# 研究论文

# 果蝇来源的GPCR Methuselah G蛋白偶联信号转导 通路研究

张 静<sup>1,2</sup> 张 儒<sup>1</sup> 叶晨立<sup>1,2</sup> 谢 欣<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>上海市信号转导与疾病研究重点实验室,同济大学生命科学与技术学院,上海 200092; <sup>2</sup>中国科学院上海药物研究 所国家新药筛选中心,上海 201203)

摘要 Methuselah(MTH)是果蝇来源的GPCR中的一员,它的突变可延长果蝇平均寿命并提高果蝇对外界胁迫因素的耐受性。但目前对MTH在细胞水平的信号转导研究鲜有报道。该研究用稳定表达MTH的HEK293细胞株,对与该受体偶联的G蛋白选择性做了研究。首先,用免疫荧光染色、Western blot及钙流实验验证了MTH在HEK293/Myc-MTH细胞表面能稳定表达,且具有正常生物学活性;MTH受体被其配体N-stunted活化后所引起细胞内钙的上升不能被PTX预处理抑制,提示活化的MTH可能通过与Gq/11而非Gi/o蛋白相偶联;进一步研究发现,MTH激活后不显著改变细胞中的cAMP水平,表明MTH不与Gs和Gi/o相偶联;MTH被激活后可引起ERK磷酸化。这些结果提示:MTH可能是Gq/11蛋白的偶联受体,为进一步研究MTH的下游信号转导和生物学功能奠定了基础。

关键词 G蛋白偶联受体; Methuselah受体; G蛋白; 信号转导

G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR) 是目前已知的最大的细胞表面受体家族<sup>[1]</sup>,是一类 高度保守的膜整合蛋白的超家族,它们可以将细胞 外的各种信号如光线、气味、激素、神经递质等 传递到细胞内<sup>[2-4]</sup>。在细胞水平上G蛋白偶联受体 都是通过与膜内侧的异源三聚体结合蛋白G蛋白的 偶联作用而将信号传递给下游的效应分子系统<sup>[5-6]</sup>。 GPCR被激动剂激活后<sup>[7-8]</sup>,与其连接的G蛋白α亚基 和β、γ亚基解离,活化的G蛋白亚基调节腺苷酸环 化酶、磷脂酶和离子通道等,起到放大和传递细胞 内信号的作用。G蛋白是由三个亚基所组成的三聚 体。根据G蛋白α亚基的不同可以将G蛋白分为四类: Gs、Gi/o、Gq/11和G12/13<sup>[9]</sup>。

1998年, Lin等<sup>[10]</sup>发现在黑腹果蝇中, 当基因methuselah (mth)发生突变后, 成年果蝇的平均寿命会 延长约35%, 并且, 果蝇对一系列外界胁迫因素如饥 饿、高温、百草枯(可产生自由基)的耐受性均有显 著提高。同时, 他们发现基因mth编码的蛋白MTH 与GPCR具有同源性。随后Cvejic等<sup>[11]</sup>发现了MTH 的内源性配体Stunted, 他们还发现当编码Stunted的 基因发生突变后也会提高果蝇的平均寿命和对氧化 性应激的耐受性。Ja等<sup>[12]</sup>于2007年研究发现,当果 蝇中持续性表达MTH受体的拮抗剂时,也会有效延 长果蝇的平均寿命。这些研究提示:在果蝇中当受 体MTH的正常信号转导被阻断后就可能会导致果蝇 平均寿命的相应延长和果蝇对外界胁迫因素耐受性 的提高。另据报道,MTH受体在成年果蝇中还有参 与调节雄性种系干细胞数量和感知运动的功能<sup>[13-14]</sup>。

相对于MTH受体在果蝇体内生理功能的研究 报道,其在细胞水平上的信号转导研究却鲜有报道。 在稳定表达MTH受体的HEK293细胞中,当用其配 体N-stunted刺激时会引起细胞内的钙离子浓度显著 上升<sup>[11-12]</sup>。这提示:MTH受体可能与Gq/11相偶联。 但也有报道显示,Gi/o也可能介导细胞内钙离子浓 度的变化<sup>[15]</sup>,因而尚不能排除MTH与Gi/o相偶联的 可能。此外,目前尚无研究报道MTH是否参与了 PKA信号通路,因而,MTH受体是否与Gs相偶联尚

