

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.21.007

尼古丁受体 CHRNA5 亚基突变对其功能影响的初步研究*

彭芳¹ 王懿春¹ 廖广园^{1Δ} 洪玮² 杨嘉琳¹ 高元妹¹

(1 广州医科大学附属第三医院重症医学科 广东 广州 510150;

2 广州医科大学附属第一医院呼吸疾病国家重点实验室 广东 广州 510120)

摘要 目的:研究 CHRNA5 亚基突变对尼古丁受体功能的影响。**方法:**通过 RT-PCR 克隆 CHRNA5 基因片段,并通过重叠延伸 PCR 方法对 CHRNA5 亚基基因定点突变,从而构建 CHRNA5 突变型及野生型表达载体,然后转染至 HEK293T 细胞中,检测其基因表达。并将其分别与 CHRNA3 和 CHRNB4 共转至 HEK293T 细胞中,检测三质粒共转后的基因表达;通过采用尼古丁持续灌流细胞 10 min,然后检测细胞内钙离子内流峰值的变化情况,接下来检测突变对转染后细胞活力的影响。**结果:**构建的 CHRNA5 表达载体在转染 HEK293T 细胞 48 h 后,能够检测到绿色荧光蛋白的表达,这证明重组载体已成功转染进 HEK293T 细胞;通过 RT-PCR 检测出转染细胞 CHRNA5 mRNA 表达,这证明 CHRNA5 突变型和野生型均在 HEK293T 细胞中成功进行了表达。通过尼古丁灌流细胞实验显示突变组和野生型组 F340/F380 峰值变化均值分别为 0.865 ± 0.048 和 0.447 ± 0.127 ,突变体组峰值显著高于野生型组 ($P < 0.05$)。细胞活力检测实验发现 0.01 mM 和 0.1 mM 尼古丁刺激下突变组的细胞活力峰值分别为 139% 和 137%,显著高于野生型的 124% 和 126%,有显著差异 ($P < 0.05$)。**结论:**本研究成功构建了 CHRNA5 突变及野生型真核表达载体,发现 CHRNA5 的突变会导致其受体功能性改变,并影响细胞活力。

关键词:尼古丁受体; CHRNA5; 细胞活力

中图分类号:R-33;Q593;Q813 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)21-4033-05

A Preliminary Research about the Mutation of CHRNA5 on Effects of nAChR Function*

PENG Fang¹, WANG Yi-chun¹, LIAO Guang-yuan^{1Δ}, HONG Wei², YANG Jia-lin¹, GAO Yuan-mei¹

(1 Intensive Care Unit, The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510150, China;

2 The State Key Laboratory of Respiratory Diseases, The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510120, China)

ABSTRACT Objective: This study investigated the effect of CHRNA5 mutant on nicotinic acetylcholine receptors. **Methods:** To cloned the fragments of CHRNA5 by RT-PCR. Overlap extension PCR was utilized for site-directed mutagenesis, to construct eukaryotic expression vector of CHRNA5 mutant. The vectors were transfected into the HEK293T cell, to detect the gene expression. Co-transfected either all three wild-type human $\alpha 3$, $\beta 4$ and $\alpha 5$ DNAs or the $\alpha 5$ SNP and wild type $\alpha 3$, $\beta 4$ into HEK293T cells. Nicotine was used to continuously perfuse the cells for 10 minutes, to detect the changes in the peak value of intracellular calcium influx and the effect of mutation on cell viability. **Results:** CHRNA5 mutation and wild gene fragments were successfully expressed in HEK293T cells, the expression of green fluorescent protein was successfully detected after 48 hours. The CHRNA5 mRNA expression in the transfected cells was detected by RT-PCR, indicating that the mutant and wild-type of CHRNA5 gene were successfully expressed in HEK293T cells. The nicotine perfusion cell experiment showed that the mean values of F340/F380 peak changes in the mutant group and the wild-type group were 0.865 ± 0.048 and 0.447 ± 0.127 , respectively. The peak values of the mutant group were significantly higher than those of the wild-type group ($P < 0.05$). Cell viability testing experiments found that the peak values of cell viability after the stimulation of 0.01 mM and 0.1 mM nicotine in the mutant group were 139% and 137%, which were significantly higher than those of 124% and 126% in the wild-type group ($P < 0.05$). **Conclusions:** This study successfully constructed the eukaryotic expression vectors of mutant and unmutated CHRNA5 gene. It confirmed that the mutation of CHRNA5 may cause functional changes related to nicotine receptors and affected the cell viability.

