

生物技术与方法

B 族 G 蛋白偶联受体 PAC1 可调控表达体系的建立

李梅¹, 余榕捷¹, 钟佳萍¹, 崔泽凯¹, 杨延旭¹, 张华华²

1 暨南大学生命科学技术学院 生物工程研究所, 广东 广州 510630

2 广东医学院 医学遗传学教研室, 广东 东莞 523808

李梅, 余榕捷, 钟佳萍, 等. B 族 G 蛋白偶联受体 PAC1 可调控表达体系的建立. 生物工程学报, 2014, 30(4): 636-643.

Li M, Yu RJ, Zhong JP, et al. Construction of controlled expression system of Class B G-protein coupled receptor PAC1. Chin J Biotech, 2014, 30(4): 636-643.

摘要: PAC1 是神经肽垂体腺苷酸环化酶激活多肽(Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, PACAP)的特异受体, 属于 B 族 G 蛋白偶联受体, 介导 PACAP 的神经递质、神经调质、神经保护、抗神经损伤及调控神经再生等功能, PAC1 高表达和神经损伤、肿瘤等生理病理过程密切相关。为了深入了解 PAC1 的功能, 构建 PAC1 可调控表达的细胞系, 通过优化的四环素控制表达系统实现 PAC1 在中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞的强力霉素(doxycycline, Dox)依赖的可控表达。首先通过双酶切将编码 PAC1 和增强型黄色荧光蛋白(EYFP, enhanced yellow fluorescent protein)的融和基因 *PAC1-EYFP* 克隆到 pTRE-Tight 载体上, 获得重组载体 pTRE-PAC1-EYFP; 基因测序鉴定正确后将新型的四环素调节元件载体 pTet-on advanced 和反应元件载体 pTRE-PAC1-EYFP 分别转入 CHO 细胞中, G418 和潮霉素(Hygromycin)双抗筛选阳性克隆 PAC1-Tet-CHO, 使用梯度浓度四环素类似物强力霉素 Dox 诱导 PAC1-EYFP 表达, 48 h 后检测受体表达水平, 并通过 MTT 法检测不同 PAC1 表达水平的细胞增殖活性。荧光检测和 Western 印迹结果显示, 成功获得了具有良好诱导性的 Dox 依赖的 PAC1 可控表达的细胞系, 这些细胞株在传 10 代后仍能稳定地可控表达 PAC1。MTT 结果显示 PAC1 表达水平越高, 细胞增殖活性越强。成功所构建的 Dox 依赖的 PAC1 可控表达细胞系, 为 PAC1 的生物学功能的深入研究奠定了基础。

关键词: 垂体腺苷酸环化酶激活多肽, 受体, PAC1, 四环素表达调控系统, 强力霉素

Received: August 15, 2013; **Accepted:** November 12, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31100545, 31200679), Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. S2011010002931), Science and Technology Bureau of Guangdong Province (No. 2011B090400024).

Corresponding author: Rongjie Yu. Tel: +86-20-85220220; Fax: +86-20-85221983; E-mail: rongjie_yu1123@163.com

国家自然科学基金(Nos. 31100545, 31200679), 广东省自然科学基金(No. S2011010002931), 广东省科技计划项目(No. 2011B090400024) 资助。

网络出版时间: 2013-12-06

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20131206.0847.002.html>

Construction of controlled expression system of Class B G-protein coupled receptor PAC1

Mei Li¹, Rongjie Yu¹, