

VPAC2 在 CHO 细胞的表达及鉴定

Expression and Characterization of VPAC2 in CHO Cells

余榕捷¹ 高媛^{1,2} 戴云¹ 谭毅力¹ 曾志宏¹ 周天鸿³ 洪岸^{1*}

YU Rong-Jie¹, GAO Yuan^{1,2}, DAI Yun¹, TAM Ngai-lik¹, ZENG Zhi-Hong¹, ZHOU Tian-Hong³ and HONG An^{1*}

1 暨南大学生物工程研究所, 广州 510632

2 河北医科大学生物化学与分子生物学教研室, 石家庄 050017

3 暨南大学生命科学与技术学院, 广州 510632

1 Bio-engineering Institute of Jinan University, Guangzhou 510632, China

2 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

3 Department of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

摘 要 PAC2 是垂体腺苷酸环化酶激活多肽(Pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide, PACAP)和血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)的共同受体,介导多种重要生物学功能。为获得稳定特异表达 VPAC2 的中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞,将 pcDNA-VPAC2 表达载体转染 CHO 细胞,经 G418 筛选转染阳性克隆,用 PACAP38 标准品诱导阳性克隆细胞的胞内 cAMP 生成,筛选出对 PACAP38 最为敏感的阳性单克隆细胞株(VPAC2-CHO),运用 RT-PCR、Western blot 和免疫荧光法检测 VPAC2 受体表达情况,利用 VPAC2 受体特异激动剂通过竞争性结合试验和促进胞内第二信使 cAMP 生成的活性检测实验证实,VPAC2-CHO 特异表达有功能的 VPAC2。Scatchard 作图分析显示 VPAC2-CHO 的 VPAC2 受体密度为 $(1.1 \pm 0.2) \mu\text{mol}/\text{mg}$ 膜蛋白, PACAP38 与 VPAC2 的解离常数 K_d 值为 $(0.55 \pm 0.10) \text{nmol}/\text{L}$ 。特异表达 VPAC2 受体细胞系的构建为深入研究该受体理化性质、生物学功能以及筛选、开发 VPAC2 受体新型特异激动剂和拮抗剂等研究奠定了基础。

关键词 VPAC2, 中国仓鼠卵巢细胞, 表达

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)06-0996-06

Abstract VPAC2 is a co-receptor of pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) and mediates multiple bio-functions. In order to construct the CHO line expressing VPAC2 stably, pcDNA-VPAC2 was used to transfect CHO cells. The positive clones were selected by G418 and the clone VPAC2-CHO with high sensitivity to PACAP38 was picked out by its ability to promoting the concentration of cAMP. RT-PCR, Western blot and Immunofluorescence assay were used to identify the express of VPAC2. Binding competition with VPAC2 agonist and the bioactivity of mediating the ligand to promote the concentration of cAMP showed that VPAC2 was expressed effectively in VPAC2-CHO. The results of Scatchard analysis revealed that VPAC2-CHO expressed a receptor density of $(1.1 \pm 0.2) \mu\text{mol}/\text{mg}$ protein, respectively, with K_d values of $(0.55 \pm 0.10) \text{nmol}/\text{L}$ for PACAP38 used as a tracer. The construction of CHO cells expressing VPAC2 specially and functionally lays a foundation not only for the further research on the characters and functions of VPAC2 but also for the screening and characterization of novel agonists or antagonists for VPAC2.

Key words VPAC2, CHO cells, expression

Received: April 10, 2006; Accepted: June 6, 2006.

This work was supported by the grants from Guangdong Natural Science Foundation (No. 021202) and Guangdong Province Important Key Technology Tackling Project (No. 2004A10902002) and Guangzhou Important Key Technology Tackling Project (No. 2006Z1-E4021).

* Corresponding author. Tel: 86-20-85221345; E-mail: gz-hongan@163.com

广东省自然科学基金重点项目(No. 021202) 广东省科技攻关项目(No. 2004A10902002)和广州市科技攻关项目(No. 2006Z1-E4021)资助