收稿日期: 2011-02-17 接受日期: 2011-05-09

科技部科研项目(No.2008DFB30150)和上海市科委科研(No.084 31910100, No.09DZ2260100, No.2010CB944901, No.2011CB965104)资助项目

<sup>\*</sup>通讯作者。Tel: 021-50801313-156, Fax: 021-50800721, E-mail: xxie @mail.shcnc.ac.cn

有待研究。

本研究通过免疫荧光染色、蛋白印迹分析、钙 流检测等实验证实MTH受体在HEK293细胞中能 够稳定表达并具有正常的生物学活性。我们发现, MTH受体活化后激起的钙流反应是通过Gq/11蛋 白介导的,Gi/o不参与这一过程。进一步研究证实, MTH既不与Gi/o也不与Gs相偶联。当受体MTH被 其内源性配体N-stunted激活后会引起明显的ERK磷 酸化现象。这些实验结果为进一步研究MTH受体 的下游信号通路奠定了基础。

# 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒及细胞系 编码MTH-B蛋白的质粒 pcDNA3.1-Myc-MTH-B(MTH-B是MTH受体的一种 选择性剪接体,在下文中MTH-B均用MTH表示)和 HEK293/Myc-MTH稳转细胞株,均由美国康奈尔大 学Huang Xinyun教授提供。pcDNA3.0-Flag-β2AR质 粒由中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细 胞生物学研究所裴钢教授提供。Glosensor质粒购自 Promega公司。HEK293细胞培养基为DMEM完全 培养基(GIBCO),含10%胎牛血清(Hyclone)。

1.1.2 主要试剂及抗体 MTH的内源性配体Nstunted(在图表中均用N表示)由上海吉尔生化合成。荧 光染料Fluo-4 AM购自Invitrogen公司(Carlsbad, USA)。 G418、Sulfinpyrazone购自Sigma-Aldrich公司。研究 中所使用抗体如下: anti-Myc 9E10(Santa Cruz), anti-GAPDH(CST), anti-Flag(Sigma), rabbit monoclonal anti-ERK、p-ERK(CST), HRP标记的相应二抗(Promega)。牛血清白蛋白BSA购自Sigma公司。

# 1.2 方法

1.2.1 细胞转染 HEK293细胞,用含10%胎牛血 清的DMEM完全培养基,于37 °C含5% CO<sub>2</sub>的培养 箱中培养。采用磷酸钙沉淀法进行细胞转染。按每 2 μg DNA量对应于1×10<sup>6</sup>个HEK293细胞的比例进行 转染。

 1.2.2 蛋白印迹分析 转染后48 h收集细胞。6孔 板中每孔以300 μL裂解液(62.5 mmol/L Tris-HCl, 3% w/v SDS, 15%甘油, 2% beta-巯基乙醇, pH6.8)裂解 细胞, 超声后于13 200 g离心5 min留上清。适量蛋 白样品经10% SDS-PAGE电泳后转移到PVDF膜上。
 PVDF膜于封闭液(含0.05% Tween-20, 5%脱脂奶粉 的TBST)中室温孵育1 h后,在相应的一抗中(anti-Myc (1:1 000)、anti-Flag (1:1 000)和 anti-GAPDH (1:10 000)稀释于TBST中) 4 °C孵育过夜。经TBST 充分洗涤后用HRP标记的二抗室温孵育1 h。再用 TBST洗涤后,经ECL Plus显色液(Amersham)显色 1~5 min检测。

1.2.3 免疫荧光染色 将培养在96孔板中的HEK
 293/Myc-MTH细胞用4%甲醛室温下固定10 min, 然
 后用0.2% Triton X-100在冰上破膜10 min, 再用抗
 Myc的一抗(9E10 1:800)室温孵育1 h。PBS充分洗
 涤后,加AlexaFluor 546荧光标记的二抗(1:1 000)室
 温孵育1 h。最后用5 μg/mL Hoechst 33342室温孵育
 10 min染核后,用Olympus IX71倒置荧光显微镜观
 察、拍照。

