

人源 μ 型阿片受体的 cDNA 克隆及转染 CHO 细胞的活性分析

刘 威 段海清 李淑琴 刘秀丽 张兆山*

(北京生物工程研究所 北京 100071)

摘 要 μ 型阿片受体是阿片类药物镇痛与成瘾的分子基础。从人脑组织总 RNA 通过 RT-PCR 扩增获得 μ 型阿片受体的 cDNA, 将其克隆至 pcDNA3.1(+) 中, 用酶切鉴定正确的重组质粒转染 CHO 细胞。筛选的单克隆细胞株, 检测阳性的细胞克隆表达的 μ 型阿片受体介导胞内信号转导的能力。通过与激动剂和拮抗剂的信号转导分析证实, 阳性的细胞克隆表达的 μ 型阿片受体与天然的 μ 型阿片受体具有基本一致的生物学特性, 因此可以用来作为高效镇痛低成瘾药物筛选平台的候选细胞株。

关键词 μ 型阿片受体, 信号转导, 受体-配体结合

中图分类号 Q5 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)03-0372-05

阿片受体是 G 蛋白偶联受体(GPCRs)家族中的成员之一, 阿片受体和它们的内源性配体-阿片肽形成一个神经调节系统, 在压力诱导的镇痛过程中发挥作用, 影响运动能力并调节神经内分泌以及自主性功能如呼吸、血压和胃肠蠕动。研究表明, 阿片系统在学习、记忆和免疫功能调节方面起着重要的作用。药理学研究将阿片受体主要分为 μ 、 κ 和 δ 三种亚型, 每种亚型都具有不同的配体选择性和分布特征^[1,2]。由于大多数组织都表达多种阿片受体, 因此长期以来研究某种受体的功能往往受到其它受体的干扰。克隆了阿片受体的基因后, 即可将这些基因分别导入原来不含阿片受体的细胞中去, 获得只表达单一类型阿片受体的细胞, 这样便可更加直接确定地研究每种受体如何介导内源性阿片肽及吗啡等易成瘾药物的作用。目前临床上所使用的镇痛药物基本上都是吗啡及其衍生物, 它们具有相似的分子结构, 亦具有相似的作用机制, 即绝大部分作用于 μ 型阿片受体, 虽然镇痛效果很好但同时也具有较强的成瘾性。初步研究结果表明^[3-6], 成瘾性以及吗啡产生的其他副反应与 μ 型阿片受体密切相关, 而与其它型阿片受体无必然联系, κ 型和 δ 型阿片受体也参与体内的镇痛反应但不介导成瘾性。因此, 建立以 κ 和 μ 型阿片受体为靶位分子的筛选平台, 可以高通量筛选高效低成瘾性的镇痛药物, μ 型阿片受体阳性的细胞克隆的筛选为本实验的研究内

容。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织样品 人脑组织总 RNA 为本室提供。

1.1.2 菌株、质粒和细胞 JM109 为本室保存, 质粒 pMD-18T 购自 TaKaRa 公司, 质粒 pcDNA3.1(+) 为 Invitrogen 公司产品, CHO(dhf-) 由本所提供。

1.1.3 试剂 限制性内切酶为 TaKaRa 公司产品, 逆转录酶为 GIBCO 公司的 Superscript II, 脂质体(Lipofectamine Reagent) 为 GIBCO 公司产品, 细胞总 DNA 提取试剂 Trizol 为 GIBCO 公司产品, cAMP 酶免疫测定(EIA) 试剂盒为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品, 吗啡由军事医学科学院毒物药理研究所宫泽辉教授提供, 拮抗剂 Naloxonazine 购自 SIGMA 公司。

1.1.4 培养基和添加剂 细菌培养基酵母提取物为 Oxoid 公司产品, 蛋白胨、琼脂粉为日本制药株式会社产品, 氨苄青霉素为华北制药厂产品。细胞培养基为 DMEM 高糖培养基, 购自 Hyclone 公司, 加强型小牛血清为北方同正公司产品, HT 添加剂为 GIBCO 公司产品, 胰酶为 Hyclone 公司产品, G418 为 GIBCO 公司产品。

