

人淀粉样蛋白前体 695 基因及人烟碱乙酰胆碱受体 $\alpha 4\beta 2$ 亚单位基因共表达细胞模型的构建

聂惠贞, 李佐青, 沈颖华, 黄旭, 王鑫, 韩燕飞, 殷明*

(上海交通大学药学院, 上海 200240)

摘要: 目的 为满足寻找可能影响淀粉样 β 蛋白 ($A\beta$) 在阿尔茨海默病过程中的药物实验的需求, 建立共表达人淀粉样蛋白前体 (APP) 695 基因和烟碱乙酰胆碱受体 (nAChR) $\alpha 4\beta 2$ 亚单位基因的细胞模型。方法 用脂质体转染方法把 APP 695 基因转染进已稳定转染 nAChR $\alpha 4\beta 2$ 亚单位基因的 SH-EP1 细胞。用 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ G418 加压筛选, 并挑选细胞单克隆。用 RT-PCR 和 Western 蛋白印迹法对转染后的细胞单克隆进行鉴定, 挑取成功转染并高表达 APP 695 的细胞进行克隆。膜片钳检测所挑细胞克隆的 $\alpha 4\beta 2$ 受体功能。结果 挑出成功稳定转染人 APP 695 基因及人 nAChR $\alpha 4\beta 2$ 亚单位基因的共表达细胞克隆株。膜片钳方法检测到此细胞克隆株上 nAChR $\alpha 4\beta 2$ 存在活性。结论 成功制备了共表达人 APP 695 基因及人 nAChR $\alpha 4\beta 2$ 亚单位基因的细胞模型, 为探讨神经元 nAChR $\alpha 4\beta 2$ 亚型对 $A\beta$ 加工影响的药物实验提供了条件。

关键词: 淀粉样 β 蛋白前体; 受体, 烟碱

中图分类号: R965.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2008)01-0073-04

淀粉样蛋白前体 (amyloid protein precursor, APP) 基因定位于 21 号染色体长臂中段, APP 基因转录后可加工剪接成为多种同源体, 主要以 3 种形式存在, 分别为 APP 695、APP 751 和 APP 770, 脑组织中主要是 APP 695。APP 有两条水解途径。一条

是经 α 分泌酶作用, 产生分泌型的 APP (sAPP), 具有神经营养、促神经细胞发育等神经细胞保护作用。另外一条水解途径是经过 β 和 γ 分泌酶水解剪切形成淀粉样 β 蛋白 (amyloid β -protein, $A\beta$)^[1]。阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的 $A\beta$ 学说认为, 病理状态下脑内 $A\beta$ 片段 $A\beta_{1-40}$ 及 $A\beta_{1-42}$ 产生增加形成寡聚体, 进而形成斑块, 对神经元产生多方面的毒性作用, 表现为 AD 的一系列症状^[2-3]。

神经元烟碱型乙酰胆碱受体 (nicotinic acetylcholine receptor, nAChR) 为配体门控性离子通道受体, 在肌肉和神经系统广泛表达多种亚型, 在中枢神经系统以 $\alpha 4\beta 2$ 亚型表达最为广泛^[4]。近年来关于神经元 nAChR 和 AD 的研究提示, 激动中枢 nAChR 可以减少 $A\beta$ 产生, 增强认知和学习记忆功能, 减缓 AD 的发生发展^[5-6]。神经元 nAChR 被认为是 AD 治疗药物的新靶点^[7], 但最为相关的受体亚型还不清楚。为了比较和寻找有效影响该受体亚型, 进而可能成为 AD 防治药物的化合物, 本研究制备了人 APP 695 基因和人 nAChR $\alpha 4\beta 2$ 亚型基因在 SH-EP1 细胞的稳定共表达模型, 为进一步在细胞水平观察 $\alpha 4\beta 2$ 亚型对 APP 和 $A\beta$ 水平的影响打下基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和细胞株、工具酶和主要试剂

