

新型镇痛靶点 $\alpha 2\delta$ -1-NMDAR 稳定表达细胞株构建及镇痛药物筛选的应用

董琳¹, 张亦雅², 陈金军^{1,3}

1 湖南农业大学 生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128

2 中南大学湘雅医院 国家老年疾病临床研究中心, 湖南 长沙 410008

3 湖南省细胞力学与功能分析工程技术研究中心, 湖南 长沙 410006

董琳, 张亦雅, 陈金军. 新型镇痛靶点 $\alpha 2\delta$ -1-NMDAR 稳定表达细胞株构建及镇痛药物筛选的应用. 生物工程学报, 2022, 38(3): 1149-1158.

DONG L, ZHANG YY, CHEN JJ. A novel cell tool for $\alpha 2\delta$ -1-NMDAR target-based analgesic drug discovery. Chin J Biotech, 2022, 38(3): 1149-1158.

摘要: 在多种神经性疼痛动物模型中均发现周围神经损伤可导致由 *CACNA2D1* 编码的 $\alpha 2\delta$ -1 蛋白在脊髓和背根神经节 (DRG) 中表达显著上调。*CACNA2D1* 过表达使脊髓背角神经元的突触前和突触后 NMDAR 活性增强, 引起疼痛过敏症。 $\alpha 2\delta$ -1 与 NMDAR 相互作用, 促进了 NMDAR 在细胞表面转运和突触膜上的定位, 可引起神经病理性疼痛, 且 $\alpha 2\delta$ -1-NMDAR 复合物也被发现存在于其他多种病理状态下, 如某些神经源性的高血压、脑缺血。本研究使用慢病毒转染构建稳定表达 $\alpha 2\delta$ -1-NMDAR 复合物的人肾胚 HEK293T 细胞株; 通过荧光显微镜、RT-qPCR 及 Western blotting 方法对所建立的稳转细胞系进行鉴定, 结果显示 HEK293T 被成功转染且基因能够稳定表达; 并采用膜片钳技术成功建立该细胞株靶向药物筛选体系。该细胞株为进一步研究 $\alpha 2\delta$ -1-NMDAR 复合物的相互作用机制及针对慢性疼痛和相关疾病的低副作用的药物筛选提供了良好应用前景的细胞模型。

关键词: $\alpha 2\delta$ -1; NMDA 受体; $\alpha 2\delta$ -1-NMDAR 复合物; 神经病理性疼痛; 靶向药物筛选

Received: February 24, 2021; **Accepted:** April 6, 2021; **Published online:** May 10, 2021

Supported by: The Educational Department Foundation of Hunan Province, China (16A098); Key R&D Project of Hunan Provincial Science and Technology Department, China (2017NK2311)

Corresponding author: CHEN Jinjun. Tel: +86-731-46736010; E-mail: chhncjj@126.com

基金项目: 湖南省教育厅基金会 (16A098); 湖南省科技厅重点科研项目 (2017NK2311)

A novel cell tool for $\alpha 2\delta$ -1-NMDAR target-based analgesic drug discovery

DONG Lin¹, ZHANG Yiya², CHEN Jinjun^{1,3}

1 College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

2 National Clinical Research Center for Geriatric Disorders, Xiangya Hospital Central South University, Changsha 410008, Hunan, China

3 Hunan Provincial Engineering Technology Research Center for Cell Mechanics and Function Analysis, Changsha 410006, Hunan, China

Abstract: The $\alpha 2\delta$ -1 protein coded by *Cacna2d1* is dramatically up-regulated in dorsal root ganglion (DRG) neurons and spinal dorsal horn following sensory nerve injury in various animal models of neuropathic pain. *Cacna2d1* overexpression potentiates presynaptic and postsynaptic NMDAR activity of spinal dorsal horn neurons to cause pain hypersensitivity. The $\alpha 2\delta$ -1-NMDAR interaction promotes surface trafficking and synaptic targeting of NMDARs in neuropathic pain caused by chemotherapeutic agents and peripheral nerve injury, as well as in other pathological conditions such as in the paraventricular nucleus (PVN) with neurogenic hypertension and in the brain with ischemic stroke. The lentiviral transfection method was used to construct a human embryonic kidney HEK293T cell line that could stably express $\alpha 2\delta$ -1-NMDAR complex. A stably transfected cell line was observed by fluorescence microscope, and identified by RT-qPCR and Western blotting. The results showed that the HEK293T cell line was successfully transfected and the genes could be stably expressed. Subsequently, the transfected cell line was successfully developed into a target drug screening system using patch clamp techniques. It provides a promising cell model for further research on the interaction mechanism of $\alpha 2\delta$ -1-NMDAR complex and drug screening for chronic pain and related diseases with low side effects.

Keywords: $\alpha 2\delta$ -1; NMDA receptor; $\alpha 2\delta$ -1-NMDAR complex; neuropathic pain; target-based drug discover

NMDA 受体 (NMDAR) 位于初级传入纤维的中央末梢的脊髓背角的浅层和深层, 以及初级传入纤维的突触后膜上。NMDA 受体在解除 Mg^{2+} 阻滞表现出一定程度的电压依赖性, 且对 Ca^{2+} 有明显的通透性。脊髓中的 NMDAR 在持续性疼痛状态下的脊髓“中枢敏化”中起重要作用。尽管靶向 NMDAR 的分子具有缓解持续性疼痛的潜力, 但 NMDAR 参与正常的生理功能, 因此, 在镇痛剂量范围内, 以 NMDAR 为靶点的镇痛药物对中枢神经系统产生明显的副作用, 其应用受到阻碍。