VPAC2是垂体腺苷酸环化酶激活肽(PACAP)和血管活性肠肽(VIP)的共同受体^[1],广泛分布于人和动物的多种组织器官,如小肠、脾、胰、肾、睾丸等,参与介导多种生物学效应,包括扩张血管,降低血压;松弛非血管平滑肌;促进肠液分泌并抑制其吸收作用;促进生长激素、黄体生成素、胰高血糖素和生长抑素分泌;调节免疫功能等^[2],因此极具研究价值。VPAC2属于G蛋白偶联的7次跨膜受体^[3],在结构上分为3部分:N-末端胞外域(含N-糖基化位点)、跨膜域(含7个疏水的跨膜片段)、C-末端胞浆域,目前该受体已经被成功克隆^[4]。在本研究中我们将VPAC2基因导入中国仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary,CHO)中,构建表达VPAC2受体的单克隆细胞株,运用RT-PCR、Western blot和间接免疫荧光法检测VPAC2受体表达情况,并利用未标记的PACAP38标准品以及本单位自行研制开发的VPAC2特异性激动剂RMROM(中国专利申请号200510100229.3),分别与¹²⁵I-PACAP38进行竞争性结合VPAC2受体的实验,检测所表达受体的特异性,然后通过检测这两种多肽刺激VPAC2-CHO细胞胞内cAMP生成情况,研究所表达的VPAC2受体生物学活性;并采用Scatchard法转换计算受体的表达密度。

本研究首次在中国建立特异表达VPAC2受体的CHO细胞系,为进一步深入研究该受体理化性质、生物学功能以及VPAC2受体新型特异激动剂和拮抗剂的筛选、开发等方面奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒和细胞克隆在pcDNA3.1的含有编码人的VPAC χ (VIPR2)基因的表达载体pcDNA-VPAC2受赠于Dr. Patrick Robberecht(Department of Biochemistry and Nutrition, Medical School, Universite Libre de Bruxells, Belgium);中国仓鼠卵巢细胞CHO细胞株由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂:脂质体转染试剂盒Lipofect AMINETM2000 Reagent购自Invitrogen公司;mRNA提取试剂盒Rneasy Mini和RT-PCR试剂盒购自QIAGEN OneStep RT-PCR Kit均购自QIAGEN公司;小鼠(Mouse)抗人大鼠VPAC χ (VIPR2)型受体抗体购自Exalpha Biologicals公司;FITC标记抗小鼠IgG二抗和辣根过氧化物酶标记抗小鼠IgG二抗均购自KPL公司;¹²⁵I-PACAP38(1813.14Ci/mmol)购自Phoenix Pharmaceuticals公司;细胞实验所需的培养

板、G418和进口小牛血清购自英韦创津公司。PACAP38标准品购自ANASPEC公司,VPAC2受体特异激动剂RMROM是本单位自行研制开发的重组多肽,是VPAC2受体经典特异激动剂Ro25-1552^[5]的结构类似物。

1.2 方法

1.2.1 CHO细胞的转染及稳定高效表达株的筛选:按Invitrogen的脂质体转染试剂盒Lipofect AMINETM2000 Reagent的工作手册进行,并用800~1000 μ g/mL的G418进行筛选,调取单克隆扩增,G418维持量为500 μ g/mL。

挑选6个克隆,扩增培养,细胞刮刮取每个克隆的细胞,PBS洗3遍,PBS重悬并调节成相同浓度的细胞悬液(1×10^6 cells/mL),加入等量的标准品PACAP38至终浓度为 1×10^{-10} mol/L,37℃温育5 min;100 μ L细胞悬浮液,加入2倍体积的0.2mol/L HCl,室温放置20 min,tip头吹打溶解细胞并混匀,1000g离心10 min,吸取上清按Cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit说明测定cAMP浓度,以转空载体pcDNA3.1的CHO细胞为对照。挑选对PACAP38最为敏感的一个克隆(命名为VPAC2-CHO),进行扩大培养。

1.2.2 VPAC2受体在CHO细胞中表达情况的检测:

(1)RT-PCR:采用试剂盒提取高效表达VPAC2受体的阳性细胞株的mRNA,RT-PCR检测受体的Mma。检测VPAC2受体基因表达的上游引物:5'TCTGAGGTCTCAAACAGAAAAACA 3';下游引物:5'TGTATCCCAGCAACCGGTGTCTTC 3',预计扩增产物为700bp。以beta actin的RT-PCR为系统内参,检测beta actin基因表达的上游引物:5'TACGTTGCTATCCAGGCTGTGCTA 3';下游引物:5'AGGAAGGCTGGAAGAGTGCCTCAG 3',预计扩增产物为400bp。mRNA提取与RT-PCR按试剂盒说明进行。