Key words: Nicotinic acetylcholine receptors; CHRNA5; Cell viability

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q593; Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)21-4033-05

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82000045)

作者简介:彭芳(1988-),女,主治医师,主要研究方向:重症孕产妇救治与呼吸疾病,E-mail: pengfang8810@163.com

Δ 通讯作者:廖广园(1981-),男,主治医师,主要研究方向:呼吸危重症,E-mail: icusjps@126.com,电话:020-81292258

(收稿日期:2021-02-06 接受日期:2021-02-28)

前言

烟碱型乙酰胆碱受体 (nicotinic acetylcholine receptor, nAChR), 又称为尼古丁受体, 通过与尼古丁结合而发挥其作用, 在哺乳动物细胞中广泛表达且发挥多种调节功能, 属于配体门控离子通道家族^[1-3]; 其编码 $\alpha 3, \alpha 5$ 和 $\beta 4$ 亚基的 CHRNA3-CHRNA5-CHRNA4 基因簇与吸烟相关性肺癌和慢性阻塞性肺部疾病的发生和发展都高度相关^[3-6]; 其中, 尤其是编码 $\alpha 5$ -nAChR 的 CHRNA5 亚基的突变与相关疾病的关系更为密切^[6-8]。因此, 对该基因簇多态性的功能研究对构建相关肺部疾病模型, 研究其发病机制具有重要意义。同时, 多态性中 rs16969968 位点核苷酸变化可引起 CHRNA5($\alpha 5$)编码蛋白质变化, 但 CHRNA5 亚基突变是否引起尼古丁受体功能改变, 则有待进一步研究。因此, 本文将初步研究尼古丁受体 CHRNA5 亚基突变对其功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人胚胎肾上皮细胞株 HEK293T 细胞购自于莱德尔生物公司; 人的原代气道上皮细胞购自于美国 Sciencell 公司; 大肠杆菌 DH5a, 逆转录试剂盒, PCR 试剂盒购自于日本 TAKARA 公司; PGEM-T EasyVector Systems 及慢病毒表达载体 EX-Q0146-LV201 购自复能基因公司; 基因片段扩增引物的设计及合成均由上海英潍捷基公司合成; 脂质体转染试剂脂质体 2000、Opti-MEM 培养基、Trizol 试剂购于美国 Invitrogen 公司; 多克隆抗体均购自于 Abcam 公司; 购于日本 TAKARA 公司; 尼古丁(nicotine)粉末购自于美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染 体外细胞培养 HEK293T 细胞, 当细胞汇合度为 70%左右时候, 将质粒野生或者突变型 CHRNA5 与 CHRNA3 及 CHRNA4 以 1:1:1 的摩尔比, 总质粒量 1.5 μ g, 与 Lip2000 脂质体以 1:2 的比例进行转染, 5-6h 后进行培养基更换, 转染 48 h 后, 红绿荧光标记蛋白表达。将转染好的 HEK293T 细胞, 置于 Axio.Imager.Z2 显微扫描分析系统, 200 倍高倍显微镜视野下进行观察。分别于 380 nm 和 550 nm 处, 固定某一视野, 分别观察绿色和红色荧光并拍照, 以判断三质粒共转染及红绿荧光蛋白重合表达的情况。

1.2.2 免疫荧光定位分析目的基因表达 以 CHRNA5 野生或者 CHRNA5 突变体转染 HEK293T 细胞, 48 h 后, 使用 PBS 进行漂洗 3 次, 5 min/次, 然后使用 4%多聚甲醛固定大约 20 min, 接着 PBS 再次漂洗 3 次, 5 min/次, Tripton-100 0.5%通透 10 min, 然后以含 0.2%吐温的 PBS 洗片 3 次, 5 min/次。使用 3%BSA 进行室温封闭 2 h 后, 以免抗人多克隆抗体 CHRNA5 ($\alpha 5$) 1:1000 稀释, 并 4℃环境孵育过夜。使用驴抗兔的二抗以 1:2500 进行稀释, 室温, 避光孵育 2 h, 使用 0.2%的 TBST 对玻片进行清洗 3 次, 5 min/次。最后滴加抗荧光猝灭封片剂进行封片, 并 4℃环境孵育过夜, 避光保存, Axio Imager Z2 显微扫描分析系统, 200 倍高倍镜下进行观察扫描。