1.1.5 细胞培养用器材 细胞培养皿、细胞培养板(96 孔和 24 孔)、细胞培养瓶和细胞冻存管为 Nunc

公司产品。

1.2 方法

1.2.1 mRNA 的逆转录及 PCR 扩增 :方法参见《分子克隆实验手册》^[7]。

1.2.2 μ 型阿片受体 cDNA 克隆 :参照《分子克隆实验手册》有关 cDNA 克隆的方法进行。

1.2.3 重组质粒转化 CHO 细胞 :取 3 个细胞培养皿($\varphi 35\text{mm}$),各接种 $1 \sim 2 \times 10^5$ 细胞约 1mL, 37°C 5% CO_2 培养过夜,使细胞长满皿底的 70% ~ 90%。制备转染液 A ($1 \sim 2\mu\text{g}$ DNA, 用无血清培养基稀释至 $100\mu\text{L}$)和 B ($10\mu\text{L}$ 脂质体, 用无血清培养基稀释至 $100\mu\text{L}$)轻轻混匀 A 和 B, 室温静置 15min, 此为复合物 C; 用 2mL 无血清培养基洗涤培养皿中的细胞 2 次, 用 0.8mL 无血清培养基稀释复合物 C, 混匀后铺满培养皿中的细胞上, 37°C 5% CO_2 培养 5h, 补加 1mL 完全培养基, 培养 24h 后吸去培养基, 加入 2mL 完全培养基再培养 24h 以使质粒上的 *neo^r* 抗性基因表达, 之后换成筛选培养基(含有 $800\mu\text{g}/\text{mL}$ G418)进行培养, 约 1 个星期后, 对照出现细胞大量死亡, 而质粒转染的 CHO 细胞则出现大量的细胞团, 这时用维持培养基(含有 $200\mu\text{g}/\text{mL}$ G418)继续培养。

1.2.4 单克隆细胞株的筛选 :将 G418 筛选后细胞团用胰酶消化后, 进行 $10 \sim 10^7$ 倍稀释, 转入 96 孔板中, 用有限稀释法制备单克隆细胞株。

1.2.5 重组与非重组细胞总 DNA 的提取及 PCR 鉴定 :按照 Trizol 细胞提取试剂的说明书进行。PCR 扩增一端采用阿片受体 cDNA 特异的引物, 一端采用载体特异的引物进行扩增检测。

1.2.6 标准工作曲线的制备 :按照 cAMP 检测试剂盒说明进行。

1.2.7 表达受体与激动剂配体结合后介导胞内 cAMP 信号反应检测 :将重组与非阳性的细胞克隆按 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 分别接种至 96 孔板, 每孔 $100\mu\text{L}$, 37°C 5% CO_2 培养过夜, 每孔加入 $100\mu\text{L}$ 一定浓度的激动剂, 本实验使用 $5\mu\text{mol}/\text{L}$ 吗啡作为受体激动剂, 37°C 5% CO_2 培养 30min, 倒掉细胞培养液并用生理盐水洗涤 2 次, 再加入 $200\mu\text{L}$ 细胞裂解液, 充分振摇 10min 以使细胞充分溶解, 将细胞裂解样品转入 96 孔酶联检测板(已包被猴抗兔 IgG), 按照试剂盒说明进行酶联免疫检测胞内 cAMP 的含量变化情况。

1.2.8 激动剂和拮抗剂介导信号的相互作用 :细胞培养及检测方法同上, 加入的药品为激动剂吗啡和 DAMGO, 拮抗剂 Naloxonazine, 处理的类别分为对照,

