

· 综 述 ·

乙酰胆碱结合蛋白的特点及应用

林 波, 高炳森, 孟海玲, 邴 暉, 吴 勇, 长孙东亭, 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, 中国海南 海口 570228)

摘 要: 乙酰胆碱结合蛋白(acetylcholine-binding proteins, AChBPs)的基本特征、结构特点和激活机制与烟碱型乙酰胆碱受体(the nicotinic acetylcholine receptor, nAChRs)相似. 通过对 AChBPs 晶体结构与功能的研究, 能准确阐明 nAChRs 结构与功能的关系. 通过对配体和 AChBPs 的复合物的晶体结构解析, 有助于我们理解配体与 nAChRs 相互作用的机理, 为开发治疗疼痛、成瘾、帕金森症、阿尔茨海默氏症和癫痫等疾病的新药提供理论基础.

关键词: 乙酰胆碱结合蛋白; 烟碱型乙酰胆碱受体; 晶体结构

中图分类号: Q512⁺. 2

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2013)05-0436-05

The Characterization and Application of Acetylcholine Binding Proteins

LIN Bo, GAO Bing-miao, MENG Hai-ling, BIN Hui,
WU Yong, ZHANGSUN Dong-ting, LUO Su-lan*

(Key Laboratory for Tropical Biological Resources, Ministry of Education; Key Laboratory for Marine Drugs of Haikou, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China)

Abstract: Acetylcholine-binding proteins (AChBPs) have been identified from different snails, including *Lymnaea stagnalis*, *Aplysia californica* and *Bulinus truncatus*. As structural homologues of the nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), AChBPs have similar characteristics and activation mechanism of nAChRs. Therefore, the crystal structure of AChBPs can provide a structural basis for understanding the structure and function of nAChRs, which would be useful to design new drugs for pain, addiction, Parkinson disease, Alzheimer's disease, and epilepsy etc.

Key words: acetylcholine-binding proteins; nicotinic acetylcholine receptors; crystal structure

(*Life Science Research*, 2013, 17(5): 436~440)

烟碱型乙酰胆碱受体(the nicotinic acetylcholine receptor, nAChRs) 是配体门控的离子通道蛋白(ligand-gated ion channel). nAChRs 具有多种亚型, 主要分布于神经节细胞膜和骨骼肌细胞膜上. 作为新药开发的靶点, nAChRs 的研究在阿尔茨海默氏病, 精神分裂症和帕金森氏病等疾病治疗和机理研究中具有十分重要的作用^[1-6]. 2005 年, 电

子显微镜显示了电鳐发电器官 nAChR (*Torpedo* nAChR)的初级三维结构^[7](见图 1a), 研究揭示 nAChRs 的整体形状和尺寸, 配体结合的位点和离子通道等. 最近 4.6 Å 分辨率 X-ray 又揭示了乙酰胆碱结合口袋, 其被 7 个 β -折叠结构所包围, 这与圆二色的测量表明配体结合结构域主要为 β -折叠结构的结果相符合. 虽然这些低分辨率手段

收稿日期: 2013-03-03; 修回日期: 2013-04-19

基金项目: 国家国际科技合作专项项目(2011DFR31210); 国家 863 计划项目(2012AA021706); 国家自然科学基金资助项目(81160503); 长江学者和创新团队发展计划项目(IRT1123); 海南大学青年基金资助项目(qnjj1010)

作者简介: 林波(1970-), 男, 海南乐东人, 博士研究生, 主要从事蛋白质结构研究; * 通讯作者: 罗素兰(1969-), 女, 四川营山人, 海南大学教授, 博士生导师, Tel: 0898-66289538, E-mail: luosulan2003@163.com.

让我们对 nAChRs 的基本轮廓有所了解,然而到目前为止,人们尚未能清楚解析这些膜蛋白的 X-ray 结构.乙酰胆碱结合蛋白(AChBPs)与 nAChRs 的膜外配体结合结构域具有同源性(见图 1a、b).在

过去的 12 年,多个 AChBPs 及其与配体结合的复合物的晶体结构已被解析.对这些晶体结构的分析有助于我们理解 nAChRs 的结构和功能的关系,并为新药开发提供理论基础.