1.2.3 CHRNA5 野生及突变体钙离子浓度峰值测定 尼古丁是尼古丁受体的激动剂, 采用尼古丁灌流转染包含 CHRNA5

野生或者 CHRNA5 突变亚基的尼古丁受体的 HEK293T 细胞。采用梯度浓度 100 μ M, 500 μ M, 1 mM, 2 mM, 5 mM 的尼古丁序贯灌流转染好的 HEK293T 细胞。根据梯度灌流实验结果, 选取适宜浓度的尼古丁灌流转染包含 $\alpha 5$ 野生或者 $\alpha 5$ 突变的尼古丁受体的 HEK293T 细胞, 比较灌流后引起的钙内流峰值的差异。具体方法为: 通过 20 $\times$ 水镜(Nikon Diaphot TMD 显微镜), 分别使用 340 nm 和 380 nm 的激发波长, 510 nm 的发射波长激发荧光, 钙离子浓度水平通过 F340/F380 双波长的荧光比值来反应。每 12s 获取图片一张, 通过钙离子荧光成像软件分析系统记录整个灌流过程 F340/F380 的荧光比值变化情况。

1.2.4 细胞活力检测 采用 CCK8 法检测细胞活力, 具体方法为: 常规细胞培养人气道平滑肌细胞, 当细胞生长融合达到 70%左右时候, 即更换为培养基配制的不同浓度梯度(WSC: 0.1-50 μ g/mL; CSC: 0.1-80 μ g/mL)凝集物, 每孔 100 μ L, 处理 24 h。向各孔中加入 CCK-8 试剂各 10 μ L, 37℃继续孵育约 4 h。此时观察到孔中的培养基颜色由粉红色变为橙黄色, 在酶联检测仪 450 nm 波长处检测各孔的吸光度值(OD 值)。细胞活力百分比(%)=(处理组的吸光度平均值-对照组的吸光度平均值)/对照组的吸光度平均值 $\times$ 100%。

1.3 数据分析处理

采用 SPSS 16.0 软件包对结果进行统计学分析。组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 被认为有显著性差异。

2 结果

2.1 CHRNA5 定点突变

以原代人气道平滑肌细胞总 RNA 为模板, 反转录克隆得到 CHRNA5 的全长片段, 经序列比对, 序列同源性为 99%, 证实其为 CHRNA5 ORF 全长序列。采用重叠延伸扩增出 CHRNA5 突变全长片段, 并进行了初筛, 转化, T 载体连接, 测序。经序列比对, 序列同源性为 99%, 证实其定点突变位点 G 转变为 A, 从天冬氨酸 GAT 突变为天冬酰胺 AAT, 见图 1。

第 398 位氨基酸天冬氨酸转变为天冬酰胺, 会导致 CHRNA5($\alpha 5$)蛋白质的一级结构发生变化。因天冬氨酸属于酸性氨基酸, 天冬酰胺为极性中性氨基酸, 此改变引起氨基酸极性改变, 可能影响到其二级, 以及三级结构, 从而影响到其受体功能。

2.2 CHRNA5 野生及突变体在 HEK293T 细胞中表达水平检测

重组慢病毒 CHRNA5 表达载体在转染 HEK293T 细胞 48 h 后, 空载体组(图 2A,B), 突变组(图 2C,D)和未突变组(野生组)(图 2E,F)的光镜和荧光表达均见图 2 中所示。三组均可见绿色荧光蛋白表达, 表明构建的重组载体成功转染进 HEK293T 细胞, 见图 2。

采用 RT-PCR 检测转染细胞 CHRNA5 mRNA 表达, 突变体(Mutant)及野生体(Wild Type, WT)转染组均扩增出 CHRNA5 目标条带 1524bp, 空载体转染(Control)组未扩增出 CHRNA5 目标条带, 见图 3。这表明 CHRNA5 基因转染 HEK293T 细胞后进行了转录表达。

