

蜈蚣毒液中钾离子通道 Kv4.1 抑制剂 SsTx-P2 的分离和结构鉴定

杜灿伟¹, 袁复楚², 段心怡¹, 容明强², 孟 尔¹, 刘长军¹

1. 湖南科技大学生命科学与健康学院, 湖南 湘潭 411201

2. 湖南师范大学生命科学学院, 湖南 长沙 410006

[摘要] 目的: 挖掘蜈蚣毒液中的电压门控钾离子通道 Kv4.1 多肽抑制剂, 确定其一级结构, 并对其空间结构进行建模分析。方法: 利用离子交换层析和反相高效液相色谱对蜈蚣毒液的多肽组分进行分离纯化, 通过全细胞膜片钳技术鉴定能够抑制 Kv4.1 通道的多肽; 运用基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱鉴定多肽的分子量, 借助 Edman 降解测序和二维质谱测序确定多肽的一级结构; 基于迭代线程装配细化在线分析建立多肽空间结构模型。结果: 从蜈蚣毒液中分离纯化得到一条能够抑制 Kv4.1 通道的多肽 SsTx-P2, 分子量为 6122.8, 氨基酸序列为 NH₂-ELTWDFVRTCKLFPDKSECTKACATEFTGGDESRLKDVWPRKLRSRGLKD-OH, 其在 1.0 μmol/L 浓度下能够抑制 Kv4.1 通道超过 95% 的电流。空间结构模型显示, 多肽 SsTx-P2 拥有一个保守的螺旋结构。结论: 本文通过分离纯化从蜈蚣毒液中得到一条多肽 SsTx-P2, 能够强效抑制钾离子通道 Kv4.1, 其空间结构具有一定的保守性。



[关键词] 蜈蚣; 多肽; 钾离子通道; Kv4.1 通道抑制剂; 结构

[中图分类号] Q95 **[文献标志码]** A

Isolation and structural identification of a potassium ion channel Kv4.1 inhibitor SsTx-P2 from centipede venom

DU Canwei¹, YUAN Fuchu², DUAN Xinyi¹, RONG Mingqiang², MENG Er¹, LIU Changjun¹ (1. School of Life and Health Sciences, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, Hunan Province, China; 2. College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410006, China)

Corresponding author: LIU Changjun, E-mail: liuchangjun@hnust.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0001-5627-2812>

收稿日期 (Received): 2023-09-08 接受日期 (Accepted): 2023-12-04 网络预发表日期 (Online): 2024-01-25

基金项目 (Funding): 国家自然科学基金 (82304448); 湖南省教育厅基金优秀青年项目 (22B0482)

第一作者 (First author): 杜灿伟, 副教授, 主要从事动物活性多肽结构与功能研究; E-mail: ducw2022@163.com; <https://orcid.org/0000-0003-4722-9403>

通信作者 (Corresponding author): 刘长军, 副教授, 主要从事生物活性物质研究; E-mail: liuchangjun@hnust.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0001-5627-2812>

[**Abstract**] **Objective:** To isolate a potassium ion channel Kv4.1 inhibitor from centipede venom, and to determine its sequence and structure. **Methods:** Ion-exchange chromatography and reversed-phase high-performance liquid chromatography were performed to separate and purify peptide components of centipede venom, and their inhibiting effect on Kv4.1 channel was determined by whole-cell patch clamp recording. The molecular weight of isolated peptide Kv4.1 channel inhibitor was identified with matrix assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry; its primary sequence was determined by Edman degradation sequencing and two-dimensional mass spectrometry; its structure was established based on iterative thread assembly refinement online analysis. **Results:** A peptide SsTx-P2 was separated from centipede venom with the molecular weight of 6122.8, and its primary sequence consists of 53 amino acid residues NH₂-ELTWDFVRTCKLFPDKSECTKACATEFTGGDESRLKDVWPRKLRSGLDSRLKD-OH. Peptide SsTx-P2 potently inhibited the current of Kv4.1 channel transiently transfected in HEK293 cell, with 1.0 μmol/L SsTx-P2 suppressing 95% current of Kv4.1 channel. Its structure showed that SsTx-P2 shared a conserved helical structure. **Conclusion:** The study has isolated a novel peptide SsTx-P2 from centipede venom, which can potently inhibit the potassium ion channel Kv4.1 and displays structural conservation.