单独加激动剂, 单独加拮抗剂, 联合加激动剂与拮抗剂, 联合加激动剂, 处理时间总计为 1h。

2 结果

2.1 重组质粒与阳性的细胞克隆的构建

利用 RT-PCR 法从人脑总 RNA 扩增 μ 型阿片受体 cDNA, 将其克隆到 T 载体并序列分析, 结果与文献报道的 μ 型阿片受体 cDNA 序列完全一致。用 *Kpn* I 和 *Xho* I 将阳性质粒和真核载体 pcDNA3.1 (+) 分别双酶切后, 电泳回收纯化。进行连接后, 转化 JM109 受体菌, 通过 Amp 抗性筛选挑取单菌落, 扩大培养提取质粒进行酶切鉴定, 酶切鉴定结果(图 1)所得到的重组质粒 pHMOR 与预期的完全一致。将 pHMOR 和空载体 pcDNA3.1 (+) 进行纯化, 采用脂质体法分别转化 CHO 细胞, 用 G418 进行筛选, 获得了阳性的细胞克隆 CHO-hMOR, 转化空载体的 CHO 细胞株为 CHO-P。本实验共获得 8 个 CHO-hMOR 单克隆细胞株和 2 个 CHO-P 细胞株。将 8 个 CHO-hMOR 细胞株, 1 个 CHO-P 细胞株和一个 CHO 细胞株进行培养, 分别提取总 DNA。用总 DNA 作为模板进行 PCR 扩增检测。电泳结果(图 2)显示 CHO-hMOR 细胞株都出现明显的单一扩增的 μ 型阿片受体 DNA 条带, 扩增片段的大小也与预期的大小一致, 表明在这些细胞株中已成功转化了 μ 型阿片受体 DNA, 而 CHO-P 细胞株和 CHO 细胞株没有出现特异扩增条带, 表明这两株细胞不含有 μ 型阿片受体 DNA。这样就从 DNA 水平上证明了 CHO-hMOR 细胞株与 CHO-P 细胞株和 CHO 细胞株的差异。

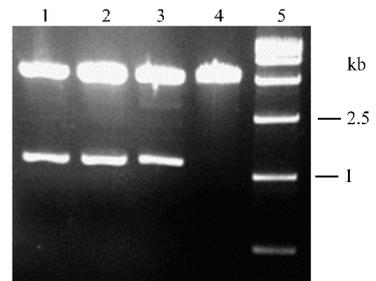


图 1 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 1 Restriction analysis of the recombinant plasmids
1 ~ 3: the recombinant plasmid pHMOR (*Kpn* I + *Xba* I);
4: pcDNA3.1 (*Kpn* I + *Xba* I) 5: DNA marker

2.2 阳性的细胞克隆对吗啡信号介导能力分析

将 8 个 CHO-hMOR 单克隆细胞株分别培养, 然后转入 96 孔板中, 设置 CHO 细胞株和 CHO-P 细胞株作为对照, 每个样品设两个备份, 分为两组, 一组

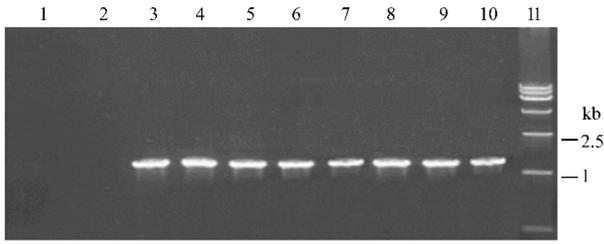


图 2 重组细胞 μ 型阿片受体基因的 PCR 检测分析

Fig.2 PCR detection of the recombinant CHO-hMOR

1 :CHO 2 :CHO-P 3~10 :CHO-hMOR1~8 ;11 :DNA marker.