2.3 尼古丁 2 mM 灌流后钙离子内流测定

采用 2 mM 的尼古丁持续灌流细胞 10 min, 发现灌流过程中转染突变体组(图 4 A)及野生体组(图 4 B)后均出现胞内的

钙离子浓度变化,但空白未转染组(图 4 C)未出现钙离子内流峰。以 F340/F380 的荧光数值变化来反映胞内钙离子浓度变化情况,结果显示突变组和野生型组 F340/F380 峰值变化均值分

别为 0.865 ± 0.048 和 0.447 ± 0.127 , 即突变体组峰值显著高于野生型组 ($P < 0.05$), 见图 4。

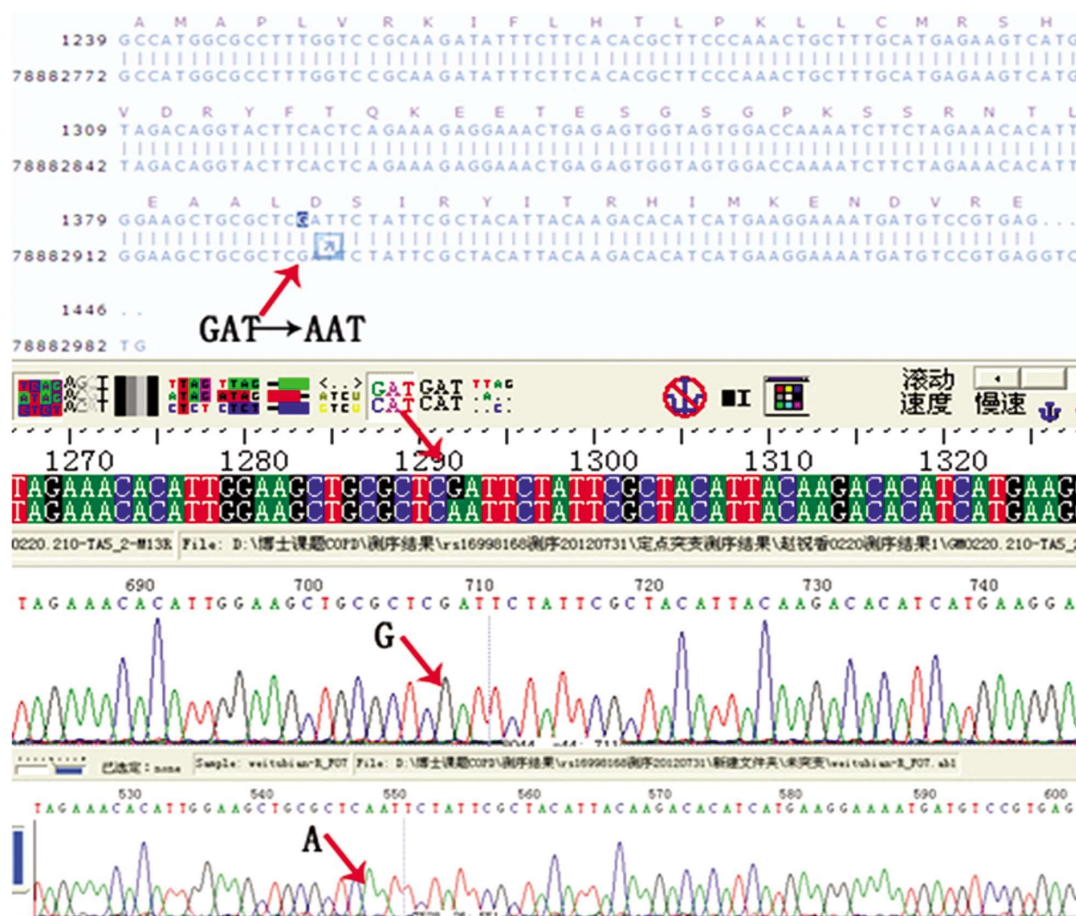


图 1 CHRNAS5 定点突变

Fig.1 Site-Directed Mutagenesis of CHRNAS5

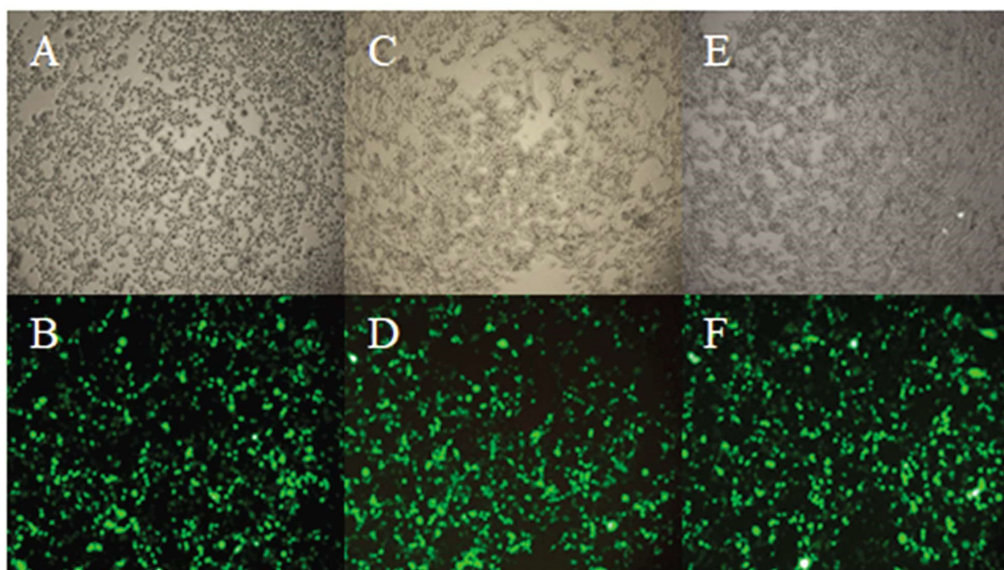


图 2 重组载体转染 HEK293T 细胞

Fig.2 Transfection of recombinant vector into HEK293T cells

2.4 不同浓度尼古丁下的细胞活力

