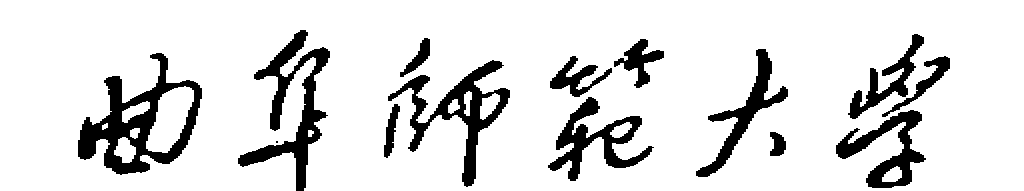
分类号：Q331 校单位代码：10446



硕 士 学 位 论 文

**论文题目：缓激肽 1 型受体和 Apelin 受体异源二聚化的实验研究**

研 究 生 姓 名 ： 刘 路 路

学 科 、 专 业 ： 生 物 化 学 与 分 子 生 物 学研 究 方 向 ： G 蛋白偶联受体的二聚化

导师姓名、职称： 白 波 教授

陈 京 教授

论文完成时间： 2 0 1 3 年 5 月

曲阜师范大学研究Th学位论文原创性说明

（根据学位论文类型相应地在“□”划“√”）

本人郑重声明：此处所提交的博士□/硕士□论文《 缓激肽 1 型受体和

Apelin 受体异源二聚化的实验研究 》，是本人在导师指导下，在曲阜师范大学攻读博士□/硕士□学位期间独立进行研究工作所取得的成果。论文中除注明部分外不包含他人已经发表或撰写的研究成果。对本文的研究工作做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确的方式注明。本声明的法律结果将完全由本人承担。

作者签名： 日期：

曲阜师范大学研究Th学位论文使用授权书

（根据学位论文类型相应地在“□”划“√”）

《 缓激肽 1 型受体和 Apelin 受体异源二聚化的实验研究 》系本人在曲阜师范大学攻读博士□/硕士□学位期间，在导师指导下完成的博士□/硕士

□学位论文。本论文的研究成果归曲阜师范大学所有，本论文的研究内容不得以其他单位的名义发表。本人完全了解曲阜师范大学关于保存、使用学位论文的规定，同意学校保留并向有关部门送交论文的复印件和电子版本，允许论文被查阅和借阅。本人授权曲阜师范大学，可以采用影印或其他复制手段保存论文，可以公开发表论文的全部或部分内容。

作者签名： 日期：

导师签名： 日期：

**缓激肽1型受体和Apelin受体异源二聚化的实验研究**

摘 要

本文探讨人G蛋白偶联受体（G protein-coupled receptors, GPCRs）超家族成员缓激肽

1型受体（bradykinin receptor 1, B1R）和Apelin受体（putative receptor protein related to AT1,

APJ）能否形成异源二聚体以及对细胞内信号途径和生理功能产生影响。为探明B1R和APJ参与生理功能的分子机制提供实验依据，为探寻相关疾病发生的分子机制提供理论依据。我们利用分子克隆方法成功构建真核重组质粒：pRluc-hAPJ-pcDNA3.1和pEGFP-hB1R-pcDNA3.1，并用Western blot和免疫荧光染色法验证其在人胚肾（human embryonic kidney 293, HEK293）细胞上的表达。然后，用激光共聚焦检测和生物发光共振能量转移（bioluminescence resonance energy transfer, BRET）研究B1R与APJ的异源二聚化。结合双荧光素酶报告基因检测细胞内三个关键信号转导分子的变化：血清反应元件

（Serum response element, SRE）、钙调磷酸酶-活化T细胞核因子（nuclear factor of activated T cells, NFAT）和cAMP反应元件（cAMP response element, CRE），来研究APJ/B1R异源二聚体信号转导方面的特点。对于功能方面，则利用Western blot和shRNA技术检测人脐静脉内皮细胞（Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVECs）中内皮型一氧化氮合酶

（endothelial Nitric Oxide Synthase, eNOS）磷酸化水平的变化。结果显示：pRluc-hAPJ-pcDNA3.1和pEGFP-hB1R-pcDNA3.1重组质粒构建正确，并且受体均在细胞膜上表达，两种受体存在着相互作用的空间基础；BRET实验表明，APJ/B1R能发生组成型异源二聚化，经配体apelin-13或des-Arg9-BK单独刺激后，BRET信号明显增强，配体能诱导增强二者的相互作用强度；检测SRE、NFAT、CRE三种关键信号转导分子发现，共转APJ/B1R组较单转APJ、B1R组，CRE-1uc活性显著增强，NFAT-1uc的活性显著增强，而SRE-luc无显著变化。这说明，APJ/B1R体与Gαq的结合力增加，与Gαi的结合力减小，信号转导途径偏向PKC途径。在內源表达APJ和B1R的HUVECs中，配体apelin-13和des-Arg9-BK都能诱导eNOS的磷酸化增强。APJ表达水平下调后，eNOS的磷酸化水平下降，但在激动剂apelin-13和des-Arg9-BK的刺激下，eNOS磷酸化水平又上升。这可能由于APJ/B1R异源二聚体，在配体刺激下利于激活PKC信号通路，促进eNOS的磷酸化引起。

本研究发现在转染APJ/B1R的HEK293细胞中，B1R和APJ能够形成组成型异源二聚体，在apelin-13或des-Arg9-BK的刺激下，信号转导途径转向PKC途径，调控eNOS的磷酸化水平。为揭示APJ和B1R参与生理功能的胞内分子机制提供了新的理论基础和实验依据，为开发治疗心血管疾病的药物提供新的潜在作用靶点。

**关键词：**G 蛋白偶联受体；缓激肽； 1 型受体； Apelin 受体；异源二聚体

**HETERODIMERIZATION OF APELIN RECEPTOR AND BRADYKININ RECEPTOR**

# **1**

Abstract

This study was to explore the possibility of heterodimers between bradykinin receptor 1 (B1R) and Apelin receptor (APJ), then investigate their novel signal transduction characteristics simulated by B1R/APJ. The results could provide helpful data for understanding physiological function and pathophysiological mechanism that they envolved in.

We constructed pRluc–hAPJ-pcDNA3.1 and pEGFP-hB1R-pcDNA3.1 eukaryotic

Expression vectors by molecular cloning techniques and recognition of its expression by confocal scanning microscope laser and Western blotting. Then, confocal scanning microscope laser and bioluminescence resonance energy transfer (BRET) were carried out on APJ/B1R cotransfected HEK293 cells to explore the heterodimerization between the recepters. Finaly, the changes of three key signaling molecules within intracellular signal transduction: SRE, NFAT and CRE were detected by Dual luciferase reporter gene analysis. The phoshorylation of eNOS was detected by the technologies of western blot and shRNA**.** The results suggested that all eukaryotic expression vectors were successfully constructed and colocalized on plasma membrane. Assays of BRET suggested a constitutive interaction between B1R and APJ.

However, BRET signal increased with the treatement of apelin-13 or des-Arg9-BK, suggesting a

Promoted affinity with their ligand. Dual luciferase reporter gene analysis showed that CRE-luc activity and NFAT·luc activity were significantly increased whereas SRE-luc was unchanged in the HEK293-APJ/B1R cells, suggesting the signal transduction of APJ/B1R heterodimers changed to PKC. The HUVECs with treatement of apelin-13 or des-Arg9-BK can increase eNOS

Phosphorylation. The eNOS phosphorylation was reduced with the lockdown of APJ and recovered with the treatement of apelin-13. This may be caused by APJ/B1R heterodimer to activate PKC signaling pathway which can promote the eNOS phosphorylation.

These combined results demonstrate that human APJ forms heterodimer with B1R in HEK293 cells for the first time and treatements of apelin-13 or des-Arg9-BK lead to a switch to PKC pathway and then mediated eNOS phosphorylation. This will provides a new theoretical foundation and experimental basis of intracellular molecular mechanisms of APJ and B1R involved in the physiological function. At the same time it will provides a new potential drug targets for the development of cardiovascular drugs.

**Keywords:** G protein-coupled receptors; Bradykinin receptor 1; Apelin receptor

Heterodimer

目 录

[摘 要](#_Toc686948986) 2

**[1](#_Toc686948987)** 2

[Abstract](#_Toc686948988) 2

[一、 前 言](#_Toc686948989) 3

**[1.1](#_Toc686948990)****[GPCRs](#_Toc686948990)**[的二聚化现象](#_Toc686948990) 3

**[1.2](#_Toc686948991)****[GPCRs](#_Toc686948991)**[异源二聚体的信号特点](#_Toc686948991) 3

**[1.3](#_Toc686948992)****[GPCRs](#_Toc686948992)**[异源二聚化的病理生理学功能](#_Toc686948992) 4

**[2](#_Toc686948993)****[APJ](#_Toc686948993)**[和](#_Toc686948993)**[B1R](#_Toc686948993)**[系统](#_Toc686948993) 4

**[3](#_Toc686948994)** [时空动态检测蛋白质](#_Toc686948994)**[-](#_Toc686948994)**[蛋白质相互作用](#_Toc686948994) 4

**[4](#_Toc686948995)** [课题的目的意义及设计思路](#_Toc686948995) 4

[二、 材料和方法](#_Toc686948996) 5

**[1](#_Toc686948997)** [实验材料](#_Toc686948997) 5

**[1.1](#_Toc686948998)** [质粒、细胞和菌株](#_Toc686948998) 5

**[1.2](#_Toc686948999)** [抗体](#_Toc686948999) 5

**[1.3](#_Toc686949000)** [生化试剂及试剂盒](#_Toc686949000) 5

**[1.4](#_Toc686949001)** [主要试剂的制备](#_Toc686949001) 6

**[1.5](#_Toc686949002)** [主要仪器](#_Toc686949002) 10

**[2](#_Toc686949003)** [实验方法](#_Toc686949003) 10

**[2.1](#_Toc686949004)** [表达载体的构建及表达](#_Toc686949004) 10

**[2.2](#_Toc686949005)****[HEK293](#_Toc686949005)**[细胞的培养](#_Toc686949005) 16

**[2.3](#_Toc686949006)** [细胞瞬时转染](#_Toc686949006) 16

**[2.4](#_Toc686949007)** [检测](#_Toc686949007)**[B1R](#_Toc686949007)**[与](#_Toc686949007)**[APJ](#_Toc686949007)**[之间的相互作用](#_Toc686949007) 18

[附： coelenterazine h发光底物储存液的配制：开装前将低压冻干的coelenterazine](#_Toc686949008) 18

**[2.5](#_Toc686949009)** [双荧光素酶报告基因检测](#_Toc686949009)**[CRE](#_Toc686949009)**[、](#_Toc686949009)**[NFAT](#_Toc686949009)**[、](#_Toc686949009)**[SRE](#_Toc686949009)** 18

**[2.6](#_Toc686949010)****[Western blot](#_Toc686949010)**[检测](#_Toc686949010)**[eNOS](#_Toc686949010)**[的磷酸化](#_Toc686949010) 19

[三、 结 果](#_Toc686949011) 19

**[1.](#_Toc686949012)** [表达载体的构建及表达](#_Toc686949012) 19

**[1.1](#_Toc686949013)** [表达载体的构建](#_Toc686949013) 19

**[1.2](#_Toc686949014)** [验证载体的表达](#_Toc686949014) 20

**[2](#_Toc686949015)****[HEK293](#_Toc686949015)**[细胞的培养](#_Toc686949015) 21

**[3](#_Toc686949016)****[HEK293](#_Toc686949016)**[细胞的转染](#_Toc686949016) 21

**[4](#_Toc686949017)****[B1R](#_Toc686949017)**[与](#_Toc686949017)**[APJ](#_Toc686949017)**[之间的相互作用](#_Toc686949017) 21

**[4.1](#_Toc686949018)** [激光扫描共聚焦显微镜检测](#_Toc686949018)**[B1R](#_Toc686949018)**[与](#_Toc686949018)**[APJ](#_Toc686949018)**[的共定位](#_Toc686949018) 21

**[4.2](#_Toc686949019)** [生物发光共振能量转移检测](#_Toc686949019)**[B1R](#_Toc686949019)**[和](#_Toc686949019)**[APJ](#_Toc686949019)**[之间的相互作用](#_Toc686949019) 21