1.2.4 钙流实验 将获得的HEK293/Myc-MTH稳 转细胞株以4×10<sup>4</sup>个/孔的密度接种于96孔平板中培 养24 h后,去除培养基,每孔加入40  $\mu$ L含2  $\mu$ mol/L Fluo-4 AM的HBSS(包含5.4 mmol/L KCl, 0.3 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.2 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 1.3 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.6 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 137 mmol/L NaCl, 5.6 mmol/L D-glucose和 250  $\mu$ mol/L sulfinpyrazone, pH7.4)于培养箱中孵育 45 min。之后吸去染料,加入50  $\mu$ L HBSS室温孵育 10 min,然后用FlexStation 3微孔板检测仪(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)检测,检测仪在指定时 间点自动将25  $\mu$ L激动剂N-stunted加入到反应体系 中,并实时检测胞内钙离子流变化所引起的染料荧 光强度的变化。

1.2.5 GloSensorTM cAMP检测 实验步骤参照
Promega公司的产品说明书进行。将HEK293/Glosensor稳转株细胞以5×10<sup>4</sup>个/孔的密度接种于96孔
平板(Opaque, Corning)中培养24 h后,去除培养基,
每孔加入45 μL Glosensor<sup>™</sup> cAMP标准培养液(含2%
Glosensor reagent, 88% CO<sub>2</sub> independent Medium 和
10% FBS)于室温条件下孵育90 min。孵育结束后加
入各种药物(激动剂或拮抗剂)并立即在FlexStation 3
微孔板检测仪下检测。

# 2 结果

# 2.1 HEK293/Myc-MTH稳转细胞株和pcDNA3.1-Myc-MTH质粒的鉴定

HEK293/Myc-MTH细胞株稳定表达带有Myc

标签的MTH<sup>[11]</sup>。我们分别用免疫染色和Western blot验证pcDNA3.1-Myc-MTH质粒及稳转细胞株中 MTH受体的表达。如图1A所示,HEK293/Myc-MTH 稳转细胞表面染色可见Myc标签阳性,且表达均一, 而HEK293细胞表面未见染色,证实HEK293/Myc-MTH细胞表面特异性表达MTH受体,且受体的细胞 内定位正常。我们同时采用Western blot对pcDNA3.1-Myc-MTH质粒进行了鉴定。HEK293细胞瞬时转染 pcDNA3.1-Myc-MTH质粒后,抗Myc的Western blot 可以检测到带有Myc标签的MTH受体的表达,而细 胞转染空载体及无Myc标签标记的MTH载体未检测 到特异性条带(图1B)。

# 2.2 MTH与Gq/11相偶联引起胞内钙的上升

已有报道表明, MTH受体被其内源性配体Nstunted激活后能引起细胞质内钙离子浓度上升<sup>[11]</sup>, 然而这一作用是通过与哪一种G蛋白相偶联而实 现尚无明确定论。通常膜受体与配体结合后激活 膜上的Gq/11蛋白, 然后由Gq/11蛋白激活磷脂肌醇 信号途经产生第二信使进而动员细胞内钙库释放 钙到细胞质中。但也有报道显示, Gi/o也可能介导

细胞内钙离子浓度的变化[15]。通过钙流实验我们 发现在HEK293/Myc-MTH稳转细胞株中, MTH受 体在其内源性配体N-stunted的激动下,可引起剂量 依赖性细胞内钙的上升(图2A), 而在没有MTH表达 的HEK293细胞中用高浓度的配体刺激仍没有钙流 反应(图2B), 证实该反应是MTH受体特异性的。为 进一步验证上述反应是否由Gi/o介导,我们在实验 中应用了百日咳毒素PTX预处理细胞使Gi/o活性丧 失。如图2D所示,已知与Gi/o相偶联的delta鸦片受 体(DOR)在配体刺激后可以减低Forskolin(Forskolin 能激活腺苷酸环化酶进而上调cAMP)所引起的细胞 内cAMP的上升; PTX预处理后, 上述cAMP的减低作 用消失,证实PTX可以使Gi/o失活。而在相同的PTX 预处理条件下, MTH活化后仍可激起钙流(图2C), 提 示MTH所介导的钙流反应可能是通过Gq/11介导的, 与Gi/o无关。

