

孤儿 G 蛋白偶联受体 hGPCRc 的亚细胞定位及组织分布 Subcellular Localization and Tissues Expression Profile of hGPCRc: an Orphan G Protein-Coupled Receptor

袁广胜¹, 潘光堂¹, 吴芳明², 韩春光², 黄火高³, 胡 明³, 盛 莉², 陈 静², 刘永学^{2*}
YUAN Guang-Sheng¹, PAN Guang-Tang¹, WU Fang-Ming², HAN Chun-Guang², HUANG Huo-Gao³,
HU Ming³, SHENG Li², CHEN Jing² and LIU Yong-Xue^{2*}

1. 四川农业大学玉米研究所, 雅安 625014

2. 军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850

3. 海军总医院, 北京 100037

1. Institute of Maize, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

3. Navy General Hospital, Beijing 100037, China

摘 要 利用相关生物信息学软件,对从人结肠组织克隆所得某一孤儿 G 蛋白偶联受体(orphan G protein-coupled receptors, oGPCRs)成员 hGPCRc 的氨基酸序列进行分析显示, hGPCRc 对应的氨基酸序列组成了七个跨膜区段的结构域,具备 GPCR 的结构特征;然后,将 hGPCRc 之 cDNA 与绿色荧光载体 pEGFP-N₁ 构建 GFP-hGPCRc 表达载体,以空白质粒 pEGFP-N₁ 作对照,转染 CHO-K₁ 细胞,在激光扫描共聚焦显微镜下观察到空白质粒 pEGFP-N₁ 转染的细胞表达了 GFP 并均匀分布于整个细胞,而 GFP-hGPCRc 转染的细胞观察到荧光清晰聚集于细胞膜和各细胞器质膜上,因而 hGPCRc 蛋白定位于膜上并稳定表达,与软件分析结果相一致;最后,以 RT-PCR 检测 hGPCRc 在 20 周龄胎儿重要组织器官及部分成人组织中的表达情况,结果显示 hGPCRc 在人心、肾、小脑及结肠等组织均有表达,但在肝、大脑、小肠及肌肉等组织里未检测到表达。该表达谱对于进一步认识 hGPCRc 在胚胎发育中的作用及生理功能提供了线索。

关键词 孤儿 G 蛋白偶联受体, hGPCRc, 组织分布, CHO-K₁ 细胞系, 亚细胞定位

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)03-0365-05

Abstract As a member of orphan G protein-coupled receptors (oGPCRs), hGPCRc was cloned from human colon tissue and analyzed by bioinformatic softwares. It was showed that the corresponding amino acids of hGPCRc formed seven-transmembrane domains as the key characteristic of GPCRs. Then, the recombinant GFP-hGPCRc was constructed by fusing hGPCRc into pEGFP-N₁ carrying green fluorescent protein (GFP) gene, and CHO-K₁ cells were subsequently transfected with the GFP-hGPCRc or pEGFP-N₁. The green fluorescence protein expression in the two different transfected cells was observed under the laser scanning confocal microscopy (LSCM). It was showed that green fluorescence protein was distributed in the whole bodies of the cells transfected with pEGFP-N₁, but mainly distributed on the plasma membrane and cytoplasm membrane transfected with GFP-hGPCRc. Thus, the localization of hGPCRc was accorded with the predication by bioinformatic analysis.

Received: December 13, 2004; Accepted: January 20, 2005.

This work was supported by Grant from National Natural Science Foundation of China (No.30171096).

* Corresponding author. Tel: 86-10-66932252; E-mail: liuyx@nic.bmi.ac.cn

国家自然科学基金(No.30171096)和全军“十五”医药卫生基金(No.01MB056)资助项目。

The expression analysis of hGPCRc by RT-PCR indicated that hGPCRc was abundantly expressed in heart, kidney, cerebel and colon *etc.*, but absent in liver, cerebra, small intestine and muscle *etc.*. The expressing profile of hGPCRc could provide some useful clues to understanding its effects on embryonic development and physiological functions.

Key words orphan G protein-coupled receptors, hGPCRc, expression profile, CHO-K₁ cell line, subcellular localization

根据 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs) 的结构特征, 利用人类基因组研究获得的大量信息, 人们对新的 GPCRs 进行了积极的寻找和预测, 并初步得到了部分可能的孤儿 G 蛋白偶联受体 (orphan GPCR, oGPCR) 序列^[1]。oGPCRs 作为最重要的潜在药物靶点, 对于创新药物研究意义重大^[2]。在分析文献报道有关序列 (GeneBank: AB083598) 的基础上, 我们首先从人体结肠组织克隆到一个 oGPCR 的完整编码序列, 命名为 hGPCRc, 并利用不同软件对该基因及其编码产物进行了较系统的分析和鉴定, 获得了较肯定的结果 (另文发表)。本文主要内容包括: 构建 GFP-hGPCRc 融合表达载体, 转染 CHO-K₁ 细胞, 在激光扫描共聚焦显微镜下观察蛋白表达情况, 确定其表达产物的细胞内定位; 以 RT-PCR 检测 hGPCRc 基因在人体胚胎及成人部分组织器官的表达情况。旨在为其配基筛选和功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源: 人体组织标本来源于一孕 20 周龄引产胎儿, 人结肠组织系成人患者手术切除物, 新鲜静脉血来自健康成人志愿者。

1.1.2 质粒、菌株及细胞: 含有通用引物测序质粒载体 pGEM-T Vectors 为 Promega 公司产品, 大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 菌株、绿色荧光表达载体 pEGFP-N₁ 和 CHO-K₁ 细胞均由本室保存。

1.1.3 试剂及仪器: Taq 酶、脱氧三磷酸核苷酸 (dNTP)、反转录试剂盒 (RNA PCR Kit (AMV)) 为 TaKaRa 公司产品, *Bam*H I、*Eco*R I、T4 DNA 连接酶、总 RNA 提取试剂盒 (RNAgents Total RNA Isolation System)、质粒及核酸片段纯化试剂盒为 Promega 公司产品, X-gal 和 IPTG 购自北京欣经科生物技术公司, 全血基因组提取试剂盒为北京天为时代科技有限公司产品, 小牛血清、DMEM 培养基为 Gibco 公司产品, TRIzol 试剂及 Lipofectamine 2000 转染试剂为 Invitrogen 公司产品, Radiance 2100 型激光扫描共聚焦显微镜 (LSCM) 为美国 BIO-RAD 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 引物设计及合成: 分别设计并合成扩增人 hGPCRc 完整蛋白编码序列和 GAPDH 部分序列 (230bp) 的引物 (表 1)。

表 1 PCR 扩增所用的引物及其序列
Table 1 Primer sequences used for the PCR amplification

Construct	Primer sequence
hGPCRc(1-1014aa)	5'-CGGGATCCATGACCATGACCCTCCACAC-3
	5'-CGGGAATTCTCAAGGGTTCTTTGAG-3'
GAPDH(1-230aa)	5'-ACGGATTGGTCTACTG-3
	5'-TCATTTGGAGGGATCTCGC-3'

1.2.2 hGPCRc 全长 cDNA 的扩增及测序: 按照 RNA 提取试剂盒说明书的步骤, 提取人结肠组织总 RNA, 将总 RNA 利用反转录试剂盒进行 RT-PCR, 其反应参数为: 30℃ 保温 10min, 42℃ 60min, 99℃ 5min, 5℃ 5min 合成第一条 cDNA 链。再以该链为模板进行 PCR 扩增, 获得 hGPCRc 的完整编码双链, 扩增参数为: 95℃ 预变性 5min 后, 按 94℃ 45s, 52℃ 45s, 72℃ 1min 的条件进行 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 8min。另外, 按照全血基因组提取试剂盒说明书的步骤, 提取人血基因组 DNA, 再以此为模板直接进行 PCR 扩增 hGPCRc 编码 DNA 序列, 其扩增参数同 RT-PCR。扩增产物经 PCR 产物片段纯化试剂盒纯化。纯化片段与 pGEM-T Vectors 用 T4 连接酶连接, 再将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态, 并将此菌液铺入含 LB 培养皿中 (LB 培养皿事先要加入 X-gal 和 IPTG), 挑选出阳性克隆, 经鉴定后由上海联合基因公司进行测序。

1.2.3 hGPCRc 氨基酸序列结构域分析^[3-5]: 利用蛋白质跨膜螺旋预测服务器 TMpred server 软件对 hGPCRc 的氨基酸序列进行结构域分析。

1.2.4 表达载体 GFP-hGPCRc 的构建和重组子鉴定: PCR 产物测序无误后, 与载体 pEGFP-N₁ 各自进行 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切, 将酶切产物连接重组, 根据重组质粒大小、酶切产物电泳结果和 PCR 扩增结果对阳性重组子予以鉴定。

1.2.5 CHO 细胞系的培养、转染及融合蛋白的细胞

定位^[6,7]: CHO-K₁ 细胞在含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液中培养,分别以空载体 pEGFP-N₁ 和重组表达载体 GFP-hGPCRc 转染细胞,前者作为对照。转染前 1d,接种 CHO-K₁ 细胞于六孔板,使细胞密度在转染时达贴壁层的 90%。具体转染步骤按 Lipofectamine 2000 转染试剂的说明书进行。转染后 24h,胰酶消化细胞并传代。对于空载体和表达载体的细胞分别命名为 CHO-pEGFP 和 CHO-hGPCRc。培养 1 周后,在激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)下观察 CHO-pEGFP 和 CHO-hGPCRc 细胞蛋白表达情况。

1.2.6 hGPCRc 基因的组织分布:按照 RNA 提取试剂盒说明书的步骤,提取胎儿 19 个组织包括心、肝、脾、肺、肾、胃、大脑、小脑、肌肉、皮肤、大肠、小肠、子宫、胎盘、胸腺、甲状腺、肾上腺、胰及胆囊和 2 个成人结肠及血液组织总 RNA,然后参照反转录试剂盒

进行 RT-PCR,反应参数同前。分别扩增 hGPCRc 基因和其内参基因 GAPDH(230bp),扩增产物于琼脂糖凝胶电泳观察。

2 结果

2.1 hGPCRc 的克隆及氨基酸序列结构域分析

将 hGPCRc 克隆到 pGEM-T Vectors 中进行测序,测序结果显示,本实验所得 RT-PCR 产物和 PCR 产物均为 1014bp,同已登录序列一致,表明所得两种 PCR 产物为同一产物,说明 hGPCRc 没有内含子,该结果符合大多数 GPCRs 基因没有内含子的规律^[1]。对 hGPCRc 的氨基酸序列分析结果显示(Fig. 1),该产物具有 7 个明显的跨膜区域和胞内、外区段,符合 GPCR 较典型的跨膜蛋白结构域特征,同时也表明所克隆 hGPCRc 基因编码一完整的 GPCR 蛋白。

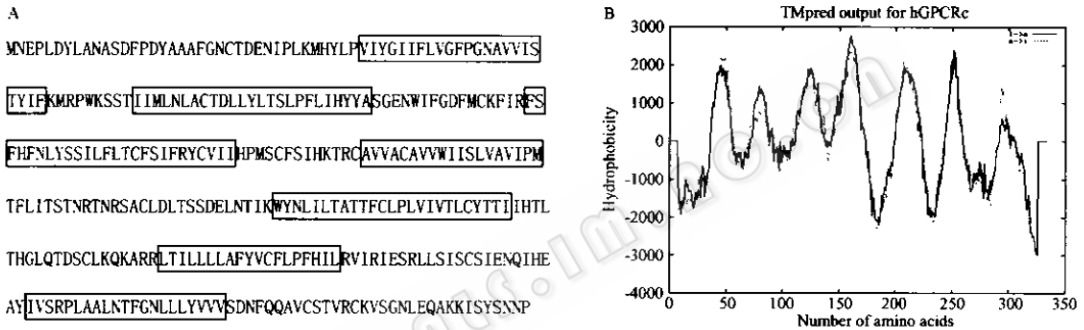


图 1 hGPCRc 的氨基酸序列及跨膜区域分析

Fig. 1 Analysis for amino acids and the transmembrane domains of hGPCRc

A: amino acid sequence of hGPCRc (The putative transmembrane domains are marked by boxes); B: hydrophobicity analysis.

2.2 hGPCRc 表达载体的构建和鉴定

琼脂糖凝胶电泳结果显示,重组载体 GFP-hGPCRc 和空白对照 pEGFP-N₁ 载体经 *Bam*H I / *Eco*R I 双酶切反应和以重组载体为模板的 PCR 扩增反应均得到大小一致的单一特异片段(Fig. 2)。说明重组载体 GFP-hGPCRc 定向克隆成功。

2.3 激光扫描共聚焦显微镜观察 hGPCRc 融合蛋白的细胞定位

经脂质体介导,将空载体 pEGFP-N₁ 和重组 GFP-hGPCRc 分别转染 CHO 细胞系。转染细胞继续培养 1 周后,通过激光扫描共聚焦显微镜于 60× 油镜下观察,结果显示 pEGFP-N₁ 转染的细胞表达了 GFP,绿色荧光呈均匀致密的细颗粒分布于整个细胞,而 GFP-hGPCRc 转染的细胞则观察到荧光清晰聚集于质膜上(Fig. 3),因而 hGPCRc 蛋白定位于膜上并稳定表达。

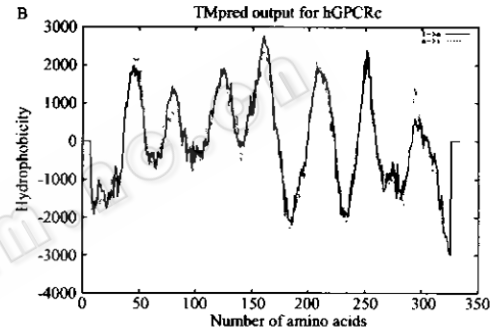


图 2 重组载体 GFP-hGPCRc 的鉴定

Fig. 2 Identification of the recombinant GFP-hGPCRc

M: markers; 1: recombinant plasmid/ *Bam*H I + *Eco*R I; 2: pEGFP-N₁/ *Bam*H I + *Eco*R I; 3: PCR analysis of the FP-hGPCRc.

2.4 hGPCRc 基因的组织分布

提取人源不同组织总 RNA,利用 RT-PCR 分别扩增人源不同组织中的 hGPCRc 基因及其内参基因 GAPDH(230bp),扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,结

果表明 hGPCRc 基因在人体组织分布较广泛,在心、脾、肺、肾、胃、小脑、皮肤、大肠、子宫、胎盘、胸腺、胆囊及结肠组织均有表达,尤其在心、肾、小脑及结肠里表达丰富,而肝、大脑、肌肉、小肠、甲状腺、肾上腺、胰及血液组织中未见表达 (Fig. 4) (1-19 为胎儿组织, 20-21 为成人组织); 提示 hGPCRc 基因编码的受体可能与多种疾病有关,但其具体的生理功能和病理意义尚待进一步研究。

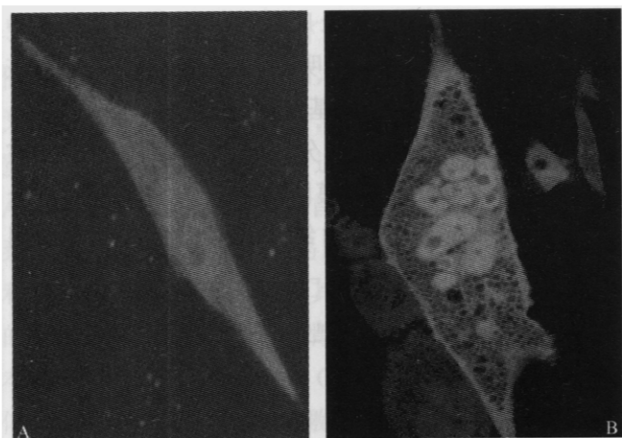


图3 pEGFP-N₁ 和 GFP-hGPCRc 转染 CHO-k₁ 细胞(600×)

Fig. 3 CHO-k₁ cells were transfected with pEGFP-N₁ and GFP-hGPCRc

A: cells transfected with pEGFP-N₁;

B: cells transfected with GFP-hGPCRc.

3 讨论

根据相关文献及基因数据库提供的信息,我们用 RT-PCR 从人结肠组织中得到一个 oGPCR 成员的完整开放阅读框(ORF)序列,称之为 hGPCRc;以 PCR 从人血液基因组 DNA 中亦得到了同一产物,提示该基因没有内含子,符合哺乳动物 GPCRs 编码基因多无内含子的特点。在此基础上,我们又对 hGPCRc 进行了较详尽的生物信息学分析表明:hGPCRc 定位于人染色体 13q32.2;对应的氨基酸具有明显的 7 个疏水性跨膜区域,符合 GPCR 的特征;在与其他人源 GPCRs 的比较中,hGPCRc 与人 P2Y₁ 受体的同源性最高,达 36%。这些生物信息学分析结果提示 hGPCRc 很可能属于一个 oGPCRs 成员,但仍需大量的实验结果予以证实。

绿色荧光蛋白(GFP)是一种生物发光物质,为一种理想的新型生物分子标签,其荧光的强弱取决于蛋白的含量,是目前最常用的细胞定位指示手段之一。GFP 分子量较小(27kD),与外源基因偶联时一般不影响外源蛋白的构象和功能,并可在活细胞