[四、 讨 论](#_Toc686949020) 23

**[1](#_Toc686949021)****[APJ/B1R](#_Toc686949021)**[的异源二聚化](#_Toc686949021) 23

**[2](#_Toc686949022)****[APJ/B1R](#_Toc686949022)**[二聚化对信号转导途径的影响](#_Toc686949022) 23

[五、 结 论](#_Toc686949023) 24

[参考文献](#_Toc686949024) 24

[中英文符号对照表](#_Toc686949025) 25

[攻读学位期间发表的学术论文](#_Toc686949026) 27

# 一、 前 言

G蛋白偶联受体（G protein-coupled receptors, GPCRs）与G蛋白相偶联，可以调解气味、光线、神经递质、激素等多种刺激的胞内效应，广泛参与生殖、发育、生长等众多生理和病理过程的调节。目前市场上靶向作用GPCRs的药物占40%–50%[1]。起初，GPCRs被认为只简单的作为某一功能单元的“开关”用来激活G蛋白，通过G蛋白调节第二信使的浓度引发胞内的下游反应。然而近些年，大量实验数据支持

GPCRs同源或异源二聚体，甚至是高阶寡聚体形式的存在。异源二聚体具有与单一受体复合物不同的生物化学特征、选择性信号途径以及表达的组织特异性，使GPCRs异源二聚化成为热门的研究领域[2]。开展GPCRs异源二聚化研究，对于探明细胞内信号转导的分子机制，发现新的药物靶点，开发副作用较少的新药物都有重要意义。

**1 G蛋白偶联受体异源二聚化**

### **1.1** **GPCRs**的二聚化现象

GPCRs异源二聚化是指两种不同亚型及不同类型受体之间的蛋白-蛋白间相互作用，有时可称为“crosstalking”[3]。目前多项研究支持，GPCRs的生成、功能发挥和凋亡都可以以二聚体的形式进行。例如，发挥全功能的GABA受体需要形成GABABR1-GABABR2二聚体。GABABR1主要负责结合配体，GABABR2用于偶联G蛋白。单独表达的GABABR1被保留在内质网中，只有与GABABR2共表达时，才能实现细胞表面的准确定位[4]。此外，研究发现味觉受体家族的三个成员（T1R1, T1R2和T1R3）之间也普遍存在相互作用：T1R1-T1R3二聚体的形成参与辨别鲜味，T1R1-T1R2二聚体则是众所周知的甜味受体。T1R和GABA受体都是典型的GPCRs家族成员，可见GPCRs二聚化现象普遍存在。而且，GPCRs的异聚化更像是两种或多种蛋白质功能的协同作用而非简单的各种类型蛋白质功能的复合。

### **1.2** **GPCRs**异源二聚体的信号特点

GPCRs异源二聚体在配体的结合、G蛋白的偶联和下游信号等方面都产生了新特点，这为配体诱导GPCRs异源二聚体产生新的信号级联反应提供了必要的条件[5]。

①配体的识别。受体异源二聚化能够改变GPCRs的配体结合特点。异源二聚化复合物形成新的受体构象，使二聚体中的某一受体与配体结合后，改变另一受体的配体识别效能。例如，用前列腺素E1刺激前列腺素E1受体（EP1）-β2-肾上腺素受体的异源二聚体中的EP1受体时，会导致β2 -肾上腺素介导的气道平滑肌细胞舒张能力下降。而κ-阿片受体和δ-阿片受体（KOR-DOR）异源二聚体与对应原体的选择性激动剂的亲和力和势能都严重降低。受体的异源二聚化能改变配体的结合特征，但是受体的生理学变化没有采用共同的模式，这表明每一个受体对都代表受体生理学独一无二的变更[6]。

②G蛋白的偶联。GPCRs的异源二聚体与G蛋白的偶联状况产生了定性和定量的变化。例如，吗啡结合腺苷2A受体（α2a-AR）-MOR异源二聚体会抑制去甲肾上

腺素介导的Gαi-MAP激酶下游信号级联反应[7]，使受体与G蛋白的偶联程度发生变化。同样，异源二聚化引起偶联G蛋白类型的改变。例如，D1-D2多巴胺受体的异源二聚化是导致Gαs/olf（D1R）介导或Gαi（D2R）介导的通路转变为Gαq/11介导通路的开关。

③信号转导。GPCRs异源二聚体配体识别和G蛋白偶联特征的变化，会影响原体的信号转导途径。最经典的例子是CB1大麻素受体/D2异源二聚体。CB1/D2异源二聚体形成后，CB1偶联Gαi的信号途径改为偶联Gαs的信号途径。本实验室前期研究证明

APJ和KOR能形成异源二聚体，用原体的配体apelin-13或DynA（1-13）诱导APJ/KOR

二聚体时，信号转导途径有所变化，PKC途径增强，PKA途径下降[8]。

④受体的运输。同源GPCRs的失活导致受体的脱敏、内化。一些受体内化的过程十分迅速而有一些受体则可以完全避免内化，内化的速度和程度多取决于受体自身的特点和所处的环境。而异源GPCRs的脱敏，多是某一受体在相应配体的刺激下引起另一受体的内化。受体的脱敏和内化率很大程度上受共表达受体相互的影响。例如，

KOR和趋化因子CXCR4受体共表达体系。而且体内实验也可以观察到CXCR4介导的KOR应答性降低等多种交叉脱敏现象[9]。以上特征说明异源二聚化可能成为扩大受体功能多样化和信号特异性的主要机制。

### **1.3** **GPCRs**异源二聚化的病理生理学功能

近年研究发现，紧密相关以及关系较远的GPCRs能够相互结合组成异源二聚体来调节彼此的活性[10]，参与多种病理生理过程[11]。例如，大麻素/腺苷α2A受体的异源二聚体调节大麻素在纹状体中介导的运动效应。μ阿片受体和CB1大麻素受体之间的相互作用能够对神经突触形成等生理过程产生影响。此外，GPCRs异源二聚体的疾病特异性，使其成为极具吸引力的药物靶点。例如，血管紧张素II 1型受体和缓激肽2型受体（bradykinin receptor 2, B2R）对于先兆子痫综合症的发生起关键作用，AT1R-B2R二聚化可增加对血管紧张素受体II的反应性[12]。Apelin作用APJ-AT1R异源聚合物能够抑制血管紧张素介导的动脉粥样硬化[13]。除此之外，疼痛、哮喘、帕金森综合征等也与GPCRs异源二聚体有关。因此，GPCRs异源二聚体的研究将有助于探寻相关疾病治疗的新突破点。

## **2** **APJ**和**B1R**系统

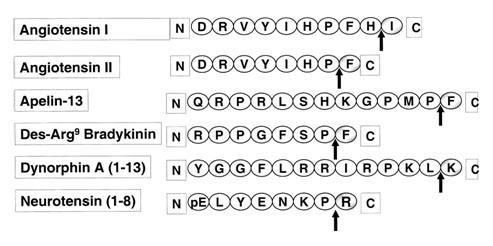
本课题着重研究B1R和APJ能否形成异源二聚体。并在此基础上探讨异源二聚体形成后对信号转导和生理功能的影响。

缓激肽（bradykinin, BK）是由激肽释放酶原在激肽释放酶作用下被激活后而生成的一种血管活性九肽。因其具有降低血压、缓慢肠道收缩的作用而得名。各种各样的创伤，包括病原体、组织损伤和过敏反应激活蛋白水解级联反应，导致位于血液和组织中的高、低分子量激肽原，在丝氨酸蛋白酶、血浆或组织激肽释放酶的作用下分别释放BK[14]。

缓激肽受体可参与调节血压、中枢痛觉调制、炎症发生和发展等众多生理和病理生理过程，受到众多研究人员关注。缓激肽受体分为B1R和B2R两种类型[15]。BK是B2R的特异激动剂。这些肽能被膜羧肽酶M或血浆羧肽酶N作用，去除C-末端的Arg残基，生成des-Arg9- BK和des-Arg10-KD，他们是B1R受体的特定激动剂。

B2R和B1R这两种受体都可以结合G蛋白的Gαi和Gαq亚基来释放调节物，如NO、花生四烯酸、前列腺素、白三烯和内皮依赖性超极化因子，并能诱导其他炎症因子的释放[16-17]，在血管系统中调节血压，维持正常的内皮屏障功能，对心脏也起到一定的保护作用。并且B1R在诱导炎症发生、形成痛觉过敏以及外周组织缺血缺氧性损伤中也发挥重要作用**。**

Apelin肽家族是由单个基因编码并能够激活G蛋白偶联受体APJ的一组内源性活性肽，广泛分布于肺、心、肾、血管、脑等几乎全身各部位，呈现广泛的生物学作用[18-21]. Apelin在心血管调节中具有降低血压、增强心脏收缩的作用，在中枢神经系统中具有调节垂体激素释放、调节摄食、摄水、体液平衡等作用。作为脂肪细胞分泌的一个新的脂肪因子，Apelin可调节胰岛素的分泌[22]。APJ更重要特征是它能够通过各自的受体与肾素-血管紧张素系统相互作用，这些受体具有明显的序列同源性，能够形成异源二聚体以及调节相应的生理功能。



**图一** **ACE2降解底物的特异性**

综合Apelin/APJ系统和BK/B1R系统的研究进展，发现二者具有许多功能和信号转导通路的交叉。在分布方面，二者在神经系统和心血管系统都有分布。在功能方面，二者都参与心血管平衡、神经系统的保护作用。并且，Apelin和BK均可被肾素血管紧张素系统（renin angiotensin aldosterone system, RAS）的一种关键酶-血管紧张素转换酶II（Angiotensin-converting enzyme II, ACE2）高效催化[23]（图一）, 这种新型作用开拓了肽类系统的发展前景，并且其相关衍生物在调节心血管功能中也发挥着重要的作用。信号转导方面，二者都可以与Gαi、Gαq亚基结合，调控PKA、PKC信号途径，参与细胞增殖与分化、细胞形态维持、细胞骨架的构建、细胞凋亡和细胞的恶变等多种生物学反应。综上所述，细胞内很可能存在APJ/B1R异源二聚体。

有些异源二聚体可以形成新的信号转导特征，表达量在疾病组织中呈现特异性变化。那么APJ/B1R异源二聚体形成后在生理病理学方面又会产生什么影响呢？是否参与

ACE2调节的心血管功能？这些研究能为理解ACE2调节的RAS系统以及高血压和心力衰竭等疾病的病理生理机制提供新的参考。

## **3** 时空动态检测蛋白质**-**蛋白质相互作用

机体细胞中蛋白质种类繁多、功能各异，但对胞外信号应答有序。这通常是受蛋白间的相互作用调节。蛋白质之间的相互作用能够整合来自不同信号通路的信号并协调细胞内部的调节机制[24]。在过去的二十年中，开发了很多用于探测蛋白质相互作用的技术和方法。比较经典的有免疫共沉淀、激光共聚焦等技术生物，但是这些方法都具有一定的局限性。一方面，基于机械的、离心力高的或去垢剂的细胞裂解，可能会改变蛋白质-蛋白质相互作用的自然状态；另一方面，上述技术无法提供活细胞内的特定蛋白间相互作用的时空信息[25]。近年来研究开发的生物发光共振能量转移

（bioluminescence resonance energy transfer, BRET）却能克服以上缺点，可以从“时间、空间、动态、连续”在活细胞中实时动态观测蛋白质之间的相互作用[26-27]。目前国际上已有一些实验室开始利用此技术研究蛋白间相互作用，而国内该研究还接近空白。本实验采用该技术结合经典的蛋白检测技术来探讨B1R和APJ之间是存在相互作用，对于进一步阐明GPCRs的功能单位机构、信号转导机制具有一定意义，对发现新的GPCRs药物作用靶点也有一定的帮助。

## **4** 课题的目的意义及设计思路

本课题研究B1R和APJ能否发生异源二聚化，以及该异源二聚体的形成对细胞内的信号转导的影响。以深入揭示二者在神经系统和心血管系统相关生理功能的分子机制，为探寻治疗高血压和心力衰竭等疾病的新突破点及新药开发提供实验依据。课题设计思路如（图二）所示。

免疫荧光染色

Western blot

构建 pRluc-hAPJ-pcDNA3.1 和

pEGFP-hB1R-pcDNA3.1 真核表达载体

验证 pRluc-hAPJ-pcDNA3.1 和

pEGFP-hB1R-pcDNA3.1 质粒的表达

BRET

饱和实验

诱导实验

研究 APJ 和 B1R 之间的相互作用

激光共聚焦共定位

鉴定实验

双荧光素酶报告基因检测 CRE、NFAT、SRE

Western blot 检测 eNOS 磷酸化

激动剂刺激

ShRNA 干扰

**图二** **课题设计思路图**

# 二、 材料和方法

## **1** 实验材料

### **1.1** 质粒、细胞和菌株

含人缓激肽1型受体全长cDNA基因序列的pcDNA 3.1-hB1R质粒、含人apelin受体全长cDNA基因序列的pcDNA3.1-hAPJ质粒、含增强型绿色荧光蛋白的pEGFP-N1（N端）质粒以及含Rluc编码序列的pRluc-pcDNA3.1（N端）质粒由陈京博士惠赠（英国University of Warwick）. pEGFP-hAPJ-pcDNA3.1重组质粒、pRluc-hKOR-pcDNA3.1重组质粒为本实验室前期构建[27, 28]。报告基因检测所用的NFAT-RE-luc、CRE-luc、SRE-luc和pRL-Tk购买于Promega公司（USA）。ShRNA