# 2.3 MTH受体不与Gi/o相偶联

在上述研究中我们已经证实,在HEK293/Myc-MTH稳转细胞株中MTH受体所介导的钙流反应与 Gi/o不相关。但MTH是否与Gi/o相偶联从而参与



A: 通过免疫荧光染色来鉴定HEK293/Myc-MTH稳转细胞株。用anti-Myc抗体染Methuselah受体(红色),用Hoechst 33342染细胞核(蓝色); B: 在 HEK293细胞中分别转染编码Myc-MTH和MTH的质粒或对照质粒(pcDNA3.0),然后用anti-Myc抗体通过Western blot检测各质粒的表达情况,同 时通过检测GAPDH来调节上样量。

A: stable cell line HEK293/Myc-MTH was analyzed by indirect immunofluorescent staining. Myc-MTH was detected with primary anti-Myc antibody and an AlexaFluor 546-conjugated secondary antibody (red). Nuclei were visualized by Hoechst33342 staining (blue); B: HEK293 cells transfected with control plasmid (pcDNA3.0) or plasmids encoding Myc-MTH or MTH were analyzed by Western blot using anti-Myc antibody. GAPDH was used as an internal loading control.

#### 图1 HEK293/Myc-MTH稳转细胞株和pcDNA3.1-Myc-MTH质粒的鉴定

Fig.1 Identification of MTH expression in HEK293/Myc-MTH stable cell line and pcDNA3.1-Myc-MTH plasmid transfected into HEK293 cells



A:用不同浓度的N-stunted(100 µmol/L、30 µmol/L、10 µmol/L、3 µmol/L、330 nmol/L、110 nmol/L)刺激HEK293/Myc-MTH稳转细胞株并进行钙流实验,同时用1% DMSO作溶剂对照; B:用30 µmol/L N-stunted刺激HEK293细胞并进行钙流实验,同时检测了30 µmol/L N-stunted的本底荧光值; C:HEK293/Myc-MTH稳转细胞株分别用100 ng/mL PTX处理过夜或不用PTX处理,之后用30 µmol/L N-stunted刺激进行钙流 实验(箭头所示加样时间),同时用1% DMSO作溶剂对照; D:HEK293/DOR稳转细胞分别在用100 ng/mL PTX处理过夜和不用PTX处理的条件下 进行细胞内cAMP水平检测。先用Forskolin(1 µmol/L,第一个箭头所示时间点)刺激10 min待细胞中cAMP浓度达到最大值时加入DOR的激动 剂DADLE(1 µmol/L,第二个箭头所示时间点),可看到相对于PTX处理组的细胞(绿色),不经PTX处理的细胞中cAMP浓度在DADLE(1 µmol/L) 的作用下迅速降低(蓝色)。

A: HEK293/Myc-MTH were treated with either N-stunted (100 µmol/L、 30 µmol/L、 10 µmol/L、 3 µmol/L、 1 µmol/L、 330 nmol/L、 110 nmol/L) or vehicle control (1% DMSO), calcium response was measured; B: HEK293 cells were treated with 30 µmol/L N-stunted, calcium response was measured. And we detected the basal fluorescence of 30 µmol/L N-stunted; C: HEK293/Myc-MTH cells pretreated with/without 100 ng/ml PTX overnight were incubated with either 30 µmol/L N-stunted or vehicle control (1% DMSO), calcium response was measured; D: HEK293 cells stably expressing DOR were transfected with Glosensor plasmid and pretreated with/without 100 ng/ml PTX overnight. After 10 min Forskolin stimulation, cells were challenged with DOR agonist DADLE (1 µmol/L) and cellular cAMP level was measured.

