

多巴胺受体的 cDNA 克隆

邢 成

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 通过多巴胺受体的 5 个 cDNA 克隆, 综述和分析了 5 个多巴胺受体 (D_1R — D_5R) 的基因结构, 在染色体上的定位及其 mRNA 在中枢脑区的分布; 比较了这 5 个受体 cDNA 克隆的结构特征和药理学性质.

关键词 多巴胺, 多巴胺受体基因, 多巴胺受体

近年来, 根据对多巴胺受体 (DR) 的药理和生化特征的研究, 将其分为两型: D_1 和 D_2 多巴胺受体. 它们都是细胞膜受体, 是与鸟核苷酸结合蛋白 (G 蛋白) 相偶联的受体大家族中的成员^[1,2]. 随着分子生物学技术和聚合酶链反应 (PCR) 的发展, 分子克隆的研究已经广泛用于受体学研究, 从而打开了探讨受体结构和基因奥秘的大门. 对 DR 分子克隆的研究指出, DR 对机体的生物学作用不仅受 D_1R 和 D_2R 的调控, 而且是由更多的相关受体的基因产物所介导. 除了 D_1R 和 D_2R 之外, 目前还克隆到了 D_3R , D_4R 和 D_5R 的 cDNA^[3]. 根据它们受体的药理和生化特性归为两类: 以 D_1R 为代表的能使腺苷酸环化酶 (AC) 激活和以 D_2R 为代表的能使 AC 抑制^[4].

1 与 D_2R 功能相似的 DR 基因

1.1 D_2R 的基因

在对 DR 的基因研究中, 最早克隆到的是 D_2R 的 cDNA. 最初, Civelli 等^[5]使用 β_2 -肾上腺素受体基因作为探针, 在低严谨的条件下筛选大鼠的基因组文库, 旨在探查阿片受体. 从一个显示出探针标记的克隆中推演出的氨基酸序列与 β_2 -肾上腺素受体有明显的同源性, 但又不同于其它的已经克隆到的 G 蛋白偶联家族中的受体. 在该基因的编码序列中, 在多个外显子间插入着一些内含子. 后来 Bunzow

等^[6]从大鼠的 cDNA 文库中获得一个全长的克隆, 它编码一个由 415 个氨基酸组成的蛋白, 将该克隆转染小鼠成纤维细胞后, 其膜制剂可与 D_2R 的激动剂和拮抗剂相结合, 表明该克隆是 D_2R 的 cDNA.

此后, 许多研究者筛选大鼠和人的 cDNA 文库以期从这些种属中得到 D_2R cDNA 的拷贝. O' Dowd 等^[4]为了探明是否还存在编码不同的 D_2R 的基因, 使用 PCR, 以一个从大鼠纹状体基因文库中得到的一个寡聚核苷酸作为模板, 除了得到上述 Bunzow 描述的 cDNA 克隆外, 还发现了 D_2R 的另一变种, 该变种在编码区中多了一个 87bp 的插入序列. 后来在许多种族中, 如人、牛、小鼠和蛙中都发现了这一较长的基因变种. 因此 D_2R 的基因实际上包括一个短基因和一个长基因^[6,7].

1.2 D_3R 基因

Sokoloff 等^[8]用 D_2R 的核苷酸序列为探针, 克隆了 D_3R 的 cDNA. 在 COS 细胞中表达后, 其膜制剂可与多巴胺受体的激动剂和拮抗剂反应, 从反应模式的特征上明显地不同于 D_2R , 且效应是 D_2R 的 20 倍. 当用 forskolin 激活 cAMP 时, D_3R 不抑制 cAMP 的产生, 不像 D_2R 一样与抑制性 G 蛋白 (G_i) 相偶联. Giros 等^[9]使用 PCR 技术扩增大鼠各脑区的