(2)Western bolt 鉴定:分别收集pcDNA-VPAC2和pcDNA3.1转染的CHO细胞,细胞裂解缓冲液(50mmol/L Tris,Cl pH6.8,100mmol/L β -巯基乙醇,2% SDS 0.1%溴酚蓝,10%甘油)进行裂解,4℃10 000g离心10 min,取上清进行SDS-PAGE电泳,电泳后参照卢圣栋的《现代分子生物学实验技术》^[6]进行Western blot分析。

(3)间接免疫荧光(IFA)检测:参照卢圣栋的《现代分子生物学实验技术》^[6]进行。处理盖玻片和玻璃培养瓶,并置于6孔板中,使细胞生长其上;PBS

洗细胞 3 次,每次 3min;丙酮/甲醇(1/1, V/V)固定 3 ~ 5min, PBS 洗 3 次, PBS 稀释一抗到适当工作浓度,在 Parafilm 膜上加入 30 ~ 50 μ L 的一抗,盖玻片上有细胞的一面向下,封闭于湿盒中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, PBS 洗 3 次,每次洗 3min,按 1:100 稀释度用 PBS 稀释 FITC 标记的二抗,操作与参考文献 [4] 相同, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, PBS 洗 3 次,每次 5min, 荧光显微镜观察,拍照。

1.2.3 配体竞争性结合实验检测 VPAC2 受体结合能力:参照 Patrick Robberecht 研究小组的研究方法^[7,8]。

(1) 细胞膜蛋白的制备:收集细胞, PBS 洗 3 次, 1mmol/L NaHCO₃ 重悬,立即冻于液氮,解冻后 800g 离心 10min,取上清 2000g 离心 10min,沉淀重悬于 1mmol/L NaHCO₃,成为膜蛋白粗制品, -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

(2) 竞争性结合实验:取上述制备的 10 μ g 膜蛋白,加入 0.1nmol/L 的 ¹²⁵I-PACAP38(1813.14Ci/mmol)和两种竞争多肽(PACAP38 标准品和 RMROM 重组多肽)并逐步提高多肽的浓度(10^{-10} ~ 10^{-5} mol/L),反应在 100 μ L 缓冲液(20mmol/L HEPES, pH7.4, 150mmol/L NaCl, 0.5% BSA, 2mmol/L MgCl₂, 0.1 mg/mL bacitracin)中进行, 37 $^{\circ}$ C 温育 20min。玻璃纤维滤膜(预先用 0.1% polyethylenimine 浸泡过夜)过滤反应物,收集膜蛋白,洗涤液(25mmol/L NaPO₄, 1% BSA)洗膜 3 次, γ 计数器测定放射量 E,以 1 μ mol/L PACAP38 存在时的放射量为非特异结合。

以没有加竞争多肽,只有 ¹²⁵I-PACAP38 所测定的放射量为 E₀,计算各浓度的多肽。PACAP38 竞争结合受体后,所测定的放射量 E 与 E₀ 比值,以百分比表示(%E/E₀);以多肽浓度的对数值为横坐标,%E/E₀ 为纵坐标作图,计算当抑制程度达到 50% 时多肽的浓度,即为半抑制量(IC₅₀, half-maximal inhibitory concentration)。每组实验重复 3 次。

(3) Scatchard 作图分析:利用(2)中数据,采用 Scatchard 法参照 Ernesto Ciccarelli^[9]和 Pascale Gaudin^[10]的方法作图,以[结合的 ¹²⁵I-PACAP38]为横坐标[结合的 ¹²⁵I-PACAP38]/[自由的 PACAP38]为纵坐标作图,其中[自由的 PACAP38]=[PACAP38 多肽]-[结合的 ¹²⁵I-PACAP38],斜率为 -1/[K_d],与纵坐标交点为[受体浓度]/K_d,与横坐标交点为[受体浓度]。

1.2.4 激动剂配体激活 VPAC2 受体后介导胞内

cAMP 信号反应检测:细胞刮刮取对数生长期的 VPAC2-CHO 细胞, PBS 洗 2 遍,调整细胞悬液浓度为 1×10^6 个/mL,加入相同浓度的 PACAP38 标准品和 RMROM 重组多肽,调节多肽的浓度从 10^{-12} mol/L 到 10^{-6} mol/L, 37 $^{\circ}$ C 温育 5min, 100 μ L 细胞悬浮液,加入 2 倍体积的 0.2mol/L HCl,室温放置 20min, tip 头吹打溶解细胞并混匀, 1000g 离心 10min,吸取上清按 Cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit 说明测定 cAMP 浓度。