APJ购买于sigma公司（USA）。HEK293细胞购自中国协和医科大细胞中心（北京）。大肠杆菌感受态细胞Top10购自天根公司（北京）。人脐静脉内皮细胞株（批号: CRL-1730），购于美国ATCC细胞库。

### **1.2** 抗体

（1）一抗：兔抗APJ多、兔抗人B1R多抗和兔抗GAPDH抗体（mo-monoclonal anti-GAPDH antibody）购于santa cruz biotechnology. 鼠抗表皮型NO合酶（endothelial Nitric Oxide Synthase, eNOS）抗体([eNOS (6H2) Mouse mAb](http://www.himarcom.net/products/5880.html))和兔抗eNOS磷酸化抗体( [Phospho-eNOS(Ser1177)(C9C3) Rabbit mAb](http://www.himarcom.net/products/9570.html))购于Cell Signaling Technology

（Danvers, USA）。

（2）二抗：罗丹明标记ft羊抗兔IgG和HRP（horseradish peroxidase，辣根过氧化物酶）标记的ft羊抗兔抗体和HRP标记的ft羊抗小鼠抗体购自中杉金桥公司（北京）。

### **1.3** 生化试剂及试剂盒

##### （1）质粒构建用试剂：

琼脂糖，购于BIOASIA生物技术公司。

酵母浸膏（Yeast Extract）和胰蛋白胨（Tryptone）为OXOID产品。

分子生物学操作所用限制性内切酶及marker购自宝生物公司（大连）。

DNA聚合酶以及T4DNA连接酶购自Fermentas公司。胶回收试剂盒、PCR产物纯化试剂盒、质粒小量提取试剂盒以及无内毒素质粒大提试剂盒购自天根公司

（北京）。

引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

##### （2）细胞培养和转染用试剂：

MEM，购自Hyclone公司。

不完全RPMI-1640培养基，购自凯基生物。

胰蛋白酶、胎牛血清（Fetal calf serum, FCS）和0.05% trypsin-0.53 mM ethylenediamine tetraacetic acid（EDTA）购自Gibco公司。

转染试剂Lipofectamine 2000和Opti-MEMⅠ无血清培养基购自Invitrogen公司。

##### （3）免疫荧光染色实验用试剂：

免清洗盖玻片购自神鹰实验器材厂（海门）。

多聚赖氨酸（poly-L-lysine）和牛血清白蛋白（bovine serum albumin, BSA）购自

Sigma公司。

4%多聚甲醛（paraformaldehyde, PFA）和4',6-二脒基-2-苯基吲哚

（4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, DAPI），购自索莱宝公司。TritonX-100，购自Amresco公司。

抗荧光衰减封片剂购自博士德生物工程有限公司（武汉）。

##### （4) Western blot检测用试剂：

丙烯酰胺（Acrylamide）、甘氨酸（Glycine）、Tris碱（Tris base）购自NOVON

公司。N，N'-甲叉双丙烯酰胺（N, N'-Methylenebisacrylamide）和Triton X-80 购自

Amresco公司。牛血清白蛋白（bovine serum albumin, BSA）、四甲基乙二胺（N, N, N', N'- tetramethyl-ethylenediamine, TEMED）及十二烷基磺酸钠（Sodium dodecyl sulfate,

SDS)购自Sigma（St. Louis, USA）。

聚偏二氟乙烯（Polyvinylidene difluoride, PVDF）膜购自Millipore(Billerica，

Massachusetts，USA)。

PageRulerTM Plus Prestained Protein Ladder购自Fermentas公司。

RIPA裂解液，苯甲基磺酰氟（Phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF）和2×SDS Protein loading buffer（还原型）蛋白裂解试剂盒购自申能博彩公司（上海）。BCA蛋白含量检测试剂盒购自凯基生物科技发展有限公司（南京）。增强型化学发光

（enhanced chemiluminescence, ECL）试剂盒购自联科生物公司（杭州）。Western膜再生液及显影定影试剂盒购自碧云天生物技术研究所（江苏海门）。

##### （5) BRET检测用试剂

BRET发光分析液HEPES缓冲液-无酚红培养基（HEPES-buffered phenol red−free medium）购自Gibco公司。

BRET发光底物coelenterazine h购自Promega公司（USA）。

受体激动剂apelin-13和des-Arg9-BK购于Phoenix公司（USA）。

##### （6) SRE、CRE、NFAT检测用试剂盒

双荧光素酶报告基因发光检测试剂盒（Dual—Luciferase@Reporter Assay System），购自Promega公司（USA）。

##### （7）p-eNOS检测

内皮生长因子，购于美国BD公司。磷酸酶抑制剂Ⅲ，购于上海生工。

### **1.4** 主要试剂的制备

##### （1) LB液体培养基

|  |  |
| --- | --- |
| 胰蛋白胨 | 1 g |
| 酵母粉 | 0.5 g |
| NaCl | 1 g |

加蒸馏水水容至100 mL，用5 M NaOH调PH至7.0。每100 mL LB液体培养基内加入1.6g琼脂粉即为LB固体培养基。

##### （2) 50　TAE缓冲液

|  |  |
| --- | --- |
| Tris | 242.0 g |
| 冰醋酸 | 57.1 ml |
| 0.5 M EDTA | 100.0 ml |

加超纯水定容至1 L。

##### （3) 10% SDS溶液

|  |  |
| --- | --- |
| SDS | 10 g |
| H2O | 100 ml |

68℃加热溶解，4℃储存。

##### （4) 10%（W/V）过硫酸铵

|  |  |
| --- | --- |
| 过硫酸铵 | 1 g |
| H2O | 10 ml |

加去离子水搅拌溶解，4℃储存。

##### （5) 30%（W/V）Acrylamide（丙烯酰胺）

|  |  |
| --- | --- |
| Acrylamide | 290 g |
| BIS（甲叉双丙烯酰胺） | 10 ml |

加去离子水搅拌溶解至1L，用滤纸过滤后于避光储存于4℃

##### （6) 5×Tris -Glycine Buffer（SDS-PAGE电泳缓冲液）

|  |  |
| --- | --- |
| Tris base | 15.1 g |
| Glycine | 100 ml |
| SDS | 5.0 g |

加去离子水至1000mL，室温保存。

##### （7) Western blot 1×膜转移缓冲液

|  |  |
| --- | --- |
| Glycine | 2.9 g |
| Tris base | 5.8 g |
| SDS | 0.37 g |

加去离子水定容至800ml，使用时与甲醇按4: 1的比例混合。

##### （8) Western blot 0.01M Tris Buffered Saline（TBS）缓冲液

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 5%浓缩胶 | | | | | |
| **各种凝胶体积所对应的各种组份的取样量** | | | | | |
| **各种组份名称** | 3ml 4ml 5ml 6ml 8ml | | | | |
| H2O | 2.10 | 2.70 | 3.40 | 4.10 | 5.50 |

|  |  |
| --- | --- |
| NaCl | 8.5 g |
| Tris base | 1.2 g |

加入纯乙酸450μl左右调节pH至7.2-7.6，加去离子水定容至1L。

##### （9) 1×TBST洗脱缓冲液

|  |  |
| --- | --- |
| Tween-20 | 1 ml |

加0.01M TBS至1000 mL搅拌至完全溶解。

##### （10) Western blot封闭液

|  |  |
| --- | --- |
| BSA | 5 g |

加1×TBST至100 mL搅拌混匀。

##### （11) Western blot一抗、二抗孵育液

|  |  |
| --- | --- |
| BSA | 3 g |

加1×TBST至100 mL搅拌混匀。

##### （12) 1.5 M Tris·HCl（pH8.8）

|  |  |
| --- | --- |
| Tris (MW121.14) | 18.156 g |

滴加HCl调pH至8.8，加去离子水定容至250ml。

##### （13) 1.0M Tris-HCl（pH 6.8）

|  |  |
| --- | --- |
| Tris | 12.12 g |

滴加HCl调pH至6.8，加去离子水定容至100ml。

##### （14) SDS-PAGE配方表

10%分离胶

**各种凝胶体积所对应的各种组份的取样量**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **各种组份名称** | 10ml | 15ml | 20ml |
| H2O | 4.0 | 5.9 | 7.9 |
| 30%Acrylamide | 3.3 | 5.0 | 6.7 |
| 1.5M Tris-HCl(pH 8.8) | 2.5 | 3.8 | 5.0 |
| 10%SDS | 0.1 | 0.15 | 0.2 |
| 10%过硫酸铵 | 0.1 | 0.15 | 0.2 |
| TEMED | 0.004 | 0.006 | 0.008 |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 30%Acrylamide | 0.50 | 0.67 | 0.83 | 1.00 | 1.30 |
| 1.0M Tris-HCl(pH 6.8) | 0.38 | 0.50 | 0.63 | 0.75 | 1.00 |
| 10%SDS | 0.03 | 0.38 | 0.05 | 0.06 | 0.08 |
| 10%过硫酸铵 | 0.03 | 0.03 | 0.05 | 0.06 | 0.08 |
| TEMED | 0.003 | 0.003 | 0.005 | 0.006 | 0.008 |

##### （15) D-PBS配方

|  |  |
| --- | --- |
| NaCl | 0.8g |
| KCl | 0.02g |
| Na2HPO4 | 0.115g |
| KH2PO4 | 0.02g |
| CaCl2 | 0.01g |
| MgCl2.6H2O | 0.01g |
| 葡萄糖 | 0.1g |

加蒸馏水定容到100ml。

##### （16）免疫荧光染色透化液和封闭液配方0.01%Triton X-100（透化液）

|  |  |
| --- | --- |
| Triton X-100 | 1ul |
| PBS | 10ml |

1%BSA（封闭液）

|  |  |
| --- | --- |
| BSA | 1g |
| 0.01%Triton X-100 | 100ml |

### **1.5** 主要仪器

(1)质粒构建仪器：PCR仪（FTC-200, Fedbio, England），紫外可见分光光度仪（AI1574800519LP, 岛津, 日本），琼脂糖凝胶电泳仪（DYCP-32A，北京六一仪器厂），凝胶成像分析仪（Universal HoodII, Bio-Rad, USA）。各种规格微量移液器（Gilson, France），离心机（eppendorf, Germany），漩涡混合器（WORTEX-5，海门市其林贝尔仪器制造有限公司）。

(2)细胞培养用仪器：高性能无菌操作台（BSC1500-I-A/B3，上海瑞仰净化装备有限公司），倒置荧光显微镜（IX71, Olympus, Japan），CO2培养箱（Forma scientific，

USA)，超低温冰箱（U410, New Brunswick Scientific, USA）。细胞梯度冻存盒

(NALGENE Cryo 1℃Freezing Container, Nalge Company, USA)，细胞刮器（cell scraper）（Corning company, Cat.3010）。

(3)共定位实验用仪器：激光共聚焦显微镜（TSC SP5, Leica, Germany）。

(4) Western blot用仪器：超速冷冻离心机（Z36HK, Eppendorf, Germany），电泳仪（EPS-300，北京凯元信瑞仪器有限公司），垂直板电泳槽（DYCZ-24D，北京六一仪器厂），迷你转移槽（DYCZ-40D，北京六一仪器厂），脱色摇床（TS-1，江苏海门），凝胶成像分析仪（Universal HoodII, Bio-Rad, USA）。X射线摄影暗匣

（AX-II，广州粤华医疗器械厂有限公司），pH 计（EL20, Mettler-Toledo, Germany）。

(5) BRET: 多功能荧光发光分析仪（FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH, Germany）。

## **2** 实验方法

### **2.1** 表达载体的构建及表达

构建一组用于BRET 技术研究APJ-B1R 间相互作用的真核表达载体：

pRluc-hAPJ-pcDNA3.1 和pEGFP-hB1R-pcDNA3.1. 将构建成功的重组载体转染入

HEK293细胞，提取蛋白质，利用Western blot和免疫荧光染色法检测受体的表达。

#### **2.1.1** 重组质粒的构建

##### （1) pRluc-hAPJ-pcDNA3.1的构建

①引物设计。根据pcDNA3.1-hAPJ和pRluc- pcDNA3.1 (N端)的序列特点设计引物。上游引物序列为：5’-CGC GGA TCC ATG GAG GAA GGT GGT GAT TTT GAC