mRNA, 观察到 D₃R 基因有两个较短的转录产物产生, 认为 D₃R 基因可能是通过改变拼接机制而产生多个基因产物. 因此 D₃R 与 D₂R 一样有两个基因. 其中一个是在 D₃R 的第 3 跨膜区 (TM₃) 中, 缺失了 113bp, 因此编码出的蛋白仅是一个只有 100 个氨基酸残基的缩短的受体, 被称为 D₃ (TM₃-del). Snyder^[10]也观察到了这一变种, 只是他们测定出来的核苷酸序列所推演到的是 109 个氨基酸组成的产物. 第二个转录基因称之为 D₃ (O₂-del), 它是与 D₃R 第 2 个细胞外攀的最后 10 个氨基酸和第 5 个跨膜段上头 8 个氨基酸相应的 54bp 发生缺失而造成的. 从 D₃ (TM₃-del) 的结构上看, 不太像一个具有受体功能的蛋白. D₃ (O₂-del) 转染的细胞也不能表现出任何与多巴胺结合的活性.

1.3 D₄R 基因

Civelli 以及 O' Malley 等^[5,11]同样以 D₂R 的 cDNA 为探针, 分别获得了人和大鼠的 D₄R 的 cDNA. 它们大约为 5kb, 编码的蛋白与 D₂R 在氨基酸序列上有高度同源. 转染 COS 细胞后, 其膜制剂与³H-螺哌隆的反应表现为低结合, 其原因可能是在 D₄R 基因中, 第 3 个内含子发生一种新的拼接方式. 内含子 3 有一个特别的内含子/外显子接合处, 在此处, 常规的拼接供体和受体位点消失了. 内含子 3 的拼接位点是一个重复序列的一部分, 该序列在 cDNA 中仅重复一次. 显然, COS 细胞不能处理这种类型的拼接方式. 当构建一个杂交基因取代 cDNA 序列中这一错误基因后, 转染的细胞具有与激动剂、拮抗剂结合的能力, 亲和力和类似 D₂R. 与抗精神病药物 clozapine 的亲和力和是 D₂R 或 D₃R 的 10 倍之多.

1.4 D₂R, D₃R 和 D₄R 的 mRNA 在脑中的分布

对编码上述三个受体的 mRNA 在大鼠脑中的分布研究表明, D₂R 的 mRNA 主要集中在纹状体、黑质和嗅结节中, 与用放射自显影方法观察到的结果相一致. D₃R 的 mRNA 分布与 D₂R 的有重叠, 但也有区别. D₃R 的 mRNA

只分布在纹状体腹侧, 而 D₂R 的 mRNA 在整个纹状体中都有分布. 在垂体中, 只有 D₃R 的 mRNA, 而不含 D₂R 的 mRNA. D₃R 的两个变种 D₃ (O₂-del) 和 D₃ (TM₃-del) 的 mRNA 在皮层、黑质和纹状体的分布比例为 5 : 1 : 4. D₄R 的 mRNA 的分布类似于 D₂R 的 mRNA, 但分布比 D₂R 的 mRNA 更为广泛, 除分布于尾壳、豆状核、黑质致密斑外, 在皮层、杏仁核、海马和松果体中也有较高含量^[8,12]. D₄R 的 mRNA 在下丘脑、丘脑、嗅结节和皮层前区都有明显表达, 此外在心血管系统中、心脏、大血管及视网膜中已都观察到 D₄R 的 mRNA 的表达. D₄R 的 mRNA 的 PCR 产物在心肌中是中枢神经系统 (CNS) 中的 20 倍. 因此 D₄R 除具有调节中枢神经系统的功能外, 还具有调节心血管系统的作用^[11].

1.5 D₂R, D₃R, D₄R 基因在染色体上的定位

多巴胺受体基因在染色体上的定位已查明. D₂R 和 D₄R 基因都定位在 11 号染色体上, D₂R 在其长臂的 22—23 区带 (11q22—23); D₄R 基因在接近 telomere 的短臂顶部. D₃R 的基因位于 3 号染色体的长臂 13.3 区带 (3q13.3). 与 D₃R 结构上相似的视紫质 (rhodopsin) 受体的基因也定位于该染色体上^[13,14].