穿梭质粒 pcDNA3.1 (-) 为 Invitrogen 公司产品, 在真核细胞表达 neo 抗性基因。含有人 APP 695 基因全长的 pXCJL 载体为美国 Mucke 博士惠赠。DH5 α 细菌为本室保存。已稳定转染人 nAChR $\alpha 4\beta 2$ 亚单位基因的 SH-EP1 (SH-EP1- $\alpha 4\beta 2$) 细胞为美国 Lukas 博士惠赠。限制性内切酶 XbaI 和 Hind III、T4 DNA 连接酶为 MBI 公司产品; Taq 酶、pfu 酶、dNTP 为天根生化公司产品; Plasmid mini kit 为 Qiagen 公司产品; PCR 引物合成及重组克隆测序由上海生工生物技术有限公司完成; DMEM 培养

收稿日期: 2007-03-12 接受日期: 2007-04-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30572179)

作者简介: 聂惠贞 (1979-), 女, 山东济宁人, 博士研究生, 研究方向为神经药理学, Tel: (021) 34204736, E-mail: hznjie@sjtu.edu.cn

* 联系作者 E-mail: myin@sjtu.edu.cn Tel: (021) 34204737

基、胎牛血清、马血清购自 Gibco 公司; LipofectamineTM Reagent、Trizol 为 Invitrogen 公司产品; ReverTra Ace 逆转录试剂盒为 Toyobo 公司产品; 鼠抗人 APP 单克隆抗体为 Chemicon 公司产品; ECL 荧光检测试剂盒是碧云天生物研究所产品; 新霉素 (neomycin, G418) 购自 Calbiochem 公司。

1.2 引物设计与 PCR 扩增

根据基因库内人 APP 695 (gi: 41406056) 基因序列用 Primer 5.0 设计引物并合成。引物 1: 5'-GGCTCTAGACCACCATGCTGCCCCGTTTGGCACTGCT-3', 引物 2: 5'-CCCAAGCTTCCGCTAGTTCTGCATCTGCTCAAAGA-3', 引物 1 的 5' 端加有 XbaI 酶切位点序列和真核翻译起始的 Kozak 序列, 引物 2 的 5' 端加有 HindIII 酶切位点序列。以 pXCJL 为模板用 pfu 酶高保真扩增 2.1 kb 的 APP 695 基因。PCR 程序为: 94℃ 变性 3 min 进入循环过程, 94℃ 变性 1.5 min, 58℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 4.5 min, 循环 31 次后 72℃ 复性 10 min。用 0.8% 凝胶电泳回收 APP 695 产物。

1.3 表达载体构建

APP 695 产物和 pcDNA3.1(-) 进行 XbaI 和 HindIII 双酶切, 凝胶回收后用 T4 DNA 连接酶连接, 转化至 DH5 α 细菌, 氨苄西林抗性筛选重组子 pcDNA3.1(-)-APP 695, 扩增提取质粒, 测序鉴定。

1.4 细胞培养

SH-EP1- $\alpha 4\beta 2$ 用 Gibco DMEM 高糖培养基在 37℃, 5% CO₂ 细胞培养箱培养。培养液中含有 5% 马血清和 10% 胎牛血清, 并加入终浓度分别为 200 和 130 mg·L⁻¹ 的 zeocin 和潮霉素 B 作为选择压力以维持 $\alpha 4$ 和 $\beta 2$ 亚单位基因的持续表达。