大量研究表明, 周围神经损伤导致 *CACNA2D1*

编码的 $\alpha 2\delta$ -1 在感觉神经元中表达上调, 并导致脊髓和背根神经节的 $\alpha 2\delta$ -1 向突触前末梢的转运增加, 其对背根神经元的兴奋性具有调节作用^[1-2]。 $\alpha 2\delta$ -1 和 $\alpha 2\delta$ -2 是临床抗癫痫和慢性疼痛的一线药物——加巴喷丁类药物的作用靶点。研究表明, 加巴喷丁和普瑞巴林可减少多种疼痛病理中的突触兴奋性神经递质释放, 降低脊髓感觉回路和新皮质的兴奋性。但此类药物研发初衷以治疗癫痫为主, 在治疗神经痛时仍存在嗜睡、头晕、周围组织水肿等副作用^[3-5]。现有治疗神经痛药物存在大量不良反应和药物滥用与依赖等风险的情况, 因此, 研究新颖靶点,

寻找低副作用、低滥用风险与依赖性的治疗药物仍是研究神经痛的关注点。

$\alpha 2\delta$ -1 可与 NMDAR 相互作用形成异聚复合物 $\alpha 2\delta$ -1-NMDAR, 在神经结扎的大鼠脊髓中, $\alpha 2\delta$ -1 表达增加, 引发 NMDAR 的电流增加; 在采用慢病毒 *CACNA2D1* 过表达的大鼠中, 脊髓背角神经元的突触前和突触后 NMDAR 活性增强, NMDAR 在突触的动态分布增加, 导致疼痛过敏症^[1]。相反, *CACNA2D1* 敲除或被干扰使神经损伤增加的突触 NMDAR 活性回归正常水平。多项研究表明, $\alpha 2\delta$ -1-NMDAR 介导的由化学药物诱导或者神经损伤引起的神经性疼痛、药物耐受和疼痛过敏, 是一个新颖的镇痛靶点^[6-10]。另外, $\alpha 2\delta$ -1-NMDAR 还被发现存在于神经源性的高血压大鼠的 PVN 和中风引起的脑缺血大鼠的脑部, 表明该膜蛋白复合物也介导了这一系列病理状态的发生。由于这是病理状态下的蛋白复合物, 因此, 特异作用于此复合物的药物将不会影响正常生理状态下的 $\alpha 2\delta$ -1 或者 NMDAR 的功能。

在本研究中, 使用 HEK293T 构建同时稳定表达 3 个基因 (*GRIN1*、*GRIN2B* 和 *CACNA2D1*) 的细胞株。成功构建的细胞株在模拟病理条件下可形成 $\alpha 2\delta$ -1-NMDAR 复合物, 并以全细胞记录为技术手段建立 1 个以 $\alpha 2\delta$ -1-NMDAR 复合物为作用靶点、使用细胞为主体的药物筛选系统, 以便更快捷、简便地筛选多种神经性疼痛和脑部缺血中的有效治疗药物, 也能够利用该细胞株更深入地探究 $\alpha 2\delta$ -1-NMDAR 复合物的相关作用机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 仪 器

IX53 倒置显微镜购自 OLYMPUS 公司; DMI3000 倒置显微镜购自 Leica; CO₂ 培箱与 NeoFuge 1600R 离心机均购自力康; EPC-10 放

大器购自德国 HEKA; 7500 荧光定量 PCR 仪、96 孔细胞培养板、高透光度粘性盖膜均购自 ABI 公司; PC-10 型电极控制仪购自 Narishige。

1.1.2 试 剂

DMEM 完全培养液、1×PBS、Trypsin-EDTA、Polybrene 均来自 Cyagen; SYBR Premix *ExTaq*TM (Tli RNaseH plus), 购自 TaKaRa 公司, 货号 RR420A; 动物组织总 RNA 提取试剂盒购自 TIANGEN, 货号 DP431; 反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司, 货号 RR047A; qPCR 引物 (10 μ mol/L) 购自金唯智; DC 蛋白检测试剂盒与 15% Tris-HCl 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 购自 Bio-Rad; 兔抗- $\alpha 2\delta$ -1 购自 Sigma-Aldrich, 1 : 1 000, 货号 C5105; MK-801 与 犬尿酸 (KA) 均购自 Sigma-Aldrich; 2-氨基-5-磷酸基戊酸酯 (AP-5) 购自 Abcam; 加巴喷丁 (GabapentinG) 购自 Tocris Bioscience。

1.2 方 法

1.2.1 目的基因片段的制备

在 *CACNA2D1* 基因 N 端插入 YFP 标签构成 YFP-*CACNA2D1* 基因; 在 *GRIN1* 基因的 N 端插入 FLAG 标签构成 FLAG-*GRIN1* 基因, 利用 PCR 技术扩增携带 YFP 标签的 *CACNA2D1*、携带 FLAG 标签的 *GRIN1* 以及 *GRIN2B* 的基因序列, 得到 YFP-*CACNA2D1*、FLAG-*GRIN1* 和 *GRIN2B* 基因片段。然后将 PCR 产物进行 DNA 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 并回收。PCR 扩增时使用的引物序列见表 1。

1.2.2 慢病毒载体构建

取目的基因的凝胶回收产物与慢病毒载体 LV-CMV-PGK-Puro、LV-CMV-PGK-Hygro 和 LV-CMV-PGK-Bsd 分别用限制性内切酶 *Bam*H I / *Asc* I、*Pml* I / *Asc* I、*Pml* I / *Asc* I 进行双酶切, 并将酶切产物回收, 分别进行连接反应, 得到 YFP-*CACNA2D1*、FLAG-*GRIN1* 和 *GRIN2B* 基因的重组慢病毒连接产物。用感受态细胞对连