-3'（含BamH I酶切位点），下游引物序列为：5’- CCG GAA TTC GTC AAC CAC AAG GGT CTC CTG GC -3'（含EcoR I酶切位点）。

②PCR扩增hAPJ cDNA. 以pcDNA 3.1-hAPJ为模板进行PCR反应，反应体系总体积为50μl。

反应体系：

|  |  |
| --- | --- |
| 模板 | 2.5 μl |
| 10×Pfu Buffer Ⅱ | 5 μl |
| DNTP(2.5 mmol/L) | 4 μl |
| 上游引物 | 1 μl |
| 下游引物 | 1 μl |
| Pfu DNA 酶(2.5U/μl) | 1 μl |
| ddH2O | 35.5 μl |

反应条件：95℃变性1 min后，95℃45 s，65℃45s，72℃1.5min，共45个循环，然后72℃延伸10 min。

③用胶回收试剂盒回收PCR产物。

a.称重1.5 ml离心管，在紫外光激发下切下琼脂糖凝胶中的目的条带，移入离心管，再次称重计算重量。

b. 每100 mg胶加400μl Solution SN，65℃水浴加热5min，胶完全融化后每400 ul Solution SN加100μl Solution B，混匀。

c. 胶转入3S柱，室温放置2 min, 12000 rpm离心1 min。

d. 弃掉收集管中的废液，加600μl Wash solution, 12000 rpm离心1 min。

e. 重复步骤d一次。

f. 弃掉收集管中的废液，12000 rpm离心2 min。

g. 将3S柱放入新的1.5 ml离心管，在3S柱膜中央加30μl TE，室温静置2 min, 12000 rpm离心2 min，紫外分光仪测量纯度和浓度。

④酶切。用限制酶BamH I和EcoR I同时将上述纯化回收的PCR产物和表达载体pRluc-pcDNA3.1（N端）分别进行双酶切（37℃，过夜）。

PCR产物的双酶切体系：

|  |  |
| --- | --- |
| BamH I | 5 μl |
| EcoR I | 5 μl |
| 10ⅹM Buffer | 5 μl |
| PCR product | 35 μl |
| 总体积 | 50 μl |

将酶切完的PCR产物放入65℃水浴加热20min，终止酶切。质粒pRluc-pcDNA3.1的酶切体系：

|  |  |
| --- | --- |
| BamH I | 1.5 μl |
| EcoR I | 1.5 μl |
| 10ⅹK Buffer | 1.5 μl |
| pRluc-pcDNA3.1 | 3.0 μl |
| H2O | 7.5 μl |
| 总体积 | 15 μl |

加入1.5μl的10×Loading Buffer，终止反应。

⑤将终止酶切的PCR产物和pRluc-pcDNA3.1电泳鉴定后，用胶回收试剂盒纯化，然后用T4DNA连接酶进行连接（20℃，过夜）。连接体系如下：

|  |  |
| --- | --- |
| PCR product | 10 μl |
| pRluc-pcDNA3.1 | 4.0 μl |
| Ligase Buffer | 2.0 μl |
| T4DNA Ligase | 2.0 μl |
| 总体积 | 20 μl |

⑥转化。

a. 准备LB固体培养基。氨苄青霉素（ampicillin, Amp）的终浓度为50μg/ml

b. 从-80℃冰箱中取出感受态细胞，冰浴中融化。在无菌1.5 ml Eppendorf管中加入20μl连接产物，其中一管加入20μl ddH2O作为对照。取30μl感受态细胞与连接产物轻轻混匀，冰浴中放置30 min。

c. 42℃热击90 s，立即冰浴5 min. 加入800μl LB液体培养（不含Amp），37°C

摇床振荡培养90 min（180 rpm）。

d. 3000 rpm离心2 min，弃上清，余留200μl悬浮沉淀，涂于LB/Amp固体培养基上，37℃倒置培养16 h。

⑦酶切及鉴定。转化连接产物至大肠杆菌感受态细胞Top10后，挑取单菌落进行扩增，按天根质粒小量提取试剂盒说明书进行质粒提取。具体步骤如下。

a. 取5 ml单克隆扩增的菌液，12000 rpm离心1 min，弃上清，重复3次。

b. 加入250μl Solution I/RnaseA，使用漩涡振荡器充分悬浮细菌沉淀。

c. 加入250μl Solution II，温和颠倒混匀使菌体充分裂解。

d. 加入350μl Solution III，立刻温和颠倒混匀至出现絮状物，12000 rpm离心10

min。

e. 小心吸取上清至平衡过的结合柱中，12000 rpm离心2min，弃废液。

f. 加600μl Wash Buffer, 12000 rpm离心1 min，弃废液。

g. 重复步骤f。

h. 12000 rpm离心2 min。

i. 柱子放入新的1.5 ml离心管中，加50μl Elution Buffer，室温放置2 min, 12000

rpm离心2 min。

用紫外分光光度计测定提取的质粒浓，用BamH I和EcoR I双酶切。酶切体系如下：

|  |  |
| --- | --- |
| BamH I | 1.5 μl |
| EcoR I | 1.5 μl |
| 10ⅹK Buffer | 1.5 μl |
| H2O | 7.5 μl |
| 质粒 | 3 μl |
| 总体积 | 15μl |

双酶切产物，利用1%琼脂糖凝胶电泳，鉴定酶切结果。将鉴定正确的结果送上海生工公司测序。

##### （2) pEGFP-hB1R-pcDNA3.1质粒的构建

①引物设计。根据pcDNA 3.1- hB1R和pEGFP - pcDNA3.1（N端）的序列特点设计引物。正向引物序列为：5’- CCG CTC GAG ATG GCA TCA TCC TGG CCC CCT

CT-3（’ 含Xhol酶切位点），反向引物序列为：5’-CGC GGA TCC ATT CCG CCA GAA

AAG TTG GAA GA -3'（含BamH I酶切位点）。

②pEGFP-hB1R-pcDNA3.1质粒的构建。以pcDNA3.1-hB1R为模板，PCR扩增

hB1R的cDNA序列，反应体系为50μl（方法同上），反应条件按常规。琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增的目的片段，并通过胶回收试剂盒回收PCR产物。然后用限制酶

Xhol和BamHⅠ双酶切PCR产物和载体pEGFP-N1，随后用T4DNA连接酶完成连接反应。将连接的产物转化大肠杆菌感受态细胞Top10，挑取单克隆，小提并双酶切初步鉴定（方法同上）。将酶切正确的结果送上海生工公司测序。

#### **2.1.2** 验证重组质粒的表达

##### （1) pRluc-hAPJ-pcDNA3.1在HEK293上的表达

Ⅰ. 质粒的大提

测序正确后，将带pRluc-hAPJ-pcDNA3.1质粒的大肠杆菌接种至100 ml LB液体培养基中，37℃培养16 h，根据无内毒素质粒大提试剂盒说明操作。步骤如下：

a. 柱平衡：向吸附柱CP5 中（含50 ml 收集管）加入2.5 ml 的平衡液BL, 12000

rpm离心2 min，弃废液。

b. 取50 ml菌液加入离心管，12000 rpm离心3 min，收集细菌，吸除上清，重复两次。

c. 用干净的吸水纸吸尽上清液。

d. 向菌体沉淀中加入7 ml 溶液P1，用涡旋振荡器充分悬浮细菌沉淀。

e. 加入7ml 溶液P2，温和翻转混匀，放置5 min。

f. 加入7 ml溶液P4，温和翻转，充分混匀，出现白色絮状沉淀。放置10 min.12000 rpm离心10 min，将溶液倒入过滤器CS 中过滤，滤液收集于新的50 ml管中。

g. 加入滤液体积0.3 倍的异丙醇，混匀后转移入CP5。

h. 12000 rpm离心2 min，弃废液。

i. 吸附柱中加入10 ml漂洗液PW, 12,000 rpm离心2 min，弃废液。

j. 重复操作步骤i。

k. 吸附柱中加入3 ml 无水乙醇，12000 rpm离心2 min，倒掉废液。

l. 12000 rpm离心5 min，将残余漂洗液去除。

m. 将CP5置于新的50 ml收集管中，向吸附膜中间悬空滴加1-2ml洗脱液TB，放置5 min, 12000 rpm离心2 min。将离心所得的洗脱液全部移入新的1.5 ml离心管，-20℃保存。

n. DNA纯度及浓度的检测

将大提的质粒DNA用紫外分光光度计检测浓度与纯度。取浓度> 300 ng/μl，纯度检测OD260/OD280在1.8～2.0之间的质粒进行琼脂糖凝胶电泳检测，检测片段大小符合实际的质粒可用于细胞转染实验。

Ⅱ. 免疫荧光染色检测APJ的蛋白表达

按1×10 6个/孔接种HEK293细胞（见HEK293细胞培养）至铺有盖玻片（经多聚赖氨酸处理）的6孔板中，待细胞融合度70%时瞬时转染pRluc-hAPJ-pcDNA3.1（见脂质体瞬时转染）。转染后48 h，细胞免疫荧光染色。具体方法如下：

a. 将免清洗盖玻片(20mm×20 mm)灭菌后，置于6孔培养板，加入50μg/ml多聚赖氨酸作用3-16 h。

b. 吸去赖氨酸，PBS洗2次，接种HEK293细胞，细胞70%融合后，瞬时转染pRluc-hAPJ-pcDNA3.1.

c. 48h后去除6孔板内的培养基，4℃的PBS洗3次，5min\次。

d. 4%多聚甲醛固定30min, PBS洗3次，5min\次。

e. 透化液0.01%Triton X-100处理5min, PBS洗3次，5min\次。

f. 封闭液1%BSA室温封闭1h, PBS洗3次，5min\次。

g. 加兔抗人APJ一抗（1:1000稀释），4℃孵育过夜，PBS洗3次，5min\次。

h. 加罗丹明标记ft羊抗兔IgG（1:500稀释），室温孵育1h, PBS洗3次，5min\次。

i. DAPI染核（终浓度为1μg\ml），封片。

g. 激光共聚焦显微镜下观察或铝箔纸包好后储存于-80℃。Ⅲ. Western blot

将大提的pRluc-hAPJ-pcDNA3.1瞬时转染HEK293细胞，48 h后，裂解细胞，提取蛋白，进行Western blot检测，具体方法如下：

①细胞总蛋白样品的制备和含量测定

吸除6孔板内培养液，每孔加1 ml 4℃预冷的PBS，洗3次。将液体吸除干净后，

每个孔加入200μl RIPA和2μl PMSF，冰上吹打、裂解30 min。将裂解液转移到1.5 ml EP管，4℃，12000 rpm离心30 min。将上清转移至高压的EP管，加入4×上样缓冲液，煮沸5-10 min后，分装并保存于-80℃。

蛋白浓度的确定使用BCA法：

a. 绘制标准曲线：取酶标板，按（表1）加入试剂，按50体积BCA试剂A加1体积BCA试剂B（50: 1）配制适量BCA工作液，每孔加200μl BCA工作液混匀，37℃放置30 min, 562 nm下测定吸光值，绘标准曲线。

表1 标准溶液的配制

| 孔号 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 蛋白标准溶液(μl) | 0 | 1 | 2 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 |
| 去离子水（μl） | 20 | 19 | 18 | 16 | 12 | 8 | 4 | 0 |
| 对应蛋白含量（μg） | 0 | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 4.0 | 6.0 | 8.0 | 10.0 |

b. 稀释待测样品至合适浓度，取20μl稀释液，加入200μl BCA工作液，以标准曲线0号管做参比，在562 nm波长测定吸光值，根据标准曲线内方程式计算样品蛋白含量（μg）。

②SDS-PAGE凝胶电泳

a. 清洗玻璃板、胶条和梳子，晾干备用。

b. 装好胶板，准备灌胶。

c. 配胶。先配10％分离胶，灌胶，水封。约30min后，配5％的浓缩胶，灌胶，加梳子，待浓缩胶凝固后，拔掉梳子。

d. 上样。将配好的胶置于电泳槽中，灌入电泳缓冲液，上样并点上预染蛋白

Marker PageRulerTM Plus Prestained Protein Ladder。

e. 电泳：恒压90V，电泳5-6 h。

③转膜。

a. 将PVDF膜置甲醇中浸泡5 min后，与转膜所需的器材（夹子、海绵垫、玻棒、滤纸）置于转膜液中浸泡1h预处理。

b. 取出电泳槽中的胶，并依次按正极-海绵垫-三层滤纸-PVDF膜-胶-三层滤纸-海绵垫-负极的顺序制成“三明治”转膜模型。

c. 转膜。300mA恒流转膜45min。

④免疫反应

a. 取出PVDF膜置于封闭液中，摇床上室温封闭1h。

b. 一抗孵育。将PVDF膜置于兔抗人APJ一抗（1: 1000稀释）中，4℃孵育过夜后，室温TBST洗三次，20min/次。

c. 二抗孵育。将PVDF膜置于辣根酶标记的ft羊抗兔IgG二抗（1:2000稀释）中，室温孵育1 h后，室温TBST洗三次，20min/次。

d. ECL反应及显影。将ECL试剂盒内A、B两种试剂等体积混合，滴于PVDF膜蛋白面，接触1～2 min后，将PVDF膜移至保鲜膜上包好，放入X射线暗匣中。在暗室中曝光、显影。