2 与 D₁R 功能相似的 DR 基因

2.1 D₁R 基因

O' Dowd^[15]于 1990 年使用分离大鼠纹状体中长的 D₂R cDNA 的方法亚克隆到一个新的编码 G 蛋白偶联受体的 cDNA, 最初称之为 G36. 根据其推演出的氨基酸序列以及 mRNA 的分布情况判断, 推测 G36 可能是 D₁R. 之后, 使用 G36 探查人基因库, 与探针结合的克隆具有一个长度为 1476bp, 编码 446 个氨基酸组成的蛋白质的开读框架. 所编码的蛋白与 D₂R 比较, 在 7 个疏水跨膜区域中有 44% 的同源, 整体比较时有 29% 同源. 将该基因亚克隆到一个哺乳动物的表达载体中, 并转染 COS 细胞, 然后用 D₁ 选择性拮抗剂 [³H]SCH23390

与其结合,显示高亲和力,表明是 D_1R ^[16].

2.2 D_5R 基因

D_1R 基因克隆成功后,许多药理学的证据表明,在哺乳动物的神经系统中至少还有一个与 D_1R 类似的受体存在.因此,O'Dowd 及同事^[13]用一个 D_1R 的 cDNA 克隆为探针,在低严谨条件下探测人基因库.与探针结合的克隆其序列的编码区结构非常类似于 D_1R ,含 5kb.当亚克隆到哺乳动物表达载体并转染 COS 细胞后,表达产物能与特异性 D_1R 拮抗剂 [³H]SCH23390 结合,呈剂量依赖性,且亲和力与 D_1R 相当.这个表达产物即为 D_5R ,是多巴胺受体第 5 个被克隆到的受体,药理性质与 D_1R 相似. Weinshank 等 (1991 年)把这个受体叫做 $D_1\beta$ 受体. Mark Coron 等 (1991 年)报告了一个大鼠的 D_5R cDNA,与人的 D_5R cDNA 类似,结构上具有 83% 的保守性.但对多巴胺的亲和力不高.

在继续从人的基因库搜索多巴胺受体的工作中,使用 PCR 扩增得到的核苷酸序列中,有一段序列与 D_5R 有 95% 同源.用其作为探针筛选人基因库,与其结合的克隆经核苷酸分析表明有三个不同的基因: D_5R 基因和两个早先命名为 PG-1 和 PG-2 的基因,即两个 D_5R 的假基因. PG-1 与 PG-2 有 98% 的同源,与 D_5R 基因有 94% 的同源.该两个假基因由于在序列上有缺失,所以不能编码具有功能的受体.在人脑的许多区域中能检测到假基因的转录产物.从其 mRNA 推测是一个由 154 个氨基酸组成的多肽,即缩短的 D_5R ,是由于 TM_3 和 TM_4 之间的攀中的框架变向而造成的.目前对这个多肽的功能和命运还不清楚.但是它可能具有生物学作用.这个多肽虽然只有三个跨膜区域,不可能成为一个与 G 蛋白偶联的受体,但它可能调节全长 D_5R 的表达水平.

2.3 D_1R 和 D_5R 的 mRNA 的分布

D_1R 的 mRNA 富含于尾壳中、伏隔核、嗅结节、海马回嗅觉小鸟、某些皮层区域和丘脑各核中.与用 D_1R 拮抗剂 [³H]SCH23390 标记结合的分布相当一致.意外的是,在黑质和苍

白球中都没有 D_1R 的 mRNA,而在这些区域中, D_1R 的密度却很高,可能的解释是, D_1R 在纹状体合成后转运到这些区域.在大鼠的尾核中, 50% 中等大小的神经原表达 D_1R 和 D_2R 的 mRNA,而大的神经原中,仅表达 D_2R 的 mRNA.

2.4 D_1R 和 D_5R 基因在染色体上的定位

D_1R 基因定位于 5 号染色体的长臂 3 区 1 带至 3 区 4 带 (5q31—34),和结构上类似的 β_2 -, α_1B -肾上腺素受体基因位置邻近.其它一些类似的基因,如 α_1 -肾上腺素受体, 5-羟色胺受体也定位于 5 号染色体上,分别位于 5q23—31 和 5q11.2—13.可能是因为存在假基因的缘故, D_5R 基因在三个不同的染色体上均有分布:分别在 1 号染色体紧邻着丝点的位置, 2 号染色体紧邻着丝点的短臂和 4 号染色体细胞发生带端点的位置 (4p15.3). D_5R 基因在 4 号染色体上的位置与杭廷顿 (Huntington's) 舞蹈病的基因很接近^[17].