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')
YFP-CACNA2D1-F	GCGACATGGTTAAGCAGCCC
YFP-CACNA2D1-R	AGTCGGTATAATCCTCCAGCAC
FLAG-GRIN1-F	AGAACATGGCAGGGGTCTTC
FLAG-GRIN1-R	AGCTGCATCTGCTTCCTACG
GRIN2B-F	ACCTGTACGACATCAGCAAGG
GRIN2B-R	GGAGGCGTTGGATGTCACAG

接产物进行转化, 将转化液涂布在含有相应抗生素的 LB 平板上, 37 °C 培养过夜; 次日, 从各平板上挑取单菌落, 进行质粒 DNA 的提取与双酶切凝胶电泳鉴定。挑选阳性克隆菌落对应的菌液培养过夜, 将质粒抽提后进行 DNA 测序鉴定。获得 LV-CMV-YFP-CACNA2D1-PGK-Puro、LV-CMV-FLAG-GRIN1-PGK-Hygro、LV-CMV-GRIN2B-PGK-Bsd 重组慢病毒。

1.2.3 细胞转染及细胞系筛选

将 1×10^5 个 HEK-293T 细胞置于含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养过夜。次日, 取细胞汇合度达到 70% 的细胞换液至 Opti-MEM 中, 2 h 后进行分步转染。将 LV-CMV-YFP-CACNA2D1-PGK-Puro 病毒液冰浴解冻融化, 按照 10 MOI (multiplicity of infection) 加入病毒液 (病毒滴度为 2.03×10^8 TU/mL) 至适量培养基中, 加入聚凝胺溶液 (polybrene, 终浓度为 $5 \mu\text{g/mL}$), 轻柔混匀。吸出 293T 细胞的原有培养基, 加入含病毒的培养基覆盖所有细胞, 放置于 37 °C、5% CO_2 环境中培养过夜。次日, 移除含病毒的培养基, 加入新鲜的培养基, 37 °C、5% CO_2 环境中培养。可持续培养转染细胞, 并使用含嘌呤霉素 (Puro) 的 10% FBS 的 DMEM 培养基进行筛选纯化, 其转染后的细胞命名为 293T/CACNA2D1。

采用上述方法, 将 LV-CMV-FLAG-GRIN1-PGK-Hygro (病毒滴度为 2.21×10^8 TU/mL) 转染至 293T- $\alpha 2\delta$ -1 中, 其转染后的细胞命名为 293T- $\alpha 2\delta$ -1-GluN1, 用潮霉素 (Hygro) 进行筛

选鉴定; 将 LV-CMV-GRIN2B-PGK-Bsd (病毒滴度为 1.88×10^8 TU/mL) 转染至 293T- $\alpha 2\delta$ -1-GluN1 中, 其转染后的细胞命名为 293T- $\alpha 2\delta$ -1-GluN1/2B, 用杀稻瘟菌素 (Bsd) 进行筛选鉴定, 并使用荧光显微镜观察 GFP 绿色荧光。对照组采用仅包含 GFP 标签的 LV-CMV-GFP-Puro 的慢病毒载体 (病毒滴度为 4.08×10^8 TU/mL) 转染 293T 后, 用嘌呤霉素筛选细胞 3 d, 显微成像后进行荧光分布对比分析。

1.2.4 RT-qPCR 鉴定

分别将实验组与对照组的单克隆细胞稀释至 96 孔板中, 培养 7 d 后挑取单克隆孔, 传代至 24 孔板中进行扩大培养 4–5 d, 之后用胰酶消化传至 12 孔板中, 继续扩大培养传至 6 孔板, 提取单克隆细胞株中的总 RNA, 进行 RT-qPCR 鉴定, 采用 *hGAPDH* 为内参基因, 引物信息见表 2。

1.2.5 Western blotting

提取实验组和对照组扩大培养后的单克隆细胞株总蛋白, $20\,000 \times g$ 、4 °C 离心 2 min。小心收集上清液, 并使用 DC 蛋白检测试剂盒测量蛋白浓度。每个样品中含总蛋白质 30 μg , 经 4%–15% Tris-HCl SDS-PAGE 分离后, 转移到 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉的 Tris 缓冲盐水 (TBS) 25 °C 封闭 1 h, 再加入一抗 (含有 0.1% Triton X-100、1% 牛血清白蛋白和兔抗- $\alpha 2\delta$ -1 的 TBS) 4 °C 孵育过夜, 用 TBST 漂洗 3 次, 每

表 2 RT-qPCR 引物序列

Table 2 RT-qPCR primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')
hGAPDH-F	GGTGTGAACCATGAGAAGTATGA
hGAPDH-R	GAGTCCTTCCACGATACCAAAG
YFP-CACNA2D1-F	GCGACATGGTTAAGCAGCCC
YFP-CACNA2D1-R	AGTCGGTATAATCCTCCAGCAC
FLAG-GRIN1-F	AGAACATGGCAGGGGTCTTC
FLAG-GRIN1-R	AGCTGCATCTGCTTCCTACG
GRIN2B-F	ACCTGTACGACATCAGCAAGG
GRIN2B-R	GGAGGCGTTGGATGTCACAG

次 10 min, 加入二抗于室温下孵育 1 h, 用 TBST 漂洗, 使用 ECL 试剂盒显色。

1.2.6 稳定转染株 293T- $\alpha 2\delta$ -1-GluN1/2B 的培养和药物筛选

取出冻存的稳定转染株的人胚肾细胞株, 于 37 °C 水浴箱中快速振荡融化后将细胞液转入离心管中, 加入含有抑制剂 MK-801 和 $MgCl_2$ 的无谷氨酸 DMEM 混匀后离心, 倒掉上清, 用该培养基将细胞吹打成单细胞悬液, 转移到培养瓶后置于 37 °C、5% CO_2 的恒温培养箱中培养至细胞贴壁, 大约 5–6 h 后加入筛选标记 Puro、Hygro、Bsd 进行筛选。当细胞融合度达 85%–90% 即可进行传代, 倒掉原培养基, PBS 清洗细胞后用胰酶进行消化, 当细胞间隙增宽, 细胞变圆变亮, 立即加入含有抑制剂 AP-5、犬尿酸 (KA) 和 $MgCl_2$ 的无谷氨酸 DMEM 终止消化, 吹打混匀后离心, 倒掉上清, 用该培养基将细胞吹打成单细胞悬液, 转移到培养瓶后置于 37 °C、5% CO_2 的恒温培养箱中培养。