加入激动剂吗啡,另一组加入生理盐水,然后进行细胞内 cAMP 浓度的测定。同时设置不同浓度 cAMP 的阳性对照,制作标准工作曲线。根据标准工作曲线确定在加入吗啡前后胞内 cAMP 的相对浓度变化。由于试剂盒设计原理是竞争性结合,因此测定值会随着样品中 cAMP 浓度的升高而下降,检测结果见表 1。以标准 cAMP 浓度的常用对数值为横坐标,以浓度为 0 的 A_{450} 值减去 NSB 值为 B_0 ,其余各浓度 A_{450} 减去 NSB 值为 B 值,算出相应的 B/B_0 (%) 作为纵坐标作图(图 3),通过直线回归得出方程 B/B_0 (%) = $-31.75 \lg [cAMP] + 128.77$ 。根据直线方程,可以算出并比较 8 个 CHO-hMOR 单克隆细胞株,1 个

CHO-P 和 1 个 CHO 细胞株的 cAMP 的相对浓度及变化情况(见表 2)。结果表明,对照细胞株 CHO-P 和 CHO 在加入吗啡前后 cAMP 水平没有显著变化,8 个 CHO-hMOR 单克隆细胞株在加入吗啡前后 cAMP 水平有 3 个有显著性降低,分别是 CHO-hMOR₂, CHO-hMOR₇ 和 CHO-hMOR₈,其余 5 个则没有显著性变化。

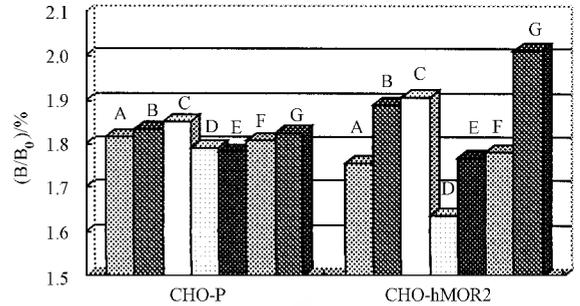


图 3 DAMGO, morphine and Naloxonazine 与 CHO-hMOR 的结合分析

Fig.3 Reaction of DAMGO, morphine and Naloxonazine with CHO-hMOR

A :NT ; B :DAMGO ; C :Morphine ;
D :Naloxonazine ; E :DAMGO + Naloxonazine ;
F :Morphine + Naloxonazine ; G :DAMGO + Morphine

表 1 胞内 cAMP 浓度分析

Table 1 Intracellular cAMP concentration

Cell	CHO	CHO-P	1	2	3	4	5	6	7	8
A_{450}	2.151	2.031	2.077	1.774	2.026	2.093	2.116	1.890	1.731	1.975
[cAMP]	18.712	26.818	23.362	57.966	27.223	22.267	20.783	40.934	65.945	31.723
A_{450}'	2.163	2.097	2.090	1.996	2.038	2.125	2.188	1.981	1.908	2.189
[cAMP']	18.051	22.002	22.469	29.786	26.261	20.230	16.747	31.157	38.783	16.697
Δ cAMP]	0.661	4.816	0.893	28.180 *	0.962	2.038	4.036	9.777	27.163 *	15.026 *

A_{450} [cAMP] before morphine treatment ; A_{450}' [cAMP] , after morphine treatment ; Δ cAMP] = [cAMP] - [cAMP]' ; * , couple design analysis , $P < 0.05$.

2.3 CHO-hMOR 对其他激动剂和拮抗剂介导信号的相互作用研究

因 CHO-hMOR₂ 在与吗啡作用介导信号转导上活性较高,故选择 CHO-hMOR₂ 作为该研究的细胞株。通过其他激动剂和拮抗剂对 CHO-hMOR₂ 信号介导的作用的观察确定表达的 μ 型阿片受体的相关生物活性。以 CHO-P 为阴性对照,以吗啡作为阳性对照,分别比较 DAMGO、Naloxonazine 单独对 CHO-hMOR₂ 的信号介导作用以及其中二者联合对 CHO-hMOR₂ 的信号介导作用,结果见表 3。以 A_{450} 对细胞

