

## 不同配体对 $m_5$ 乙酰胆碱受体-G 蛋白亚单位 $G_{11}$ 融合蛋白表达和功能的影响

郭政东<sup>1</sup>, 王海波<sup>2\*</sup>, 李 智<sup>1</sup>, 刘洪瑞<sup>1</sup>, 郭政礼<sup>3</sup>, 赵立斌<sup>3</sup>

(中国医科大学 1. 药理学教研室 2. 病理生理学教研室, 辽宁 沈阳 110001;

3. 沈阳市中心医院药剂科, 辽宁 沈阳 110024)

**摘要:** 目的 制备毒蕈碱乙酰胆碱受体  $m_5$  亚型与 G-蛋白亚单位  $G_{11}$  ( $m_5$ AChR- $G_{11}$ ) 融合蛋白, 探索  $m_5$ AChR 与  $G_{11}$  之间的耦联功能、相互作用及其影响因素。方法 两步 PCR 法建立  $m_5$ AChR 与  $G_{11}$  融合 cDNAs, 并在 Sf9 细胞内表达。 $[^3H]$ QNB 和  $[^{35}S]$ GTP $\gamma$ S 结合实验检测  $m_5$ AChR 与  $G_{11}$  融合蛋白的功能。结果  $m_5$ AChR- $G_{11}$  融合蛋白的表达水平为  $(60.4 \pm 2.0) \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$  膜蛋白。不同配体存在使融合蛋白中  $G_{11}$  与 GDP 的亲合力发生变化。乙酰胆碱(ACh)、卡巴胆碱、毛果芸香碱、异丙铵、异丙嗪及阿托品存在时, GDP 的  $IC_{50}$  值分别为 135, 63, 182, 4.1, 8.9 和  $5.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 无配体存在时, GDP 的  $IC_{50}$  值为  $23.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论 杆状病毒 Sf9 细胞系统表达的  $m_5$ AChR- $G_{11}$  融合蛋白具备 m 受体配体结合特性和组分间耦联的功能。 $m_5$ AChR- $G_{11}$  融合蛋白对 GDP 亲和力取决于 m 受体配体的性质, 分析 GDP 的亲合力的变化有利于筛选和鉴别  $m_5$  受体亚型特异性配体。

**关键词:** 受体, 毒蕈碱; G 蛋白类; 融合蛋白; 胆碱能激动剂; 胆碱能拮抗剂

中图分类号: R962

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2004)01-0011-06

毒蕈碱乙酰胆碱受体 (muscarinic acetylcholine receptors, mAChR) 作为 G-蛋白耦联受体超家族中的

一员, 具有该家族特征性的分子结构及跨膜信号转导方式。mAChR 由 5 种亚型  $m_1 \sim m_5$  构成, 经激动剂活化后, 与异三聚体 G-蛋白 ( $G_{\alpha}\text{-GDP}_{\beta\gamma}$ ) 形成受体-配体-G-蛋白三聚体复合物。当  $G_{\alpha}$  上的 GDP 被 GTP 替代后与  $G_{\beta\gamma}$  亚基分离进入活化状态, 兴奋下游效应器, 引起生物学效应。G-蛋白介导的跨膜信号转导机制一直倍受关注, 尤其是对受体后信号各组分之间分子水平的耦联机制及影响因素需更详尽的探讨。

本研究采用分子生物学技术, 将  $m_5$ AChR 与 G 蛋白亚单位  $G_{11}$  的 cDNAs 重组, 利用 Sf9 细胞系统表达  $m_5$ AChR- $G_{11}$  融合蛋白<sup>[1,2]</sup>。该融合蛋白具有三个显著的特点: (1) 信号组分间精确的 1:1 化学定量关系; (2) 信号组分的空间位置相互比邻; (3) 将  $G_{\alpha}$  紧紧锚定在细胞膜上<sup>[3]</sup>。这些特点使该融合蛋白具有高效耦联的特性。利用  $[^3H]$ 二苯羟乙酸奎宁酯 ( $[^3H]$ quinuclidinyl benzilate,  $[^3H]$ QNB) 放射配体结合实验和  $[^{35}S]$ GTP $\gamma$ S 竞争替代结合实验检测  $m_5$ AChR 与  $G_{11}$  之间的耦联功能, 阐明  $m_5$ AChR 与  $G_{11}$  亚单位相互作用和信号转导机制及影响因素, 鉴别和寻找  $m_5$  受体亚型特异性药物。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 药品与试剂

