钠离子通道都具有阻断作用,其中优先抑制 Nav1.8 和 Nav1.4<sup>[32]</sup>。2007-2008 年,Wang 等分别对 LtVIA 和 LtVIC (来源于字码芋螺, *Conus litteratus*) 做了全细胞膜片钳实验,结果表明它们都能够抑制大鼠背根神经元中钠离子电流<sup>[33-34]</sup>。

表 2  $\mu$ O-芋螺毒素钠离子通道抑制剂

Table 2 Sodium channel blockers of  $\mu$ O-conotoxins

$\mu$ O-conotoxins	Residue number	VGSC subtypes (IC <sub>50</sub> )	Amino acid sequence of $\mu$ O-conotoxins
MrVIA	31	Nav.1.7 (2 317-5 491 nmol/L) Nav.1.8 (529 nmol/L)	A <b>C</b> RKKWEY <b>C</b> IVPIIGFIY <b>CC</b> PGLI <b>C</b> GPFV <b>C</b> V
MrVIB	31	Nav.1.3 (1 $\mu$ mol/L) Nav.1.7 (345 nmol/L) Nav.1.8 (1-326 nmol/L)	A <b>C</b> SKKWEY <b>C</b> IVPILGFVY <b>CC</b> PGLI <b>C</b> GPFV <b>C</b> V
MfVIA	32	Nav.1.3 (2 175 nmol/L) Nav.1.7 (2 317-5 491 nmol/L) Nav.1.8 (529 nmol/L)	R <b>D</b> CQEKWEY <b>C</b> IVPILGFVY <b>CC</b> PGLI <b>C</b> GPFV <b>C</b> V
LtVIIA	29	N.D.	GE <b>C</b> LGWSNY <b>C</b> TSHS <b>I</b> CCSGE <b>C</b> ILSY <b>C</b> DIW
LtVIC	28	N.D.	WP <b>C</b> KVAGSP <b>C</b> GLVSE <b>CC</b> GT <b>C</b> NVLRN <b>R</b> C <b>V</b>

N.D.: not determined. The cysteins that form disulfide bridges are bold and marked with different underlines.

### 3.2.2 蜘蛛毒素

蜘蛛在捕食或御敌时其毒腺能够通过分泌蜘蛛毒素从而将猎物或天敌麻痹甚至杀死。这主要是由于蜘蛛毒素中含有多种分子量较小、且富含二硫键的多肽类神经毒素，其可影响神经元中离子通道的正常活动，包括钠离子通道、钾离子通道和钙离子通道等。这些神经毒素在医学研究中占据很重要的地位，其中部分毒素已于临床上用于缓解疼痛或治疗心律失常等疾病。

据文献统计，有近总数 1/3 的蜘蛛毒素其作用靶点是钠离子通道。根据一级结构和二硫键结构的差异，这些蜘蛛毒素可被划分为 12 个不同的家族：NaSpTx family 1–NaSpTx family 12 (Spider toxins that target Na<sup>+</sup> channel family)<sup>[35]</sup>，其中 NaSpTx family 1–3、NaSpTx family 5 和 NaSpTx family 7–9 家族中有些成员具有钠离子通道抑制剂的属性(表 3)。各个 NaSpTx family 家族成员都含有 1 个由二硫键构成的抑制剂半胱氨酸结模体 (Inhibitor cystine knot, ICK)。它能够保证蜘蛛毒素在成人血清中处于稳定状态，并持续数日。已有研究报道该抑制剂半胱氨酸结模体在胃液中的半衰期可长达 12 个多小时。到目前为止，已有多种药物以其为核心进行定向设计改造，如止痛药齐考诺肽 (Prialt<sup>TM</sup>) 等。此外，部分具有钠离子通道调控功能的蜘蛛毒素也因其能够有效缓解疼痛而受到广泛的关注。

NaSpTx family 1 家族成员通常来自于捕鸟蛛科 Theraphosidae 蜘蛛的毒液，由 33–35 个氨基酸组成。其中，来自虎纹捕鸟蛛 *Ornithoctonus huwena* 毒液的  $\mu/\omega$ -TRTX-Hh1a (Huwentoxin-1) 能够抑制大鼠海马神经元和美洲大蠊 *Periplaneta americana* 背侧不成对中间神经元中的钠离子电流<sup>[36]</sup>；且  $\mu/\omega$ -TRTX-Hh1a 经鞘内注射后对由福尔马林诱发的