全细胞记录均在 25 °C 下进行, 将细胞培养液缓慢倒出, 加入细胞外液 (160 NaCl, 2.5 KCl, 0.2 $CaCl_2$, 10 HEPES, pH 7.35, 单位为 mmol/L), 并将细胞内液 (135 CsF, 2 $MgCl_2$, 0.5 $CaCl_2$, 5 EGTA, 2 Mg-ATP 和 10 HEPES, pH 7.25, 单位为 mmol/L) 灌入使用 PC-10 型电极拉制仪拉制成的硅酸玻璃微管电极 (sutter instrument)。使用 EPC-10 放大器 (HEKA instruments, Lambrecht, Germany) 记录全细胞电流, 保持电位为 -60 mV。建立全细胞封接后, 对细胞膜电容和电阻进行电子补偿, 采用甘氨酸 (10 μ mol/L) 和 NMDA (300 μ mol/L) 诱导 NMDAR 电流。在电压依赖性 Mg^{2+} 阻断实验中, 将 2 mmol/L $MgCl_2$ 加入细胞外液中, 评估 NMDARs 的电导-电压关系。通过拟合电流-电压关系和玻尔兹曼函数来评估 NMDARs 对 Mg^{2+} 的敏感性。所有 HEK293T 细胞记录实验均在 25 °C 进行。

将候选药物按不同浓度加入细胞外液中形成含有候选药物的灌流液; 以加巴喷丁 (gabapentin) 为阳性对照 (160 NaCl, 2.5 KCl, 0.2 $CaCl_2$, 10 HEPES, pH 7.35, gabapentin 1 mmol/L, 单位为 mmol/L); 平行注入灌流装置, 并按上述全细胞记录方法在 25 °C 进行 HEK293T 细胞记录实验。采用膜片钳技术全细胞封接模式将细胞钳制在 -60 mV, 用激动剂灌流 2 s, 记录细胞电流 (I_0), 切换到装有细胞外液和 AP-5 灌流 2 s; 然后用细胞外液灌流 3 min, 再用含候选药物的灌流管灌流 1 min, 打开有激动剂的灌流管 2 s, 记录细胞电流 (I_1), 切换到装有细胞外液和 AP-5 的灌流管 2 s; 用仅含细胞外液的灌流管灌流 3 min, 打开装有细胞外液和激动剂的灌流管 2 s, 记录细胞电流 (I_0'), 切换到装有细胞外液和 AP-5 的灌流管 2 s; 最后用细胞外液灌流 3 min, 再用含加巴喷丁的灌流管灌流 1 min, 打开装有细胞外液和激动剂的灌流管 2 s, 记录细胞电流 (I_2), 切换到装有细胞外液和 AP-5 的灌流管 2 s。按以上程序, 重复 6–12 个细胞, 获得平均值。

本研究以 CT-Tat 和 Tat (阴性对照) 作为候选药物。药物 1 CT-Tat: VSGLNPSLWSIFGLQFILLWLVSGSRHYLWYGRKKRRQRRR; 药物 2 Tat: YGRKKRRQRRR。

2 结果与分析

2.1 载体构建的鉴定

采用经典的分子克隆方法, 分别将 3 个目的基因连接到有不同筛选标记的慢病毒载体上, 并转化大肠杆菌 DH5 α , 挑选阳性克隆菌落进行初步的双酶切鉴定之后, 进行 DNA 测序, 获得 3 个正确插入了目的基因的重组慢病毒表达载体: LV-CMV-YFP-CACNA2D1-PGK-Puro 载体序列图谱如图 1A 所示, LV-CMV-FLAG-GRIN1-PGK-Hygro 载体序列图谱如图 1B 所示,