人  $m_5$ AChR 与牛  $G_{11}$  的 cDNAs, 杆状病毒载体质粒 pBacPAK9 cDNAs 购于日本 Takara Co.; 乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh)、卡巴胆碱 (carbachol)、毛果芸香碱 (pilocarpine)、异丙铵 (isopropamide)、异丙嗪 (promethazine)、阿托品 (atropine) 及鸟苷 5'-O-(3-硫代三磷酸) [guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate), GTP $\gamma$ S], 日本东京大学医学部脑生化研究室 Haga 教授赠; Sf9 昆虫细胞株, 北京大学生命科学学院陈建国教授赠; IPL-41 昆虫培养基购于 JRH Biosciences 公司;

收稿日期: 2003-03-20 接受日期: 2003-09-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30171077); 辽宁省自然科学基金资助项目 (002039)

作者简介: 郭政东 (1953-), 男, 辽宁省新民市人, 教授, 主要从事乙酰胆碱受体亚型与信号转导的研究。

\* 联系作者 E-mail: wang\_haibo@hotmail.com Tel: (024) 23256666-5362

胎牛血清, 磷酸丙糖-肉汤 (triose phosphate-broth), Pluronic F-68 溶液等购于 Sigma 公司;  $[^3\text{H}]$ QNB ( $17.8 \text{ PBq} \cdot \text{mol}^{-1}$ ),  $[^{35}\text{S}]$ GTP $\gamma$ S ( $388.6 \text{ PBq} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), 购于 Amersham Pharmacia Biotech 公司。

## 1.2 构建重组的 pBacPAK9-m<sub>5</sub>AChR-G<sub>11</sub> 表达载体和 pBacPAK9-m<sub>5</sub>AChR 表达载体

通过两步 PCR 实现 m<sub>5</sub>AChR-G<sub>11</sub> 的 cDNAs 重组, 并在 T4 连接酶的作用下, 将重组的外源性 m<sub>5</sub>AChR-G<sub>11</sub> cDNAs 插入 pBacPAK9 的 cDNAs 中, 形成 pBacPAK9-m<sub>5</sub>AChR-G<sub>11</sub> 表达载体。同样的方法构建 pBacPAK9-m<sub>5</sub>AChR 表达载体。

## 1.3 细胞培养和病毒转染

将快速复苏的 Sf9 细胞附壁生长于含有 10% 胎牛血清和 0.5% Pluronic F-68 的 IPL-41 昆虫培养液。当 Sf9 细胞生长至 50% 融合时, 分别传入重组的 pBacPAK9-m<sub>5</sub>AChR-G<sub>11</sub> 病毒载体和 pBacPAK9-m<sub>5</sub>AChR 病毒载体, 继续培养接种病毒表达载体的 Sf9 细胞, 表达 m<sub>5</sub>AChR 蛋白和 m<sub>5</sub>AChR-G<sub>11</sub> 融合蛋白, 48 h 后收集该细胞。

## 1.4 细胞膜蛋白的制备

将冷藏的 Sf9 细胞置于冰冷的 HEPES-KOH (pH 8.0) 匀浆缓冲液中悬浮, 倒入 Dounce 匀浆器内, 冰浴下匀浆 20 次,  $15\,000 \times g$ , 4℃ 离心 30 min 弃上清, 收集沉淀, 分装, -70℃ 冻存。应用 BCA 法测定膜蛋白量<sup>[4]</sup>。

## 1.5 $[^3\text{H}]$ QNB 放射配体结合实验和高亲和性 $[^{35}\text{S}]$ GTP $\gamma$ S 结合实验<sup>[4]</sup>

取 m<sub>5</sub>AChR 和 m<sub>5</sub>AChR-G<sub>11</sub> 膜蛋白各 10  $\mu\text{L}$  (蛋白量 14 和 20  $\mu\text{g}$ ), 在  $0.1 \sim 10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $[^3\text{H}]$ QNB 各 10  $\mu\text{L}$  做放射配体饱和结合实验, 在非特异性结合的反应体系中加入  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  阿托品, 总反应体积 100  $\mu\text{L}$ , 检测 m<sub>5</sub>AChR 蛋白和 m<sub>5</sub>AChR-G<sub>11</sub> 融合蛋白的活性及表达水平。在  $[^{35}\text{S}]$ GTP $\gamma$ S 竞争替代结合实验体系内, m<sub>5</sub>AChR 蛋白和 m<sub>5</sub>AChR-G<sub>11</sub> 融合蛋白与  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ACh,  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  阿托品,  $10^{-1} \sim 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 GDP 和  $0.3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $[^{35}\text{S}]$ GTP $\gamma$ S 进行反应。同时检测不同浓度 GTP, ATP 或不同的 m 受体配体对  $[^{35}\text{S}]$ GTP $\gamma$ S 与 m<sub>5</sub>AChR-G<sub>11</sub> 融合蛋白结合能力的影响。