将构建的突变 CHRNAS5 或野生 (未突变)CHRNAS5 与

CHRNAS3, CHRNA4 质粒共同转染进 HEK293T 细胞, 48 h 后, 转染好的细胞采用 0.01 mM 和 0.1 mM 浓度的尼古丁处理, 研

究其对细胞活力的影响。检测发现 0.01 mM 和 0.1 mM 尼古丁刺激下突变组的细胞活力峰值分别为 139%和 137%,显著高于野生组的 124%和 126%,有显著差异($P<0.05$),见图 5。这表明 CHRNA5 发生突变后使细胞对尼古丁的刺激反应显著增加。

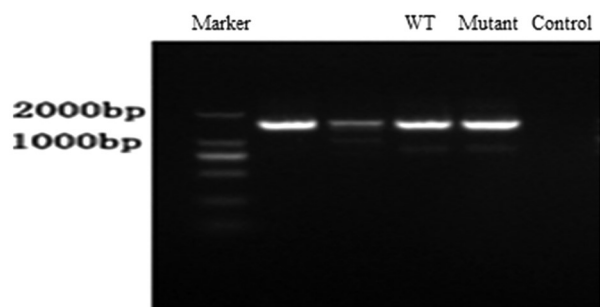


图 3 RT-PCR 检测转染细胞 CHRNA5 mRNA 表达
Fig.3 The RT-PCR detection of CHRNA5 mRNA expression in transfected cells

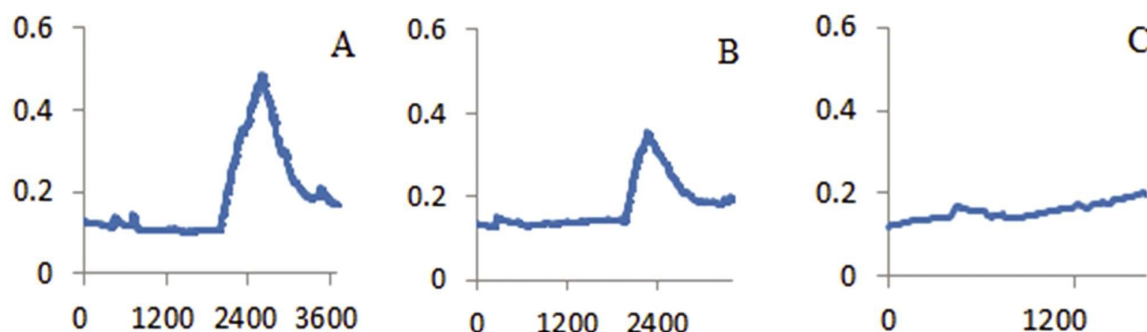


图 4 尼古丁灌流细胞后钙离子浓度变化
Fig.4 Ca^{2+} imaging of transfected cell after nicotine perfusion

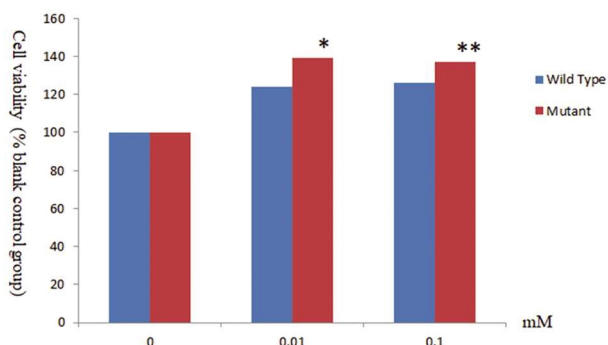


图 5 不同浓度尼古丁下的细胞活力
Fig.5 Cell viability under different concentrations of nicotine

3 讨论

尼古丁受体主要分为神经型和肌肉型两种亚型,其主要结构特征为由 17 种亚单位即 $\alpha 1$ -10, $\beta 1$ -4, δ , ϵ 和 γ 联合组成的五聚体^[9-12]。其中最常见五聚体组合为 $\alpha 4\alpha 5\beta 2$, $\alpha 3\alpha 5\beta 4$, 以及同源性的 $\alpha 7$ 五聚体,前者主要位于中枢神经系统,后两者主要位于周围神经系统以及外周组织中,主要以离子通道的形式控制细胞内外的 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} 的流动^[13-16]。

尼古丁可能模拟乙酰胆碱通过分布于神经系统以及人体各组织的尼古丁受体,从而参与相关性疾病的发生及发展^[17,18]。外周神经系统中,CHRNA5 亚基的表达与 CHRNA3-CHRNA4

共同结合形成 CHRNA3-CHRNA5-CHRNA4 尼古丁受体,其在神经细胞及非神经细胞中均有表达,如自主神经节后细胞,支气管上皮,气道上皮等^[19-21]。CHRNA5 是尼古丁成瘾和肺癌的重要易感性基因位点,有研究认为 CHRNA5 的减少与细胞存活率降低,细胞凋亡增加以及不同癌症的细胞运动性改变相关^[22-24],但对于 CHRNA5 亚基的突变是否影响了 CHRNA3-CHRNA5-CHRNA4 尼古丁受体的功能,目前还并不是十分清楚。

本研究证实了 CHRNA5 亚基的突变会引起氨基酸极性改变,从而影响到其二级及三级结构,并最终可能导致其受体功能发生变化。接下来,我们使用重叠延伸 PCR 法,成功进行基因定点突变构建成功未突变(野生)和突变 CHRNA5 真核表达载体;以适宜浓度的尼古丁灌流,通过采用细胞内钙离子荧光成像系统来检测 CHRNA3-CHRNA5-CHRNA4($\alpha 3\alpha 5\beta 4$)未突变(野生)和突变体钙离子内流变化的生理学功能差异情况,发

现 2 mM 的尼古丁灌流条件下,野生体和突变体引起的钙内流峰值存在差异。突变体钙内流峰值高于其未突变体。Tam-mimaki 等研究 CHRNA5 D398N 多态性对人胚肾细胞中人 $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ 烟碱型乙酰胆碱受体特性的影响时,也发现了钙离子行为存在明显差异^[25]。我们的结果间接反应 CHRNA5 的点突变在一定程度上可能影响尼古丁受体 $\alpha 3\alpha 5\beta 4$ 对胞内游离钙离子内流渗透的敏感性或者快速脱敏性,而钙离子在神经细胞中参与递质的释放,非神经细胞中作为第二信使参与细胞的增殖、黏附、迁移、分泌,凋亡等,那么分布该受体的非神经细胞,肺上皮、气道上皮细胞等可能通过受体对钙离子开放速度及程度的改变而参与影响上皮细胞的迁移、增殖、转分化等;我们通过比较了两者对细胞活力的影响,发现突变体相对于野生型对细胞的活力有显著的促进作用,这进一步反应突变影响了细胞的生存状态。