3 内含子在 G 蛋白受体家族分化中的作用

Robert 等 (1986 年)惊奇地发现,在 β_2 -肾上腺素受体基因编码区中缺少内含子,许多 G 蛋白偶联受体在其编码区中也都缺少内含子. D_1R 和 D_5R 基因在它们的编码区也没有内含子.但 D_1R 的基因在 5' 端非编码区有 1 个内含子. D_2R , D_3R 和 D_4R 的基因中,被一些内含子插入编码区中.

对人的 D_2R 的基因分析表明,其编码区内含有 7 个外显子,在跨膜区 TM_2 , TM_3 , TM_4 之后和 TM_6 之前都连接着内含子.在编码第 3 个细胞内攀的序列中有两个内含子,一个大的内含子将外显子 1 和 2 间隔开.外显子 2—7 群聚一起,约为 13kb.由于内含子 1 较大,整个基因的长度超过 50kb.此外,还有一组内含子位于大约 87bp 的仅编码 29 个氨基酸的小外显子侧面.正因为这个小外显子的存在,所以 D_2R 基因分化为长短两种形式.编码 D_5R , D_4R 的基因中,内含子也是位于 TM_2 , TM_3 ,

TM₄ 之后和 TM₅ 之前, 和 D₂R 基因相当一致. 因此, 这三个基因起源一个共同的原始基因^[18]. 基因的这些差异反映出: 这些基因在从一个共同的前基因分化过程中可能有的基因内含子增多了, 而有的基因内含子丢失了. 内含子丢失在 G 蛋白偶联受体家族中很重要, 因为内含子丢失的过程使得基因在复制过程中可能通过某些修饰作用而复制出具有新功能作用的基因, 使得同一受体家族中的受体不仅成员增加了, 而且功能的复杂性也增加了^[4].

目前, 利用分子生物学和 PCR 技术, 虽然克隆到 5 个不同的多巴胺受体亚基, 比较了它们的 cDNA 结构上的差异和分布, 通过转染细胞研究了各自的药理学作用和功能. 但至今对于多巴胺受体亚基的多样性的生物学意义了解很少. 可以预料到, 随着对多巴胺受体家族进一步的深入研究; 将会对这些亚基有更丰富的了解并且可望寻找到一些有特殊作用的新药.

参 考 文 献

- 1 Kebabian J W, Greengard P. *Science*, 1971; **164**: 1346
- 2 Onali P, Olanas M C, Gessa G L. *Mol Pharmacol*, 1985; **28**: 138
- 3 Sibley D R, Monsam Jr. *TIPS*, 1992; **13**: 61
- 4 O'Dowd B F. *J Neurochem*, 1993; **60**: 804
- 5 Giveli O, Bunzow J, Grandy D *et al.* *Eur J Pharmacol*, 1991; **207**: 277
- 6 Bunzow J R, Vna Tol H M, Grandy G K *et al.* *Nature*, 1988; **336**: 783
- 7 Dulbecco R. *Encyclopedia of human biology*, J. San Diego: Academic Press INC, 1991: 81—92
- 8 Sokoloff P, Giros B, Martres M P *et al.* *Nature*, 1990; **347**: 146
- 9 Giros B, Martres M P, Pilon C *et al.* *Biochem. Biophys. Res Commun*, 1991; **176**: 1584
- 10 Snyder L A, Roberts J L, Sealfon S C. *Neurosci Lett*, 1991; **122**: 37
- 11 O'Malley K L, Armon S, Tang L *et al.* *New Biologist*, 1992; **4**: 137
- 12 Meador-Woodruff J H, Mansour A, Bunzow J R *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; **86**: 7625
- 13 Grandy D K, Litt M, Allen L *et al.* *Am J Hum Genet*, 1989; **45**: 778
- 14 Gelernter J, Kennedy J A, Van Tol H M *et al.* *Genomics*, 1992; **13**: 208
- 15 O'Dowd B F, Nguyen T, Tirpak A *et al.* *FEBS Lett*, 1990; **262**: 8
- 16 Dearth A, Gingrich J A, Falardeau P *et al.* *Nature*, 1990; **347**: 72
- 17 Sunahara R K, Niznik H, Weiner D M *et al.* *Nature*, 1990; **347**: 80
- 18 Grandy D K, Marchionni M A, Makam H *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; **86**: 9762