## 1.6 统计学处理

采用 SPSS10.0 及 Excel 软件对实验结果进行 *t* 检验分析。

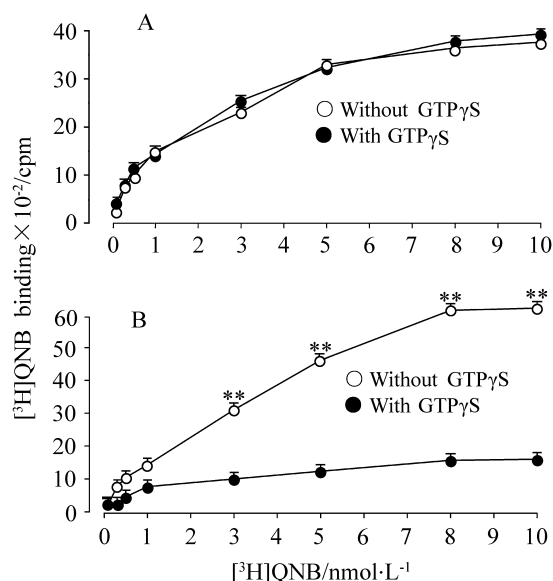
## 2 结果

### 2.1 m<sub>5</sub>AChR 蛋白和 m<sub>5</sub>AChR-G<sub>11</sub> 融合蛋白的表达水平

培养 48 h 后观察 Sf9 细胞, 正常的细胞大小均匀, 圆亮饱满; 而转染外源病毒载体后, 细胞肿胀变大, 边界不清, 大小不均, 颗粒增多。 $[^3\text{H}]$ QNB 放射配体饱和实验测得 m<sub>5</sub>AChR 蛋白表达水平为  $(40.6 \pm 1.8) \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$  膜蛋白, 而 m<sub>5</sub>AChR-G<sub>11</sub> 融合蛋白的表达水平为  $(60.4 \pm 2.0) \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$  膜蛋白。结果表明 m<sub>5</sub>AChR 和 m<sub>5</sub>AChR-G<sub>11</sub> 都保持了 m<sub>5</sub> 受体亚型与  $[^3\text{H}]$ QNB 结合的特异性, 这种高水平结合的能力, 为 m<sub>5</sub>AChR 与 G<sub>11</sub> 相互作用的机制及影响因素的研究提供了特异性的保证。

### 2.2 GTP $\gamma$ S 对 $[^3\text{H}]$ QNB 与 m<sub>5</sub>AChR-G<sub>11</sub> 融合蛋白结合的竞争性抑制作用

图 1A 和 B 显示随着  $[^3\text{H}]$ QNB 浓度的升高, m<sub>5</sub>AChR 蛋白及 m<sub>5</sub>AChR-G<sub>11</sub> 融合蛋白与  $[^3\text{H}]$ QNB 的结合量增加, 当  $[^3\text{H}]$ QNB 浓度为  $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 基本达到饱和。结果说明转染表达的 m<sub>5</sub>AChR 及 m<sub>5</sub>AChR-G<sub>11</sub> 的外源 DNA 的 Sf9 细胞收获的膜蛋白具



**Fig 1.**  $[^3\text{H}]$ QNB binding studies on stable expressed m<sub>5</sub>AChR protein (A) and m<sub>5</sub>AChR-G<sub>11</sub> fusion protein (B) with or without  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GTP $\gamma$ S.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ . \*\*  $P < 0.01$ , compared with the presence of  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GTP $\gamma$ S.