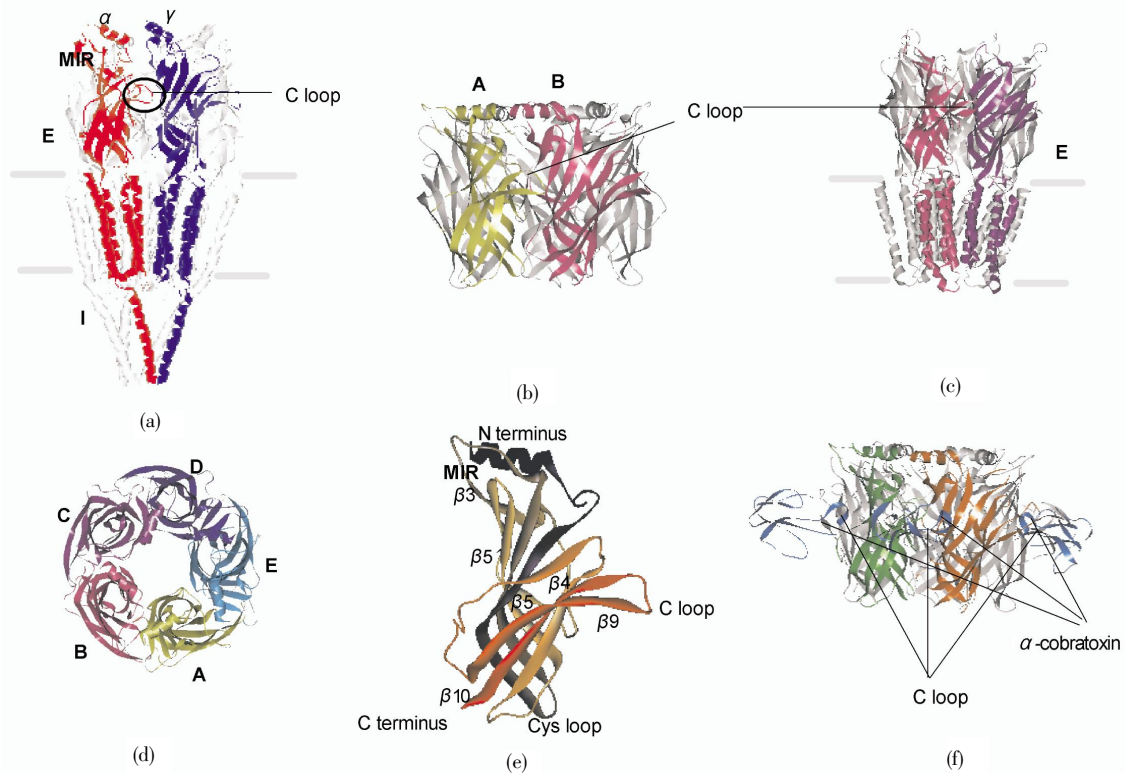


图 1 AChBPs、*Torpedo* AChR、细菌离子通道 GLIC 的三维结构图

(a) 电子显微镜显示 *Torpedo* AChR 初级三维结构模型,其 PDB 代码为 2BG9,它由 α 、 β 、 δ 、 α 、 γ 5 个亚基组成,这里只突出显示强调了 α 亚基(红)与亚基 γ (蓝色),配体结合部位用圆圈表示.横杠表示细胞胞膜,E 表示胞外结构,I 表示胞内结构;(b) 从垂线方向看 AChBPs 五聚体,其 PDB 代码为 1Y9B.图中突出显示强调了 A(黄色)与 B(红色)两个原体及其接触面;(c) 细菌离子通道 GLIC 开放的三维结构,其 PDB 代码为 3EHZ;(d) 从顶部方向看 AChBPs 五聚体,每个原体以 A、B、C、D、E 和不同的颜色表示,AB、BC、CD、DE、EA 表示 5 个原体(亚基)的接触面,也是配体结合位点;(e) AChBPs 原体(亚基)结构概貌图.在一个完整的离子通道中,N 端指向突触间隙,C 端将进入膜,一直持续到跨膜结构域;(f) AChBPs 与眼镜蛇神经毒素的共结晶结构(PDB 1YI5).