大鼠疼痛模型起到了镇痛的作用<sup>[37]</sup>。2006 年 Bosmans 等从塔兰图拉毒蛛 *Phrixotrichus auratus* 的毒液中分离纯化出 1 种多肽类神经毒素  $\beta$ -TRTX-Ps1a (Phrixotoxin-3)。电生理实验结果显示  $\beta$ -TRTX-Ps1a 对非洲爪蟾 *Xenopus laevis* 卵母细胞上多种类型的钠离子通道均有抑制作用，如 Nav1.1、Nav1.2、Nav1.4 和 Nav1.5 通道<sup>[38]</sup>。此外，来自于虎纹捕鸟蛛 *Ornithoctonus huwena* 的  $\mu$ -TRTX-Hh2a (Huwentoxin-4) 和来自于海南捕鸟蛛 *Ornithoctonus hainana* 的  $\mu$ -TRTX-Hhn1b (Hainantoxin-IV) 均能够抑制大鼠背根神经元中的 TTX-S 型钠离子电流。其中， $\mu$ -TRTX-Hh2a 是通过与钠离子通道的神经毒素结合位点 4 (位于 DII 中 S1–S2 之间和 S3–S4 之间形成的胞外连接环上<sup>[14]</sup>) 发生结合从而阻断 TTX-S 型钠离子通道<sup>[39]</sup>；而  $\mu$ -TRTX-Hhn1b 则是通过作用于结合位点 1 发挥作用<sup>[40]</sup>。根据现有结果我们不难看出 NaSpTx family 1 的这 4 个成员大多能选择性地抑制 TTX-S 型钠离子通道，对其功能的深入研究不仅可为今后筛选具有较高药效的镇痛药物奠定基础，还为深入研究钠离子通道的结构与功能提供必要的理论支持。

NaSpTx family 2 家族成员主要来自于捕鸟蛛科 Theraphosidae 蜘蛛的毒液，由 33–41 个氨基酸组成。其中，来自金属红尾蛛 *Thrixopelma pruriens* 毒液的  $\beta/\omega$ -TRTX-Tp1a (Protoxin I) 能够抑制人胚肾细胞 (HEK293) 中的 Nav1.7 电流。到目前为止，Middleton 和 Priest 等认为  $\beta/\omega$ -TRTX-Tp1a 是 Nav1.7 通道最为有效的抑制剂之一，极具成药前景。2006 年，Bosmans 等从塔兰图拉毒蛛 *Phrixotrichus auratus* 的毒液中分离纯化出另 1 种多肽类神经毒素  $\beta$ -TRTX-Cm2a (Ceratotoxin-3)。电生理实验结果

表明其能够阻断非洲爪蟾卵母细胞上的 Nav1.5 和 Nav1.8 通道。不过,  $\beta$ -TRTX-Cm2a 对 Nav1.8 的抑制作用较弱。2  $\mu\text{mol/L}$  的  $\beta$ -TRTX-Cm2a 才能够减少 Nav1.8 通道中 45% 的电流。此外, 来自敬钊缨毛蛛 *Chilobrachys jingzhao* 毒液的  $\mu$ -TRTX-Cj1a (Jingzhaotoxin-34) 能够阻断大鼠背根神经元中的 TTX-S 型钠离子通道。到目前为止, NaSpTx family 2 家族所报道的这 3 个成员都能够抑制传播疼痛信号的钠离子通道亚型 (Nav1.7 或 Nav1.8)。不过, 这些具有潜在镇痛功能的蜘蛛毒素能否进一步应用于临床还有待于后续的动物学实验及临床前研究。

NaSpTx family 3 家族成员通常来自于不同属的狼蛛 *Tarantula* 毒液, 由 29–32 个氨基酸组成。来自金属红尾 *Thrixopelma pruriens* 毒液的  $\beta/\omega$ -TRTX-Tp2a (Protoxin II) 和智利红玫瑰毛蜘蛛 *Grammostola rosea* 毒液的  $\beta$ -TRTX-Gr1b (GsAF I) 都对 Nav1.7 通道具有抑制作用。其中,  $\beta/\omega$ -TRTX-Tp2a 抑制人胚肾细胞钠离子电流的  $\text{IC}_{50}$  仅为 0.3 nmol/L。这也是迄今为止所发现的最为有效的 Nav1.7 通道抑制剂之一<sup>[41]</sup>, 具有非常广阔的开发应用前景。目前, NaSpTx family 3 家族的这 2 个成员均是选择性地作用于 Nav1.7 通道, 这也为今后研制成 Nav1.7 通道的特异性镇痛药物 (Nav1.7-selective analgesics) 奠定了坚实的理论基础。

NaSpTx family 5 家族到目前为止只有 2 个成员, 均来自于粒突蛛属 *Hexathelid* 蜘蛛的毒液, 分别由 28 和 29 个氨基酸组成。2007 年, Corzo 等发现, 来自于巨型上户蛛 *Macrothele gigas* 毒液的  $\beta$ -HXTX-Mg1a (Magi-5) 能够通过作用于非洲爪蟾卵母细胞上 Nav1.2 通道的神经毒素结合位点 4 而使 Nav1.2 中的电流发生减少 (<15%)<sup>[42]</sup>。