有与 m 受体配体特性。在有或没有  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GTP $\gamma$ S 存在时,  $\text{m}_5\text{AChR-G}_{11}$  融合蛋白的  $[\text{}^3\text{H}]\text{QNB}$  饱和结合曲线明显不同, 表现为 GTP $\gamma$ S 使曲线下移, 且两组间结合量差异显著 ( $P < 0.01$ ); 而在相同条件下  $\text{m}_5\text{AChR}$  蛋白与  $[\text{}^3\text{H}]\text{QNB}$  的饱和结合曲线无明显变化。结果说明 GTP $\gamma$ S 可能通过与  $\text{G}_{11}$  亚单位的结合, 改变  $\text{m}_5\text{AChR}$  的构象降低拮抗剂  $[\text{}^3\text{H}]\text{QNB}$  与  $\text{m}_5\text{AChR}$  蛋白的亲和性, 减少与  $[\text{}^3\text{H}]\text{QNB}$  的结合量, 使饱和结合曲线下移, 由此反映克隆表达的  $\text{m}_5\text{AChR-G}_{11}$  融合蛋白两分子具备耦联作用的能力。

### 2.3 $\text{m}_5\text{AChR}$ 蛋白和 $\text{m}_5\text{AChR-G}_{11}$ 融合蛋白与 $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 放射配体结合水平

当 GDP 零浓度时, ACh 使  $\text{m}_5\text{AChR-G}_{11}$  融合蛋白与  $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  的结合量高于阿托品存在时  $\text{m}_5\text{AChR-G}_{11}$  融合蛋白与  $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  的结合量, 且明显高于同等条件下  $\text{m}_5\text{AChR}$  蛋白与  $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  的结合量, 而在 ACh 和阿托品作用下  $\text{m}_5\text{AChR}$  蛋白与  $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  结合量无差别 (表 1)。

**Tab 1. Effects of acetylcholine (ACh) and atropine on  $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  binding in Sf9 membrane expressing  $\text{m}_5\text{AChR-G}_{11}$  fusion protein or  $\text{m}_5\text{AChR}$  protein**

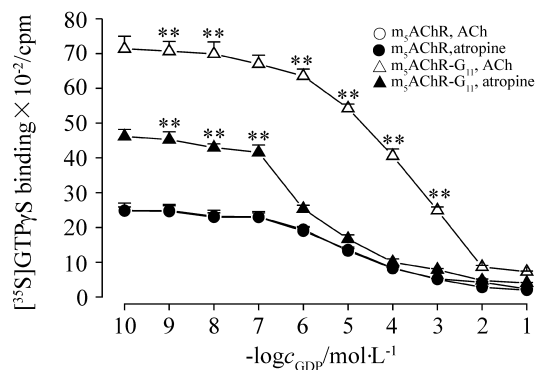
Membrane protein	Binding $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}/\text{fmol} \cdot \text{L}^{-1}$	
	ACh ( $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Atropine ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
$\text{m}_5\text{AChR-G}_{11}$	$71.4 \pm 1.3^{**}$	$46.2 \pm 1.5^{**}$
$\text{m}_5\text{AChR}$	$24.9 \pm 1.7$	$24.8 \pm 1.5$

$\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ .  $^{**} P < 0.01$ , compared with corresponding  $\text{m}_5\text{AChR}$  group.

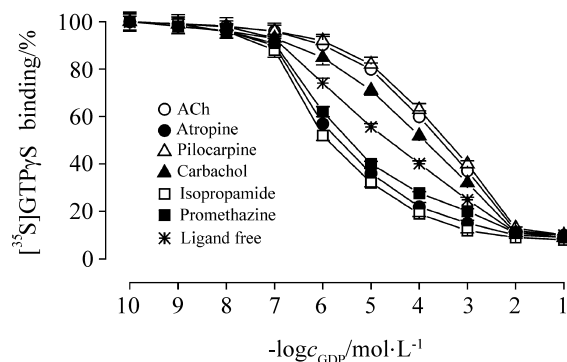
图 2 显示在 ACh 或阿托品存在下,  $10^{-10} \sim 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GDP 对  $0.3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} [\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  与  $\text{m}_5\text{AChR-G}_{11}$  融合蛋白和  $\text{m}_5\text{AChR}$  蛋白的竞争性替代结合实验的影响。ACh 使  $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  与  $\text{m}_5\text{AChR-G}_{11}$  融合蛋白结合量明显高于阿托品作用下  $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  与  $\text{m}_5\text{AChR}$  蛋白的结合量; 且显著高于在 ACh 或阿托品作用下,  $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  与  $\text{m}_5\text{AChR}$  蛋白的结合量 ( $P < 0.01$ )。