1.5 pcDNA3.1(-)-APP 695 在 SH-EP1- $\alpha 4\beta 2$ 细胞转染及细胞克隆鉴定

预实验确定 G418 筛选浓度为 500 g·L⁻¹。用脂质体法 LipofectamineTM PLUS (Invitrogen) 进行转染。转染实验按说明书操作。转染 3 d 后 G418 500 mg·L⁻¹ 加压筛选, 未转染进 neo 抗性基因的细胞开始死亡。14 d 后细胞单克隆形成, 有限稀释法将细胞进行单克隆化, 2 周后单克隆长满 96 孔板, 胰酶消化, 转入 24 孔板, 长满后转入 12 孔板培养。转染 34 d 后收集单克隆细胞, 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 鉴定细胞克隆。用 Trizol 法按说明书步骤提取细胞总 RNA。以总 RNA 为模板, APP 695 引物 1 和引物 2 进行 PCR。PCR 程序为: 94℃ 变性 3 min

进入循环过程, 94℃ 变性 1.5 min, 55℃ 退火 1.5 min, 72℃ 延伸 3 min, 循环 31 次后 72℃ 复性 10 min。凝胶电泳鉴定 PCR 产物。然后用 $\alpha 4$ 和 $\beta 2$ 基因引物进行 PCR, $\alpha 4$ 引物为 5'-CCATCGCTCAGCTCATTGACG-3' 和 5'-CTGGTCGGAGGGTGACTTGC-3', $\beta 2$ 引物为 5'-TATTCCAATGCCGTGGTCTCC-3' 和 5'-TG-GTCATCGTCCTCGCTC-3', 凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

1.6 Western 蛋白印迹法检测 APP 695 的表达

对 RT-PCR 挑选出的阳性克隆, 裂解细胞, 提取细胞蛋白。用酶标仪测定蛋白浓度, 取 10 μ g 上样进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 用 12% 分离胶, 5% 积层胶, 硝酸纤维素膜半干电转移, 转膜时间 2 h, 小鼠抗人 APP 695 单抗孵育 3 h, 山羊抗小鼠 IgG 二抗孵育 1 h, ECL 荧光检测, 显影、定影并拍照。

1.7 膜片钳检测 SH-EP1- $\alpha 4\beta 2$ -APP 695 细胞上 $\alpha 4\beta 2$ 受体功能

对 Western 蛋白印迹法挑选出的 APP 695 表达较高的细胞克隆进行膜片钳实验, 采取传统的全细胞记录技术。钳制电位为 -60 mV, 低通滤波为 2 kHz, 采样滤波为 5 kHz, 测试和记录软件用 Axon DigiData-1200A, 结果分析用 Axonscope 1.1.1 软件。通过微操纵器移动快速给药装置的排管给药, 给予 100 μ mol·L⁻¹ 烟碱 4 s, 观察细胞上 nAChR $\alpha 4\beta 2$ 亚型通道活性。

2 结果与讨论

2.1 重组质粒 pcDNA3.1(-)-APP 695 的构建

以 pXCJL 为模板扩增目的片段, 得到约 2.1 kb 的 PCR 产物 (图 1), 回收后与 pcDNA3.1(-) 进行 XbaI 和 HindIII 双酶切, 凝胶回收后用 T4 DNA 连接酶连接, 转化至 DH5 α 细菌, 氨苄西林抗性筛选重组子 pcDNA3.1(-)-APP 695, 扩增提取质粒, 测序鉴定, 测序结果与 GenBank 报道序列 (gi: 41406056) 同源性达 100%。

2.2 RT-PCR 结果

扩增的 PCR 产物凝胶电泳鉴定结果, 22 个 pcDNA3.1(-)-APP 695 转染细胞克隆中, 13 个有目的条带 APP 695 的表达, 约 2.1 kb; pcDNA3.1(-) 转染细胞克隆没有目的条带出现 (图 2)。然后用 $\alpha 4$ 和 $\beta 2$ 基因引物进行 PCR, 13 个表达 APP 695 的细胞克隆中有 4 个克隆既有 $\alpha 4$ 目的条带又有 $\beta 2$ 目的条带 (图 3)。

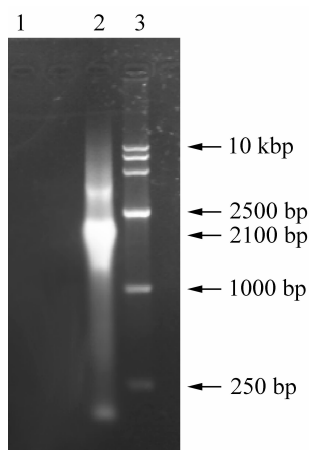


Fig 1. Electrophoresis of amyloid protein precursor (APP) 695 PCR product. Lane 1: negative control (PCR without template); lane 2: PCR product; lane 3: marker.