[**Key words**] Centipede; Peptide; Potassium channel; Kv4.1 channel inhibitor; Structure

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2024, 53(2): 194-200.]

[**缩略语**] 电压门控钾离子通道亚家族 Q 成员 (potassium voltage-gated subfamily Q member, KCNQ); 瞬时受体电位香草酸通道 (transient receptor potential vanilloid, TRPV); 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid, HEPES); 乙二醇二乙醚二胺四乙酸 (ethylene glycol tetraacetic acid, EGTA); 基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS); 反相高效液相色谱 (reversed-phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC); 离子交换层析 (ion exchange chromatography, IEC)

蜈蚣是蜈蚣科节肢动物,广泛分布于我国浙江、江苏、湖南和河南等地。作为一味传统中药材,蜈蚣具有息风止痉、通络止痛等功效。近年研究表明,蜈蚣毒液中的多肽成分具有治疗多种疾病的潜力,如 μ-SLPTX-Ssm6a 在啮齿目动物模型上显示出比吗啡更强的镇痛作用^[1]。蜈蚣的毒螫在蜈蚣进行种内竞争及捕食防御等生存斗争中发挥着重要作用。一方面,蜈蚣毒腺中的多肽毒素(如 SsTx 和 RhTx 等)作用于 KCNQ 和 TRPV1 离子通道等受体进而影响哺乳动物的神经系统、呼吸系统及心血管系统等^[2-3];另一方面,蜈蚣毒腺中存在的组织特异性可变剪切极大程度上降

低了毒素自我耐受程度^[4-5]。

钾离子通道是一类能够介导钾离子进出细胞的膜蛋白,广泛分布于人体内各类组织和器官^[6-8]。其中,电压门控钾离子通道 Kv4.1 属于 Shal 型钾离子通道家族,在心脏、大脑、肝脏及肾脏等组织中具有高丰度表达。在神经系统中,Kv4.1 能够限制动作电位反向传播,协助建立缓慢重复的尖峰放电,并促进信号放大和尖峰复极化;在心脏中,Kv4.1 参与突触传递、膜兴奋性和心肌细胞的复极化等多种生命活动^[9-12]。本研究通过分离纯化蜈蚣毒液获取到一条能够抑制 Kv4.1 通道的多肽分子 SsTx-P2,同时结合 Edman

降解测序和二维质谱分析对其一级结构进行分析,并借助于从头建模对多肽 SsTx-P2 的空间结构进行预测。本文不仅为 Kv4.1 通道研究提供了新型分子工具,同时可用于阐释蜈蚣利用毒液多肽进行捕食防御的生存策略。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

HEK293 细胞来自中国科学院昆明细胞库。少棘巨蜈蚣(*S. subspinipes mutilans*)毒液组分为早年研究获取的样品^[3]。氯化钠、氯化钾、氯化镁、氯化钙、氢氧化钠、氢氧化钾、葡萄糖、HEPES、EGTA、Edman 试剂(酚异硫氰酸)为美国 Sigma-Aldrich 公司产品;乙腈为美国 TEDIA 公司产品;三氟乙酸为奥地利 Biochemika 公司产品;其他试剂均为国产分析纯。滤膜(货号 GVWP04700)为美国 Merck 公司产品;超纯水机(型号 YTUP15S)为上海叶拓科技有限公司产品;低糖无血清培养基为索莱宝生物公司(中国)产品;脂质体 Lipofectamine 2000 为美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品。

高压液相色谱仪(型号 e2695,美国 Waters 公司);蛋白全自动纯化系统(型号 AKTA Explorer100,美国 GE 公司);蛋白测序仪(型号 PPSQ-31A,日本 Shimadzu 公司);MALDI-TOF-MS 质谱仪(德国 Bruker Daltonics 公司);冻干机(型号 CN-03353-13,美国 Labconco 公司);恒温培养箱(型号 3111,美国 Thermo 公司);高速冷冻离心机(型号 5810r,德国 Eppendorf 公司);膜片钳放大器(型号 EPC-10,德国 HEKA 公司);电极拉制仪(型号 P-97,美国 Sutter 公司);倒置荧光显微镜(型号 CKX53,日本 Olympus 公司);硼硅酸盐玻璃毛细管(货号 VWRI611-9194,美国 VWR 公司);RP-HPLC 色谱柱 C18(5 μ m 4.6 mm $\times$ 250 mm,美国 Sepax 公司);GEHiTrap 离子交换 S 柱(货号 17115201,美国 GE 公司)。

1.2 IEC 和 RP-HPLC 对蜈蚣毒液进行分离纯化

将 0.5 mg 的蜈蚣毒液组分溶解于 1 mL 离子交换 A 液(50 mmol/L Tris 盐酸缓冲液, pH 6.0)中,经 0.22 μ m 滤器过滤后,进样至离子交换 S 柱;开始用离子交换 A 液冲洗 10 min,随后按照每分钟递增 1% B 液(50 mmol/L Tris 盐酸缓冲液, 1 mol/L 氯化钠, pH 6.0)进行梯度洗脱 40 min,检测 215

nm/280 nm 波长下吸收值并进行组分收集。

通过 RP-HPLC 色谱,将上述收集得到的组分进一步纯化。进样至 C18 柱后,用 A 液(含有 0.1% 三氟乙酸的超纯水)平衡 C18 柱,然后按照每分钟递增 1% B 液(含有 0.1% 三氟乙酸的乙腈)进行梯度洗脱,检测 280 nm 波长下吸收值并进行组分收集。经冷冻干燥处理后,样品置于 -20 $^{\circ}$ C 储存备用。

1.3 采用 MALDI-TOF-MS 分析确定多肽的分子量

将获取的多肽样品溶解于超纯水中, MALDI-TOF-MS 仪经校准后,按照默认参数设定,对多肽样品进行分子量测定。

1.4 全细胞膜片钳技术鉴定多肽对 Kv4.1 通道的抑制作用

将细胞室培养良好的 HEK293 细胞培养至 70% 密度时进行转染,具体如下:在 1.5 mL 离心管中加入 100 μ L 低糖无血清培养液(opti-DMEM)和 5 μ L 脂质体 Lipofectamine 2000;将 100 μ L opti-DMEM 和 5 μ g 目的质粒加入另一个 1.5 mL 离心管中(同时加入 1 μ g eGFP 质粒)。室温静置 5 min,将以上两管溶液混匀后室温静置 20 min。HEK293 细胞培养液换成 2 mL opti-DMEM 培养液,将上述混合液滴入其中,轻轻晃匀。4 h 后用含有血清的 DMEM 培养液替换 opti-DMEM 培养液,置于 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳恒温细胞培养箱中培养过夜。

HEK293 钾离子通道细胞内液:145 mmol/L 氯化钾、1 mmol/L 氯化镁、10 mmol/L HEPES、5 mmol/L EGTA,使用氢氧化钾调节 pH 至 7.2,经 0.22 μ m 滤膜过滤;细胞外液:140 mmol/L 氯化钠、3 mmol/L 氯化钾、2 mmol/L 氯化钙、1.5 mmol/L 氯化镁、10 mmol/L HEPES、10 mmol/L 葡萄糖,使用氢氧化钠调节 pH 至 7.4,经 0.22 μ m 滤膜过滤。

选取细胞膜光滑、细胞质较均一、荧光较亮的细胞移至视野的中央。将电极安装在膜片钳电极臂上,向电极施加正压并将其降低到细胞外液中,然后进行液接电位补偿,随后在显微镜下将电极靠近细胞,当电阻增加 0.2~0.4 M Ω 时释放电极正压,加以负压。此时电极与细胞膜表面会形成高阻封接,电阻达到 1 G Ω 以上后进行快电容补偿;继续给电极施加负压,使细胞破膜。将细胞慢慢提起到灌流电极的下方,通过慢电容补偿

和串联电阻补偿将细胞钳制在相应钳制电流,细胞稳定后选择全细胞模式给予细胞刺激电压,记录电流。

1.5 采用Edman降解测序和二维质谱分析确定多肽的一级结构

将待测多肽样品与Edman试剂(酚异硫氰酸)预处理反应后加入到玻璃纤维膜片上,经偶联、环化裂解和转化,利用蛋白测序仪进行测序。将多肽样品经胰蛋白酶处理后,进行多肽片段化二维质谱分析。结合降解测序、降解测序结果和多肽的分子量确定多肽的一级结构。

1.6 基于迭代线程装配细化在线分析建立多肽空间结构模型

将多肽序列置于NCBI BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bblast.cgi>)中进行序列比对,下载比对到同源性较高的多肽;利用MEGA V. 10.1.8软件进行同源性比对,设定比对方法为MUSCLE (Multiple Protein Sequence Alignment),选定默认参数。

将多肽序列通过在线网站I-TASSER (<https://zhanggroup.org/i-tasser/>)进行迭代线程装配细化分析^[13],下载获取评分前三的结构模型,利用PyMOL进行可视化分析。多肽SsTx结构下载自PDB bank(PDB ID:5X0S)。

2 结果

2.1 蜈蚣毒液多肽 SsTx-P2 的分离纯化

对实验室前期获取的蜈蚣毒液样品进行活性测试后,将其中对 Kv4.1 通道有抑制作用的组分进行分离纯化。首先,利用 IEC 得到三个不同的组分峰(图 1A),然后利用 RP-HPLC 对其中的 2 号组分进行进一步的纯化分析。如图 1B, RP-HPLC 显示研究获得一个高纯度的多肽样品,命名为 SsTx-P2。MALDI-TOF-MS 测定多肽 SsTx-P2 的分子量为 6122.8(图 2A)。

2.2 多肽 SsTx-P2 抑制 Kv4.1 通道

将带有 Kv4.1 通道基因的质粒通过瞬时转染到 HEK293 细胞内,利用全细胞膜片钳技术检测多肽 SsTx-P2 对该通道的抑制作用。结果显示,1.0 μmol/L 浓度的 SsTx-P2 能够抑制 Kv4.1 通道超过 95% 的电流,表明 SsTx-P2 是一个强效的 Kv4.1 通道抑制剂(图 2B)。

2.3 多肽 SsTx-P2 的一级结构

运用 Edman 降解测序得到 SsTx-P2 氨基端的片段序列为 ELTWDFVRTCK。利用二级质谱分析获得多肽 SsTx-P2 的片段化序列,结合 Edman 降解测序结果及多肽分子量,推测多肽 SsTx-P2 的一级结构为 NH₂-ELTWDFVRTCKLFPKSECTKACATEFTGGDESRLKDVWPRKLRSGLSRDK-OH(附图 1)。SsTx-P2 含有四个半胱氨酸残基,结合 SsTx-P2 分子量,推测其可能形成两对分子内二硫键。

2.4 多肽 SsTx-P2 的空间结构模拟

同源性分析结果显示,多肽 SsTx-P2 与蜈蚣

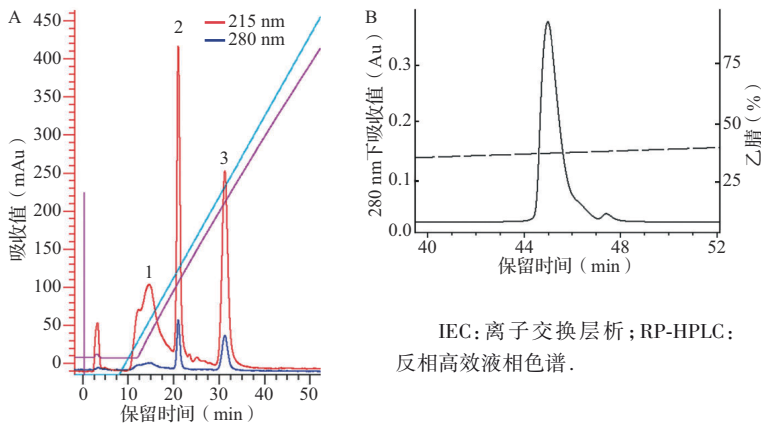


图1 经IEC(A)和RP-HPLC(B)纯化后获得多肽 SsTx-P2
Figure 1 Peptide SsTx-P2 was obtained by IEC (A) and RP-HPLC (B) purification

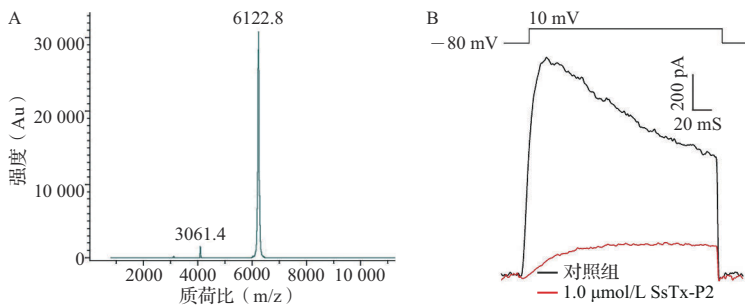


图2 多肽 SsTx-P2 的分子量(A)及对 Kv4.1 通道的抑制作用(B)
Figure 2 Determination of peptide SsTx-P2 molecular weight (A) and the inhibitory effect of peptide SsTx-P2 on Kv4.1 channel (B)

毒液中的多肽在某些片段的一级结构上存在高度的保守性,提示多肽 SsTx-P2 可能与蜈蚣中的其他毒素存在着共同的起源(图3)。

```

SsTx-P2 -- FPDKSECTKACATFTGGDESRLKDVWP-----
SsTx -- FPYKSECLKACATSTFTGGDESRIQEGKP-----
Ssm1a -- FPYKSECLKACATSTFTGGDESRIQEGKP-----
Ssm2a KKFA DRGECIRACAAKFDTGDL SKIKDVLPRYYK
Ssd3a -- FPYKSECRKACATFTFTGGDESRIKDVKP-----
Ssd3b -- FANRSYCIKT CATFTFTGGDESRIKDVRPRHYK
Ssd3c -- FPYKSECLKACAAAF TGGDESRIQEGKP-----
    
```

*经序列比对后,该位置氨基酸残基具有一致性。

图3 多肽 SsTx-P2 与几个蜈蚣多肽的保守序列比对

Figure 3 Alignment of conserved sequence in SsTx-P2 with its similar peptides

基于 I-TASSER 迭代线程装配细化分析结果,选取评分较高的三个多肽 SsTx-P2 空间结构进行分析,发现多肽 SsTx-P2 存在与蜈蚣毒素 SsTx 相似的螺旋结构,且其氨基末端和羧基末端均暴露在外(图4)。

3 讨论

有毒动物通过产生的毒液进行种内竞争和种间生存,以维持能够捕捉食物和防御天敌的能力,如蝎子、蜈蚣等^[14-16]。这些动物的毒液成分十分复杂,不仅仅含有小分子化合物,也有大量酶类蛋白质和多肽^[17-19]。如在蛇类中,毒液成分的90%以上是酶类蛋白质和多肽,这些物质作用途径广泛,作用系统复杂,为蛇类适应复杂环境提

供了强有力的工具^[20-22]。另外,人类通过对有毒动物毒液成分的分析改造,成功地开发了多类药物用以相关疾病的治疗,如卡托普利作为血管紧张素转化酶抑制剂用于治疗高血压和某些类型的充血性心力衰竭^[23]。

蜈蚣是节肢动物唇足纲中的一类,其锋利的螯肢是储存毒液的重要组织,也是进行生存斗争的重要武器^[24]。研究发现,蜈蚣毒液中存在大量多肽,这些多肽能够与哺乳动物体内的多种离子通道受体进行相互作用,进而影响机体的心血管系统和呼吸系统等。蜈蚣毒液中的 RhTx 通过作用于 TRPV1 通道的外孔区激活该通道而引起哺乳动物的疼痛不适^[2]。 μ -SLPTX-Ssm6a 能够选择性地作用于钠离子通道 NaV1.7,动物模型研究发现其具有比吗啡更好的镇痛效果^[1]。 ω -SLPTX-Ssm1a 是从蜈蚣毒液中发现的电压门控钙离子通道抑制剂^[25]。多肽 SsTx 能够通过其关键氨基酸残基 R12 和 K13 靶向啮齿目动物的 KCNQ 通道,破坏啮齿目动物的心血管系统、呼吸系统和神经系统等的稳定性,从而快速捕食体重数倍于自己的猎物^[3]。SsTx 还能够借助于不同的关键氨基酸残基(K11 和 K13)抑制 Kv1.3 通道^[26]。以上研究为靶向该通道相关疾病的治疗提供了一类新的探针分子。本研究通过对蜈蚣毒液的分离纯化及序列鉴定,获得了一个新型多肽 SsTx-P2,其在结构上与蜈蚣毒液中的几种多肽有着高度的相似性,提示 SsTx-P2 可能与这些多肽存在相似的起源。本文资料显示,SsTx-P2 能够有效抑制钾离子通道 Kv4.1,为钾离子通道 Kv4.1 的研究提供了一个新的探针分子。电压门控钾离子通道在结构上存在相似的孔区结构,蜈蚣毒液多肽 SsTx 能作用于 KCNQ4 通道和 Kv1.3 通道的孔区并对通道进行阻塞^[3, 26]。而 SsTx-P2 是否通过相似的机制对 Kv4.1 通道进行抑制及其对钾离子通道作用的选择性需要进一步探索。

离子通道是一类分布于

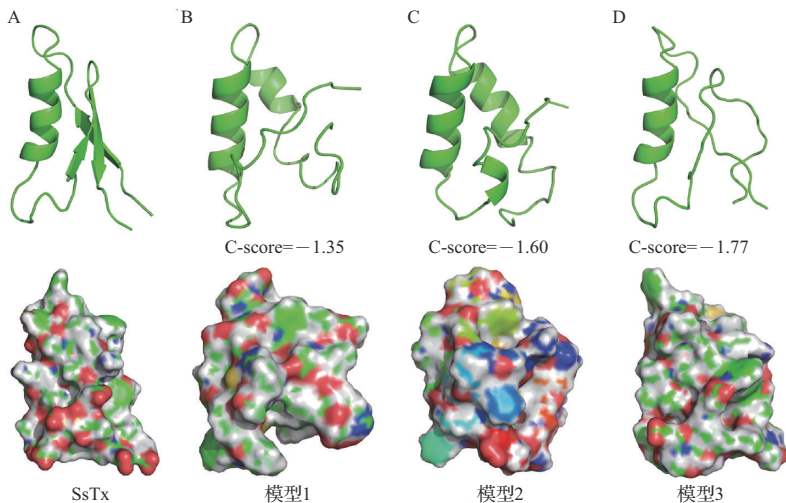


图4 多肽 SsTx-P2 的从头建模空间结构

Figure 4 Spatial structure of peptide SsTx-P2 by de novo modeling

细胞膜或细胞器膜上的受体蛋白,能够介导各类离子跨膜流动,在众多生命活动中发挥着不可或缺的作用。有毒动物毒液中含有大量能够作用于离子通道的活性成分,如蜘蛛中的多肽毒素能够作用于钠离子通道而使猎物产生麻痹状态^[2, 27-28]。受体的进化也能够使某些物种处于动物食物链更有利的一方,如蝎毒中的 α 毒素通过抑制钠通道的快失活控制了猎物的运动系统进而麻痹猎物,但同时蛙类自身钠通道上关键氨基酸残基的突变使其在捕食蝎子的过程中不发生运动系统的异常^[29]。Kv4.1通道是一类A型电压门控钾通道,具有在亚阈值膜电位下快速激活、快速失活和失活后快速恢复的特点。Kv4.1通道在心肌细胞中的功能障碍与多种心脏病有关,如心力衰竭和心房颤动等^[9];在神经元中,Kv4.1通道功能的丧失会导致神经性疼痛^[30]。而蜈蚣毒液中Kv4.1通道的多肽抑制剂较少报道。本文资料显示,多肽SsTx-P2能够抑制外源性表达的Kv4.1通道,提示该分子可能影响细胞的膜电位和神经传导,推测其通过抑制Kv4.1通道进而可能在蜈蚣进行捕食或防御中发挥重要的作用。

综上所述,本文通过对蜈蚣毒液的分离纯化得到了一个新多肽分子SsTx-P2;通过Edman降解测序和二维质谱拼接分析明确了多肽SsTx-P2的一级结构,基于迭代线程装配细化分析构建了多肽SsTx-P2的空间结构模型。多肽SsTx-P2能够有效抑制外源性表达的Kv4.1通道,为Kv4.1通道的研究提供了一个新的探针分子。

本文附图见电子版。



志谢 研究得到国家自然科学基金(82304448)和湖南省教育厅基金优秀青年项目(22B0482)支持

Acknowledgements The study was supported by the National Natural Science Foundation of China (82304448) and Scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Department (22B0482)

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2024. This is an open access article under the

CC BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

参考文献(References)

- [1] YANG S, XIAO Y, KANG D, et al. Discovery of a selective NaV1.7 inhibitor from centipede venom with analgesic efficacy exceeding morphine in rodent pain models[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(43): 17534-17539.
- [2] YANG S, YANG F, WEI N, et al. A pain-inducing centipede toxin targets the heat activation machinery of nociceptor TRPV1[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8297.
- [3] LUO L, LI B, WANG S, et al. Centipedes subdue giant prey by blocking KCNQ channels[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(7): 1646-1651.
- [4] YANG S, WANG Y, WANG L, et al. Target switch of centipede toxins for antagonistic switch[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(32): eabb5734.
- [5] WANG Y, YIN C, ZHANG H, et al. Venom resistance mechanisms in centipede show tissue specificity[J]. *Curr Biol*, 2022, 32(16): 3556-3563.e3.
- [6] JENSEN M Ø, JOGINI V, BORHANI D W, et al. Mechanism of voltage gating in potassium channels[J]. *Science*, 2012, 336(6078): 229-233.
- [7] HUANG X, JAN L Y. Targeting potassium channels in cancer[J]. *J Cell Biol*, 2014, 206(2): 151-162.
- [8] URREGO D, TOMCZAK A P, ZAHED F, et al. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2014, 369 (1638): 20130094.
- [9] YUNOKI T, TAKIMOTO K, KITA K, et al. Differential contribution of Kv4-containing channels to A-type, voltage-gated potassium currents in somatic and visceral dorsal root ganglion neurons[J]. *J Neurophysiol*, 2014, 112(10): 2492-2504.
- [10] KISE Y, KASUYA G, OKAMOTO H H, et al. Structural basis of gating modulation of Kv4 channel complexes [J]. *Nature*, 2021, 599(7883): 158-164.
- [11] KUO Y L, CHENG J K, HOU W H, et al. K(+) channel modulatory subunits KChIP and DPP participate in Kv4-mediated mechanical pain control[J]. *J Neurosci*, 2017, 37(16): 4391-4404.
- [12] ANDERSON D, MEHAFFEY W H, IFTINCA M, et al. Regulation of neuronal activity by Cav3-Kv4 channel signaling complexes[J]. *Nat Neurosci*, 2010, 13(3): 333-337.
- [13] ZHOU X, ZHENG W, LI Y, et al. I-TASSER-MTD: a deep-learning-based platform for multi-domain protein structure and function prediction[J]. *Nat Protoc*, 2022, 17(10): 2326-2353.
- [14] BOHLEN C J, CHESLER A T, SHARIF-NAEINI R, et al. A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain[J]. *Nature*, 2011, 479(7373): 410-414.