### 2.4 在不同配体作用下 GDP, GTP 及 ATP 对 $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 替代结合作用的影响

图 3 所示为  $10^{-10} \sim 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GDP 存在时,  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ACh,  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  卡巴胆碱,  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  毛果芸香碱,  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  异丙胺,  $0.1$



**Fig 2. Displacement by GDP of  $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  binding to  $\text{m}_5\text{AChR}$  membrane protein or  $\text{m}_5\text{AChR-G}_{11}$  fusion protein expressing in Sf9 cells in the presence of  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ACh or  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  atropine.**  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ .  $^{**} P < 0.01$ , compared with corresponding  $\text{m}_5\text{AChR}$  group.

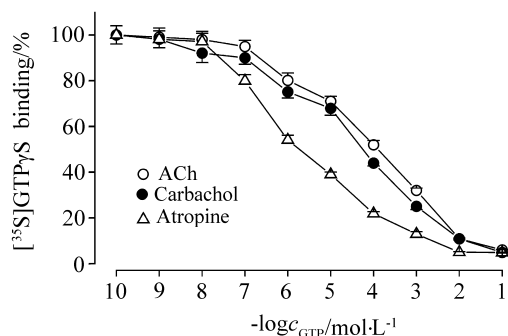


**Fig 3. Displacement by GDP of  $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  binding to  $\text{m}_5\text{AChR-G}_{11}$  fusion protein expressed in Sf9 cells in the presence of different ligands.** Ligands:  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ACh,  $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  atropine,  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  pilocarpine,  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  carbachol,  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  isopropamide,  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  promethazine.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ . There is a significant difference between all ligand groups and corresponding points of ligand-free group, when GDP at concentration  $10^{-6} \sim 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ).

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  异丙胺及  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  阿托品对  $\text{m}_5\text{AChR-G}_{11}$  融合蛋白与  $0.3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} [\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  替代结合曲线的影响。毛果芸香碱、ACh 和卡巴胆碱使替代曲线右移, 且毛果芸香碱使曲线右移最显著; 异丙胺、异丙胺和阿托品使曲线左移, 且异丙胺使曲线左移最显著。结果提示, 不同种类配体对 GDP 替代  $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  与  $\text{m}_5\text{AChR-G}_{11}$  融合蛋白的结合产生不同的影响。在 ACh、毛果芸香碱、卡巴胆碱、异丙胺、异

丙嗪及阿托品作用下 GDP 的  $IC_{50}$  值分别为 135, 182, 63, 4.1, 8.9 和  $5.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 无配体存在时为  $23.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结果提示, 与无配体存在时相比, 激动剂 ACh、毛果芸香碱、卡巴胆碱使 GDP 与  $m_5\text{AChR-G}_{11}$  分子中  $G_{11}$  亚单位亲和力显著下降, 而拮抗剂异丙铵、异丙嗪和阿托品使 GDP 与  $m_5\text{AChR-G}_{11}$  融合蛋白分子中  $G_{11}$  亚单位亲和力增强。

图 4 显示在相同实验条件下, 用  $10^{-10} \sim 10^{-1} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GTP 对  $0.3 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $[^{35}\text{S}] \text{GTP}\gamma\text{S}$  与  $m_5\text{AChR-G}_{11}$  融合蛋白的竞争性替代结合实验, 发现不同配体对 GTP 替代  $[^{35}\text{S}] \text{GTP}\gamma\text{S}$  与  $m_5\text{AChR-G}_{11}$  结合曲线有着与 GDP 相似的作用, 但曲线变化的幅度小于 GDP。ACh、卡巴胆碱和阿托品存在时, GTP 的  $IC_{50}$  值分别是 21.9, 14.8 和  $6.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

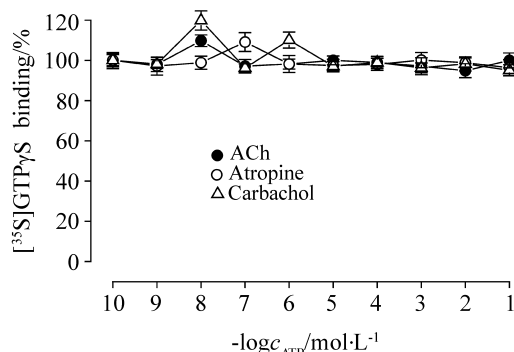


**Fig 4. Displacement by GTP of  $[^{35}\text{S}] \text{GTP}\gamma\text{S}$  ( $0.3 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) binding to  $m_5\text{AChR-G}_{11}$  fusion protein expressed in Sf9 cells in the presence of different ligands.** Ligands:  $0.1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ACh,  $0.1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  carbachol or  $0.01 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  atropine.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ . There is a significant difference between ACh or carbachol group and corresponding points of atropine group, when GTP at concentration  $10^{-7} \sim 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ).