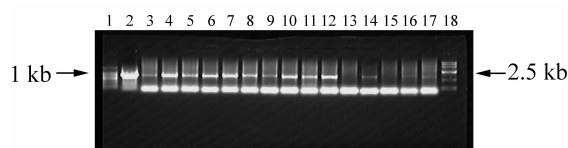


Fig 2. Electrophoresis of RT-PCR products (APP 695 primer). Lanes 1 and 18: marker; lane 2: positive control [pcDNA3.1(-)-hAPP 695 as template]; lanes 3-17: RT-PCR products of different clones.

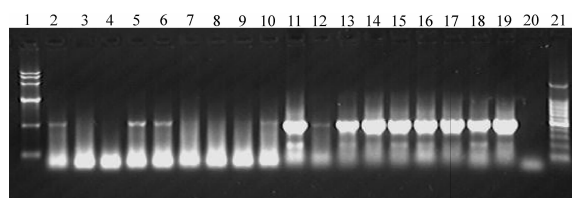


Fig 3. Electrophoresis of RT-PCR products (α4 and β2 primer). Lanes 1 and 21: marker; lane 20: negative control (PCR without template); lanes 2-10: RT-PCR products of different clones with α4 primer; lanes 11-19: RT-PCR products of different clones with β2 primer.

2.3 Western 蛋白印迹法检测结果

通过 RT-PCR 挑选出的 4 株细胞克隆用 Western 蛋白印迹法检测 APP 695 表达。结果显示, 4 株 SH-EP1-α4β2-APP 695 细胞克隆中以编号为 1C8 细胞株 APP 695 及其水解产物 sAPP 表达最高(图 4), 故将 1C8 细胞株作为成功建立的细胞模型进行下一步 α4β2 受体活性实验。

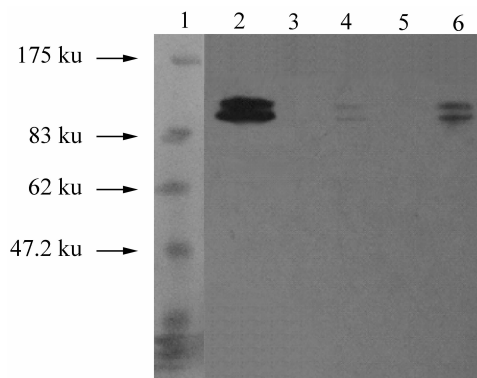


Fig 4. Western blot analysis of expression products. Lane 1: marker; lane 2: clone 1C8; lane 3: clone 2D12; lane 4: clone 1D4; lane 5: negative control (not transfected cell); lane 6: clone 1A7.

2.4 膜片钳检测结果

对 1C8 细胞株进行膜片钳实验, 采取传统的全细胞记录技术, 共钳取 8 个细胞进行观察, 结果一致。没有给予烟碱时, 细胞膜电位平稳, 没有电流出现。给予 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 烟碱 4 s, 细胞膜 α4β2 受体离子通道被激活, 出现内向电流(图 5), 说明细胞上 α4β2 受体有活性。

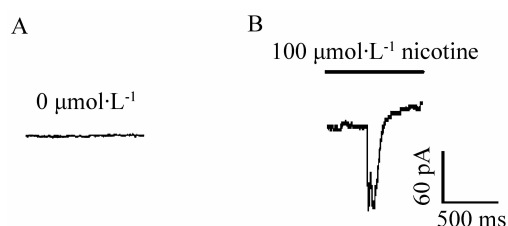


Fig 5. Effect of nicotine on membrane potential of selected transfected cell clone. A: $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ nicotine, no effect on membrane potential; B: $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ nicotine, α4β2 nAChR was activated and introvert current was induced.