不过目前我们对于该家族的了解还是很少, 亟待于进一步的研究证明。

NaSpTx family 7 家族成员主要是从捕鸟蛛科 Theraphosid 蜘蛛的毒液中分离纯化出来的, 由 33–36 个氨基酸构成。Xiao 和 Rong 等发现来自于敬钊缨毛蛛 *Chilobrachys jing-zhao* 毒液中的  $\alpha$ -TRTX-Cj1a (Jingzhaotoxin-1) 和  $\beta/k$ -TRTX-Cj1a (Jingzhaotoxin-3) 均能够作用于 Nav1.5 通道。其中, Xiao 等认为  $\alpha$ -TRTX-Cj1a 是通过与钠离子通道的神经毒素结合位点 3 (位于 DIV 中 S3 和 S4 之间形成的胞外连接环上<sup>[14]</sup>) 发生结合从而抑制大鼠背根神经元中 Nav1.5 的电流<sup>[43]</sup>; 而  $\beta/k$ -TRTX-Cj1a 则是通过作用于结合位点 4 从而抑制人胚肾细胞中 Nav1.5 的电流<sup>[44]</sup>。不过, 现已报道的 NaSpTx family 7 家族成员大多作为钾离子通道的抑制剂而被广泛研究, 只有上述 2 个成员被发现具有钠离子通道调控功能。

目前, Rodríguez de la Vega 等在 NaSpTx family 8 家族中发现 3 个成员:  $\mu$ -CNTX-Pn1a (PhTx1)、 $U_5$ -CNTX-Pk1a (PKTx1A) 和  $U_5$ -CNTX-Pk1b (PKTx1B), 分别由 79、78 和 78 个氨基酸组成, 均来自于栉足蛛科 Ctenid 蜘蛛的毒液。通常, NaSpTx family 家族成员只含有 3 对二硫键, 而 NaSpTx family 8 家族成员却包含 7 对二硫键 (表 3)。2006 年, Martin-Moutot 等人从香蕉塔兰图拉毒蛛 *Phoneutria nigriventer* 的毒液中分离纯化出  $\mu$ -CNTX-Pn1a (PhTx1), 并发现其能够通过与钠离子通道上的神经毒素结合位点 1 结合从而抑制中国仓鼠卵巢细胞 *Chinese hamster ovary cells* 中 Nav1.2 的电流<sup>[45]</sup>。此外, 序列分析结果显示 NaSpTx family 8 家族的这 3 个成员氨基酸序列高度一致, 因此推测其可能具有相同的药理学性质。

NaSpTx family 9 家族目前只有 2 个成员被

报道,均来自于毛蟹蛛属 *Heriades melloteei* 蜘蛛的毒液。它们分别是  $\mu$ -TMTX-Hme1a (Hm-1) 和  $\mu$ -TMTX-Hme1b (Hm-2), 由 37 和 40 个氨基酸组成。 $\mu$ -TMTX-Hme1a 和  $\mu$ -TMTX-Hme1b 都能够抑制非洲爪蟾卵母细胞的 Nav1.2、Nav1.4、Nav1.5 和 Nav1.6 通道, 其中  $\mu$ -TMTX-Hme1b 对 Nav1.5 通道的抑制作用及其微弱<sup>[46]</sup>。

据保守估计蜘蛛毒液中至少含有 1 000 多万种具有生物活性的多肽。但是, 目前文献报道的具有离子通道调控功能的多肽也仅为 0.01% 左右, 还有很多组分尚未被分离及鉴定。因此, 蜘蛛毒液中还有很多新的蜘蛛毒素亟待被发现、定性和研究, 这将为今后镇痛、局麻药物的开发利用起到极大的推进作用。