图 5 显示不同浓度的 ATP 对  $0.3 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $[^{35}\text{S}] \text{GTP}\gamma\text{S}$  与  $m_5\text{AChR-G}_{11}$  融合蛋白替代结合作用的影响。  $10^{-10} \sim 10^{-1} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 ATP 未引起  $[^{35}\text{S}] \text{GTP}\gamma\text{S}$  与  $m_5\text{AChR-G}_{11}$  融合蛋白结合量的明显变化, 结果说明 ATP 对  $m_5\text{AChR-G}_{11}$  融合蛋白分子中  $G_{11}$  亚单位与  $[^{35}\text{S}] \text{GTP}\gamma\text{S}$  结合的亲和性无影响。

### 3 讨论

$m\text{AChR}$  是跨膜受体家族成员之一, 是 G-蛋白耦



**Fig 5. Displacement by ATP of  $[^{35}\text{S}] \text{GTP}\gamma\text{S}$  ( $0.3 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) binding to  $m_5\text{AChR-G}_{11}$  fusion protein in the presence of different ligands.** Ligands:  $0.1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ACh,  $0.01 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  atropine and  $0.1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  carbachol, respectively.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ .

联受体。当  $m\text{AChR}$  与配体结合后发生构象变化进一步使胞内的 G-蛋白活化或抑制, 介导多种信号转导过程。通过检测受体兴奋后 G-蛋白上 GTP 交换和水解的能力, 可以研究  $m\text{AChR}$  与 G-蛋白耦联作用的机制。融合蛋白正是满足这种需要而产生的新的受体及受体后信号转导机制的研究工具。本实验采用分子生物学方法成功地表达了  $m_5\text{AChR-G}_{11}$  融合蛋白, 其保证了受体与 G-蛋白亚单位间精确的 1:1 信号伴侣关系及空间比邻的位置关系, 可排除内源性 G-蛋白的干扰, 直接在 G-蛋白水平检测 m 受体激动后 G-蛋白催化 GTP 结合及水解的能力。因此该融合蛋白可用于  $m_5$  受体与 G-蛋白耦联机制及信号转导影响因素的研究, 鉴别和寻找  $m_5$  受体特异性配体<sup>[3,4]</sup>。

在 GDP 替代  $[^{35}\text{S}] \text{GTP}\gamma\text{S}$  结合实验中, ACh 作用下  $[^{35}\text{S}] \text{GTP}\gamma\text{S}$  与  $m_5\text{AChR-G}_{11}$  融合蛋白结合量明显高于阿托品存在时两者的结合量; 且显著地高于在 ACh, 阿托品分别作用下,  $[^{35}\text{S}] \text{GTP}\gamma\text{S}$  与  $m_5\text{AChR}$  蛋白的结合量 (图 2)。说明激动剂 ACh 可引起  $m_5\text{AChR-G}_{11}$  融合蛋白分子中的  $G_{11}$  亚单位对  $[^{35}\text{S}] \text{GTP}\gamma\text{S}$  亲和性增加, 这种亲和性增加强度大于拮抗剂阿托品。而 ACh 和阿托品对  $m_5\text{AChR}$  与  $[^3\text{H}] \text{QNB}$  结合量相似, 再次证明内源性 G-蛋白对 GDP 替代  $[^{35}\text{S}] \text{GTP}\gamma\text{S}$  与  $m_5\text{AChR}$  蛋白或  $m_5\text{AChR-G}_{11}$  融合蛋白地结合作用几乎无影响。

在 GDP 替代  $[^{35}\text{S}] \text{GTP}\gamma\text{S}$  与  $m_5\text{AChR-G}_{11}$  融合蛋白的结合实验中, 与无配体存在时相比, ACh、卡巴