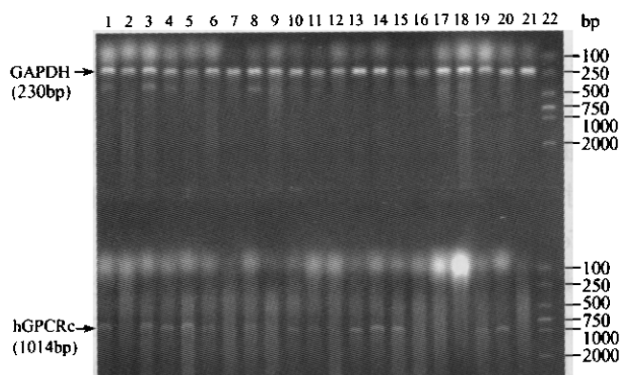


图4 hGPCRc 表达的人体组织分布

Fig. 4 RT-PCR analysis of hGPCRc expression in different human tissues (1 ~ 19 from fetus; 20 and 21 from adult)

1: heart; 2: liver; 3: spleen; 4: lung; 5: kidney; 6: stomach; 7: cerebra; 8: cerebel; 9: muscle; 10: skin; 11: large intestine; 12: small intestine; 13: uterus; 14: placenta; 15: thymus; 16: hypothyroid; 17: adrenal gland; 18: pancreas; 19: gallbladder; 20: colon; 21: blood.

内长时间存在,荧光没有衰变,反映了外源基因表达的蛋白质强度,因此可通过激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)在活细胞内观察蛋白表达定位情况。本研究利用 GFP 的上述特性,首先构建 GFP-hGPCRc 融合基因表达载体,并在 CHO 细胞系表达此融合蛋白,然后通过激光扫描共聚焦显微镜对 hGPCRc 的表达产物进行定位,结果显示该产物属于膜蛋白,与生物信息学的分析结果相符。

本研究采用的人体组织标本为一 20 周龄的引产胎儿,虽然多数组织器官已基本成型,但与成人器官仍会存在一定的差异,因此 hGPCRc 在生长发育过程中起何种作用有待进一步研究。从 hGPCRc 基因的组织分布情况来看,它在众多组织里均有表达,尤其在心、肾、小脑及结肠里表达丰富,以此推测 hGPCRc 很可能广泛参与各种生理或病理过程,特别是与一些心脏、肾脏、神经及消化系统方面的疾病有关,提示该受体可作为多种疾病防治靶点的潜在可能性。

尽管 oGPCRs 的研究已成为热点之一,但因其所知信息较少,尤其是该类受体的配基并不知晓,而后者又是深入研究受体分子结构、功能及病理意义的重要工具,因此 oGPCRs 的研究进展并不尽如人意^{8,9}。一方面,hGPCRc 的克隆、亚细胞定位及组织分布将为我们了解该受体的蛋白功能提供线索,并为寻找其内源性配基、揭示其生理功能及病理意义奠定基础;另一方面,hGPCRc 研究模式的建立和应用也将为其他 oGPCR 成员提供有益的借鉴。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Shigeki T, Tatsuya H, Shigeki M *et al*. Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett*, 2002, **520**(1-3): 97-101
- [2] Liu YX(刘永学), Yu SP(余少平). Orphan G protein-coupled receptors and their significance as novel drug targets. *Chin Pharmacol Bul* (中国药理学通报), 2003, **19**(6): 601-604
- [3] Karnik, SS, Gogonea C, Takezako T *et al*. Activation of G protein-coupled receptors: a common molecular mechanism. *Trends Endocrinol Metab*, 2003, **14**(17): 431-437
- [4] Lee DK, Nguyen T, Odowd BF *et al*. Discovery and mapping of ten novel G protein-coupled receptor genes. *Gene*, 2001, **275**(1): 83-91
- [5] Wittenberger T, Hellebrand S, Hampe W *et al*. GPR99, a new G protein-coupled receptor with homology to a new subgroup of nucleotide receptors. *BMC Genomics*, 2002, **3**(1): 17-23
- [6] Kallal L, Benovic JL. Using green fluorescent proteins to study G protein-coupled receptor localization and trafficking. *Trends Pharmacol Sci*, 2000, **21**(3): 175-180
- [7] Weill C, Ilien B, Galzi JL *et al*. Fluorescent muscarinic EGFP-hM1chimeric receptors: design, ligand binding and functional properties. *J Recept and Sig Transdu Res*, 1999, **19**(1-4): 423-436
- [8] Stadel JM, Wilson S, Bergsma D J. Orphan G protein-coupled receptors: a neglected opportunity for pioneer drug discovery. *Trends Pharmacol Sci*, 1997, **18**(11): 430-437
- [9] Dowell SJ. Understanding GPCRs-from orphan receptors to novel drugs. *Drug Discovery Today*, 2001, **6**(9): 884-886