⑤膜再生免疫内参GAPDH

a. 将曝光后的膜置于纯水中漂洗5min，弃纯水，加入膜再生液，摇床上漂洗1h

后，再加纯水漂洗一次。

b. 重复④的步骤。其中GAPDH一抗用TBST按1: 1000稀释。二抗选用辣根酶标记ft羊抗小鼠按1: 2000稀释。

##### （2) pEGFP-hB1R-pcDNA3.1在HEK293上的表达

将大提的pEGFP-hB1R-pcDNA3.1质粒瞬时转染HEK293细胞48h后，通过免疫荧光染色和Western blot检测B1R的表达（方法同上）。免疫荧光染色检测B1R 的

表达中，4%多聚甲醛固定30min, PBS洗3次后，直接染核、滴加抗荧光衰减剂，封片。利用激光共聚焦显微镜观察EGFP的自发荧光即可。

### **2.2** **HEK293**细胞的培养

本研究选用人的胚胎肾细胞（HEK293）这一细胞株，易于培养、转染率高，最为关键的是不內源表达APJ和B1R，可满足本研究的基本要求。

##### （1) HEK293细胞的复苏

取出冻存细胞立即37℃水浴，摇动使之迅速完全融化。于无菌操作台中吸出细胞液，加人10ml无菌离心管，1000 rpm离心5 min，去上清。随后加入适当体积的培养液（含10% FCS的MEM），用微量加样器温和吹打，充分悬浮细胞沉淀后，转至6孔细胞培养板或细胞培养瓶中，37℃，5%CO2培养箱培养。

##### （2) HEK293细胞的培养及传代

定时于倒置显微镜下观察细胞的贴壁、生长情况，适时给细胞换液，至90%融合后，细胞传代：PBS洗两遍，胰蛋白酶消化细胞约1 min，加入含10%FCS的MEM终止反应，吹打混匀后，于10 ml离心管1000 rpm离心3 min，去上清，加培养基悬浮细胞进行培养。

##### （3) HEK293细胞的冻存

冻存细胞前1天预换液，按上述方法对细胞进行消化、离心后，每只冻存管加入冻存液（10% DMSO、70%FCS和20%MEM）1ml充分悬浮，放入冻存盒（NALGENE Cryo 1℃Freezing Container, Nalge Company, USA），迅速置-80℃冰箱冻存。

### **2.3** 细胞瞬时转染

将带有人B1R和APJ基因的重组真核表达载体转入HEK293细胞，使细胞内表达相应的蛋白以用于体外受体之间的相互作用和作用机制。我们的实验选用脂质体转染法。脂质体Lipofectamine 2000作为转染试剂，根据不同的检测指标，选用不同规格的培养皿进行转染。

表2 转染试剂Lipofectamine 2000和质粒用量参照表

|  |  |  | 试 剂 |  | DNA 转染 | RNAi 转染 | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 培养容器 | 每孔的  表面积 | 培养基的  总量 | 稀释培养基的总量 |  |  |  |  |
|  | DNA | 脂质体 2000 | RNA | 脂质 2000 |
| 96-well | 0.3cm² | 100 μl | 2×25 μl | 0.2μg | 0.5μl | 5.0 pmol | 0.25 μl |
| 24-well | 2 cm² | 500 μl | 2×50 μl | 0.8μg | 2.0μl | 20 pmol | 1.0 μl |
| 12-well | 4 cm² | 1 ml | 2×100 μl | 1.6μg | 4.0μl | 40 pmol | 2.0 μl |
| 6-well | 10 cm² | 2 ml | 2×250 μl | 4.0μg | 10μl | 100 pmol | 5.0 μl |
| 60-mm | 20 cm² | 5 ml | 2×0.5 ml | 8.0μg | 20μl | 200 pmol | 10 μl |
| 10-cm | 60 cm² | 15 ml | 2×1.5 ml | 24μg | 60μl | 600 pmol | 30 μl |

具体转染方法如下（以6孔板为例）：

a. 将10μl Lipofectamine 2000加入250μl Opti-MEMⅠ无血清培养基，混匀后室温孵育5 min。

b. 将4.0μg质粒DNA加入250μl Opti-MEMⅠ无血清培养基，混匀。

c. 将（1）和（2）溶液混合，室温孵育30 min；

d. 将6孔板中培养基换成无血清MEM，滴加转染混合液，摇板混匀，置于培养箱中孵育。

e. 转染6h/过夜，换用含10%FCS的MEM培养基继续培养。

### **2.4** 检测**B1R**与**APJ**之间的相互作用

为检测APJ**与**B1R能否发生异源二聚化，我们采用：激光扫描共聚焦显微镜检测APJ**与**B1R的共定位和BRET方法检测二者之间的相互作用。

#### **2.4.1** 激光扫描共聚焦显微镜检测**B1R**与**APJ**的共定位

脂质体法将pRluc-hAPJ-pcDNA3.1 和pEGFP-hB1R-pcDNA3.1 质粒共转染

HEK293细胞，48h后制作然后进行免疫荧光染色样片，激光扫描共聚焦显微镜检测两种受体在细胞内的表达。制作共转染细胞样片的具体实验方法参照2.1.2（1）的方法。

观察B1R与APJ的共定位：激光共聚焦显微镜下，用594nm的激发器激发罗丹明标记、542nm的激发器激发eGFP、紫外激发DAPI用，将上述分别激发的图重叠组合，观察两受体的共定位情况。

#### **2.4.2** 生物发光共振能量转移检测**B1R**与**APJ**之间的相互作用

本课题用BRET实时检测HEK293细胞中B1R与APJ的相互作用。

实验原理：共转染pRluc-hAPJ-pcDNA3.1和pEGFP-hB1R-pcDNA3.1的HEK293

细胞内表达EGFP-B1R和Rluc-APJ后，Rluc-APJ与底物Coelenterazine h作用生成

480nm的发射光（发射光波长与EGFP的激发波长重叠），如果B1R与APJ能发生相互作用（距离<10 nm），便能将能量转移到APJ上标记的EGFP，产生515 nm的激发光。即通过Rluc融合蛋白和EGFP融合蛋白间的相互作用实现对B1R与APJ相互作用的定性和定量分析。具体实验方法：

##### （1) 荧光和发光检测

①发光检测 检测转染质粒的发光水平。将pRluc-hAPJ - pcDNA3.1 + pEGFP-pcDNA3.1、pEGFP-pcDNA3.1、pEGFP-hB1R - pcDNA3.1 + pRluc-hAPJ -

pcDNA3.1、pEGFP-hB1R - pcDNA3.1、pRluc-pcDNA3.1五组质粒分别转染到24孔板内的HEK293细胞，24h后转染细胞一传三（参照传代方法），接种于96孔白色培养板，继续培养24h，于多功能荧光发光分析仪（FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH, Germany）中检测，检测时选用单发光检测探头，发射滤光片选空

（empty），读数时间10s/孔。采集数据，统计分析后，绘制表格和柱形图。

②荧光检测检测转染质粒的荧光水平。在24孔板进行细胞转染，将pRluc - hAPJ

- pcDNA3.1+pEGFP - pcDNA3.1、pEGFP - hB1R - pcDNA3.1+pRluc - pcDNA3.1、pEGFP - hB1R - pcDNA3.1+pRluc - hAPJ - pcDNA3.1、pEGFP - hAPJ - pcDNA3.1+

pRluc - hKOR - pcDNA3.1、pRluc - pcDNA3.1五组质粒分别转染到24孔板内的

HEK293细胞，24h后转染细胞一传三（参照传代方法），接种于96孔黑色培养板，继续培养24h，于多功能荧光发光分析仪中检测。检测时选用荧光检测探头，激发光滤光片选485nm，发射光滤光片选535nm，读数时间10s/孔。采集数据，统计分析后，绘制表格和柱形图。

##### （2) BRET

①BRETl鉴定实验实验组共转染pEGFP - hB1R - pcDNA3.1+pRluc - hAPJ - pcDNA3.1，用pRluc - pcDNA3.1 + pEGFP - hB1R - pcDNA3.1共转染或pRluc - hAPJ - pcDNA3.1 + pEGFP - pcDNA3.1共转染细胞作阴性对照组，用实验室前期已证实发生二聚化的pRluc - hKOR - pcDNA3.1 + pEGFP - hAPJ - pcDNA3.1共转染细胞作阳性对照，单转pRluc - hAPJ - pcDNA3.1、pRluc - pcDNA3.1或pRluc - hAPJ - pcDNA3.1、pRluc - hKOR - pcDNA3.1分别作为实验组、阴性和阳性对照组的背景，共转染组受体质粒与供体质粒的比值均为3: 1。转染后24h，消化、传代，接种于96孔白色培养板（1传3），用HEPES缓冲液-无酚红培养基继续培养24h. 随后吸走HEPES缓冲液-无酚红培养基，换D-PBS，加入coelenterazine h（终浓度5μM）后立刻进行BRETl检测。BRET检测选用双发光探头：长波长选built-in lenses（535-30），用来检测受体pEGFP- hB1R表达的荧光活性（fluorescence），短波长选built-in lenses（475-30），用来检测供体pRluc-hAPJ的发光活性（luminescence）。采用孔模式，同时双发射进行检测。收集数据，统计分析，绘图。

②BRET饱和实验BRETl初步证实APJ和B1R能发生相互作用的基础上，进行

BRET饱和实验，检测二者相互作用的特异性。实验分组参照BRET鉴定实验。共转染组均固定供体质粒量（800 ng/well），受体质粒与供体质粒的比例依次增加（受体

/供体=1: 1～1: 6）。转染后的操作同BRET鉴定实验。

③配体诱导实验在饱和实验的基础上，选取最佳受体/供体比值转染细胞24h后，加入受体对应激动剂apelin-13或des-Arg9-BK进行处理15min，检测配体诱导下受体的相互作用强度变化。

④BRET信号的计算BRET信号用BRET ratio表示。

BRET ratio相互作用蛋白长波长发光值背景长波长发光值

相互作用蛋白短波长发光值 背景短波长发光值

MiliBRET( mBRET) = BRET ratio×1000

⑤数据统计处理和图像绘制用SPSS13.0统计处理实验数据，结果用三次独立实验（每次两个重复）的平均值±SEM表示。用GraphPad Prism 5．0软件，非线性回

归（Nonlinear regression）分析方法制作饱和信号曲线图。组间比较采用单因素方差分析，多重比较采用SNK法。组间差异以\*p<0.05，\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001表示。

附： coelenterazine h发光底物储存液的配制：开装前将低压冻干的coelenterazine

h平衡至室温以避免凝结，用甲醇溶解coelenterazine h，涡旋重悬。储存浓度为500μM

（100×），避光条件下分装、-80℃储存。

### **2.5** 双荧光素酶报告基因检测**CRE**、**NFAT**、**SRE**

通过以上实验初步证实B1R和APJ能发生异源二聚化，我们进一步检测apelin-13或des-Arg9-BK刺激对异源二聚物信号转导的影响。选取CRE、NFAT和SRE三种下游信号因子进行检测。CRE-luc（CRE-1uciferase, CRE-荧光素酶）报告子系统能很好的区分PLC／PKC和AC／PKA信号途径，能反应出受体激活Gαi和Gαs的水平。

NFAT是通过PKC而非PKA途径激活，能够反应出受体激活Gαq的水平。SRE-luc则通过Raf/MAPK途径激活，反应Gβγ的活化水平。我们将质粒pNFAT-RE-luc或pCRE-lue或pSRE-luc和pRL-Tk共同转染HEK293-APJ、HEK293-B1R和HEK293-APJ/B1R细胞，然后用双发光酶报告子检测系统(Dual-Luciferase Reporter(DLR) Assay System)试剂盒和多功能荧光发光分析仪FLUOstar OPTIMA

（BMG LABTECH, Offenburg, Germany）检测。pRL-Tk是海肾荧光素酶（renilla

luciferase，RL）构建子，与pNFAT-RE-luc、pCRE-Luc或pSRE-Luc共转染作为内参照，以校正由细胞密度和转染效率不一造成的实验误差。具体方法如下：