胆碱、毛果芸香碱可使 GDP 的  $IC_{50}$  值增大,而异丙铵、异丙嗪、阿托品可使 GDP 的  $IC_{50}$  值减小(图 3)。这一结果表明,激动剂 ACh、卡巴胆碱、毛果芸香碱可兴奋  $m_5$ AChR,从而活化  $m_5$ AChR- $G_{11}$  融合蛋白中  $G_{11}$  亚单位,降低  $G_{11}$  亚单位与 GDP 结合的亲和性,使 GDP 易于与  $G_{11}$  相脱离,促进 GTP 和 GDP 与  $G_{11}$  结合及解离速率,实现  $m_5$ AChR 兴奋后的信号转导作用。而拮抗剂阿托品、异丙铵、异丙嗪作用到  $m_5$ AChR 上,使 GDP 与  $G_{11}$  亚单位亲和性增加,降低了在  $G_{11}$  亚单位 GDP 与 GTP 交换速率,导致受体后信号转导过程的抑制作用。众所周知竞争性拮抗剂在药理学上的定义是有亲和力,而无内在活性。而本实验结果则表明,阿托品、异丙铵、异丙嗪作用到  $m_5$ AChR- $G_{11}$  融合蛋白分子上,导致  $G_{11}$  亚单位构象变化使 GDP 与  $G_{11}$  亚单位亲和性下降,依次为异丙铵、阿托品、异丙嗪。因此有必要修正对竞争性拮抗剂的认识,即它不但有亲和力,而且有内在活性。但这个内在活性或效应力只能从  $m$  受体后 G-蛋白的水平上显现出来。同时通过本实验 GDP 的  $IC_{50}$  比较,判断未知  $m_5$ AChR 配体是激动剂或拮抗剂。而在做  $m_5$ AChR 蛋白的竞争性替代实验中是无法实现的<sup>[5]</sup>。

与 ACh 和卡巴胆碱相比,在毛果芸香碱作用下,GDP 的  $IC_{50}$  值最大,GDP 与  $m_5$ AChR- $G_{11}$  融合蛋白分子中  $G_{11}$  亚单位亲和性最低,GTP 与 GDP 在  $G_{11}$  亚单位交换速率最快,从而使  $m_5$ AChR 后信号转导过程加快。推测毛果芸香碱是  $m_5$ AChR 亚型的特异性的完全激动剂。这一结果与  $m_2$ AChR- $G_{i1\alpha}$  及  $m_1$ AChR- $G_{11}$  融合蛋白实验结果不同<sup>[4~7]</sup>。可能毛果芸香碱就是  $m_5$ AChR 亚型的特异性激动剂,其原因有待于进一步研究。

在 ACh、卡巴胆碱、阿托品作用下,GTP 替代  $[^{35}S]$ GTP $\gamma$ S 与  $m_5$ AChR- $G_{11}$  融合蛋白的结合曲线形状与 GDP 相似(图 4)。与 GDP 的  $IC_{50}$  值相比,GTP 的  $IC_{50}$  值较小,说明 GTP 与  $m_5$ AChR- $G_{11}$  融合蛋白分子中  $G_{11}$  亚单位亲和力较高,易与  $G_{11}$  亚单位结合,但在阿托品作用下,GDP 的  $IC_{50}$  值和 GTP 的  $IC_{50}$  值相似,与激动剂的作用不同。同等条件下,ATP 对

$[^{35}S]$ GTP $\gamma$ S 与  $m_5$ AChR- $G_{11}$  融合蛋白替代结合作用无影响(图 5)。可能是鸟嘌呤与腺嘌呤分子结构上的差异造成 ATP 不能与  $m_5$ AChR- $G_{11}$  融合蛋白分子中  $G_{11}$  亚单位结合,因而不能影响  $m_5$ AChR- $G_{11}$  融合蛋白分子中  $G_{11}$  亚单位构象变化而改变与  $[^{35}S]$ GTP $\gamma$ S 的亲和性。说明  $G_{11}$  亚单位具有 G-蛋白立体结构的专一性。

总之, $m_5$ AChR- $G_{11}$  融合蛋白成功表达为研究  $m_5$ AChR 后信号转导机制提供便利条件,同时也为筛选  $m_5$  受体亚型特异性配体提供了可能性,为  $m_5$  受体亚型特异性新药的开发和研制提供有力的实验手段。