Fig.1 Three-dimensional structures of AChBPs, AChR and bacterial ligand-gated ion channels

(a) Structural model of the acetylcholine receptor from the *Torpedo* electric organ (PDB 2BG9), only the front two subunits are highlighted (α , red; γ , blue); ligand-binding domain was highlighted in cycle, horizontal bars indicated the cell membrane (E, extracellular; I, intracellular); (b) Viewing the AChBPs pentamer perpendicular to the five-fold axis (PDB 1Y9B), only the front two subunits are highlighted only in the A (yellow) — B (red) interface; (c) X-ray structure of GLIC with the channel apparently open (PDB 3EHZ); (d) Viewing the AChBPs pentamer perpendicular from top. Each protomer representation is A, B, C, D, E and has a different colour. Subunits are labelled clockwise, with AB, BC, CD, DE and EA forming ligand-binding sites; (e) Overview of the AChBPs protomer structure. In a complete ion channel the N terminus would point towards the synaptic cleft and the C terminus would enter the membrane at the bottom, continuing into the first transmembrane domain; (f) Crystal structural of AChBPs complex with α -cobratoxin (PDB 1YI5).

在新药开发中,我们需要了解 nAChRs 配体结合结构域的具体特征及与不同配体结合的情况,这就需要研究它与配体共结晶的情况.由于 nAChRs 是跨膜蛋白,目前尚未获得完整的晶体.因此,要找到一种容易得到完整晶体的蛋白来代替 nAChRs,目前主要是通过乙酰胆碱结合蛋白

(AChBPs) 的晶体结构来研究 nAChRs 的结构. AChBPs(见图 1b)是水溶性蛋白,相对分子质量在 30 kD 左右,它的功能又与 nAChRs 相似,调节突触传递.它没有跨膜结构,因此较易纯化和得到完整的晶体结构. AChBPs 已经被证明与 nAChRs 具有同源的配体结合结构域和相同药理特性^[8-15].

作为研究的模板, AChBPs 不但可以帮助我们研究 nAChRs, 还使我们了解细菌的配体门控通道(见图 1c), 细菌的配体门控通道只比 AChBPs 多出一个跨膜结构, 但它又比 nAChRs 少一个胞内结构. 通过三者比较我们可以看出 AChBPs 是配体门控通道家族中最简单、原始的蛋白. 本文通过 AChBPs 的基本特征、结构特点和激活机制来说明它与 nAChRs 的关系, 并阐明了这些方面的研究进展及在新药开发中的应用.

1 AChBPs 的基本特征

目前, 已纯化与鉴别出 3 种 AChBPs, 它们结构相基本相同, 它们分别是 *Lymnaea stagnalis*、*Aplysia californica*、*Bulinus truncatus*, 简称为 Ls-AChBP、Ac-AChBP、Bt-AChBP, 已知与 nAChRs 结合的激动剂和竞争性拮抗剂如乙酰胆碱、尼古丁、筒箭毒碱、 α -银环蛇毒素、 α -芋螺毒素等都与 AChBPs 结合^[1]. 因此, AChBPs 可用来作为研究 nAChRs 的配体结合结构域及结合方式. AChBPs 含有 210 个氨基酸残基, 形成稳定的五聚体. 与 nAChRs 的配体结合结构域很相似.

图 2 比较了 3 种 AChBPs 与人类同源神经型 $\alpha 7$ 亚基蛋白序列比对. 结果显示, 它们总的相似率为 30%, 3 种 AChBPs 残基在 C loop 处 (127~140 残基之间) 高度保守. 而 nAChRs 的残基在这一区域与 AChBPs 残基不相同, 在 nAChRs 中, 这一区域是与跨膜结构相联接的部位, 但在 AChBPs 中, 缺乏 nAChRs 的跨膜区和胞内结构, 它们只是水溶性蛋白, 所以它们在这个区域有一些区别. 其它区域 AChBPs 的残基与 nAChRs 家族的残基相类似, 所有 nAChRs 家族的保守的残基 (包括那些具有与配体结合的残基) 都存在于 AChBPs 中.

2 AChBPs 的结构特点

如图 1(d)所示, AChBPs 是由 5 个原体(亚基)组成的, 形状像小孩玩的风车, 而每个原体像风车的一个花瓣, 每个原体相互连接, 形成接触面, 5 个亚基分别用 A、B、C、D、E 表示, 形成了 AB、BC、CD、DE、EA 5 个接触面, 这 5 个接触面是配体结合位点. AChBPs 每个亚基的 N 端位于顶部, 而 C 端位于底部. 在 nAChRs 中, 也是类似的结构, 只不过多了跨膜结构域和胞内结构, 跨膜结构域是从配体结合结构域 C 端开始的. 假如我们

把 AChBPs 看成是 nAChRs 配体结合结构域, 那它也是从 C 端开始进入跨膜结构域, 从图 1 (e)中可清楚地看到从 β 链的尾部 $\beta 10$ 处(C 端)开始进入跨膜结构域^[1].