表3 蜘蛛毒素钠离子通道抑制剂

Table 3 Sodium channel blockers of spider toxins

Spider toxins	NaSpTx family	Residue number	VGSC subtypes (IC <sub>50</sub> , nmol/L)	Amino acid sequence of spider toxins
$\mu/\omega$ -TRTX-Hh1a	1	33	TTX-S (66.1±5.2)	<b>A</b> <u>C</u> <b>K</b> G <b>V</b> F <b>D</b> A <b>C</b> T <b>P</b> G <b>K</b> N <b>E</b> <u>C</u> <b>C</b> <b>P</b> N <b>R</b> V <b>C</b> S <b>D</b> K <b>H</b> K <b>W</b> <u>C</u> <b>K</b> W <b>K</b> L
$\beta$ -TRTX-Ps1a	1	34	Nav.1.1 (610±63.0) Nav.1.2 (0.6±0.1) Nav.1.4 (288±58.0) Nav.1.5 (72.0)	<b>D</b> <u>C</u> L <b>G</b> F <b>L</b> W <b>K</b> <b>C</b> N <b>P</b> S <b>N</b> D <b>K</b> <u>C</u> <b>C</b> R <b>P</b> N <b>L</b> V <b>C</b> S <b>R</b> K <b>D</b> K <b>W</b> <u>C</u> <b>K</b> Y <b>Q</b> I
$\mu$ -TRTX-Hh2a	1	33	TTX-S (30.0)	<b>G</b> <b>C</b> <b>K</b> G <b>F</b> G <b>D</b> S <b>C</b> T <b>P</b> G <b>K</b> N <b>E</b> <u>C</u> <b>C</b> <b>P</b> N <b>Y</b> A <b>C</b> S <b>S</b> K <b>H</b> K <b>W</b> <u>C</u> <b>K</b> V <b>Y</b> L
$\mu$ -TRTX-Hhn1b	1	33	TTX-S (34.0)	<b>A</b> <b>C</b> <b>K</b> G <b>V</b> F <b>G</b> A <b>C</b> T <b>P</b> G <b>K</b> N <b>E</b> <u>C</u> <b>C</b> <b>P</b> N <b>R</b> V <b>C</b> S <b>D</b> K <b>H</b> K <b>W</b> <u>C</u> <b>K</b> W <b>K</b> L
$\beta/\omega$ -TRTX-Tp1a	2	35	Nav.1.7 (51.0)	<b>E</b> <b>C</b> R <b>Y</b> W <b>L</b> G <b>G</b> <b>C</b> S <b>A</b> G <b>Q</b> T <b>C</b> <u>C</u> <b>K</b> H <b>L</b> V <b>C</b> S <b>R</b> R <b>H</b> G <b>W</b> <u>C</u> V <b>W</b> D <b>G</b> T <b>F</b> S
$\beta$ -TRTX-Cm2a	2	39	Nav.1.5 (447.0) Nav.1.8 (N.D.)	<b>G</b> V <b>D</b> K <b>E</b> G <b>C</b> R <b>K</b> L <b>L</b> G <b>G</b> <b>C</b> T <b>I</b> D <b>D</b> D <u>C</u> <b>C</b> <b>P</b> H <b>L</b> G <b>C</b> N <b>K</b> K <b>Y</b> W <b>H</b> <u>C</u> G <b>W</b> D <b>G</b> T <b>F</b>
$\mu$ -TRTX-Cj1a	2	35	TTX-S (85.0)	<b>A</b> <b>C</b> R <b>E</b> W <b>L</b> G <b>G</b> <b>C</b> S <b>K</b> D <b>A</b> D <u>C</u> <b>C</b> A <b>H</b> L <b>E</b> <b>C</b> R <b>K</b> K <b>W</b> P <b>Y</b> H <u>C</u> V <b>W</b> D <b>W</b> T <b>V</b>
$\beta/\omega$ -TRTX-Tp2a	3	30	Nav.1.2 (41.0) Nav.1.5 (79.0) Nav.1.7 (0.3)	<b>Y</b> <u>C</u> <b>Q</b> K <b>W</b> M <b>W</b> T <b>C</b> D <b>S</b> E <b>R</b> K <u>C</u> <b>C</b> E <b>G</b> M <b>V</b> <b>C</b> R <b>L</b> W <u>C</u> <b>K</b> K <b>K</b> L <b>W</b>
$\beta$ -TRTX-Gr1b	3	29	Nav.1.7 (350.0)	<b>Y</b> <u>C</u> <b>Q</b> K <b>W</b> L <b>W</b> T <b>C</b> D <b>S</b> E <b>R</b> K <u>C</u> <b>C</b> E <b>D</b> M <b>V</b> <b>C</b> R <b>L</b> W <u>C</u> <b>K</b> K <b>R</b> L
$\beta$ -HXTX-Mg1a	5	29	Nav.1.2 (N.D.)	<b>G</b> <b>C</b> <b>K</b> L <b>T</b> F <b>W</b> K <b>C</b> K <b>N</b> K <b>E</b> <u>C</u> <b>C</b> G <b>W</b> N <b>A</b> <b>C</b> A <b>L</b> G <b>I</b> <u>C</u> M <b>P</b> R
$\&$ -TRTX-Cj1a	7	33	Nav.1.5 (32.0)	<b>A</b> <b>C</b> G <b>Q</b> F <b>W</b> W <b>K</b> <u>C</u> G <b>E</b> G <b>K</b> P <b>P</b> <u>C</u> <b>C</b> A <b>N</b> F <b>A</b> <b>C</b> K <b>I</b> G <b>L</b> Y <b>L</b> <u>C</u> I <b>W</b> S <b>P</b>
$\beta/k$ -TRTX-Cj1a	7	36	Nav.1.5 (350.0)	<b>D</b> G <b>E</b> <u>C</u> G <b>G</b> F <b>W</b> W <b>K</b> <u>C</u> G <b>R</b> G <b>K</b> P <b>P</b> <u>C</u> <b>C</b> K <b>G</b> Y <b>A</b> <u>C</u> S <b>K</b> T <b>W</b> G <b>W</b> <u>C</u> A <b>V</b> E <b>A</b> P
$\mu$ -CNTX-Pn1a	8	79	Nav.1.2 (N.D.)	<b>A</b> E <b>L</b> T <b>S</b> <u>C</u> F <b>P</b> V <b>G</b> H <b>E</b> <u>C</u> D <b>G</b> D <b>A</b> S <b>N</b> <u>C</u> <b>N</b> <b>C</b> <b>C</b> G <b>D</b> D <b>V</b> Y <b>C</b> G <u>C</u> G <b>W</b> G <b>R</b> W <b>N</b> <u>C</u> <b>K</b> <b>C</b> K <b>V</b> A <b>D</b> Q <b>S</b> Y <b>A</b> Y <b>G</b> <u>C</u> <b>K</b> D <b>K</b> V <b>N</b> C <b>P</b> N <b>R</b> H <b>L</b> W <b>P</b> A <b>K</b> V <u>C</u> <b>K</b> K <b>P</b> C <b>R</b> R <b>N</b> <u>C</u> G <b>G</b>
$\mu$ -TMTX-Hme1a	9	37	Nav.1.2, Nav.1.4, Nav.1.5 (150.0–500.0)	<b>G</b> <b>C</b> I <b>P</b> Y <b>G</b> K <b>T</b> <u>C</u> E <b>F</b> W <b>S</b> G <b>P</b> <u>C</u> <b>C</b> A <b>G</b> K <b>C</b> K <b>L</b> N <b>V</b> W <b>S</b> M <b>T</b> L <b>S</b> <u>C</u> T <b>R</b> N <b>F</b>
$\mu$ -TMTX-Hme1b	9	40	Nav.1.2, Nav.1.4 (150.0–500.0)	<b>G</b> <b>C</b> I <b>P</b> S <b>F</b> G <b>E</b> <u>C</u> A <b>W</b> F <b>S</b> G <b>E</b> S <u>C</u> <b>C</b> T <b>G</b> I <b>C</b> <b>K</b> W <b>V</b> F <b>F</b> T <b>S</b> K <b>F</b> M <b>C</b> R <b>R</b> V <b>W</b> G <b>K</b> D

N.D.: not determined. The cysteins that form disulfide bridges are bold and marked with different underlines.

### 3.3 七鳃鳗口腔腺富含半胱氨酸分泌蛋白

富含半胱氨酸分泌蛋白 (Cysteine-rich secretory protein, CRISP) 家族成员多为单链分泌蛋白, 分子质量在 20–30 kDa 之间, 其一级结构含有多个高度保守的 Cys 残基。现已确认分布于爬行动物毒腺中的 CRISP 对多种离子通道具有阻断作用<sup>[47]</sup>。2009 年, Xiao 等研究发现, 来源于七鳃鳗 *Lampetra japonica* 口腔腺的富含半胱氨酸分泌蛋白 (*Lampetra japonica* cysteine-rich buccal gland protein, Lj-CRBGP)

与蛇毒富含半胱氨酸分泌蛋白中的 Ablomin 具有较高的同源性 (60%), 且含有 16 个高度保守的半胱氨酸残基 (图 5)。此外, 电生理实验结果表明天然 Lj-CRBGP 能够通过阻断海马神经元和背根神经元的钠离子电流从而减弱神经元的兴奋性<sup>[48]</sup>。因此, Xiao 等推测水中“吸血鬼”七鳃鳗可能通过其口腔腺中的 Lj-CRBGP 来抑制宿主鱼体的局部疼痛反应以保证其能成功地吸附在鱼体上吸血食肉。不过, 具体机制仍需进一步的动物实验证明。