#### 4 参考文献:

- [1] Wenzel-Seifert K, Lee TW, Seifert R, Kobilka BK. Restricting mobility of G $\alpha$  relative to the  $\beta_2$ -adrenoceptor enhances adenylyl cyclase activity by reducing G $\alpha$  GTPase activity[J]. *Biochem J*, 1998, **334**(Pt 3):519 - 524.
- [2] Seifert R, Wenzel-Seifert K, Gether U, Lam VT, Kobilka BK. Examining the efficiency of receptor/G-protein coupling with a cleavable  $\beta_2$ -adrenoceptor-G $\alpha$  fusion protein[J]. *Eur J Biochem*, 1999, **260**(3):661 - 666.
- [3] Milligan G. Insights into ligand pharmacology using receptor-G-protein fusion proteins[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2000, **21**(1):24 - 28.
- [4] Guo ZD, Suga H, Okamura M, Takeda S, Haga T. Receptor-G $\alpha$  fusion proteins as a tool for ligand screening[J]. *Life Sci*, 2001, **68**(19 - 20):2319 - 2327.
- [5] Wang H, Guo ZD, Li Z, Liu HR. Effects of various muscarinic ligands on  $M_2$ AChR- $G_{i1\alpha}$  fusion protein expressed in Sf9 insect cells[J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 2002, **23**(3):230 - 236.
- [6] Guo ZD, Kameyama K, Rinken A, Haga T. Ligand binding properties of muscarinic acetylcholine receptor subtypes ( $m_1 - m_5$ ) expressed in baculovirus-infected insect cells[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995, **274**(1):378 - 384.
- [7] Guo ZD, Wang HB, Liu HR, Li Z, Yu XH, Guo ZL, et al. The effects of different ligands on the expression and function of  $m_1$ AChR- $G_{11}$  fusion protein[J]. *Pharmacol Bull China* (中国药理学通报), 2003, **19**(11):1294 - 1298.

## Effects of various muscarinic ligands on the expression and function of m<sub>5</sub> muscarinic acetylcholine receptor-G<sub>11</sub> fusion protein

GUO Zheng-Dong<sup>1</sup>, WANG Hai-Bo<sup>2\*</sup>, LI Zhi<sup>1</sup>, LIU Hong-Rui<sup>1</sup>, GUO Zheng-Li<sup>3</sup>, ZHAO Li-Bin<sup>3</sup>

(1. Department of Pharmacology, 2. Department of Pathophysiology, China Medical University, Shenyang 110001, China; 3. Department of Pharmacy, Central Hospital of Shenyang, Shenyang 110024, China)

**Abstract:** **AIM** To test the coupling function, the interreaction and the influence factors between m<sub>5</sub> muscarinic acetylcholine receptor (m<sub>5</sub>AChR) and G<sub>11</sub> protein by generating m<sub>5</sub>AChR and G<sub>11</sub> fusion protein (m<sub>5</sub>AChR-G<sub>11</sub>) in baculovirus-Sf9 cells system. **METHODS** m<sub>5</sub>AChR-G<sub>11</sub> Fused DNA was generated in a two-step PCR and then expressed in Sf9 cells to produce fusion protein. [<sup>3</sup>H]QNB and [ $\gamma$ -<sup>35</sup>S]GTP binding experiments were used to study the function of m<sub>5</sub>AChR-G<sub>11</sub> fusion protein. **RESULTS** The expression level of m<sub>5</sub>AChR-G<sub>11</sub> was  $(60.4 \pm 2.0) \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$  protein. The affinity of GDP to G<sub>11</sub> partner changed in the presence of different muscarinic ligands. IC<sub>50</sub> values of GDP in the presence of acetylcholine (ACh), carbachol, pilocarpine, isopropamide, promethazine and atropine were 135, 63, 182, 4.1, 8.9 and 5.9  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , respec-

tively, and that in the absence of muscarinic ligand was 23.4  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . **CONCLUSION** The m<sub>5</sub>AChR-G<sub>11</sub> fusion protein expressed in baculovirus-sf9 cells system has pharmacological specificity for m<sub>5</sub> receptor and the efficient coupling function between the two partners. Affinity of GDP to ligand-bound fusion protein represents the species of muscarinic ligands. This is helpful to screen and detect new specific ligands of the muscarinic receptors subtype.

**Key words:** receptors, muscarinic; G-proteins; fusion proteins; cholinergic agonists; cholinergic antagonists

**Foundation item:** The project supported by National Natural Science Foundation of China (30171077); and by Natural Science Foundation of Liaoning Province (002039)

\* Corresponding author.

(本文编辑 乔虹)