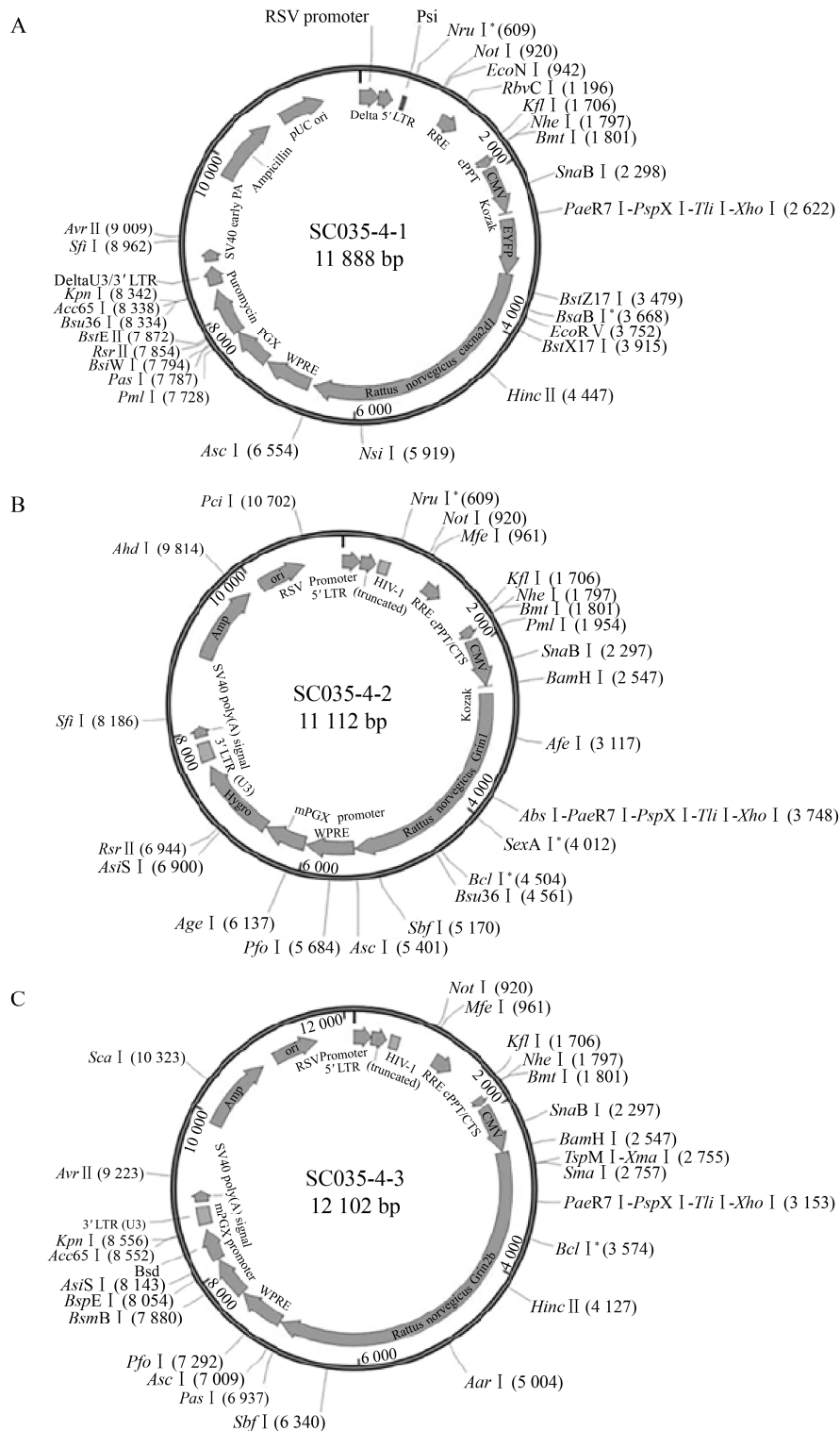


图 1 3 个重组慢病毒载体序列图谱

Figure 1 Maps of three recombinant lentiviruses. (A) LV-CMV-YFP-*CACNA2D1*-PGK-Puro. (B) LV-CMV-FLAG-*GRIN1*-PGK-Hygro. (C) LV-CMV-*GRIN2B*-PGK-Bsd.

LV-CMV-GRIN2B-PGK-Bsd 载体序列图谱如图 1C 所示。

2.2 293T- $\alpha 2\delta$ -1-GluN1/2B 稳转细胞株系的鉴定

采用分步转染的策略将 3 个含有目的基因的重组慢病毒转入 HEK293T 细胞,并用相应的筛选标记进行筛选。荧光显微镜下观察筛选 3 d 的转染细胞 293T/CACNA2D1、293T/CACNA2D1/GRIN1、293T/CACNA2D1/GRIN1/GRIN2B 以及对照组仅含 GFP 标签的慢病毒载体 293T 细胞的绿色荧光信号分布。初步鉴定实验组细胞的黄绿色荧光在细胞膜上均匀分布,符合受体的分布情况,而对照组细胞的绿色荧光则分散于整个细胞质中(图 2)。而且,当转入 3 个基因后,细胞的聚集较为明显。

提取单克隆细胞株中的总 RNA,进行 RT-qPCR 鉴定。结果显示 YFP-CACNA2D1 (293T/CACNA2D1) 的溶解曲线实验组和对照组

均为单一峰形且重叠,说明两组的 PCR 产物一致(图 3A);FLAG-GRIN1 (293T/CACNA2D1/GRIN1) 的溶解曲线中实验组和对照组均为单一峰形,但峰形不重叠,说明两组的 PCR 产物不同,可能由于在对照组 PCR 反应后期产生了引物二聚体,导致形成了与目标基因不一致的峰(图 3B);GRIN2B (293T/CACNA2D1/GRIN1/GRIN2B) 的溶解曲线中实验组为单一尖锐的峰形,说明引物特异性强,无非特异扩增(图 3C);hGAPDH 的溶解曲线中,基因实验组和对照组均为单一峰形且重叠,说明两组的 PCR 产物一致(图 3D)。

Western blotting 结果显示,在对照组细胞中未检测到目的蛋白,而实验组均可见条带清晰的目的蛋白,证明各目的基因相应蛋白表达成功(图 4)。

将所获得的稳定共表达 CACNA2D1、GRIN1 和 GRIN2B 的人胚肾细胞株命名为 293T- $\alpha 2\delta$ -1-GluN1/2B,已保藏于中国典型培养