在肌肉型的 nAChRs 中, 主要的免疫原区域 (MIR)位于 $\alpha 7$ 亚基残基 67~76 处, MIR 在自身免疫性疾病—重症肌无力中是一个抗原表位. 在 AChBPs 五聚体的顶部处也有相关的 MIR 区域(见图 1a、e), 也位于亚基残基 67~76 处, 尽管在 AChBPs 中这个区域的残基与 $\alpha 7$ 同源的序列较少(见图 2), 但它与电子显微镜下研究的 nAChRs 的 MIR 区域位置相符合, 也位于受体的远前端^[16, 17].

AChBPs 五聚体的中心孔隙由带电荷的残基构成, 具有亲水性. 在中心孔隙的周边有 5 个大的口袋, 这些口袋的入口处由不带电荷、疏水的 β 链($\beta 3$ 、 $\beta 4$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 5'$)构成(见图 1e), 这个区域与离子通道开放或关闭有关. 同样, 在 4.6 Å 分辨率下观察 *Torpedo* AChR, 也看到类似这种结构^[18].

AChBPs 的两个亚基接口—C loop 处有一些小口袋, 这些口袋是由不同的残基排列而成的, AChBPs 与不同的配体共结晶结构显示, 它是配体结合位点. 在 nAChRs 受体中, 这个位置也存在一些口袋, 从五聚体中心垂线看, 这些口袋(功能区)就在其球蛋白赤道的附近, 大约离 C 端有 30 Å 的距离, 电镜中观察 *Torpedo* AChR 的这个位置就是配体结合位点^[1]. 同样, 通过同位素标记和电镜分析, 口袋中的残基被证明参与配体结合的过程, 因此进一步确定是结合位点^[19].

3 AChBPs 的激活机制与应用

在 nAChRs 中配体结合结构域的位置是保守的, 但实际上每个残基是变化的, 由于进化产生不同亚型的受体, 各种亚型的受体与不同的配体相结合. 然而, 所有 nAChRs 的配体结合结构域有一个共同的功能, 就是激活膜通道, 如 nAChRs 的配体结合结构域能激活五羟色胺膜通道等^[20]. 所以在烟碱型乙酰胆碱受体(nAChRs)的配体结合结构域中, 这种激活机制是保守的. 通过 AChBPs 与配体共晶体的研究, 更多的观点认为激活机制是来自配体结合结构域的 C loop 处的变化^[21].

AChBPs 与配体结合时, C loop 发生了变化, 比如 Celie 等在研究中观察到 AChBPs 与芋螺毒素 α -cobratoxin 结合时, AChBPs 的 C loop 打开(向外移动), 而与尼古丁结合时 C loop 关闭(向内

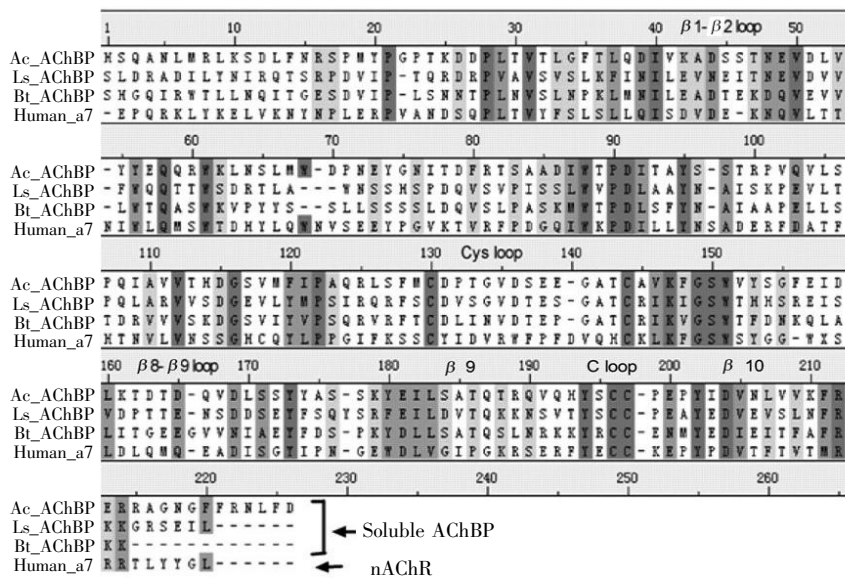


图 2 Ac-AChBP、Ls-AChBP、Bt-AChBP 3 种 AChBPs 的蛋白序列和人类 nAChRs 的 $\alpha 7$ 比对
 Fig.2 Three soluble binding proteins from *Aplysia californica*, *Lymnaea stagnalis* and *Bulinus truncatus* are aligned with human nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunits

移动)^[20, 21, 24]。在 nAChRs 中 C loop 的这种变化是离子通道的开关信号。比如 nAChRs 与 α -cobratoxin 结合时 C loop 向外移动, 好像是要避开配体一样, 是结合拮抗剂时引起离子通道关闭的表现。与配体氨基乙酰胆碱和尼古丁结合时, 其 C loop 向内移动, 好像是要拥抱配体一样, 是结合激动剂时引起离子通道打开的表现。在 EM 中观察到 nAChRs 的 C loop 这种变化信号会通过 $\beta 9$ - $\beta 10$ 发夹传到膜通道, 同时伴随大的亚基也发生扭转。

AChBPs 的 X-ray 结构帮助我们更好了解 nAChRs 的 EM 结构及结合位点, 比如通过 AChBPs 的结构, 就可以看出配体与 nAChRs 结合时, C loop 向内移动, 这种移动使 Arg 209 与 Glu 45 形成盐桥, Val 46 靠近跨膜片段 M2 和 M3 上残基 Pro 272 和 Ser 269, 从而开放通道。这种信号转导方式在配体门控离子通道家族中似乎是共同的, 因为在 γ -氨基丁酸和 5-羟色胺受体与配体结合时, Pro272 也发生构象变化^[21]。

氨基乙酰胆碱和尼古丁、芋螺毒素, α -cobratoxin 等与 AChBPs 复合物的晶体表明, 配体主要与 C loop 附近的芳族氨基酸残基相互作用, 而且每种配体的空间结构不同, 结合位点可能不同, 改变配体的特点, 可以增加它对 nAChRs 亚基的选择性。比如 Se' bastien D 等通过分析芋螺毒素与 AChBPs 的晶体结构发现: 含有 Leu 10、Arg 5 残基的芋螺毒素(比如 TxIA)与 AChBPs 亲和力较大, 主要是这种芋螺毒素中 Arg 5 残基与 AChBPs 中

的 Asp 195 残基形成盐桥, Leu 10 残基与 AChBPs 的一个疏水位置结合。

在以上研究的基础上, Se' bastien D 等突变另外一种芋螺毒素 PnIA, 即把它的 Leu 5 残基突变为 Arg 5 残基, Ala 10 残基突变为 Leu 10 残基, 结果, 突变体 PnIA (Leu 5 Arg, Ala 10 Leu)对 AChBPs 和 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs 的亲和力都增大 200 倍, 大大增加了它对 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs 的选择性。nAChRs 的不同亚基具有不同的生理作用, 所以增加 nAChRs 亚基的选择性可以改变药物的药效和药理作用^[22]。

4 结语

AChBPs 的基本特征、结构特点和激活机制与 nAChRs 相似。AChBPs 与 nAChRs 的配体结合域具有同源性, 它们的各亚基的接触面, 主要免疫原区(MIR)的部位, 结合位点的位置, 基本一致。AChBPs 晶体结构信息使我们更具体地了解 nAChRs。通过 AChBPs 与 nAChRs 的激动剂或拮抗剂的共结晶研究, 可以揭示了 nAChRs 与这些配体结合时的结构与功能的变化, 及其如何激活膜信号, 这些研究大量应用在与 nAChRs 相关疾病的新药开发和设计^[4]。

例如, AChBPs 与激动剂尼古丁和氨基乙酰胆碱共结晶研究 (PDB 1UV6), 不同 AChBPs 与芋螺毒素共结晶研究 (PDB 2C9T, 2BR8)^[23, 24], AChBPs 与眼镜蛇神经毒素的共结晶研究(PDB 1Y15, 见图

1f)^[25], AChBPs 与部分激动剂如洛贝林共结晶研究(PDB 2BYS)^[26]等. 比较这些不同的晶体结构, 揭示了配体结合时受体构象发生了变化, 解释配体为什么能兴奋受体或拮抗受体. 在治疗疼痛、成瘾、帕金森症、阿尔茨海默氏症和癫痫等疾病的新药开发中, 这种研究得到广泛的应用.

虽然目前还不清楚 AChBPs 是否也具有 nAChRs 的变构和脱敏功能, 非竞争拮抗剂结合位点是否在 AChBPs 存在. AChBPs 是在自然界中存在的水溶性蛋白, 它产生并存储在神经胶质细胞中, 并释放进入突触间隙, 它的功能是调节突触传递, 但它缺乏跨膜通道, 因此, 配体与其结合时不会有打开跨膜通道的功能. 还有, 不是所有的 nAChRs 结合模型都能用 AChBPs 来解释, 比如 α -bungarotoxin. 与 nAChRs 结合时, 还与 $\alpha 1$ 上的糖基结合等. 但是, 在 AChBPs 进化过程中还是保存 nAChRs 的一些功能, 它还是研究 nAChRs 方便而有效的工具^[27-31].

研究 AChBPs 的晶体结构与功能不但有利于我们对 nAChRs 的了解, AChBPs 的晶体结构也适用于研究 γ -氨基丁酸, 5-羟色胺受体等. 广义上讲, AChBPs 与配体门控离子通道家族的配体结合结构域具有同源性^[27-30]. 配体门控离子通道家族包括 nAChRs, γ -氨基丁酸受体、甘氨酸受体、谷氨酸受体及 5-羟色胺受体等. AChBPs 帮助我们了解这些受体与配体结合的特点, 有利于我们开发相关的新药, 如 AChBPs 应用于开发止吐药(作用于 5-羟色胺受体)和控制情绪药(作用于 γ -氨基丁酸受体)等. 总之, AChBPs 是对配体门控离子通道家族的配体结合结构域的具体解释, AChBPs 是研究配体门控离子通道家族有效而方便的工具, 是开发与这类受体相关的新药所必需的模板^[31-33].

参考文献(References):

- [1] BREJC K, SMIT A B, SIXMA T K, *et al.* Crystal structure of ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors[J]. *Nature*, 2001, 411(6835): 269-276.
- [2] HAGA K, KRUSE A C, ASADA H, *et al.* Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist[J]. *Nature*, 2012, 482(7386): 547-551.
- [3] BUCHAPUDI K, XU X, ATAIAN Y, *et al.* Micromechanical measurement of AChBP binding for label-free drug discovery[J]. *Analyst*, 2011, 137(1): 263-268.
- [4] KOMBO D C, MAZUROV A, TALLAPRAGAD A K, *et al.* Docking studies of benzylidene anabaseine interactions with $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) and acetylcholine binding proteins (AChBPs): application to the design of related $\alpha 7$ selective ligands[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 46(11): 5625-5635.
- [5] TURABEKOVA M A, RASULEV B F, DZHAKHANGIROV F N, *et al.* Aconitum and delphinium alkaloids of curare-like activity. QSAR analysis and molecular docking of alkaloids into AChBP[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 45(9): 3885-3894.
- [6] BOURNE Y, RADIC Z, ARÁOZ R, TALLEY T T, *et al.* Structural determinants in phycotoxins and AChBP conferring high affinity binding and nicotinic AChR antagonism[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107 (13): 6076-6081.
- [7] UNWIN N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 346(4): 967-989.
- [8] WEST A P, BJORKMAN P J, DOUGHERTY D A, *et al.* Expression and circular dichroism studies of the extracellular domain of the alpha subunit of the nicotinic acetylcholine receptor[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(41): 5468-5473.
- [9] SCHRATTENHOLZ A. Expression and renaturation of the N-terminal extracellular domain of Torpedo nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunit[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(49): 32393-32399.
- [10] MIYAZAWA A, FUJIYOSHI Y, STOWELL M, *et al.* Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 288(4): 765-786.
- [11] WELLS G B, ANAND R, WANG F, *et al.* Water-soluble nicotinic acetylcholine receptor formed by alpha 7 subunit extracellular domains[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(2): 964-973.
- [12] TIERNEY M L, UNWIN N. Electron microscopic evidence for the assembly of soluble pentameric extracellular domains of the nicotinic acetylcholine receptor[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 303(2): 185-196.
- [13] GEITMANN M, RETRA K, DEKLOE G E, *et al.* Interaction kinetic and structural dynamic analysis of ligand binding to acetylcholine-binding protein[J]. *Biochemistry*, 2010, 49(37): 8143-8154.
- [14] OLIVERA B M, QUIK M, VINCLER M, *et al.* Subtype-selective conopeptides targeted to nicotinic receptors: Concerted discovery and biomedical applications[J]. *Channels*, 2008, 2(2): 143-152.
- [15] NICKE A, WONNACOTT S, LEWIS R J. Alpha-conotoxins as tools for the elucidation of structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271(12): 2305-2319.
- [16] ANSEN S B, TALLEY T T, RADIC Z, *et al.* Structural and ligand recognition characteristics of an acetylcholine-binding protein from *aplysia californica*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(23): 24197-24202.
- [17] TZARTOS S J, CUNG M T, DEMANGE P, *et al.* The main immunogenic region (MIR) of the nicotinic acetylcholine receptor and the anti-MIR antibodies[J]. *Molecular Neurobiology*, 1991, 5(1): 1-29.
- [18] FERNAND O, VALENZUELA C, WEIGN P, *et al.* Transverse distance between the membrane and the agonist binding sites on the Torpedo acetylcholine receptor: a fluorescence study[J]. *Biophysical Journal*, 1994, 66(3 Pt 1): 674-682.
- [19] WESTERMANN J C, CLARK R J, CRAIK D J. Binding mode of alpha-conotoxins to an acetylcholine binding protein determined by saturation transfer difference NMR[J]. *Protein & Peptide Letters*, 2008, 15(9): 910-914.
- [20] CELIE P H, van ROSSUM-FIKKERT S E, van DIJK W J, *et al.* Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures[J]. *Neuron*, 2004, 41(6): 907-914.
- [21] VICTOR T, FERDINAND H. Nicotinic acetylcholine receptors at atomic resolution[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2009, 9(3): 306-310.

- ment of a tissue-engineered vascular graft combining a biodegradable elastomeric scaffold and muscle-derived stem cells in a rat model[J]. *Tissue Engineering, Part A*, 2010, 16(4): 1215-1223.
- [22] KANE N M, XIAO Q, BAKER A H, *et al.* Pluripotent stem cell differentiation into vascular cells: a novel technology with promises for vascular re (generation)[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2011, 129(1): 29-49.
- [23] FERRETTI C, BORSARI V, FALCONI M, *et al.* Human periosteum-derived stem cells for tissue engineering applications: the role of VEGF[J]. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2012, 8(3): 882-890.
- [24] NING H, LIU G, LIN G, *et al.* Fibroblast growth factor 2 promotes endothelial differentiation of adipose tissue-derived stem cells[J]. *Journal of Sexual Medicine*, 2009, 6(4): 967-979.
- [25] GAENGEL K, GENOVE G, ARMULIK A, *et al.* Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis[J]. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2009, 29(5): 630-638.
- [26] SAHARINEN P, EKLUND L, MIETTINEN J, *et al.* Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and cell-matrix contacts[J]. *Nature Cell Biology*, 2008, 10(5): 527-537.
- [27] OSWALD J, BOXBERGER S, J RGENSEN B, *et al.* Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells *in vitro*[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(3): 377-384.
- [28] MOBY V, LABRUDE P, KADI A, *et al.* Polyelectrolyte multilayer film and human mesenchymal stem cells An attractive alternative in vascular engineering applications[J]. *Journal of Biomedical Materials Research, (Part A)*, 2011, 96(2): 313-319.
- [29] LASCHKE M, SCHANK T, SCHEUER C, *et al.* Three-dimensional spheroids of adipose-derived mesenchymal stem cells are potent initiators of blood vessel formation in porous polyurethane scaffolds[J]. *Acta Biomaterialia*, 2013, 9(6): 6876-6884.
- [30] HASHI C K, ZHU Y, YANG G Y, *et al.* Antithrombotic property of bone marrow mesenchymal stem cells in nanofibrous vascular grafts[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2007, 104(29): 11915-11920.
- [31] YUAN L, SAKAMOTO N, SONG G, *et al.* Migration of human mesenchymal stem cells under low shear stress mediated by mitogen-activated protein kinase signaling[J]. *Stem Cells and Development*, 2012, 21(13): 2520-2530.
- [32] YUAN L, SAKAMOTO N, SONG G, *et al.* High-level shear stress stimulates endothelial differentiation and VEGF secretion by human mesenchymal stem cells[J]. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 2013, 6(2): 220-229.
- [33] ZHANG P, MOUDGILL N, HAGER E, *et al.* Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells from elderly patients with cardiovascular disease[J]. *Stem Cells and Development*, 2011, 20(6): 977-988.
- [34] LARGHERO J, FARGE D, BRACCINI A, *et al.* Phenotypical and functional characteristics of *in vitro* expanded bone marrow mesenchymal stem cells from patients with systemic sclerosis[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2008, 67(4): 443-449.
- [35] ZHAO Y, ZHANG S, ZHOU J, *et al.* The development of a tissue-engineered artery using decellularized scaffold and autologous ovine mesenchymal stem cells[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(2): 296-307.
- [36] MEIRELLES LDA S, FONTES A M, COVAS D T, *et al.* Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2009, 20(5-6): 419-427.
- [37] SHIN'OKA T, MATSUMURA G, HIBINO N, *et al.* Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells[J]. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2005, 129(6): 1330-1338.
- [38] GUIDUCCI S, PORTA F, SACCARDI R, *et al.* Autologous mesenchymal stem cells foster revascularization of ischemic limbs in systemic sclerosis: a case report[J]. *Annals of Internal Medicine*, 2010, 153(10): 650-654.
- [39] GHARAIBEH B, DROWLEY L, HUARD J. *Stem Cells and Regenerative Medicine*[M]. New York: Humana Press, 2011. 565-578.

(上接第 440 页)

- [22] SE' BASTIEN D, CHRIS U, REGINA B, *et al.* AChBP-targeted α -conotoxin correlates distinct binding orientations with nAChR subtype selectivity[J]. *The EMBO Journal*, 2007, 26(16): 3858-3867.
- [23] ULENS C, HOGG R C, CELIE P H, *et al.* Structural determinants of selective α -conotoxin binding to a nicotinic acetylcholine receptor homolog AChBP[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(10): 3615-3620.
- [24] CELIE P H, KASHEVEROV I E, MORDVINTSEV D Y, *et al.* Crystal structure of nicotinic acetylcholine receptor homolog AChBP in complex with an α -conotoxin PnIA variant[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2005, 12(7): 582-588.
- [25] BOURNE Y, TALLEY T, HANSEN S B, *et al.* Crystal structure of a Cbtx-AChBP complex reveals essential interactions between snake α -neurotoxins and nicotinic receptors[J]. *The EMBO Journal*, 2005, 24(8): 1512-1522.
- [26] HANSEN S B, SULZENBACHER G, HUXFORD T, *et al.* Structures of Aplysia AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations[J]. *The EMBO Journal*, 2005, 24(20): 3635-3646.
- [27] SMIT A B, SYED N I, SCHAAP D, *et al.* A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission[J]. *Nature*, 2001, 411(6835): 261-268.
- [28] LUO S, NGUYEN T A, CARTIER G E, *et al.* Single-residue alteration in α -conotoxin PnIA switches its nAChR subtype selectivity[J]. *Biochemistry*, 1999, 38(44): 14542-14548.
- [29] CELIE P H, KLAASSEN R V, van ROSSUM-FIKKERT S E, *et al.* Crystal structure of acetylcholine-binding protein from *Bulinus truncatus* reveals the conserved structural scaffold and sites of variation in nicotinic acetylcholine receptors[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(28): 26457-26466.
- [30] EISELE J L. Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities[J]. *Nature*, 1993, 366(6454): 479-483.
- [31] AZAM L, MCINTOSH J M. α -conotoxins as pharmacological probes of nicotinic acetylcholine receptors[J]. *Acta Pharmaceutologica Sinica*, 2009, 30(6): 771-783.
- [32] BILLEN B, SPURNY R, BRAMS M, *et al.* Molecular actions of smoking cessation drugs at $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors defined in crystal structures of a homologous binding protein[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(23): 9173-9178.
- [33] GEITMANN M, RETRA K, DE KLOE G E, *et al.* Interaction kinetic and structural dynamic analysis of ligand binding to acetylcholine binding protein[J]. *Biochemistry*, 2010, 49(37): 8143-8154.