# 图2 MTH受体活化后可能通过与Gq/11而非Gi/o蛋白相偶联引起细胞内钙的上升 Fig.2 Calcium response elicited by MTH via Gq/11 rather than Gi/o

了PKA信号通路的调节尚不明确。我们在HEK293/ Myc-MTH稳转细胞株中共表达与Gi/o相偶联的DOR 受体,然后通过Glosensor cAMP实验和钙流实验来验 证MTH受体是否与Gi/o相偶联从而参与了PKA信号 通路。如图3A所示,用1 µmol/L Forskolin刺激细胞, 约10 min后细胞中cAMP水平达到最大值。此时加入 不同浓度的N-stunted,细胞中的cAMP水平没有发生 显著变化,与1%DMSO溶剂对照组没有差别(图3A); 而细胞在无Forskolin而单独给予N-stunted刺激下未见 cAMP水平升高(图4A, DMSO vs N)。而同样的细胞 经1 µmol/L Forskolin刺激10 min,待细胞中cAMP水平 达到最大值时再加入1 µmol/L DADLE(DOR受体激 动剂),此时由于激活了与DOR受体相偶联的Gi/o,进 而抑制了细胞中腺苷酸环化酶活性,最终引起细胞 中cAMP水平迅速降低(图3B),提示该系统中的Gi/o 信号通路处于正常水平。为进一步验证上述细胞中 MTH受体生物学功能是否仍然正常,我们同时进行 了钙流实验(图3C)。细胞表达的MTH受体在N-stunted 激动下,仍然可引起剂量依赖性细胞内钙的上升,说 明该细胞中MTH受体具有正常的生物学活性,进一 步证实了MTH受体不与Gi/o相偶联。

# 2.4 MTH受体不与Gs相偶联

在前面的研究中我们已排除了MTH受体与Gi/o 相偶联的可能性,然而尚不清楚MTH是否与Gs蛋白



A:HEK293/Myc-MTH稳转细胞株中转染了DOR质粒和Glosensor质粒后进行cAMP实验。用Forskolin(1 µmol/L,第一个箭头所示时间点)刺激 10 min后待细胞中cAMP水平达到最大值时加入各种浓度的N-stunted,或用1% DMSO作溶剂对照(第二个箭头所示时间点),并继续监测细胞中 cAMP水平;B:上述细胞(同图A)先用Forskolin(1 µmol/L,第一个箭头所示时间点)刺激10 min后待细胞中cAMP水平达到最大值时加入DOR的激 动剂DADLE,或用1% DMSO作溶剂对照(第一个箭头所示时间点),并继续监测细胞中cAMP水平;C:上述细胞(同图A)用不同浓度的N-stunted (10 µmol/L或30 µmol/L,箭头所示时间点)刺激后进行钙流实验,同时用1% DMSO作溶剂对照。

A: HEK293 cells stably expressing MTH were transfected with DOR plasmid and Glosensor plasmid. After 10 min Forskolin stimulation, cells were challenged with different concentration of N-stunted and cellular cAMP level was measured; B: cells same as in A were stimulated with Forskolin for 10 min. DADLE (1 µmol/L) was added and cellular cAMP level was measured; C: cells same as in A were treated with either N-stunted (10 µmol/L or 30 µmol/L) or vehicle control (1% DMSO), calcium response was measured.

# 图3 MTH受体不与Gi/o相偶联 Fig.3 MTH uncoupled to Gi/o

相偶联。用已知与Gs相偶联的β2AR受体作对照,我 们检测了MTH受体是否与Gs相偶联。在HEK293/ Glosensor稳转细胞株中共表达了Myc-MTH受体和 Flag-β2AR受体,分别进行了Glosensor cAMP实验、 钙流实验和Western blot检测。如图4A所示,当用 Forskolin或Isoproterenol(ISO, β2AR受体的激动剂) 刺激时均能引起细胞内cAMP水平显著上升,这表明 在细胞中cAMP反应体系是正常的;而用30 μmol/L N-stunted刺激该细胞时不能上调细胞内cAMP的水 平(图4A-N),同时钙流实验显示当用30 µmol/L Nstunted刺激细胞时仍然能激起明显的钙流信号(图 4B), 提示该细胞表达具有正常生物学活性的MTH 受体, 而该受体不与Gs相偶联。我们同时收取了上 述细胞,裂解后检测受体表达,Western blot显示转染 受体后的细胞特异性的表达Myc标签的MTH受体和 带有Flag标签的β2AR受体(图4C)。综上所述, MTH受 体不与Gs蛋白相偶联,不参与PKA信号通路的调控。