株样品作图,结果表明 CHO-P 在不同类型的给药前后胞内 cAMP 水平没有明显的变化,而 CHO-hMOR₂ 在单独给药的情况下,DAMGO 和吗啡一样能明显降低胞内 cAMP 水平(OD_{450} 升高),Naloxonazine 则能明显提高胞内 cAMP 水平(OD_{450} 降低);在联合给药的情况下,DAMGO 与 Naloxonazine 或吗啡与 Naloxonazine 同时给药,效果基本抵消,DAMGO 与吗啡同时给药产生较为明显的协同作用。该实验表明,CHO-hMOR₂ 不仅能与激动剂相互作用介导胞内的信号转导,而且能与 μ 型阿片受体拮抗剂相互作用,产生拮抗激动剂的效果。激动剂与拮抗剂分别作用于受

体的不同位点,该实验证实 CHO-hMOR₂ 表达的 μ 型阿片受体具有与天然受体类似的活性区域,可以与传统的阿片类配体结合产生显著的生物学效应。

表 2 不同的配体结合细胞后的 cAMP 浓度分析

Table 2 cAMP concentration after binding of different ligands

Cell	CHO-P	CHO-hMOR ₂
NT	1.817 ± 0.017	1.757 ± 0.020
DAMGO	1.835 ± 0.004	1.892 ± 0.033 *
Morphine	1.852 ± 0.035	1.907 ± 0.044 *
Naloxonazine	1.791 ± 0.016	1.636 ± 0.021 *
DAMGO + Naloxonazine	1.783 ± 0.038	1.772 ± 0.006
Morphine + Naloxonazine	1.810 ± 0.023	1.781 ± 0.031
DAMGO + Morphine	1.824 ± 0.027	2.015 ± 0.017 *

* couple design analysis, $P < 0.05$

3 讨论

μ 型阿片受体是吗啡等阿片类药物镇痛与成瘾的基础,近年来经体外基因敲除试验^[3-6]证明了这一点。低成瘾性药物筛选平台的设想即基于此^[15,16]基础是 κ 和 μ 型阿片受体。作为低成瘾性药物筛选平台的最终目标是筛选到具有很好镇痛活性而且不具有成瘾性的化合物,这一点由 κ 型阿片受体的结合特异性为目标,并以 μ 型阿片受体作为反向排除可以进行进一步的鉴定,因此 μ 型阿片受体阳性的细胞克隆的筛选将为低成瘾性药物筛选平台的构建打下良好的基础。另外通过克隆表达 μ 型阿片受体可以获得单一表达该受体的细胞株,这对于研究阿片类药物的作用具有很重要的意义。对重组细胞表达的受体分析实际上是对表达的重组蛋白进行分析,有三种途径:一是分析重组的受体蛋白是否表达在细胞膜表面;二是分析表达在膜表面的受体蛋白是否能与相应的配体特异性结合,也就是评价表达的重组受体是否具有类似天然受体的构象;三是受体与特异配体结合后能否介导胞内的信号转导。若以前两项作为评价的指标进行筛选既不经济亦不合理,且筛选的风险较大,因此将重组细胞信号介导能力作为筛选指标是具有可行性的。本研究通过一系列实验获得了 CHO-hMOR 阳性的细胞克隆,CHO-hMOR 细胞株所表达的 μ 型阿片受体可以通过与配体结合介导胞内相应的信号反应,因此将 CHO-hMOR 作为阿片类药物筛选平台的候选细胞株做进一步研究,可以满足以后对合适的多态性文库进行