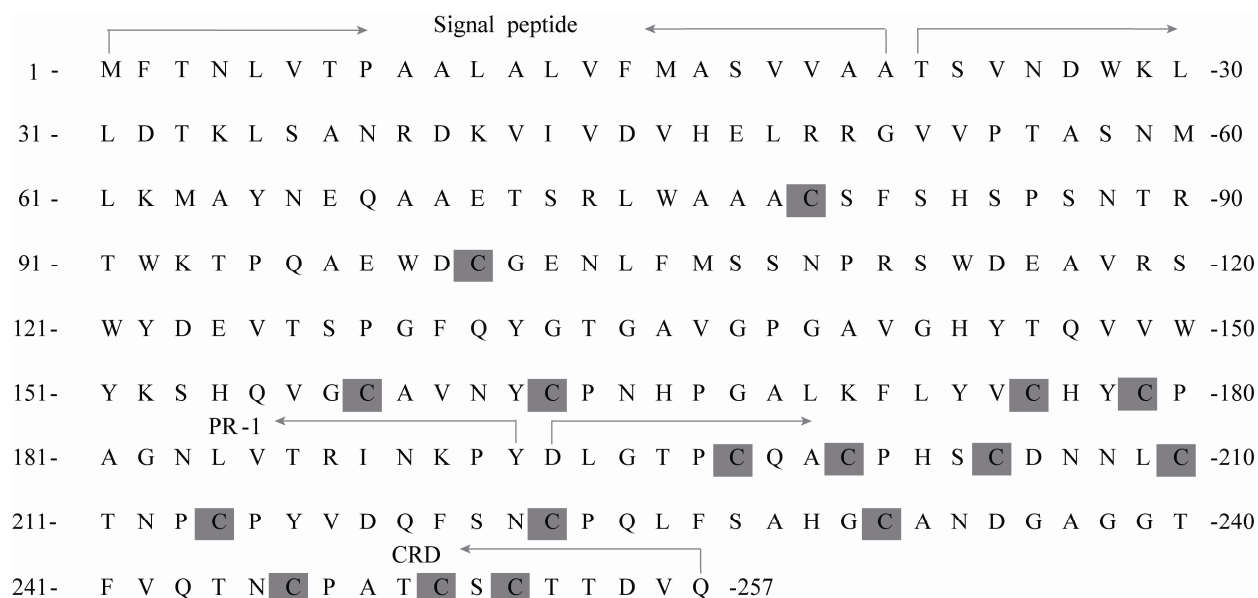


图 5 日本七鳃鳗 CRBGP 氨基酸序列及其各结构域

Fig. 5 Amino acid sequences and domains of CRBGP of *Lampetra japonica*. Signal peptide (1–22): guiding the protein transfers across the cell membrane; PR-1 domain (23–192): Determine the diversity of the function of the protein; CRD domain (193–257): relate to the activity of ion channel. The grey boxes are representative of cysteine residues.

## 4 研究前景

到目前为止, 研究人员对钠离子通道的基因、结构和功能等都已进行了较为透彻的研究, 并已确定其参与多种疾病的发病过程。因此,

目前临床上有多种药物是以钠离子通道为治疗靶点, 如人工合成的化合物, 自然界中天然存在的神经毒素, 以及根据神经毒素的结构进行定向设计改造的新型分子。这使它们有望在某些与钠离子通道相关的疑难疾病的治疗中得到

更广泛的应用。近年来，七鳃鳗富含半胱氨酸分泌蛋白被报道具有钠离子通道阻断功能以及抑制中性粒细胞迁移功能，对其生物学功能的深入研究将有助于开发新型、低毒的消炎镇痛药物，具有较高的科学意义以及应用前景。

## REFERENCES

- [1] Colombo E, Franceschetti S, Avanzini G, et al. Phenytoin inhibits the persistent sodium current in neocortical neurons by modifying its inactivation properties. *PLoS ONE*, 2013, 8(1): e55329.
- [2] Savio-Galimberti E, Gollob MH, Darbar D. Voltage-gated sodium channels: biophysics, pharmacology, and related channelopathies. *Front Pharmacol*, 2012, 3: 124.
- [3] Payandeh J, Scheuer T, Zheng N, et al. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*, 2011, 475(7356): 353–358.
- [4] Payandeh J, Gamal El-Din TM, Scheuer T, et al. Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature*, 2012, 486(7401): 135–139.
- [5] Vastani N, Seifert B, Spahn DR, et al. Preconditioning depolarizing ramp currents enhance the effect of sodium channel blockers in primary sensory afferents. *Neuromodulation*, 2013, 16(4): 336–344.
- [6] Dib-Hajj SD, Binshtok AM, Cummins TR, et al. Voltage-gated sodium channels in pain states: role in pathophysiology and targets for treatment. *Brain Res Rev*, 2009, 60(1): 65–83.
- [7] Schuelert N, McDougall JJ. Involvement of NaV1.8 sodium ion channels in the transduction of mechanical pain in a rodent model of osteoarthritis. *Arthritis Res*, 2012, 14(1): R5.
- [8] Lossin C, Wang DW, Rhodes TH. Molecular basis of an inherited epilepsy. *Neuron*, 2002, 34(6): 877–884.
- [9] Liao Y, Deprez L, Maljevic S, et al. Molecular correlates of age-dependent seizures in an inherited neonatal-infantile epilepsy. *Brzin*, 2010, 133(Pt 5): 1403–1414.
- [10] Levin SI, Khaliq ZM, Aman TK. Impaired motor function and learning in mice with conditional knockout of the Na channel SCN8A (Nav1.6) in cerebellar Purkinje neurons and granule cells. *J Neurophysiol*, 2006, 96: 785–793.
- [11] Michel P, Sternberg D, Jeannet PY, et al. Comparative efficacy of repetitive nerve stimulation, exercise, and cold in differentiating myotonic disorders. *Muscle Nerve*, 2007, 36(5): 643–650.
- [12] Lerche H, Heine R, Pika U. Human sodium channel myotonia: slowed channel inactivation due to substitutions for a glycine within the III - IV linker. *J Physiol*, 1993, 470(10): 13–22.
- [13] Facer P, Punjabi PP, Abrari A. Localisation of SCN10A gene product Nav1.8 and novel pain-related ion channels in human heart. *Int Heart J*, 2011, 52(3): 146–152.
- [14] Stevens M, Peigneur S, Tytgat J. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. *Front Pharmacol*, 2011, 2: 71.
- [15] Southcott RV. The neurologic effects of noxious marine creatures. *Contemp Neurol Ser*, 1975, 12: 165–258.
- [16] Tardieu F, Reymond M, Hamard P, et al. Spatial distributions of expansion rate, cell division rate and cell size in maize leaves: a synthesis of the effects of soil water status, evaporative demand and temperature. *J Exp Bot*, 2000, 51(350): 1505–1514.
- [17] Berde CB, Athiraman U, Yahalom B, et al. Tetrodotoxin-bupivacaine-epinephrine combinations for prolonged local anesthesia. *Mar Drugs*, 2011, 9(12): 2717–2728.
- [18] Shankarappa SA, Tsui JH, Kim KN, et al. Prolonged nerve blockade delays the onset of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(19): 7958.
- [19] Sheets MF, Hanck DA. Molecular action of lidocaine on the voltage sensors of sodium channels. *J Gen Physiol*, 2003, 121(2): 163–175.

- [20] Binshtok AM, Bean BP, Woolf CJ. Inhibition of nociceptors by TRPV1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers. *Nature*, 2007, 449(7162): 607–610.
- [21] Shen J, Fox LE, Cheng J. Differential effects of peripheral versus central coadministration of QX-314 and capsaicin on neuropathic pain in rats. *Anesthesiology*, 2012, 117(2): 365–380.
- [22] McGaraughty S, Chu KL, Scanio MJ, et al. A selective Nav1.8 sodium channel blocker, A-803467[5-(4-chlorophenyl-N-(3,5-dimethoxyphenyl) furan-2-carboxamide], attenuates spinal neuronal activity in neuropathic rats. *Pharmacol Exp Ther*, 2008, 324(3): 1204–1211.
- [23] Eijkelkamp N, Linley JE, Baker MD, et al. Neurological perspectives on voltage-gated sodium channels. *Brain*, 2012, 135(9): 2585–2612.
- [24] Urbarova I, Karlsen BO, Okkenhaug S, et al. Digital marine bioprospecting: mining new neurotoxin drug candidates from the transcriptomes of *cold-water sea anemones*. *Mar Drugs*, 2012, 10(10): 2265–2279.
- [25] Cemazar M, Kwon S, Mahatmanto T, et al. Discovery and applications of disulfide-rich cyclic peptides. *Curr Top Med Chem*, 2012, 12(14): 1534–1545.
- [26] Shon KJ, Olivera BM, Watkins M, et al.  $\mu$ -Conotoxin PIIIA, a new peptide for discriminating among tetrodotoxin-sensitive Na<sup>+</sup> channel subtypes. *J Neurosci*, 1998, 18(12): 4473–4481.
- [27] Safo P, Rosenbaum T, Shcherbatko A, et al. Distinction among neuronal subtypes of voltage-activated sodium channels by  $\mu$ -conotoxin PIIIA. *J Neurosci*, 2000, 20(1): 76–80.
- [28] Lewis RJ, Schroeder CI, Ekberg J, et al. Isolation and structure-activity of  $\mu$ -conotoxin TIIIA, a potent inhibitor of tetrodotoxin-sensitive voltage-gated sodium channels. *Mol Pharmacol*, 2007, 71(3): 676–685.
- [29] Wilson MJ, Yoshikami D, Azam L, et al.  $\mu$ -Conotoxins that differentially block sodium channels Nav1.1 through 1.8 identify those responsible for action potentials in sciatic nerve. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(25): 10302–10307.
- [30] Knapp O, McArthur JR, Adams DJ. Conotoxins targeting neuronal voltage-gated sodium channel subtypes: potential analgesics? *Toxins (Basel)*, 2012, 4(11): 1236–1260.
- [31] Ekberg J, Jayamanne A, Vaughan CW, et al.  $\mu$ O-conotoxin MrVIB selectively blocks Nav1.8 sensory neuron specific sodium channels and chronic pain behavior without motor deficits. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(45): 17030–17035.
- [32] Vetter I, Dekan Z, Knapp O, et al. Isolation, characterization and total regioselective synthesis of the novel  $\mu$ O-conotoxin MfVIA from *Conus magnificus* that targets voltage-gated sodium channels. *Biochem Pharmacol*, 2012, 84(4): 540–548.
- [33] Wang L, Pi C, Liu J, et al. Identification and characterization of a novel O-superfamily conotoxin from *Conus litteratus*. *J Pept Sci*, 2008, 14(10): 1077–1083.
- [34] Pi C, Liu J, Wang L, et al. Soluble expression, purification and functional identification of a disulfide-rich conotoxin derived from *Conus litteratus*. *J Biotechnol*, 2007, 128(1): 184–193.
- [35] Klint JK, Senff S, Rupasinghe DB, et al. Spider-venom peptides that target voltage-gated sodium channels: pharmacological tools and potential therapeutic leads. *Toxicon*, 2012, 60(4): 478–491.
- [36] Wang M, Rong M, Xiao Y, et al. The effects of huwentoxin-I on the voltage-gated sodium channels of rat hippocampal and cockroach dorsalunpaired median neurons. *Peptides*, 2012, 34(1): 19–25.
- [37] Chen JQ, Zhang YQ, Dai J, et al. Antinociceptive effects of intrathecally administered huwentoxin-I, a selective N-type calcium channel blocker, in the formalin test in conscious rats. *Toxicon*, 2005, 45(1): 15–20.