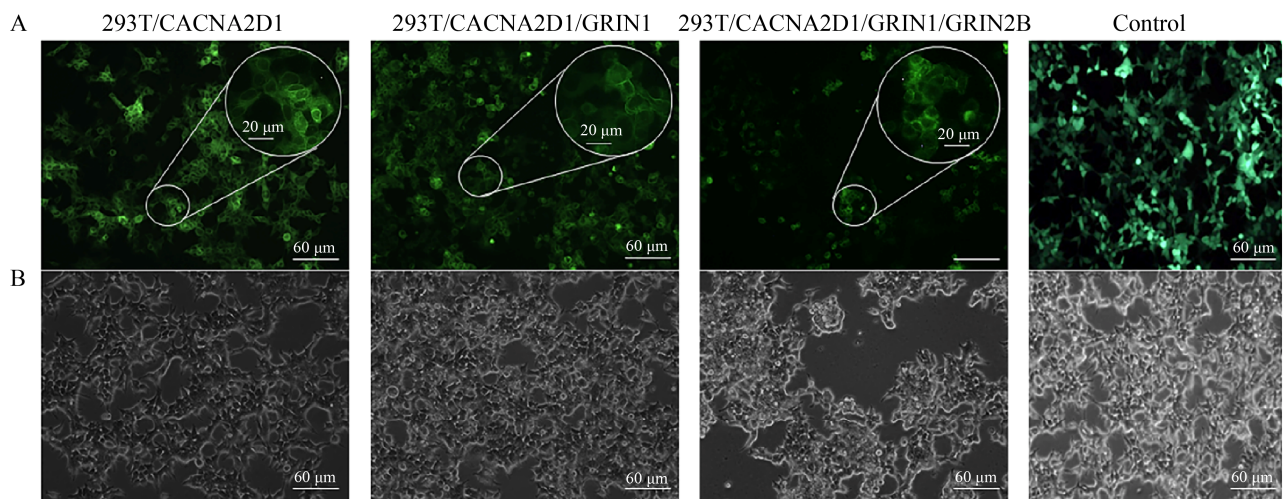


图 2 293T- $\alpha 2\delta$ -1-GluN1/2B 稳定转染细胞株荧光表达 (100 \times)

Figure 2 Fluorescence of 293T- $\alpha 2\delta$ -1-GluN1/2B stably transfected cell line (100 \times). (A) Stably transfected cell lines 293T/CACNA2D1, 293T/CACNA2D1/GRIN1 and 293T/CACNA2D1/GRIN1/GRIN2B were the experimental group cells and the green fluorescence of each was evenly distributed on the cell membrane, which was consistent with the distribution of receptors. The green fluorescence of the control cells was dispersed throughout the cytoplasm. (B) Morphology of the stably transfected cell lines 293T/CACNA2D1, 293T/CACNA2D1/GRIN1 and 293T/CACNA2D1/GRIN1/GRIN2B, and the control.

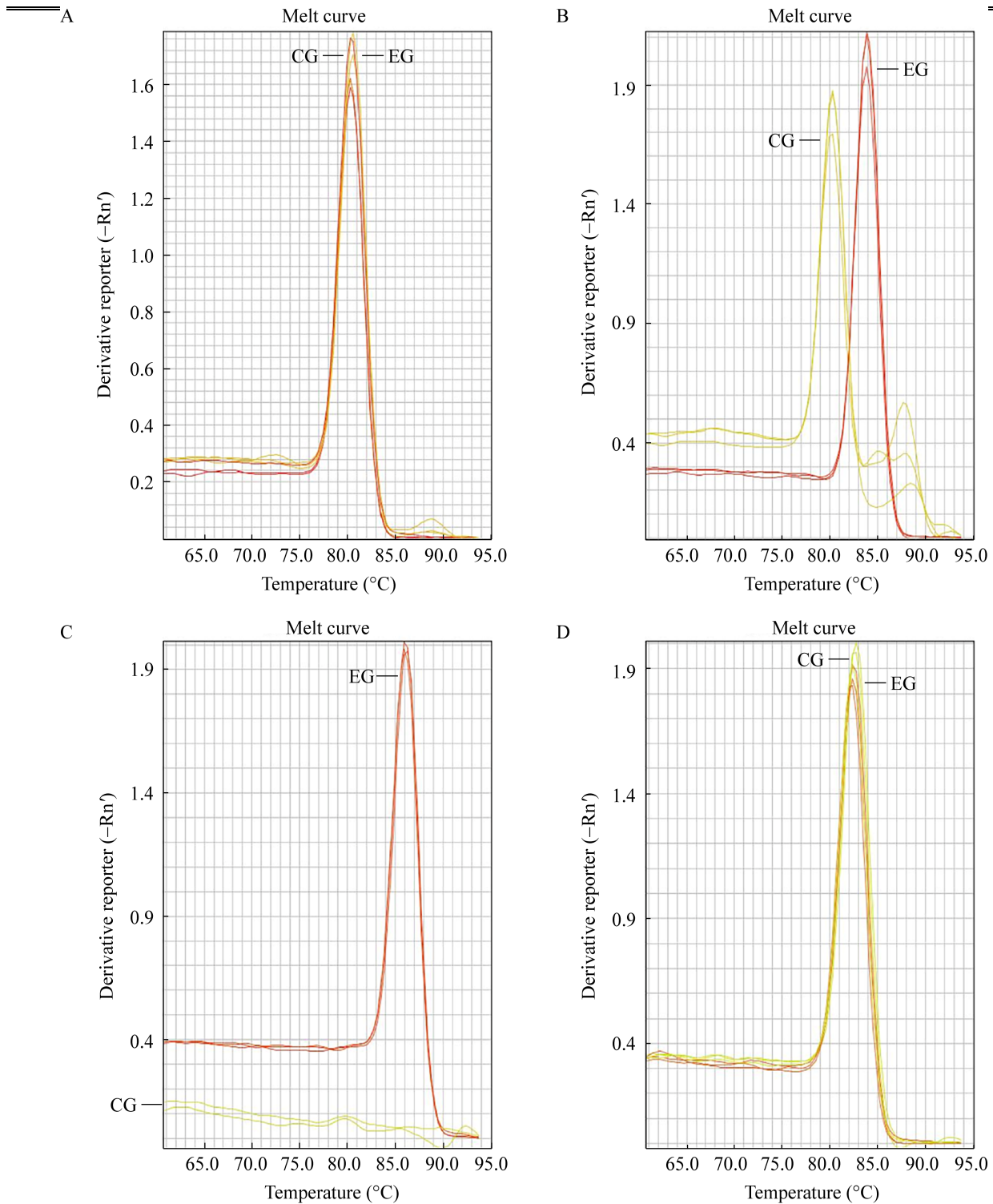


图3 293T- α 2 δ -1-GluN1/2B 细胞株 RT-qPCR 溶解曲线

Figure 3 Melting curves of real-time qPCR in 293T- α 2 δ -1-GluN1/2B cell line. The experimental groups (EG) and the control groups (CG) are shown in orange and yellow, respectively. (A) YFP-CACNA2D1 (293T/CACNA2D1). (B) FLAG-GRIN1 (293T/CACNA2D1/GRIN1). (C) GRIN2B (293T/CACNA2D1/GRIN1/GRIN2B). (D) hGAPDH.