2 结果

2.1 重组表达载体的鉴定

以 T7 universal promoter 为测序引物,对于受赠的重组质粒 pcDNA-VPAC2 进行全序列测序确定该表达载体含有对框正确的完整的 VPAC2 的 cDNA。

2.2 VPAC2 受体在 VPAC2-CHO 细胞中转录及表达情况的检测

2.2.1 RT-PCR 检测 VPAC2 受体表达:RT-PCR 检测,结果(图 1)显示:在 mRNA 水平,可检测到 VPAC2-CHO 细胞内有 VPAC2 的 mRNA,而 CHO 本身不表达组成型的 VPAC2 受体,因此 RT-PCR 结果为负。

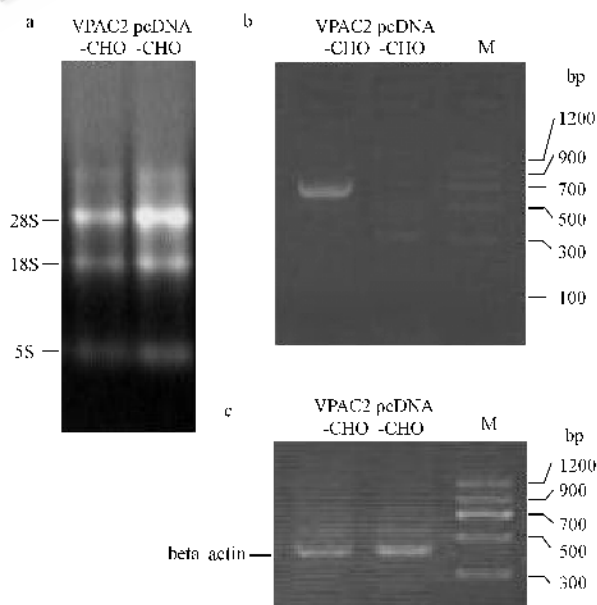


图 1 VPAC2-CHO 细胞的 mRNA 提取及 RT-PCR 检测

Fig.1 Purified mRNA and RT-PCR products of VPAC2-CHO cell strain

a: mRNA of cell strain; b: RT-PCR product of VPAC2 receptor; c: RT-PCR product of beta actin; M: DNA marker.

2.2.2 Western blot 和免疫荧光检测 VPAC2 受体的表达:利用小鼠抗人 VPAC2 受体的抗体进行 Western blot 和免疫荧光实验,检测特异受体在蛋白水平和

细胞水平的表达 ,结果(图 2、3)显示所筛选的 VPAC2-CHO 细胞株特异地表达 VPAC2 受体。

图 2 VPAC2 的 Western blot 检测
Fig. 2 Identification of the expression of
VPAC2 receptor using Western blot
1 :VPAC2-CHO ;2 :pcDNA-CHO.

2.3 竞争性结合实验检测 VPAC2 受体结合能力

通过逐步提高未标记的 PACAP38 标准品或受体特异激动剂 RMROM 的浓度($10^{-10} \sim 10^{-5}$ mol/L),与 0.1nmol/L 的 125 I-PACAP-38 竞争结合 VPAC2 受体 ,检测与受体蛋白结合的 125 I-PACAP-38 的放射量 ,以没有加竞争多肽 ,只有 125 I-PACAP38 所测定的放射量为 E_0 ,计算各浓度的多肽与 125 I-PACAP38 竞争结合受体后 ,所测定的放射量 E 与 E_0 比值 ,以百分比表示(% E/E_0) ;以多肽浓度的对数值为横坐标 ,% E/E_0 为纵坐标作图 ,计算当抑制程度达到 50% 时多肽的浓度 ,即为半抑制量(IC_{50} , half-maximal inhibitory concentration)。每个实验重复 3 次。

结果显示未标记的 PACAP38 标准品以及 VPAC2 受体特异激动剂 RMROM 均能抑制 125 I-PACAP-38 与 VPAC2 受体的结合 ,并有明显的浓度

依赖性。计算得出 PACP38 半抑制量 IC_{50} (half-maximal inhibitory concentration) 为(30 ± 10)nmol/L ,RMROM 的 IC_{50} 为(60 ± 5)nmol/L(如图 4)。PACAP38 和 RMROM 都是 VPAC2 受体配体 ,从而说明 VPAC2-CHO 所表达的受体是 VPAC2 受体。