①转染分组：空白对照组（将pNFAT-RE-luc或pCRE-lue或pSRE-luc和pRL-Tk共转染HEK293细胞，转染比例为10: 1），APJ组（将pNFAT-RE-luc或pCRE-lue或pSRE-luc和pRL-Tk共转染HEK293-APJ细胞，转染比例10: 1），B1R组（将pNFAT-RE-luc或pCRE-lue或pSRE-luc和pRL-Tk共转染HEK293-KOR细胞，转染比例10: 1），APJ／B1R组（将pNFAT-RE-luc或pCRE-lue或pSRE-luc和pRL-Tk共转染HEK293-APJ／B1R细胞，转染比例10; 1）。

②将上述各组质粒转染六孔板培养的细胞，24h后传代到包被有赖氨酸的24孔板，继续培养24h。更换无血清MEM培养基，并加入相应激动剂进行处理3-4h。处HEK293-APJ和HEK293-APJ／B1R细胞用apelin-13（100nM终浓度）处理，HEK293-APJ／B1R和HEK293-B1R细胞用des-Arg9-BK（100nM终浓度），空白对照组不处理。

③处理完后用PBS洗2次，24孔板的每孔加100ul 1×PLB裂解液，晃动裂解30 min。转移裂解物至0．5 ml离心管内，直接用DLR试剂盒检测或储存于超低温冰箱备用。

④监测采用多功能荧光发光分析仪FLUOstar OPTIMA。将3号和4号进样管分别浸入配好的LARII和stop&Glo试剂。设置双荧光素酶报告基因检测程序，3号、4号进样器每次每孔进样量设为100ul，震荡时间1s，检测前延迟2 s，每个报告子检测

10 s。96孔白色细胞培养板（BMG LABTECH）内每孔加入20 ul的PLB细胞裂解物，置于仪器内检测读数，以上实验重复3次，每个处理重复2次。结果用萤火虫荧光素酶（firefly luciferase, lue）的发光值与海肾荧光素酶（Renilla luciferase, Rluc）的发光值的比值表示。用SPSSl3．0软件，组间比较采用单因素方差分析，多重比较采用SNK法。结果用平均值±SEM表示。组间差异以\*p<0.05，\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001表示。

### **2.6** **Western blot**检测**eNOS**的磷酸化

#### **2.6.1** **HUVECs**的培养

HUVECs的复苏、传代和冻存：与HEK293细胞的复苏方法基本相同。专用培养基：不完全培养基RPMI-1640(90%) +FCS(10%) +表皮细胞生长添加剂（Endothelial Cell Growth Supplement, ECGS）(30ug/ml) +青霉素/链霉素（100ug/ml），置于37℃，5% CO2培养箱常规培养。HUVECs的传代时，加入1ml胰酶后，要在倒置显微镜下时刻观察细胞的收缩状况，至变圆前终止消化。

#### **2.6.2** **shRNA APJ**转染**HUVECs**

在6孔板内培养HUVECs，细胞融合度80%时，用脂质体转染法将shRNA APJ、阳性对照shRNA转入细胞，12h后加入嘌呤霉素筛选，空白对照组不作处理。24h

后传代（一传三），48h后换无血清培养基并用激动剂对各组进行处理1h：转染shRNA

APJ的分为apelin-13、des-Arg9-BK和不刺激组，转染阳性对照shRNA的分为apelin-13

和des-Arg9-BK刺激组，空白对照组不处理。

#### **2.6.3** **Western blot**检测**eNOS**磷酸化

各组细胞刺激后，制备细胞总蛋白样品并对细胞总蛋白样品定量，随后进行Western blot。稍有不同的是电泳时，电压80V，1h，随后120V, 5-6 h；转膜时，300mA，1.5-2h，总eNOS作内参。

#### **2.6.4** 图像采集及分析

扫描仪扫描X光片上的条带后，后用Quantity One软件进行条带的灰度值计算。

P-eNOS度=p-eNOS值/总eNOS 值

采取的数据用SPSS13.0进行统计学分析，结果以三次独立实验的平均值±SEM表示，组内和组间比较采用单因素方差分析（ANOVA）。组间差异用\*\*p<0.01，\*p<0.05表示。

# 三、 结 果

## **1.** 表达载体的构建及表达

### **1.1** 表达载体的构建

#### **1.1.1** 重组质粒**pRluc-hAPJ-pcDNA3.1**的构建

①以pcDNA 3.1-hAPJ为模板扩增hAPJ基因，得到一条全长为1143 bp的目的片段，与GenBank（BC032688.1）相同（图1-1）。BamH I和EcoR I双酶切纯化回收的PCR产物和pRluc - pcDNA3.1载体（图1-2），载体由环状被切成线状，泳动速度变慢。



**图1-1** **PCR扩增hAPJ产物**

1: 目的片段大小为1143 bp，M: DL2000 Marker



**图1-2** **BamH I和EcoR I双酶切载体pRluc-pcDNA3.1**

1: pRluc-pcDNA3.1，M: DNA marker(500-12000)，2：BamH I和EcoR I双酶切的

pRluc-pcDNA3.1载体

②重组质粒的鉴定

BamH I和EcoR I双酶切初步鉴定单克隆提取出的质粒，结果表明存在目的片段

（图1-3）。将其菌液送至上海生工进行测序，测序结果表明重组质粒的构建成功（图1-4）。



**图1-3** **BamH I和EcoR I双酶切pRluc-hAPJ-pcDNA3.1重组质粒**

M: DNA marker(500-12000), 1: BamH I和EcoR I双酶切的

pRluc-hAPJ-pcDNA3.1



**图1-4** **重组质粒pRluc-hAPJ-pcDNA3.1测序结果**

#### **1.1.2** 重组质粒**pEGFP-hB1R-pcDNA3.1**的构建

①以pcDNA 3.1- hB1R为模板，PCR扩增hB1R基因，得到一条全长为1062 bp的基因片段，与GenBank（NM\_000710）相同（图1-5）。Xhol和BamHⅠ双酶切纯化回收的PCR产物和pEGFP - pcDNA3.1载体（图1-6），载体由环状被切成线状，泳动速度变慢。



**图1-5** **PCR扩增hB1R产物**

1: 目的片段大小为1062 bp，M: DL2000 Marker



**图1-6** **Xhol和BamHⅠ双酶切载体pEGFP - pcDNA3.1**

1: pEGFP - pcDNA3.1, M: DNA marke(r 500-12000)，2：Xhol和BamHⅠ双酶切的pEGFP

- pcDNA3.1载体

②重组质粒的鉴定

Xhol和BamHⅠ双酶切初步鉴定由单克隆提取出的质粒，结果表明存在目的片段

（图1-7）。将其菌液送至上海生工进行测序，测序结果表明载体构建成功（图1-8）。



**图1-7** **Xhol和BamHⅠ双酶切pEGFP-hB1R-pcDNA3.1重组质粒**

M: DNA marker（500-12000），：Xhol和BamHⅠ双酶切的pEGFP-hB1R-pcDNA3.1



**图1-8** **重组质粒pEGFP-hB1R-pcDNA3.1测序结果**

### **1.2** 验证载体的表达

#### **1.2.1** 重组质粒**pRluc-hAPJ-pcDNA3.1**的表达

①细胞免疫荧光检测pRluc-hAPJ-pcDNA3.1的表达

pRluc-hAPJ-pcDNA3.1瞬时转染HEK293细胞48h后，对细胞进行免疫荧光处理后，激光共聚焦显微镜观察发现APJ在HEK293细胞上有较强表达，并主要在细胞膜上表达（图1-10（b））。

②Western blot检测重组载体的表达

a. BCA法测总蛋白含量，绘制的蛋白浓度标准曲线如下（图1-9）：



600

500

400

300

200

100

0

-100 0

y = 1002.4x - 177.73

R2 = 0.9667

0.2

0.4

吸光度

0.6

0.8

蛋白浓度（mg/ml）

**图1-9** **BCA法测蛋白含量的标准曲线图**

根据线性方程式，计算转染组和空白组的总蛋白浓度分别为：1.20μg/μl 和

1.15μg/μl。

b. Western blot检测转染pRluc-hAPJ-pcDNA3.1的细胞，有一条78kDa的条带，与Rluc-hAPJ重组蛋白的大小相符，而未转染组中无此蛋白条带（图1-11（a）)，证明Rluc-APJ在HEK293细胞膜上表达。

#### **1.2.2** 重组质粒**pEGFP-hB1R-pcDNA3.1**的表达

①细胞免疫荧光检测pEGFP-hB1R-pcDNA3.1的表达

pEGFP-hB1R-pcDNA3.1瞬时转染HEK293细胞48h后，对细胞进行免疫荧光处理后，激光共聚焦显微镜观察发现B1R在HEK293细胞上有较强表达，并主要在细胞膜上表达（图1-10（a））。

②Western blot检测重组载体的表达

a. BCA法测总蛋白含量，根据标准曲线图的线性方程式，计算转染组和空白组的总蛋白浓度分别为：2.10μg/μl和2.43μg/μl。

b. Western blot检测转染pEGFP-hB1R-pcDNA3.1的细胞，有一条62kDa的条带，与EGFP-B1R重组蛋白的大小相符，而未转染组中无此蛋白条带（图1-11（b）)，证明EGFP-B1R在HEK293细胞膜上表达。



**图1-10** **激光共聚焦观察重组质粒在HEK293细胞的表达**

（a）B1R在细胞膜上表达，（b）APJ在细胞膜上表达。



**图1-11** **Western blot检测重组质粒在HEK293细胞上的表达**

（a）APJ蛋白的表达。Basal，未转染的HEK293细胞；APJ，转染pRluc- hAPJ- pcDNA3.1质粒的HEK293细胞。(b) B1R蛋白的表达。Basal，未转染的HEK293细胞；B1R，转染pEGFP-hB1R-pcDNA3.1质粒的HEK293细胞。GAPDH的表达作为内参照。

经上海生工测序鉴定，重构的两个质粒中含有与目的受体片段100%的重复相

同。应用共聚焦显微镜观察免疫荧光染色样片显示，B1R和APJ均在细胞膜上表达。以上说明表达载体构建成功，可用于BRET检测。

## **2** **HEK293**细胞的培养

倒置显微镜下观察HEK293细胞的生长状况：细胞贴壁后，伸展出不规则突起（图

2-1)。



A. 10X B. 20X C. 40X

**图2-1** **光学显微镜下观察HEK293的形态**

A、B、C分别代表物镜的放大倍数：10倍（10×）、20倍（20×）、40倍（40×）。

## **3** **HEK293**细胞的转染

用脂质体转染法，将各组载体转入HEK293细胞，用于后期实验研究。荧光显微镜下观察转染pEGFP-hB1R- pcDNA3.1质粒的HEK293细胞，转染效率可达70%-80%

（图3-1）。



**图3-1** **荧光显微镜下转染pEGFP-hB1R的HEK293细胞状态**

## **4** **B1R**与**APJ**之间的相互作用

### **4.1** 激光扫描共聚焦显微镜检测**B1R**与**APJ**的共定位

将pRluc-hAPJ-pcDNA3.1和pEGFP-hB1R-pcDNA3.1共转染HEK293细胞48h后，制作免疫荧光染色样片，激光扫描共聚焦显微镜检测两种受体在细胞内的表达（图

4-1）。B1R与APJ在主要HEK293细胞膜上表达，定位置高度一致，表明二者存在相互作用的可能。



**图4-1** **激光共聚焦显微镜检测B1R与APJ共定位**

Rluc-APJ显红色，EGFP-B1R显绿色，二者叠加后呈黄色，即共定位的位置，蓝色为DAPI

染色的细胞核。

### **4.2** 生物发光共振能量转移检测**B1R**和**APJ**之间的相互作用

#### **4.2.1** 荧光和发光检测

为保证BRET信号检测结果的稳定性，我们首先检测转染质粒的荧光和发光水平。发光检测结果显示：加入底物腔肠素（Coelenterazine h）后，只转染带EGFP基因的两个组发光水平显著较低（$$$p<0.001 vs Rluc-hAPJ+EGFP组；&&&p<0.001 vs Rluc-hAPJ+hB1R-EGFP组；###p<0.001 vs Rluc组），而转染带Rluc基因的三个组发光水平明显较高，且各组之间发光水平无显著差异（图4-2）。荧光检测结果显示：只pRluc-pcDNA3.1组的荧光水平显著较低($$$p<0.001 vs Rluc-hAPJ+EGFP组；&&& p<0.001 vs Rluc+hB1R-EGFP 组；###p<0.001 vs Rluc-hAPJ+hB1R-EGFP 组；