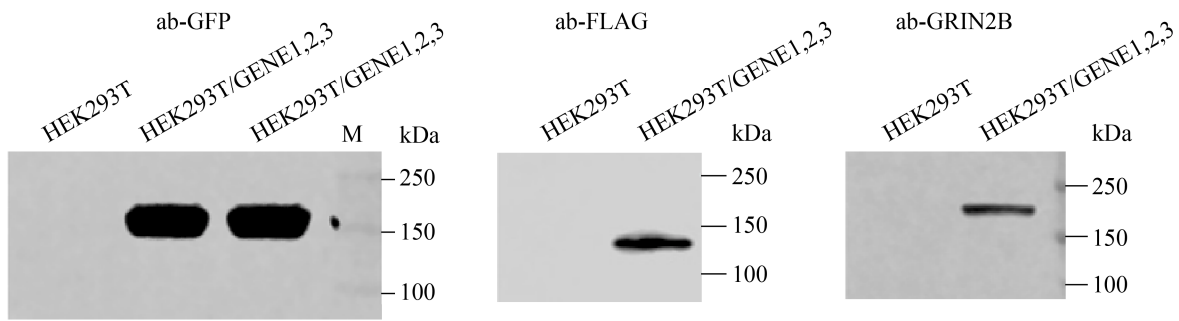


图 4 Western blotting 鉴定 293T- $\alpha 2\delta-1$ -GluN1/2B 细胞系结果

Figure 4 Western blotting detection of protein expression in 293T- $\alpha 2\delta-1$ -GluN1/2B cell line. The HEK293T and HEK293T/GENE1,2,3 showed the results of protein expression in the control and experimental group (293T- $\alpha 2\delta-1$ -GluN1/2B cell line), respectively.

物保藏中心, 保存号为 CCTCC NO: C2019189。

2.3 人胚肾细胞系 293T- $\alpha 2\delta-1$ -GluN1/2B 药物筛选系统的应用

采用全细胞记录方法进行 293T- $\alpha 2\delta-1$ -GluN1/2B 细胞电流的记录 (图 5)。药筛结果可通过比较细胞电流获得: $I_1 < I_0$ 表明候选药物有效; $I_0 = I_0'$ 表明候选药物为可逆抑制; $(I_0 - I_1)/(I_0' - I_2)$ 表征候选药物的效果。

CT-Tat 药物筛选的结果为: $I_0 = (840 \pm 16)$ pA, $I_1 = (510 \pm 17)$ pA, $I_0' = (848 \pm 19)$ pA, $I_2 = (560 \pm 22)$ pA,

其中, $I_1 < I_0$, $(I_0 - I_1)/(I_0' - I_2) = 1.15$, 表明 CT-Tat 有效, 且其与加巴喷丁相比, 对电流的抑制效果稍强。

Tat 药物筛选的结果为: $I_0 = (920 \pm 17)$ pA, $I_1 = (930 \pm 16)$ pA, $I_0' = (910 \pm 21)$ pA, $I_2 = (540 \pm 23)$ pA, 其中, $I_1 > I_0$, 表明候选药物 Tat 无效。

在之前的研究中发现 CT-Tat 药物可有效降低 SNL 大鼠的疼痛超敏反应, 证明本研究药物筛选结果与动物实验结果相符^[1]。

3 讨论

神经性疼痛是由于末梢或中神经系统的功能异常而导致的难治性疼痛, 是因外伤、感染、癌症、贫血、糖尿病、自身免疫性疾病等所引起的神经障碍。经大量研究, $\alpha 2\delta-1$ -NMDAR 复合物介入了多项病理机制, 在神经性疼痛疾病中发挥了重要的作用^[1,6-10]。突触前 NMDAR 活性的增加可以增强谷氨酸从初级传入神经末梢向脊髓背角神经元的释放, 这对于与创伤性神经损伤和化疗诱导的周围神经病引起的神经性疼痛相关的突触可塑性至关重要。此外, 之前被认为是钙通道亚单位的 $\alpha 2\delta-1$ 可以通过其 C 端直接与 NMDAR 相互作用, 通过促进

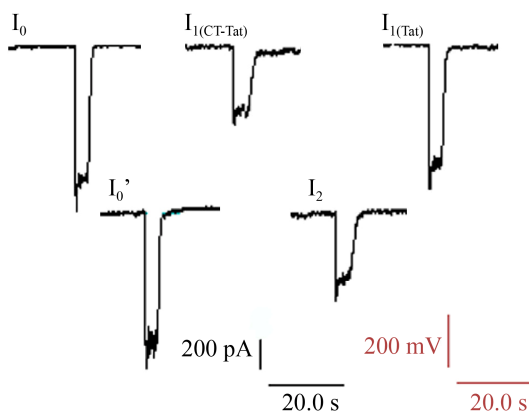


图 5 293T- $\alpha 2\delta-1$ -GluN1/2B 细胞株药物筛选细胞电流记录图

Figure 5 Cell current recording for drug screening in 293T- $\alpha 2\delta-1$ -GluN1/2B cell line.