# 2.5 MTH受体活化后可引起ERK磷酸化

许多GPCR的生物学效应是通过激活丝裂原活 化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号转导通路来实现的<sup>[16]</sup>。细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK)是MAPK 家族中的一员,包括ERK1和ERK2,磷酸化激活的 ERKI/2由胞质转位到核内,进而介导Elk-1、ATF、 NF-κB、AP-1、c-fos和c-Jun等下游基因的转录活 化,从而参与细胞增殖与分化、细胞形态维持、细 胞骨架的构建、细胞调亡和细胞的恶变等多种生 物学反应<sup>[15,17-18]</sup>。MTH受体活化后是否也可引起 ERK的磷酸化目前尚无报导。我们将HEK293/Myc-MTH稳转细胞株在无血清培养液中饥饿2 h,之后用 30 μmol/L N-stunted分别孵育0 min、2 min、5 min、 10 min、30 min、60 min、120 min, 细胞收集后进行 Western blot 检测。结果表明, MTH受体经内源性配体N-stunted (30 µmol/L)刺激后可显著引起ERK的磷酸化, 且磷酸化在配体刺激2 min时已明显可见, 在

10 min左右达到峰值,并持续至刺激后2 h(图5)。抗 Total ERK的Western blot提示总的ERK表达在刺激 前后没有改变。



A: 在HEK293/Glosensor细胞中共转了Myc-MTH和Flag-β2AR质粒后进行Glosensor cAMP实验。分别用30 μmol/L N-stunted (N)、1 μmol/L Forskolin、1 μmol/L Isoproterenol (ISO)刺激细胞,同时以1% DMSO作溶剂对照; B: 在空白或共转了Myc-MTH和Flag-β2AR质粒的HEK293/Glosensor细胞中(同图A)进行钙流实验,用30 μmol/L N-stunted刺激两种细胞,以1% DMSO作溶剂对照; C: 通过Western blot检测图A及B中的细胞中的两种受体(Myc-MTH与Flag-β2AR)的表达。

A: HEK293/Glosensor cells co-transfected with Myc-MTH and Flag-β2AR plasmids were treated with 30 µmol/L N-stunted (N), 1 µmol/L Forskolin, 1 µmol/L Isoproterenol (ISO) or vehicle control (1% DMSO), and cellular cAMP level was measured; B: HEK293/Glosensor cells transfected with/ without Myc-MTH and Flag-β2AR (cells same as in A) were treated with either 30 µmol/L N-stunted or vehicle control (1% DMSO), calcium response was measured; C: Western blot analysis of Myc-MTH and Flag-β2AR expression in HEK 293/Glosensor cells.

> 图4 MTH受体不与Gs相偶联 Fig.4 MTH uncoupled to Gs



HEK293/Myc-MTH稳转细胞株在无血清培养液中饥饿2 h, 之后用30 µmol/L N-stunted分别孵育0 min、2 min、5 min、10 min、30 min、60 min、120 min, 细胞收集后用Western blot进行ERK磷酸化状态的检测。

HEK293/Myc-MTH cells were starved in serum-free medium for 2 h and N-stunted (30 µmol/L) was added into the medium for the indicated period. Cells were then harvested and Western blot analysis was performed using anti-p-ERK and total ERK antibodies.

图5 MTH 受体活化后引起的ERK磷酸化 Fig.5 MTH stimulates ERK1/2 phosphorylation

# 3 讨论

GPCR是一类非常重要的信号分子受体,在多种 中枢和外周生理学事件中承担着重要的生理作用<sup>[19-21]</sup>, 这也使得其成为许多现代药物的潜在作用靶点,据估 计有40%~45%现代药物都是以这些受体为靶标<sup>[22]</sup>。 GPCR的经典信号转导是通过膜内侧的异源三聚体 G蛋白来实现的。根据G蛋白α亚基的不同可以将G 蛋白分为四类: Gs、Gi/o、Gq/11和G12/13。

MTH是果蝇中的一个GPCR,参与调节果蝇的 寿命、应激反应、雄性种系干细胞数量和运动感知 能力<sup>[10-14]</sup>。MTH受体在果蝇体内生理功能方面的作 用的研究已有较多文献报道,但是其在细胞水平上 的信号转导方面的研究报道相对较少,因此本研究 在细胞水平上对MTH受体的信号转导过程进行了 探讨。