- [15] ZHANG Y. Why do we study animal toxins[J]. **Zool Res**, 2015, 36(4): 183-222.
- [16] ALMEIDA D D, VIALA V L, NACHTIGALL P G, et al. Tracking the recruitment and evolution of snake toxins using the evolutionary context provided by the Bothrops jararaca genome[J/OL]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2021, 118(20): e2015159118.
- [17] YUAN F, LI S, HUANG B, et al. Molecular mechanism by which spider-driving peptide potentiates coagulation factors[J]. **Biomed Pharmacother**, 2023, 166: 115421.
- [18] YANG S, LIU Z, XIAO Y, et al. Chemical punch packed in venoms makes centipedes excellent predators [J]. **Mol Cell Proteomics**, 2012, 11(9): 640-650.
- [19] WEI X S, LIU L Z, BIAN X L, et al. Protein composition of extracellular vesicles from skin secretions of the amphibian *Bombina maxima*[J]. **Zool Res**, 2022, 43 (4): 687-690.
- [20] OLIVEIRA A L, VIEGAS M F, DA SILVA S L, et al. The chemistry of snake venom and its medicinal potential [J]. **Nat Rev Chem**, 2022, 6(7): 451-469.
- [21] OLAOBA O T, KARINA DOS SANTOS P, SELISTRE-DE-ARAUJO H S, et al. Snake venom metalloproteinases (SVMPs): a structure-function update[J]. **Toxicon X**, 2020, 7: 100052.
- [22] TASOULIS T, ISBISTER G K. A review and database of snake venom proteomes[J]. **Toxins (Basel)**, 2017, 9 (9): 290.
- [23] MOHAMED ABD EL-AZIZ T, GARCIA SOARES A, STOCKAND J D. Snake venoms in drug discovery: valuable therapeutic tools for life saving[J]. **Toxins (Basel)**, 2019, 11(10): 564.
- [24] LIU Z C, LIANG J Y, LAN X Q, et al. Comparative analysis of diverse toxins from a new pharmaceutical centipede, *Scolopendra mojiangica*[J]. **Zool Res**, 2020, 41(2): 138-147.
- [25] LUO A, WANG A, KAMAU P M, et al. Centipede venom: a potential source of ion channel modulators [J]. **Int J Mol Sci**, 2022, 23(13): 7105.
- [26] DU C, LI J, SHAO Z, et al. Centipede KCNQ inhibitor SsTx also targets $K_v1.3$ [J]. **Toxins (Basel)**, 2019, 11 (2): 76.
- [27] YANG S, YANG F, ZHANG B, et al. A bimodal activation mechanism underlies scorpion toxin-induced pain[J/OL]. **Sci Adv**, 2017, 3(8): e1700810.
- [28] YUAN F C, SUN F D, ZHANG L, et al. General mechanism of spider toxin family I acting on sodium channel Nav1.7[J]. **Zool Res**, 2022, 43(5): 886-896.
- [29] LI B, SILVA J R, LU X, et al. Molecular game theory for a toxin-dominant food chain model[J]. **Natl Sci Rev**, 2019, 6(6): 1191-1200.
- [30] MA D, ZHAO C, WANG X, et al. Structural basis for the gating modulation of $K_v4.3$ by auxiliary subunits [J]. **Cell Res**, 2022, 32(4): 411-414.

[本文编辑 沈 敏 余 方]

· 学术动态 ·

徐平龙教授团队合作成果揭示细胞衰老的天然免疫识别调控及其在肝纤维化中的关键功能

2024年2月28日,《科学·进展》(*Science Advances*)在线刊登了浙江大学生命科学研究院徐平龙、冯新华、沈立教授与杭州市肿瘤医院的夏冰教授合作成果“IRF3 activates RB to authorize cGAS-STING-induced senescence and mitigate liver fibrosis”(DOI:10.1126/sciadv.adj2102)。研究解析了天然免疫识别信号诱导细胞衰老的新机制,阐明了其限制肝纤维化进展的重要意义。

研究人员在DNA损伤、复制压力、氧化压力等多种刺激因素诱导的细胞衰老中发现环鸟苷酸-腺苷酸合成酶(cGAS)-干扰素基因刺激因子(STING)通路的关键转录因子干扰素调节因子3(IRF3)有重要作用。IRF3与关键的细胞周期调控蛋白视网膜母细胞瘤蛋白(RB)形成核内复合物,激活RB,驱动细胞进入衰老状态。机制上,IRF3通过与RB互作形成IRF3-RB-E2F1复合体,从而阻碍CDK4/6-cyclin D1-RB复合体的形成,因此保持RB在低磷酸化的活化状态能阻滞细胞周期,从而诱导细胞衰老。功能上,STING-IRF3-RB信号轴推动活化的肝星状细胞进入衰老状态,产生衰老相关分泌表型并减少胶原分泌。全身性IRF3基因敲除或在肝星状细胞中条件性敲除IRF3均加剧了肝纤维化水平。此外,应用CDK4/6抑制剂则能缓解IRF3缺失加剧的肝纤维化。

论文第一作者为吴芑柔博士、冷小红博士研究生。研究得到国家自然科学基金、国家重点研发计划等资助。