$\alpha 2\delta$ -1-NMDAR 复合物在药物和神经病理疼痛中的突触传递来增加突触前 NMDAR 活性^[11]。因此,我们选择了穿膜序列 (Tat),该序列已在多个研究中应用^[14-17],设计了 $\alpha 2\delta$ -1 的 C 端序列带上穿膜序列 (Tat) 形成 CT-Tat 来干扰复合物的相互作用,并在前期实验中使用 SNL 大鼠证明了 CT-Tat 能有效降低疼痛超敏反应^[1]。

最新研究发现, *CACNA2D1* 基因与抑郁症、双相情感障碍和精神分裂症等精神疾病具有相关性,并显示由 *CACNA2D1* 基因编码的 $\alpha 2\delta$ -1 蛋白是潜在的药物靶向^[12-13]。有研究发现, $\alpha 2\delta$ -1 在 LTP 诱导和学习记忆中的 NMDAR 调节中也起关键作用,可为突触可塑性和相关的学习和记忆的分子机制提供新的见解^[2,18],这使 $\alpha 2\delta$ -1-NMDAR 复合物具有研究神经痛与其他精神疾病的关联性和遗传特性的潜力。

REFERENCES

- [1] Chen JJ, Li LY, Chen SR, et al. The $\alpha 2\delta$ -1-NMDA receptor complex is critically involved in neuropathic pain development and gabapentin therapeutic actions. *Cell Rep*, 2018, 22(9): 2307-2321.
- [2] Taylor CP, Harris EW. Analgesia with gabapentin and pregabalin may involve N-methyl-D-aspartate receptors, neurexins, and thrombospondins. *J Pharmacol Exp Ther*, 2020, 374(1): 161-174.
- [3] Mathieson S, Lin CWC, Underwood M, et al. Pregabalin and gabapentin for pain. *BMJ*, 2020, 369: m1315.
- [4] 赵序利, 许永广, 宋文阁, 等. 抗癫痫药物治疗神经病理性疼痛的对照研究. *中国疼痛医学杂志*, 2012, 18(2): 73-77.
Zhao XL, Xu YG, Song WG, et al. Clinical use of antiepileptic drugs in the management of chronic pain. *Chin J Pain Med*, 2012, 18(2): 73-77 (in Chinese).
- [5] 宋佳男, 于海波, 刘玉梅. 神经病理性疼痛的治疗和药物发现现状. *药学学报*, 2021, 56(3): 679-688.
Song JN, Yu HB, Liu YM. Current status of treatment and drug discovery for neuropathic pain. *Acta Pharmaceutica Sin*, 2021, 56(3): 679-688 (in Chinese)
- [6] Deng MC, Chen SR, Chen H, et al. $\alpha 2\delta$ -1-bound N-methyl-D-aspartate receptors mediate morphine-induced hyperalgesia and analgesic tolerance by potentiating glutamatergic input in rodents. *Anesthesiology*, 2019, 130(5): 804-819.
- [7] Ma HJ, Chen SR, Chen H, et al. $\alpha 2\delta$ -1 is essential for sympathetic output and NMDA receptor activity potentiated by angiotensin II in the hypothalamus. *J Neurosci*, 2018, 38(28): 6388-6398.
- [8] Luo Y, Ma H, Zhou JJ, et al. Focal cerebral ischemia and reperfusion induce brain injury through $\alpha 2\delta$ -1-bound NMDA receptors. *Stroke*, 2018, 49(10): 2464-2472.
- [9] Huang YY, Chen SR, Chen H, et al. Calcineurin inhibition causes $\alpha 2\delta$ -1-mediated tonic activation of synaptic NMDA receptors and pain hypersensitivity. *J Neurosci*, 2020, 40(19): 3707-3719.
- [10] Petrenko AB, Yamakura T, Baba H, et al. The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review. *Anesth Analg*, 2003, 97: 1108-1116.
- [11] Deng M, Chen SR, Pan HL. Presynaptic NMDA receptors control nociceptive transmission at the spinal cord level in neuropathic pain. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(10): 1889-1899.
- [12] Howard DM, Folkersen L, Coleman JRI, et al. Genetic stratification of depression in UK Biobank. *Transl Psychiatry*, 2020, 10: 163.
- [13] Ikeda M, Shimasaki A, Takahashi A, et al. Genome-wide environment interaction between depressive state and stressful life events. *J Clin Psychiatry*, 2016, 77(1): e29-e30.
- [14] Li X, Zheng L, Xia Q, et al. A novel cell-penetrating peptide protects against neuron apoptosis after cerebral ischemia by inhibiting the nuclear translocation of annexin A1. *Cell Death Differ*, 2019, 26(2): 260-275.
- [15] Wu H, You C, Chen F, et al. Enhanced cellular uptake of near-infrared triggered targeted nanoparticles by cell-penetrating peptide TAT for combined chemo/photothermal/photodynamic therapy. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 103: 109738.
- [16] Karagiota A, Kourti M, Simos G, et al. HIF-1 α -derived cell-penetrating peptides inhibit ERK-dependent activation of HIF-1 and trigger apoptosis of cancer cells under hypoxia. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(4): 809-825.
- [17] Rizzuti M, Nizzardo M, Zanetta C, et al. Therapeutic applications of the cell-penetrating HIV-1 Tat peptide. *Drug Discov Today*, 2015, 20(1): 76-85.
- [18] Zhou JJ, Li DP, Chen SR, et al. The $\alpha 2\delta$ -1-NMDA receptor coupling is essential for corticostriatal long-term potentiation and is involved in learning and memory. *J Biol Chem*, 2018, 293(50): 19354-19364.

(本文责编 郝丽芳)