我们以稳定表达Myc-MTH的HEK293细胞为 研究对象,首先经过免疫染色、Western blot和钙流 实验验证了受体MTH能够在HEK293细胞中正常表 达并且具有正常的生物学活性。我们的结果提示, MTH受体活化后可能通过与Gq/11而非Gi/o蛋白相 偶联进而引起细胞内钙离子浓度的上升。然后我们 设计实验证明了受体MTH既不与Gs也不与Gi相偶 联。这些结果为以后更进一步地探讨MTH的信号 通路和其生物学功能机制奠定了基础。最后我们 通过Western blot检测发现受体MTH活化后能激起 ERK磷酸化, 在受体被激活5 min、10 min、30 min 后引起的ERK磷酸化情况最为明显。尤其有趣的 现象是, MTH受体在被激活长达120 min后仍然会 出现一定的ERK磷酸化现象。而在通常情况下,许 多受体活化后引起的ERK磷酸化现象持续时间较 短(5~10 min)。据研究报道ERK的持续激活会引发 FADD(death receptor adaptor)非依赖性的caspase 8的 激活并最终导致神经细胞凋亡[23-24]。据此,我们猜 测在正常情况下, MTH受体活化后会长时间持续激 活ERK, 也就有可能激发与细胞死亡相关的信号通 路最终导致大量细胞凋亡。当这种情况发生在果蝇 体内时, ERK的持续激活可能导致重要细胞群落的 凋亡,势必会引起果蝇的最终死亡,即限制了果蝇寿 命的延长,而当在果蝇体内MTH受体的正常信号转 导被阻断后即不能够持续激活ERK,也就不会诱导 众多重要细胞的快速死亡,因此就可能会导致果蝇 平均寿命的相应延长及果蝇对外界胁迫因素耐受性 的提高。当然这些推论都需要进一步的研究结果来 证实。

此外,该果蝇来源的GPCR MTH在哺乳动物中 是否会存在有同源性受体也是我们比较感兴趣的问题。对此我们也在通过生物信息学等方法,在哺乳 动物中寻找与MTH具有高度同源性的相关受体,了 解该受体在进化中是否存在功能上的保守性,探讨 该同源性受体在哺乳动物中在生物体的老化和生物 应激反应是否仍然具有重要作用。

随着研究的进一步深入,受体MTH的下游信号 通路和受体作用的分子机制将会更加清晰,其功能 也将不断被认清。

#### 参考文献 (References)

- Ji TH, Grossmann M, Ji I. G protein-coupled receptors I. Diversity of receptor-ligand interactions. J Biol Chem 1998; 273(28): 17299-302.
- 2 Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RA. Structure and function of G protein-coupled receptors. Annu Rev Biochem 1994; 63: 101-32.
- 3 Dikic I, Blaukat A. Protein tyrosine kinase-mediated pathways in G protein-coupled receptor signaling. Cell Biochem Biophys 1999; 30(3): 369-87.
- 4 Ram PT, Iyengar R. G protein coupled receptor signaling through the Src and Stat3 pathway: Role in proliferation and transformation. Oncogene 2001; 20(13): 1601-6.
- 5 Neer EJ. Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. Cell 1995; 80(2): 249-57.
- 6 Iiri T, Farfel Z, Bourne HR. G-protein diseases furnish a model for the turn-on switch. Nature 1998; 394(6688): 35-8.
- 7 Gether U, Lin S, Ghanouni P, Ballesteros JA, Weinstein H, Kobilka BK. Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor. EMBO J 1997; 16(22): 6737-47.
- 8 Burstein ES, Spalding TA, Brann MR. The second intracellular loop of the m5 muscarinic receptor is the switch which enables G-protein coupling. J Biol Chem 1998; 273(38): 24322-7.
- 9 The state of GPCR research in 2004. Nat Rev Drug Discov 2004;
   3(7): 575, 577-626.
- 10 Lin YJ, Seroude L, Benzer S. Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant methuselah. Science 1998; 282(5390): 943-6.
- 11 Cvejic S, Zhu Z, Felice SJ, Berman Y, Huang XY. The endogenous ligand Stunted of the GPCR Methuselah extends lifespan in *Drosophila*. Nat Cell Biol 2004; 6(6): 540-6.
- 12 Ja WW, West AP Jr, Delker SL, Bjorkman PJ, Benzer S, Roberts RW. Extension of *Drosophila* melanogaster life span with a GPCR peptide inhibitor. Nat Chem Biol 2007; 3(7): 415-9.