\*\*p<0.01 vs EGFP-hAPJ+Rluc-hKOR组），其他有EGFP的组荧光水平明显较高，且各组之间荧光水平无显著性差异（图4-3）。提示用于BRET实验的各组细胞荧光和发光水平表达较一致。



****

**图4-2** **BRET发光水平分析**

**图4-3** **BRET荧光水平分析**

#### **4.2.2** **BRET**鉴定实验

在发光和荧光检验的基础上，初步进行BRETl检测。结果显示：pEGFP - hB1R - pcDNA3.1+pRluc - hAPJ - pcDNA3.1共转染组与阳性对照组、阴性对照组和背景组相比，mBRET值均显著升高（$$$p<0.001 vs Rluc-hAPJ组；&& p<0.01 vs EGFP-hAPJ + Rluc

-hKOR组；###p<0.001 vs Rluc + hB1R-EGFP组；\*\*p<0.01 vs Rluc-hAPJ + EGFP组）

（图4-4），表明APJ和B1R之间能够相互作用。



**图4-4** **BRETl实时分析APJ和B1R之间的相互作用**

$$$p<0.001 vs Rluc-hAPJ组；&&p<0.01 vs EGFP-hAPJ + Rluc-hKOR组；###p<0.001 vs Rluc + hB1R-EGFP组；\*\*p<0.01 vs Rluc-hAPJ + EGFP 组

#### **4.2.3** **BRET**饱和实验

BRETl初步证实APJ和B1R能发生相互作用的基础上，进行BRET饱和实验，检测二者相互作用的特异性。固定供体Rluc、Rluc-hAPJ或Rluc-hKOR的浓度，逐渐增加受体EGFP、EGFP-hB1R或EGFP-hAPJ的浓度（1:1-1:6），检测BRETratio值。结果显示：实验组和阳性对照组随着受体浓度的增加，mBRET值逐渐增加，并达到饱和，BRET50值为2.8（图4-5）。阴性对照组则未出现饱和现象，证明APJ与KOR在HEK293细胞中能够发生特异相互作用。



**图4-5** **BRET饱和实验**

固定供体Rluc、Rluc-hAPJ或Rluc-hKOR的浓度，逐渐增加受体EGFP、EGFP-hB1R或EGFP-hAPJ的浓度（1:1-1:6），BRET ratio值用mBRET表示，结果用三次独立实验的平均值±SEM表示。pEGFP-hB1R+pRluc-hAPJ组随受体浓度的增加，mBRET值逐渐增加，并达到饱和，BRET50值为2.8.

#### **4.2.4** **BRET**配体诱导实验

将pRluc - hAPJ - pcDNA3.1与pEGFP - hB1R - pcDNA3.1（1: 3）共转染HE293细胞。BRET检测前，用Apelin-13和/或des-Arg9-BK处理或不处理细胞15min. 结果为三次独立实验的平均值±SEM. 检测结果：用apelin-13或des-Arg9-BK单刺激组，BRET信号明显增强（\*\*p<0.01）。而apelin-13和des-Arg9-BK共刺激组，BRET信号比单刺激明显降低（#p<0.05 vs apelin-13刺激组；$$p<0.01 vs des-Arg9-BK刺激组），但仍高于未刺激组（图4-6）。这表明配体的刺激能够使二者相互作用的亲和力增强，而apelin-13和des-Arg9-BK与二聚体结合可能存在竞争性。



**图4-6** **Apelin-13和/或des-Arg9-BK对BRET信号的信号影响**

pRluc - hAPJ与pEGFP - hB1R（1: 3）共转染HE293细胞，用Apelin-13和/或des- Arg9-BK处理或不处理细胞15min. 与未刺激对照组比，apelin-13或des-Arg9-BK单刺激组BRET信号显著增强（\*\*p<0.01），apelin-13和des-Arg9-BK共刺激组的BRET信号比单刺激组显著降低（#p<0.05 vs apelin -13 刺激组；$$p<0.01 vs des-Arg9-BK 刺激组）。**5双荧光素酶报告基因检测CRE、NFAT、SRE**

双报告基因检测CRE、NFAT、SRE下游信号。CRE报告子能区分PLC／PKC

和AC／PKA信号途径，反应出受体激活Gαs的水平。NFAT通过PKC途径激活，反应受体激活Gαq的水平。SRE-luc则通Raf/MAPK途径激活，反应Gβγ的活化水平。将pNFAT-RE-luc或pCRE-lue或pSRE-luc和pRL-Tk共转染HEK293、HEK293-APJ、HEK293-B1R和HEK293-APJ/B1R细胞，检测二聚体信号途径的改变。结果显示：与背景组相比，HEK293-APJ和HEK293-B1R细胞中，CRE-1uc活性显著降低，NFAT-1uc的活性显著增强，说明在激动剂刺激的单转细胞中PKA-CRE途径受到抑

制，主要激活PKC-NFAT信号通路。与HEK293-APJ和HEK293-B1R细胞相比，HEK293-APJ/B1R细胞中，CRE-1uc活性显著增强（图5-1），而SRE的活性无明显变化（图5-2），NFAT-1uc的活性显著增强（图5-3）。



**图5-1** **CRE活性检测**

将pCRE·luc 和pRL-Tk质粒按（1 0: 1）转染HEK293、HEK293-APJ、HEK293-B1R和HEK293- APJ/B1R细胞。细胞用apelin-13（终浓度100 nM）或des-Arg9-BK（终浓度1 nM）处理细胞4h, 检测CRE活性。结果为三次独立实验的平均值±SEM. APJ/B1R组与B1R组比，\*\*\*P <0.001；与

APJ组相比，\*\*\*P<0.001. Basal组与APJ、B1R组比，###p<0.001.



**图5-2** **SRE活性检测**

将pSRE·luc 和pRL-Tk质粒按（10: 1）转染HEK293、HEK293-APJ、HEK293-B1R和HEK293

-APJ/B1R细胞。细胞用apelin-13（终浓度100 nM）或des-Arg9-BK（终浓度1 nM）处理细胞4h,

检测SRE活性。结果为三次独立实验的平均值±SEM 。



**图5-3** **NFAT活性检测**

将NFAT-RE·luc和pRL-Tk质粒按（10: 1）转染HEK293、HEK293-APJ、HEK293-B1R和HEK293 -APJ/B1R细胞。细胞用apelin-13（终浓度100 nM）或des-Arg9-BK（终浓度1 nM）处理细胞4h,检测NFAT活性。结果为三次独立实验的平均值±SEM. APJ/B1R组与B1R组比，

\*P<0.05；与APJ组相比，\*\*P<0.01. Basal组与APJ、B1R组比，#p<0.05.

**6** **Western blot检测eNOS的磷酸化**

**6.1** **HUVECs的培养**

于倒置显微镜下观察人脐静脉内皮细胞的生长状态：细胞较大，呈多角形，无重叠生长现象，镶嵌排列呈“铺路石”样（图6-1）。





**A 10X** B **20X**

**图6-1** **光镜下观察到HUVECs的形态**

A、B分别代表物镜的放大倍数：10倍（10×）、20倍（20×）。

**6.2** **shRNA APJ转染HUVECs**

在6孔板内培养HUVECs，细胞融合度80%时，转染shRNA APJ、阳性对照

shRNA, 12h后加入嘌呤霉素筛选，空白对照组不转染。Western blot检测APJ的相对表达量（结果用APJ的表达量/GAPDH的表达量表示）变化，结果显示：转染shRNA

APJ组的APJ表达显著显低于空白对照组和阳性对照（\*\*p<0.01），而空白对照组和阳性对照组无明显差异（图6-2A），说明转染shRNA APJ能有效的下调APJ表达量。

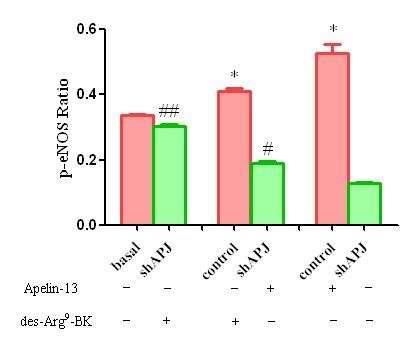
**6.3** **Western blot检测eNOS磷酸化**

在HUVECs中分别转染各组的shRNA，并用激动剂对各组进行处理1h，转染shRNA APJ的分为apelin-13、des-Arg9-BK和不刺激组，转染阳性对照shRNA的分为apelin-13和des-Arg9-BK刺激组，空白对照组不处理。Western blot检测eNOS磷酸化的变化，结果显示：与空白对照组对比，des-Arg9-BK和apelin-13刺激组eNOS的磷酸化显著增加（\*p<0.05）；同样转染shRNA APJ的三组中，apelin-13 和

des-Arg9-BK刺激的两组要比未刺激一组eNOS的磷酸化显著增加（#p<0.05, ##p<0.01）

（图6-2 B）。说明配体apelin-13刺激能够增加eNOS的磷酸化水平，当应用shRNA技术使APJ的胞内表达水平下调时（图6-2 A），eNOS的磷酸化水平下降，但是在apelin-13和des-Arg9-BK的刺激下，eNOS磷酸化水平又显著上升，很可能存在

APJ/B1R异源二聚体对eNOS磷酸化水平的调控。



**图6-2** **Western blot检测eNOS磷酸化**

apelin-13和des-Arg9-BK刺激的阳性对照组eNOS磷酸化比率显著高于空白对照组（\*p<0.05 vs basal组），转染shRNA APJ的三组中，apelin-13和des-Arg9-BK刺激的两组要比未刺激一组

eNOS的磷酸化显著增加（#p<0.05 vs apelin-13刺激组, ##p<0.01 vs des-Arg9-BK刺激组）。

# 四、 讨 论

## **1** **APJ/B1R**的异源二聚化

在建立共转染APJ和B1R的HEK293细胞模型上，我们首先采用传统方法免疫荧光共定位检测，证实二者在HEK293细胞膜表达，而且定位高度一致。该方法在鉴别多数蛋白质-蛋白质相互作用中发挥了巨大作用，但步骤繁多，可能会改变蛋白质-蛋白质相互作用的自然状态，导致假阳性。因此我们进一步采用BRET实时、动态检测HEK293细胞中二者相互作用。BRET结果表明：B1R和APJ在HEK293细胞中能够发生组成型的特异结合，并且des-Arg9-BK或apelin-13刺激时BRET效率增加。由以上实验我们推测，B1R和APJ很可能以异源二聚物的形式存在。目前国内外尚未有关APJ/B1R异源二聚物的相关报道。

## **2** **APJ/B1R**二聚化对信号转导途径的影响

目前许多研究表明，GPCRs异源二聚体改变了GPCRs原有的一些特征，例如配体的药理学性质、激动剂的亲和力、G蛋白的活性、信号转导通路等。我们的研究发现，APJ/B1R异源二聚物的形成对信号转导途经产生了影响。双报告基因检测本实验采用双报告基因检测CRE、NFAT、SRE下游信号。CRE报告子能有效区分PLC／

PKC和AC／PKA信号途径，反应出受体激活Gαs启动PKA信号通路的水平[28]。NFAT通过PKC途径激活，反应受体激活Gαq的水平。SRE-luc则通Raf/MAPK途径激活，反应Gβγ的活化水平。研究发现，与HEK293-APJ和HEK293-B1R细胞相比，HEK293-APJ/B1R细胞中，CRE-1uc活性显著增强，NFAT-1uc的活性显著增强，而SRE-luc则无明显变化。说明APJ/B1R的异源二聚化很可能通过受体的构象变化对受体激活G蛋白的能力和HEK293细胞的信号转导途径都产生了影响，在Gαq介导的PKC-NFAT途径增强的同时，引起了与Gαi结合力的降低，来降低对Gαs介导

PKA-CRE途径的抑制作用（图三）。



**图三** **GPCRs的信号转导示意图**

有些异源二聚体呈现出疾病特异性，通过形成新的信号转导特征，参与疾病的形成或呈现吸引药物靶向作用的特点。最典型的例子是AT1R-B2R异源二聚体，妊娠期

这两个受体对的增量调节对先兆子痫中血管紧张素II诱导的超敏反应发挥重要作用。此外，apelin-13作用APJ-AT1R异源二聚体，能够抑制血管紧张素介导的动脉粥样硬化的形成。靶向β1AR-β2AR二聚体的药物在治疗心肌疾病方面比单体特异性更强[24]。

APJ和B1R系统在调节心血管的舒缩，维持心血管功能平衡方面发挥重要作用。那么，APJ/B1R异源二聚物很可能也参与ACE2调节的心血管功能，成为高血压和心力衰竭等疾病的重要发病机制。