目前关于 CHRNA5(rs16969968)亚基突变的研究主要是通过外源性表达于 HEK293T 或者蟾蜍卵母细胞系统,并且这些研究结果中有部分又是相互矛盾的,因此目前对 $\alpha 5$ 亚基发挥的具体调节作用及其机制仍然不清楚^[26-28]。本研究中我们通过构建外源表达尼古丁受体野生型和突变型 $\alpha 3\alpha 5\beta 4$ 的 HEK293T 细胞,探讨 $\alpha 5$ 亚基突变对受体功能的影响,认为位点的突变可影响外源尼古丁受体刺激下细胞的胞内游离钙离子行为,并影响了细胞的生存状态,这在人源细胞系中初步证

实了 CHRNA5 亚基的突变会导致受体功能改变。因此,本研究具有一定的新颖性和创新性,对于体外构建相关肺部疾病模型,探索尼古丁在肺部疾病发生发展中的机制研究等都具有重要意义。但是本研究的不足之处是通过瞬时转染多个质粒至细胞中,会存在一个转染效率和蛋白功能表达效能的问题,这需要通过我们稳定转染来进一步优化和探究。另外,该突变点对于本身表达尼古丁受体的细胞,如上皮细胞,是否存在类似的影响,或者是否存在更为表观的影响,如上皮的迁移,转分化等等^[29-31],有待于我们进一步探索。

参考文献(References)