- 13 Wallenfang MR, Nayak R, DiNardo S. Dynamics of the male germline stem cell population during aging of *Drosophila* melanogaster. Aging Cell 2006; 5(4): 297-304.
- 14 Petrosyan A, Hsieh IH, Saberi K. Age-dependent stability of sensorimotor functions in the life-extended *Drosophila* mutant methuselah. Behav Genet 2007; 37(4): 585-94.
- 15 Meyer ZU, Heringdrof D, van Koppen CJ, Windorfer B, Himmel HM, Jakobs KH. Calcium signalling by G protein-coupled sphingolipid receptors in bovine aortic endothelial cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1996; 354(4): 397-403.
- 16 Tao J, Malbon CC. G-protein-coupled receptor-associated Akinase anchoring proteins AKAP5 and AKAP12: Differential signaling to MAPK and GPCR recycling. J Mol Signal 2008; 3: 19.
- 17 Rao VN, Reddy ES. Elk-1 proteins interact with MAP kinases. Oncogene 1994; 9(7): 1855-60.
- 18 Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: A family of protein kinases with diverse biological functions. Microbiol Mol Biol Rev 2004; 68(2): 320-44.

- 19 Bjarnadottir TK, Gloriam DE, Hellstrand SH, Kristiansson H, Fredriksson R, Schioth HB. Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. Genomics 2006; 88(3): 263-73.
- 20 Foord SM, Bonner TI, Neubig RR, Rosser EM, Pin JP, Davenport AP, et al. International union of pharmacology. XLVI. G proteincoupled receptor list. Pharmacol Rev 2005; 57(2): 279-88.
- 21 Millar RP, Newton CL. The year in G protein-coupled receptor research. Mol Endocrinol 2010; 24(1): 261-74.
- 22 Fredriksson R, Hoglund PJ, Gloriam DE, Lagerstrom MC, Schioth HB. Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. FEBS Lett 2003; 554(3): 381-8.
- 23 Cagnol S, Van Obberghen-Schilling E, Chambard JC. Prolonged activation of ERK1,2 induces FADD-independent caspase 8 activation and cell death. Apoptosis 2006; 11(3): 337-46.
- 24 Cagnol S, Chambard JC. ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. FEBS J 2010; 277(1): 2-21.

# Characterization of G Protein-coupled Signal Transduction of the Drosophila GPCR Methuselah

# Zhang Jing<sup>1,2</sup>, Zhang Ru<sup>1</sup>, Ye Chenli<sup>1,2</sup>, Xie Xin<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Shanghai Key Laboratory of Signaling and Disease Research, Laboratory of Receptor-based Bio-medicine, School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China; <sup>2</sup>State Key Laboratory of Drug Research, the National Center for Drug Screening, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

**Abstract** Drosophila Methuselah (MTH) is a member of the G protein-coupled receptor (GPCR) super family. Mutation of MTH receptor leads to extended life span and resistance to various forms of stress in fruit fly. However, the signal transduction of MTH at cellular level has rarely been studied. Using HEK293 cell line which stably expresses MTH, we investigated its G protein-coupling preference. Firstly, we confirmed the expression and biological activity of MTH in HEK293 cells by using immunofluorescent staining, Western blot analysis and calcium mobilization assay. N-stunted, the endogenous ligand of MTH, induced calcium mobilization in cells expressing MTH. The calcium signal was insensitive to PTX pretreatment, indicating MTH is probably coupling to Gq/11 rather than Gi/o pathway. Then we discovered that activation of MTH did not induce any change in the intracellular cAMP level in HEK293 cells, suggesting that MTH is not coulpled to Gs or Gi/o. Finally, we showed that activation of MTH could induce MAP kinase ERK1/2 phosphorylation. Our results revealed major signal transduction pathways of MTH which might facilitate further research of this receptor and help us understanding its biological functions.

Key words GPCR; Methuselah; G protein; signal transduction

Received: February 17, 2011 Accepted: May 9, 2011

This work was supported by Grants from the Ministry of Science and Technology of China (No.2008DFB30150) and Shanghai Commission of Science and Technology (No.08431910100, No.09DZ2260100, No.2010CB944901, No.2011CB965104)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: 86-21-50801313-156, Fax: 86-21-50800721, E-mail: xxie@mail.shcnc.ac.cn