NO作为一种在多数组织和器官中普遍存在的信号分子，在调控心血管系统稳态中发挥重要的生理功能。它具有抑制血小板聚集，抑制平滑肌细胞增生，调节血管张力，介导细胞免疫等作用。NO生物功能的紊乱会导致心脏的保护因素消失，加速心血管疾病的进程。正常况下，催化脉管系统产生NO的主要是eNOS，而B1R、B2R都可通过二聚体的形成，蛋白-蛋白间的相互作用等调控eNOS的活性[29]。我们用Western

blot检测APJ/B1R的异源二聚化对eNOS磷酸化的影响。配体apelin-13或des-Arg9-BK的刺激能够增加eNOS的磷酸化水平，当应用shRNA技术使APJ的胞内表达水平下调时，eNOS的磷酸化水平下降，但是在apelin-13激动剂的刺激下，eNOS磷酸化水平又上升，很可能存在APJ/B1R异源二聚体对eNOS磷酸化水平的调控，而这种调控可能是通过增加二聚体与Gαq的结合力，加强PKC信号途径引起。由此推测，形成APJ/B1R异源二聚物，很可能利于激活PKC信号通路促进eNOS的磷酸化，催化脉管系统产生NO，缓解高血压、动脉硬化等心血管疾病症状。

# 五、 结 论

1. 在APJ和B1R两种受体于HEK293细胞膜上定位高度一致的基础上，首次应用BRET技术，发现二者之间发生组成型异源二聚化。相应配体apelin-13（APJ）或des-Arg9-BK（B1R）的刺激能显著增强APJ/B1R的相互作用。

2. 双报告基因检测CRE、NFAT、SRE下游信号结果显示，APJ/B1R异源二聚体可能通过增强与Gαq和Gαs的结合力，降低与Gαi的结合力，使信号转导偏向PKC途径，同时降低对PKA信号途径的抑制作用。

3. 在HUVECs中，APJ/B1R异源二聚体调节与Gαq结合力的强度，激活PKC信号途径，可能对eNOS的磷酸化水平起到调控作用。

本研究首次提出，在转染人APJ/B1R的HEK293细胞中，B1R和APJ能形成异源二聚体。在激动剂的刺激下激活二聚体，信号转导途径偏向PKC途径，增强eNOS的磷酸化水平，释放NO，调控心血管系统的生理功能。这一发现为理解ACE2调节

RAS系统的分子机制提供新的参考，为开发治疗高血压和心力衰竭等疾病的药物提供新的潜在药物作用靶点。

参考文献

[1] Rozenfeld R. Devi L. A. Receptor heteromerization and drug discovery[J]. *Trends Pharmacol Sci*. 2010, 31(3): 124-130.

[2] Kenakin TP. Cellular assays as portals to seven-transmembrane Receptor based drug discovery[J]. [*Nat Rev Drug Discov*,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Cellular%20assays%20as%20portals%20to%20seven-transmembrane) 2009, 8(8): 617-26.

[3] Ferre S[, Baler R,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Baler%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19219011) [Bouvier M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Bouvier%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19219011), et al. Building a new conceptual framework for receptor heteromers[J]. *Nat Chem Biol*, 2009, 5(3): 131–4.

[4] Pin JP, Kniazeff J, Liu J, et al. Allosteric functioning of dimeric class C G protein coupled receptors. *FEBS J*, 2005, 272(12): 2947-2955.

[5] Cai X, Chen J, Bai B. Exploring the specific role of GPCRs dimerization in drug disco- verry. *J Chin Pharmaceutical Sci,* 2011, 535-541.

[6] Rozenfeld R, Fabien MD, Adriaan PI, et al. Heterodimers of G protein-coupled receptors as novel and distinct drug targets[J]. *Drug Discov Today*: *Ther Strat,* 2006, 3(4): 437–3.

[7] Jordan BA, Gomes I, Rios C, et al. Functional interactions between mu opioid and alpha 2A-adrenergic receptors[J]. *Mol Pharmacol,* 2003, 64(6): 1317–24.

[8] Li Y, Chen J, Bai B, et al. [Heterodimerization of human apelin and kappa opioid receptors: roles in signal transduction[J]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22200678). *Cell Signal*, 2012, 24(5): 991-1001

[[9] Breit A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Breit%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20674667), [Büch TR](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=B%C3%BCch%20TR%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20674667), [Boekhoff I](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Boekhoff%20I%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20674667) et al. Alternative G protein coupling and biased agonism: New insights into melanocortin-4 receptor signalling[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, 331(2): 232–40.

[10] Panetta R., Greenwood MT. Physiological relevance of GPCR oligomerization and its impact on drug discovery. *Drug Discov Today*, 2008, 13(23-24): 1059-1066.

[[11] Thompson MD](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Thompson%20MD%22%5BAuthor%5D), [Cole DE](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Cole%20DE%22%5BAuthor%5D)., [Jose PA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Jose%20PA%22%5BAuthor%5D). Pharmacogenomics of G protein-coupled receptor signaling: insights from health and disease, *Methods Mol Biol*, 2008, 448: 77- 107.

[12] AbdAlla S, Lother H., Massiery A, et al. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med*, 2001, 7(9): 1003-1009.

[[13] Chun HJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&amp;Cmd=Search&amp;Term=%22Chun%20HJ%22%5BAuthor%5D&amp;itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus), [Ali ZA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&amp;Cmd=Search&amp;Term=%22Ali%20ZA%22%5BAuthor%5D&amp;itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus), [Kojima Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&amp;Cmd=Search&amp;Term=%22Kojima%20Y%22%5BAuthor%5D&amp;itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus), et al. Apelin signaling antagonizes Ang II effects in mouse models of atherosclerosis. *J Clin Invest*, 2008, 118(10): 3343-335.

[14] Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, et al. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev*, 2005, 57(1): 27–77.

*[15]* Regoli D, Barabe J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev,* 1980, 32: 1–46.

[16] 刘路路, 蔡欣, 陈京, 白波. 缓激肽受体信号转导对心血管疾病的调控机制[J]. 生理科学进展, 2012, 43(3): 177-182.

[17] Stewen P, Outi S, Tuulikki N, et al. Cyclic AMP increases bradykinin receptor binding affinity in human endothelial cells [J]. *L ife Sci,* 2004, 74(23): 2839-2852.

[18] Bai B, Tang J Y, Liu H. Q, et al. Apelin-13 induces ERK1/2 but not p38 MAPK activeation through coupling of the human apelin receptor to Gi2 pathway[J]. *Acta Biochimicaet Biophysica Sinica*, 2008, 40(4): 311-318.

[[19] Masri B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Masri%20B%22%5BAuthor%5D), [Knibiehler B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Knibiehler%20B%22%5BAuthor%5D) [Audigier Y.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Audigier%20Y%22%5BAuthor%5D) Apelin signalling: a promising pathway from cloning to pharmacology[J]. *Cell Signal*, 2005, 17(4): 415-426.

[20] Zeng XJ, Yu SP, Zhang L, et al. Neuroprotective effect of the endogenous neural peptide apelin in cultured mouse cortical neurons[J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316(11): 1773-1783.

[21] Xu N, Wang HT, Li F, et al. Supraspinal administration of apelin-13 induces antinociception via the opioid receptor in mice[J]. *Peptides*, 2009, (30): 1153–1157.

[22] Boucher J, Masri B, Daviaud D, et al. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(4): 1764-1771.

[23] Adya R, Tan BK, Punn A, et al. visfatin induces human endothelial vegf and mmp-2/9 production via mapk and pi3k/akt signalling pathways: novel insights into visfatin-induced angiogenesis[J]. *Cardiovasc Res,* 2008, 78(2): 356-65.

[24] Khan SH, Ahmad F, Ahmad N, et al. Protein-protein interactions: principles, tec- hniques, and their potential role in new drug development[J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2011, 28(6): 929-938.

[25] 蔡欣, 陈京, 白波. G蛋白偶联受体高阶聚化和信号转导中蛋白复合体的时空动态检测[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(1): 8-12.

[26] 李雅林, 白波, 陈京. 生物发光共振能量转移技术及其应用. 中国生物化学与分子生物学报[J], 2009, 2(12): 1077-1082.

[27] Pfleger KD, Seeber RM., Eidne KA. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions[J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(1): 337-345.

[28] F Kuhr, B. B. A. J, Lowry, et al. Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors[J]. *Neuropeptides*, 2010, 44(2): 145–154.

[29] Zhu WZ, [Chakir K,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chakir%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16002745) [Zhang S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhang%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16002745), et al. Heterodimerization of beta1- and beta2-adrenergic receptor subtypes optimizes beta-adrenergic modulation of cardiac contractility[J]. *Circ Res*, 2005, 97(4): 244–51.

[30] Danilczyk U, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney[J]. *Circ Res*, 2006, 98(4): 463-471.

## 中英文符号对照表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **英文缩写** | **英文全称** | **中文全称** |
| APJ | Putative receptor protein related to AT1 | 血管紧张素受体 ATI 相关受体蛋白 |
| B1R | Bradykinin receptor 1 | 缓激肽 1 型受体 |
| BRET | Bioluminescence resonance energy transfer | 生物发光共振能量转移 |
| BSA | Bovine serum albumin | 牛血清白蛋白 |
| CRE | CAMP response element | cAMP 反应元件 |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindole | 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 |
| dNTP | Deoxy-ribonucleoside triphosphate | 三磷酸脱氧核（糖核）苷 |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide | 二甲基亚矾 |
| EGFP | Enhanced green fluorescence protein | 增强型绿色荧光蛋白 |
| eNOS | Endothelial Nitric Oxide Synthase | 内皮型一氧化氮合酶 |
| FCS | Fetal calf serum | 胎牛血清 |
| GAPDH | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | 3-磷酸甘油醛脱氢酶 |
| GPCRs | G-protein-coupled receptors | G 蛋白偶联受体 |
| HEK | Human embryonic kidney | 人胚胎肾细胞 |
| HEPES | N-2-hydroxylthlpiperazine-N-2-ethares  Sulfonic acid | N-2-羟乙基呱嗪-N-2 一乙磺酸 |
| HUVECs | Human umbilical vein endothelial cells | 人脐静脉内皮细胞 |
| LB | Luria-Bertani medium | LB 培养基 |
| LSCM | Laser confocal scanning microscope | 激光共聚焦扫描显微镜 |
| NFAT | Nuclear factor of activated T cells | 钙调磷酸酶-活化 T 细胞核因子 |
| PCR | Polymerise chain reaction | 聚合酶链反应 |
| Rluc | Renilla luciferase | 海肾荧光素酶 |
| SRE | Serum response element | 血清反应元件 |
| TBS | Tris-buffered saline | Tris 缓冲盐水 |
| TEMED | N, N, N', N'-  tetramethyl-ethylenediamine | 四甲基乙二胺 |
| Tris | trihydroxymethlaminomethane | 三羟甲基氨基甲烷 |
| WB | Western blot | 免疫印迹法 |

## 攻读学位期间发表的学术论文

[1]刘路路, 蔡欣, 陈京, 白波. 缓激肽受体信号转导对心血管疾病的调控机制[J].生理科学进展, 2012,43(3):177-182.

[2]刘路路, 张宁, 白波, 陈京. GPCR偏向性配体介导的选择性功能[J].中国药理学通报, 2012,28(12):1643-1647.

[3]刘路路, 陈京, 白波. GPCRs异源二聚体及其偏向性配体: 未来药物研发的新主角[J].中国药理学通报, 2013（已接收）

[4]张宁, 陈京, 龚磊, 刘路路, 白波. GPCR二聚体别构调节的药理学作用[J].生理科学进展, 2013（已接收）

致 谢

岁月如梭，转眼间三年的研究生求学生活即将结束。在此我特别感谢我的导师白波教授和陈京教授。白老师治学态度严谨，工作上精益求精作风、尽心尽力，待人亲切和蔼、平易近人，对我的学习和工作都给予了很大的帮助。陈老师敏锐的科学洞察力，诲人不倦的高尚师德，以及朴实无华的人格魅力都深深地影响着我。不仅使我掌握到了很多专业知识，还使我明白了许多为人处世的道理。衷心感谢我的老师白波教授和陈京教授对我三年来的精心培养和谆谆教诲。

感谢曲阜师范大学的校领导给予我这难得的深造机会。感谢济宁医学院神经生物学实验室的王林、王春梅、龚磊、程葆华、潘衍有和路海老师给予我在实验上提供的大力帮助。感谢实验室的陈小娱、刘海青、张宁、何春琴、姜云璐、张如敏等师兄弟姐妹们在我实验研究、学习和生活中给予的大力帮助。

本研究得到国家自然科学基金(No.81070961, No.31271243)的资助，在此表示谢忱！

感谢我的父母一直以来的默默的支持和无私的爱，他们永远是我前进的动力。