- [1] Boyd RT. The molecular biology of neuronal nicotinic acetylcholine receptors[J]. Crit Rev Toxicol, 1997, 27(3): 299-318
- [2] Lavezzi AM. Toxic Effect of Cigarette Smoke on Brainstem Nicotinic Receptor Expression: Primary Cause of Sudden Unexplained Perinatal Death[J]. Toxics, 2018, 6(4): 63
- [3] Moll M, Sakomsakolpat P, Shrine N, et al. Chronic obstructive pulmonary disease and related phenotypes: polygenic risk scores in population-based and case-control cohorts[J]. Lancet Respir Med, 2020, 8(7): 696-708
- [4] Cheng WL, Chen KY, Lee KY, et al. Nicotinic-nAChR signaling mediates drug resistance in lung cancer [J]. J Cancer, 2020, 11(5): 1125-1140
- [5] Watza D, Lusk CM, Dyson G, et al. COPD-dependent effects of genetic variation in key inflammation pathway genes on lung cancer risk[J]. Int J Cancer, 2020, 147(3): 747-756
- [6] Wen L, Jiang K, Yuan W, et al. Contribution of Variants in CHRNA5/A3/B4 Gene Cluster on Chromosome 15 to Tobacco Smoking: From Genetic Association to Mechanism[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(1): 472-484
- [7] Tubío-Pérez RA, Torres-Durán M, Pérez-Ríos M, et al. Lung emphysema and lung cancer: what do we know about it? [J]. Ann Transl Med, 2020, 8(21): 1471
- [8] Mouronte-Roibas C, Leiro-Fernández V, Fernández-Villar A, et al. COPD, emphysema and the onset of lung cancer. A systematic review [J]. Cancer Lett, 2016, 382(2): 240-244
- [9] Triakash I, Kasatkina L, Lykhmus O, et al. Nicotinic acetylcholine receptors regulate clustering, fusion and acidification of the rat brain synaptic vesicles[J]. Neurochem Int, 2020, 138: 104779
- [10] Wittenberg RE, Wolfman SL, De Biasi M, et al. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotine addiction: A brief introduction[J]. Neuropharmacology, 2020, 177: 108256
- [11] Wu J, Liu Q, Tang P, et al. Heteromeric $\alpha 7 \beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Brain[J]. Trends Pharmacol Sci, 2016, 37(7): 562-574
- [12] Stone TW. Does kynurenic acid act on nicotinic receptors? An assessment of the evidence[J]. J Neurochem, 2020, 152(6): 627-649
- [13] Wang Q, Khan NA, Muthumalage T, et al. Dysregulated repair and inflammatory responses by e-cigarette-derived inhaled nicotine and humectant propylene glycol in a sex-dependent manner in mouse lung [J]. FASEB Bioadv, 2019, 1(10): 609-623
- [14] Jackson A, Grobman B, Krishnan-Sarin S. Recent findings in the pharmacology of inhaled nicotine: Preclinical and clinical in vivo studies[J]. Neuropharmacology, 2020, 176: 108218
- [15] Zou W, Liu S, Hu J, et al. Nicotine reduces the levels of surfactant proteins A and D via Wnt/ β -catenin and PKC signaling in human airway epithelial cells[J]. Respir Physiol Neurobiol, 2016, 221: 1-10
- [16] DeVito EE, Krishnan-Sarin S. E-cigarettes. Impact of E-Liquid Components and Device Characteristics on Nicotine Exposure [J]. Curr Neuropharmacol, 2018, 16(4): 438-459
- [17] Mucchietto V, Crespi A, Fasoli F, et al. Neuronal Acetylcholine Nicotinic Receptors as New Targets for Lung Cancer Treatment[J]. Curr Pharm Des, 2016, 22(14): 2160-2169
- [18] Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology[J]. Prog Neurobiol, 2004, 74(6): 363-396
- [19] Kraiss AM, Hautefeuille AH, Cros MP, et al. CHRNA5 as negative regulator of nicotine signaling in normal and cancer bronchial cells: effects on motility, migration and p63 expression [J]. Carcinogenesis, 2011, 32(9): 1388-1395
- [20] Mucchietto V, Fasoli F, Pucci S, et al. $\alpha 9$ - and $\alpha 7$ -containing receptors mediate the pro-proliferative effects of nicotine in the A549 adenocarcinoma cell line[J]. Br J Pharmacol, 2018, 175(11): 1957-1972
- [21] Zhang Y, Jia Y, Li P, et al. Reciprocal activation of $\alpha 5$ -nAChR and STAT3 in nicotine-induced human lung cancer cell proliferation[J]. J Genet Genomics, 2017, 44(7): 355-362
- [22] Cingir Koker S, Jahja E, Shehwana H, et al. Cholinergic Receptor Nicotinic Alpha 5 (CHRNA5) RNAi is associated with cell cycle inhibition, apoptosis, DNA damage response and drug sensitivity in breast cancer[J]. PLoS One, 2018, 13(12): e0208982
- [23] Simeone X, Karch R, Ciurazkiewicz A, et al. The role of the nAChR subunits $\alpha 5$, $\beta 2$, and $\beta 4$ on synaptic transmission in the mouse superior cervical ganglion[J]. Physiol Rep, 2019, 7(6): e14023
- [24] Impropgo MR, Scofield MD, Tapper AR, et al. From smoking to lung cancer: the CHRNA5/A3/B4 connection[J]. Oncogene, 2010, 29(35): 4874-4884
- [25] Tamminenäki A, Herder P, Li P, et al. Impact of human D398N single nucleotide polymorphism on intracellular calcium response mediated by $\alpha 3 \beta 4 \alpha 5$ nicotinic acetylcholine receptors[J]. Neuropharmacology, 2012, 63(6): 1002-1011
- [26] Scholze P, Huck S. The $\alpha 5$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Differentially Modulates $\alpha 4 \beta 2^*$ and $\alpha 3 \beta 4^*$ Receptors [J]. Front Synaptic Neurosci, 2020, 12: 607959
- [27] Jackson KJ, Sanjakdar SS, Muldoon PP, et al. The $\alpha 3 \beta 4^*$ nicotinic acetylcholine receptor subtype mediates nicotine reward and physical nicotine withdrawal signs independently of the $\alpha 5$ subunit in the mouse[J]. Neuropharmacology, 2013, 70: 228-235
- [28] George AA, Lucero L M, Damaj M I, et al. Function of human $\alpha 3 \beta 4 \alpha 5$ nicotinic acetylcholine receptors is reduced by the $\alpha 5$ (D398N) variant[J]. J Biol Chem, 2012, 287(30): 25151-25162
- [29] Zhou M, Zhao J, Zhang Q, et al. Nicotine Upregulates the Level of Mcl-1 through STAT3 in H1299 Cells [J]. J Cancer, 2020, 11(5): 1270-1276
- [29] Bagdas D, Alkhlaif Y, Jackson A, et al. New insights on the effects of varenicline on nicotine reward, withdrawal and hyperalgesia in mice [J]. Neuropharmacology, 2018, 138: 72-79
- [31] Wittenberg RE, Wolfman SL, De Biasi M, et al. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotine addiction: A brief introduction[J]. Neuropharmacology, 2020, 177: 108256