电荷耦合器件荧光成象及生物学应用

胡坤生

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 冷却慢扫描电荷耦合器件照相机附在荧光显微镜上组成了一个系统, 可把一系列成象进行贮存, 通过标记颗粒的位置、强度以及强度分布的差别, 在每幅象上可区分 500 个荧光点. 荧光点的运动可以跟踪, 通过分析可区分不同的运动方式. 在活细胞表面, 已观察到受体有直接扩散, 随机扩散和局部随机扩散三种运动方式. 电荷耦合器件的高灵敏度使观察过程中只产生少量的漂白. 现介绍这系统的测量原理和它在生物学上的应用.

关键词 电荷耦合器件, 荧光成象, 侧向扩散, 运动跟踪, 细胞融合

膜蛋白(如受体)在膜中侧向运动的研究, 对详细了解细胞过程的变化是十分重要的^[1,2].

测量膜上分子侧向运动, 最主要和常用的方法是荧光漂白恢复方法. 其基本原理是用强激光

plasm. activates the special transcription factors to attach the *cis*-elements existing on the upstream of ISGs in nucleus and then induces gene expression. The paper reviewed mainly on the signalling pathway and the products which play antiproliferative action of ISGs expression.

Key words interferon (IFN), IFN-stimulated genes (ISGs), IFN-stimulated response elements (ISRE), antiproliferation

cDNA Cloning of Dopamine Receptors. Xing Cheng. (*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (5): 418—421

Molecular cloning studies on five types of dopamine receptors were summarized. The five types of dopamine receptors are members of family of the G protein-coupled receptors, and divided into two classes by pharmacologic and biochemical criteria: (a) D₁R and D₅R mediating the activation of adenylyl cyclase through G protein (G_s) and (b) D₂R, D₃R, D₄R, inhibiting the activation of adenylyl cyclase through the G protein (G_i). The gene structure, distribution of their mRNA in the brain and location on chromosomes between the two classes of dopamine receptors were compared.

Key words dopamine receptors, cDNA cloning of dopamine receptors, dopamine receptor genes

Fluorescence Digital Imaging Using a Charge-Coupled Device Camera and Its Biological Applications. Hu Kunsheng. (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (5): 421—425

A system, using a cooled slow-scan charge coupled device camera attached to a fluorescence microscope, allows a series of images to be stored, up to 500 fluorescent spots (labelling particles) per image can be identified by position and intensity. The movement of the spots can be traced. The tracking method allows the mobility to be analysed. The receptors of influenza virus and low density lipoprotein on fibroblast have three different types of motion: random motion, directed motion and motion limited to a domain. The high sensitivity of the system leads to short exposures and little photobleaching during the observations. The measurement principle of this system and its biological applications were described.

Key words charge-coupled device, fluorescence imaging, lateral diffusion, motion track, cell fussion

Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression in Some Tumors. Xiu Bo, Yu Xin, Li Huifang, Zhou Airu. (*Department of Biochemistry, Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (5): 426—429

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a specific mitogen on endothelial cells and promotes angiogenesis. It has been identified that VEGF is very closely linked to the growth of solid tumors. With Dot blot technique, expression of the VEGF mRNA in cancers of stomach, kidney, bladder and colon are investigated. The results showed that the expression of the VEGF mRNA is higher in tumors than in peritumors. There is significant expression of VEGF mRNA in SGC-7901 cells after adding TPA 4h. Human bladder carcinoma cell line BIU-87 transfected with antisense N-ras exon 1 DNA fragment inhibit VEGF