筛选的要求。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Dhawan BN, Cesselin F *et al.* Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev.* 1996 **48**: 567 - 592
- [2] Qin B Y (秦伯益). *Dependence of opioid drugs In Neurobiology* edited by XU Shao-Fen (阿片类药物的依赖 神经生物学), Shanghai: Medical University Press (上海医科大学出版社), 1999, pp. 488 - 495
- [3] Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff Claire. Exploring the opioid system by gene knockout. *Progress in Neurobiology* 2002 **66**: 285 - 306
- [4] Parnot C *et al.* Lessons from constitutively active mutants of G protein-coupled receptors. Review. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2002, pp. 1 - 8
- [5] Kieffer BL. Opioids: first lessons from knockout mice. *TIPS*, 1999, **20**: 19 - 26
- [6] Perry NF, Carolina R *et al.* Characterization of mechanical withdrawal responses and effects of opioid agonists in normal and opioid receptor knockout mice. *Brain Research*, 1999, **821**: 480 - 486
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis. *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [8] Talmont F, Sidobre S *et al.* Expression and pharmacological characterization of the human μ -opioid receptor in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEBS Letters*, 1996, **394**: 268 - 272
- [9] Stanasila L, Massotte D *et al.* Expression of δ , κ and μ human opioid receptors in *Escherichia coli* and reconstitution of the high-affinity state for agonist with heterotrimeric G proteins. *European Journal of Biochemistry*, 1999, **260**: 430 - 438
- [10] Gong J, Strong JA *et al.* Endomorphins fully activate a cloned human μ opioid receptor. *FEBS Letters*, 1998, **439**: 152 - 156
- [11] Kempf J, Snook LA *et al.* Expression of the human μ opioid receptor in a stable Sf9 cell line. *Journal of Biotechnology*, 2002, **95**: 181 - 187
- [12] Knapp R J *et al.* Molecular biology and pharmacology of cloned opioid receptors. *FASEB*, 1995, **9**: 516 - 526
- [13] Thompson RC, Mansour A *et al.* Cloning and pharmacological characterization of a rat μ opioid receptor. *Neuron*, 1993, **11**: 903 - 913
- [14] Wang JB, Imai Y *et al.* μ opioid receptor cDNA cloning and expression. *Neurobiology*, 1993, **90**: 10230 - 10234
- [15] Matthews DJ, Kopczyński J. Using model-system genetics for drug-based target discovery. *DDT* 2001, **6**: 141 - 149
- [16] Coward P, Chan SDH *et al.* Chimeric G proteins allow a high-throughput signaling assay of G_i-coupled receptors. *Analytical Biochemistry*, 1999, **270**: 242 - 248
- [17] Tate CG. Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies. *FEBS* 2001, **504**: 94 - 98
- [18] Stanasila L, Pattus F *et al.* Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: Human opioid receptors under scrutiny. *Biochimie*, 1998, **80**: 563 - 571
- [19] E Zheng (鄂征). *Technology of Tissue Culture and Molecular Cytology* (组织培养和分子细胞学技术), Beijing Press (北京出版社)

Expression of Human μ -opioid Receptor cDNA in CHO Cell

LIU Wei DUAN Hai-Qing LI Shu-Qin LIU Xiu-Li ZHANG Zhao-Shan*

(Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China)

Abstract Opioid receptor, is classified into three subtypes μ , κ and δ , with the μ -type receptor plays important roles in opioid analgesia and opioid addiction. The cDNA encoding μ -type receptor was obtained by RT-PCR from human brain RNA and was cloned into pcDNA3.1(+). The resultant recombinant plasmid pcDNAMORs were transfected into CHO cells by liposome. After PCR identification, the positive clone were treated with agonist and antiagonist were tested for their competence of signal transduction. CHO cells that contained μ -opioid receptor in the expression vector pcDNA3.1(+) acquired naloxone-blockable high-affinity specific binding of morphine and DAMGO. The concentration of cAMP in CHO cells transfected with pcDNAMOR was reduced after binding to morphine and DAMGO, and increased after binding naloxone. These results indicate that the μ -type receptor expressed on the CHO cell has similar biological property as the nature receptor. The availability of these specific cell lines will facilitate the drug development and promote our understanding the mechanism underlying opiate addiction.

Key words opioid receptor, signal transduction, analgesics screening platform

Received: 09-08-2003

* Corresponding autor. Tel: 86-10-63834140; Fax: 86-10-63833521; E-mail: zhangzs@im.jlb.ac.cn <http://journals.im.ac.cn>