- [38] Bosmans F, Rash L, Zhu S, et al. Four novel tarantula toxins as selective modulators of voltage-gated sodium channel subtypes. *Mol Pharmacol*, 2006, 69(2): 419–429.
- [39] Xiao Y, Bingham JP, Zhu W, et al. Tarantula huwentoxin-IV inhibits neuronal sodium channels by binding to receptor site 4 and trapping the domain ii voltage sensor in the closed configuration. *J Biol Chem*, 2008, 283(40): 27300–27313.
- [40] Li D, Xiao Y, Xu X, et al. Structure-activity relationships of hainantoxin-IV and structure determination of active and inactive sodium channel blockers. *J Biol Chem*, 2004, 279(36): 37734–37740.
- [41] Schmalhofer WA, Calhoun J, Burrows R, et al. ProTx-II a selective inhibitor of  $\text{Na}_v1.7$  sodium channels, blocks action potential propagation in nociceptors. *Mol Pharmacol*, 2008, 74(5): 1476–1484.
- [42] Corzo G, Sabo JK, Bosmans F, et al. Solution structure and alanine scan of a spider toxin that affects the activation of mammalian voltage-gated sodium channels. *J Biol Chem*, 2007, 282(7): 4643–4652.
- [43] Xiao Y, Tang J, Hu W, et al. Jingzhaotoxin-I, a novel spider neurotoxin preferentially inhibiting cardiac sodium channel inactivation. *J Biol Chem*, 2005, 280(13): 12069–12076.
- [44] Rong M, Chen J, Tao H, et al. Molecular basis of the tarantula toxin jingzhaotoxin-III ( $\beta$ -TRTX-Cj1a) interacting with voltage sensors in sodium channel subtype Nav1.5. *FASEB J*, 2011, 25(9): 3177–3185.
- [45] Martin-Moutot N, Mansuelle P, Alcaraz G, et al. Phoneutria nigriventer toxin 1: a novel, state-dependent inhibitor of neuronal sodium channels that interacts with micro conotoxin binding sites. *Mol Pharmacol*, 2006, 69(6): 1931–1937.
- [46] Billen B, Vassilevski A, Nikolsky A, et al. Two novel sodium channel inhibitors from *Heriades melloteei* spider venom differentially interacting with mammalian channel's isoforms. *Toxicon*, 2008, 52(2): 309–317.
- [47] Wang YL, Kuo JH, Lee SC, et al. Cobra CRISP functions as an inflammatory modulator via a novel  $\text{Zn}^{2+}$  and heparan sulfate-dependent transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules. *J Biol Chem*, 2010, 285(48): 37872–37883.
- [48] Xiao R, Pang Y, Li QW. The buccal gland of *Lampetra japonica* is a source of diverse bioactive proteins. *Biochimie*, 2012, 94(5): 1075–1079.

(本文责编 陈宏宇)