2.4 Scatchard 作图与分析

设定同位素标记与未标记的 PACAP38 与 VPAC2 结合力相同 ,采用 Scatchard 法作图。固定 125 I-PACAP-38 的浓度为 0.1nmol/L ,的逐步增加 PACAP38 的浓度 ,检测与受体蛋白结合的 125 I-PACAP38 的放射量 ,以结合的 125 I-PACAP-38 为横坐标 ,结合的 125 I-PACAP38 比自由的 PACAP38 的比值 为纵坐标作图如图 5。VPAC-CHO 细胞表达 VPAC2 受体密度为(1.1 ± 0.2)pmol/mg 膜蛋白 ,相应解离常数 K_d 值为(0.55 ± 0.10)nmol/L(mean + S. E. M. of 3 determinations)。

2.5 RMROM 和 PACAP38 促进 VPAC2-CHO 细胞 cAMP 生成的活性测定

PACAP38 以及 VPAC2 受体激动剂 RMROM 均有效促进 VPAC2-CHO 细胞胞内 cAMP 生成 ,并呈浓度依赖性 ;PACAP38 的 EC_{50} (half-maximal effective concentration , EC_{50})为(0.3 ± 0.2)nmol/L ,RMROM 的 EC_{50} 为(0.6 ± 0.2)nmol/L(图 6) ;这说明所表达的 VPAC2 受体能成功介导配体诱导的生物学功能。

图 3 免疫荧光检测 VPAC2(400 ×)

Fig.3 Immunofluorescence assay of VPAC2(400 ×)
a :VPAC2-CHO(bright field) ;b : VPAC2-CHO(fluorescent light) ;c : pcDNA-CHO(bright field) ;d : pcDNA-CHO(fluorescent light) .

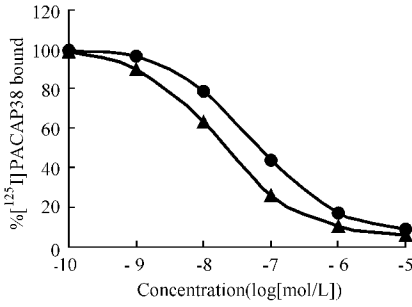


图4 PACA38(▲)或RMRM(●)和

¹²⁵I-PACAP38对VPAC2受体的竞争结合

Fig.4 Inhibition of ¹²⁵I-PACAP38 by RMRM(●) or

PACAP38(▲) in membranes purified from VPAC2-CHO cells

The results are expressed as % of maximum binding by ¹²⁵I-PACAP38.

The data are representative of three experiments.

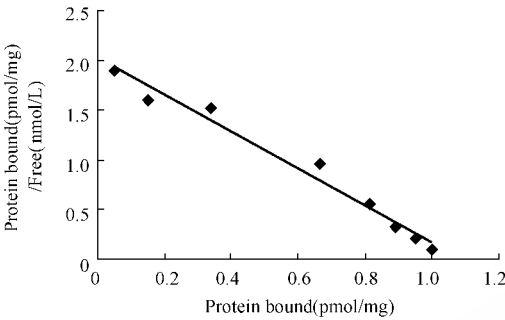


图5 Scatchard 作图

Fig.5 Scatchard transformation of saturation curves

obtained by incubating a fixed ¹²⁵I-PACAP38

concentration (0.1nmol/L) and

increasing concentrations of PACAP38

型糖尿病的新型多肽药物^[12,13];VPAC2受体及其特异激动剂研究得到进一步的关注。

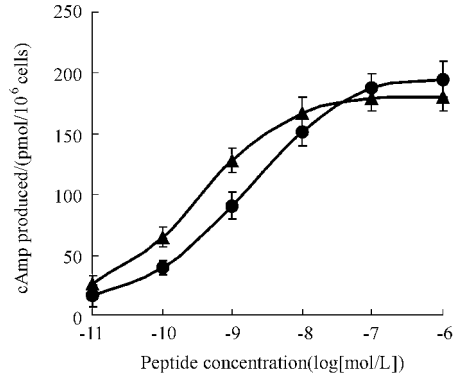


图6 PACAP38(▲)和RMRM(●)促进VPAC2-CHO细胞内cAMP生成的活性测定

Fig.6 cAMP accumulation stimulated by RMRM(●)

and PACAP38(▲) in VPAC2-CHO cells

The data are means ± SE of three experiments.