至此, 本实验成功建立人 APP 695 基因及人 nAChR α4β2 亚单位基因的共表达细胞模型, 为探讨神经元 nAChR α4β2 亚型对 Aβ 加工的影响的药物实验提供了条件。

致谢: 美国加州大学旧金山分校 Gladstone 神经病学研究所 Mucke 博士赠送质粒; 美国亚利桑那州 Barrow Neurological Institute Lukas 博士赠送细胞株。

3 参考文献:

- [1] Selkoe DJ. Deciphering the genesis and fate of amyloid beta-protein yields novel therapies for Alzheimer disease [J]. *J Clin Invest*, 2002, **110**(10):1375-1381.
- [2] Dickson DW, Crystal HA, Bevona C, Honer W, Vincent I, Davies P. Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly [J]. *Neurobiol Aging*, 1995, **16**(3):285-298.
- [3] Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, et al. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function [J]. *Nat Neurosci*, 2005, **8**(1):79-84.
- [4] Dani JA. Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system [J]. *Biol Psychiatry*, 2001, **49**(3):166-174.
- [5] O'Neill MJ, Astles P, Dell CP, Keenan M, Murray TK, Lakics V, et al. Neuronal nicotinic receptors and neuroprotection; newer ligands may help us understand their role in neurodegeneration [J/OL]. *Medicinal Chemistry Reviews-Online*, 2005, **2**(6):455-471. <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/mcro/2005/>
- [6] Dajas-Bailador F, Wonnacott S. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2004, **25**(6):317-324.
- [7] Jones IW, Westmacott A, Chan E, Jones RW, Dineley K, O'Neill MJ, et al. Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor expression in Alzheimer's disease: receptor densities in brain regions of the APP (SWE) mouse model and in human peripheral blood lymphocytes [J]. *J Mol Neurosci*, 2006, **30**(1-2):83-84.

Construction of coexpression cell model of human amyloid protein precursor 695 gene and human nicotinic acetylcholinergic $\alpha 4\beta 2$ subunit genes

NIE Hui-Zhen, LI Zuo-Qing, SHEN Ying-Hua, HUANG Xu, WANG Xin, HAN Yan-Fei, YIN Ming*
(School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: **AIM** For the need of cell model in drugs research that may have effect on amyloid β -protein in Alzheimer's disease processing, the cells coexpressed with human amyloid protein precursor (APP)695 gene and human nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) $\alpha 4\beta 2$ subunit genes were constructed. **METHODS** Liposome was used to transfect human APP 695 gene into SH-EP1 cells which stably expressed nAChR $\alpha 4\beta 2$ genes. Neomycin ($500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) was used to ensure stable expression of APP 695, and limiting dilution assay was used to obtain single transfected cell clones. RT-PCR and Western blot were used to verify the clones. The highly expressed cell clones were selected, and the activity of nAChR $\alpha 4\beta 2$ was justified by patch clamp. **RESULTS** Cell

clone with stable coexpression of APP 695 gene and nAChR $\alpha 4\beta 2$ genes was constructed successfully, and the activity of $\alpha 4\beta 2$ receptors in the cell clone was confirmed by patch clamp.

CONCLUSION Coexpression cell model of human APP 695 and nAChR $\alpha 4\beta 2$ genes was constructed successfully, which may provide good method for pharmaceutical experiments on effects of nAChR $\alpha 4\beta 2$ on amyloid processing.

Key words: amyloid β -protein precursor; receptors, nicotinic

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China(30572179)

* Corresponding author.

(本文编辑 乔虹)