建立特异表达VPAC2的CHO细胞系是VPAC2受体特异激动剂筛选和鉴定的平台。目前国内尚未有构建特异表达VPAC2受体的CHO细胞的报道;本研究首次在中国建立了特异表达的VPAC2的CHO细胞系,并完成了其相关特性的研究,例如受体密度等。受体表达密度结果显示受体表达密度达到(1.1±0.2)pmol/mg和已有的报道^[11,14]相比,表达效率较高。VPAC2受体在CHO细胞的高效表达为具有自主知识产权的VPAC2受体特异激动剂的筛选和鉴定奠定了基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Harmar AJ, Arimura A, Gozes I *et al.* International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol Rev*, 1998, **50**: 265 - 270
- [2] Igarashi H, Ito T, Pradhan TK *et al.* Elucidation of the vasoactive intestinal peptide pharmacophore for VPAC2 receptors in human and rat and comparison to the pharmacophore for VPAC1 receptors. *JPET*, 2002, **303**(2): 445 - 460
- [3] Inooka H, Ohtaki T, Kitahara O *et al.* Conformation of a peptide ligand bound to its G-protein coupled receptor. *Nat Struct Biol*, 2001, **8**(2): 161 - 170
- [4] Wei Y, Martin SC, Heinrich G *et al.* Cloning and functional characterization of PACAP-specific receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, **865**: 45 - 49
- [5] Gourlet P, Vertongen P, Vandermeers A *et al.* The long-acting vasoactive intestinal polypeptide agonist RO 25-1553 is highly selective of the VIP2 receptor subclass. *Peptides*, 1997, **18**: 403 - 408

3 讨论

VPAC2作为PACAP和VIP的共同受体,属于G蛋白偶联受体,通过调节细胞内第二信使cAMP的浓度,介导多种重要生物学功能。目前,比利时和美国已开展VPAC2在CHO细胞的表达^[11],并利用特异表达VPAC2的CHO细胞建立VPAC2受体特异激动剂的筛选和鉴定工作^[7,8]。最初作为治疗哮喘的药物的Ro25-1553是最早确定的VPAC2受体的特异激动剂^[5]。本研究所涉及的RMRM就是利用基因工程原理和技术制备的重组的Ro25-1553的结构类似物。

2001年,美国公开了“PACAP及其受体VPAC2是体内能量平衡的调节因子”的专利申请(United States Patent, No. 6,316,596)后,2002年,国际医药巨头(BAYER公司)证明了VPAC2受体的特异激动剂可有效促进葡萄糖依赖的胰岛素分泌,将是治疗II

- [6] Li SD (卢圣栋). Current Protocols for Molecular Biology. 2nd ed. Beijing : Xiehe Medical University of China , 1999 , pp.397 – 400
- [7] Juarranz MG , Van Rampelbergh J , Gourlet P *et al.* Different vasoactive intestinal polypeptide receptor domains are involved in the selective recognition of two VPAC(2)-selective ligands. *Mol Pharmacol* , 1999 , **56**(6) : 1280 – 1287
- [8] Moreno D , Gourlet P , De Neef P *et al.* Development of selective agonists and antagonists for the human vasoactive intestinal polypeptide VPAC(2) receptor. *Peptides* , 2000 , **21**(10) : 1543 – 1549
- [9] Ciccarelli E , Svoboda M , De Neef P *et al.* Pharmacological properties of two recombinant splice variants of the PACAP type I receptor , transfected and stably expressed in CHO cells. *European Journal of Pharmacology Molecular Pharmacology , Molecular Pharmacology Section* , 1995 , **288** : 259 – 267
- [10] Gaudin P , Couvineau A , Maoret JJ *et al.* Stable expression of the recombinant human VIP1 receptor in clonal Chinese hamster ovary cell : pharmacological , functional and molecular properties. *European Journal of Pharmacology* , 1996 , **302** : 207 – 214
- [11] Ciccarelli E , Vilardaga JP , De Neef P *et al.* Properties of the VIP-PACAP type- II receptor stably expressed in CHO cells. *Regul Pept* , 1994 , **54** : 397 – 407
- [12] Tsutsumi M , Claus TH , Liang Y *et al.* A potent and highly selective VPAC2 agonist enhances glucose-induced insulin release and glucose disposal : a potential therapy for type 2 diabetes. *Diabetes* , 2002 , **51**(5) : 1453 – 1460
- [13] Yung SL , Cruz FD , Hamren S *et al.* Generation of highly selective VPAC2 receptor agonists by high throughput mutagenesis of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclaseactivating peptide. *J Biol Chem* , 2003 , **278** : 10273 – 10281
- [14] Gourlet P , Vandermeers A , Vandermeers-Piret MC *et al.* Fragments of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide discriminate between type I and II recombinant receptors. *Eur J Pharmacol* , 1995 , **287**(1) : 7 – 11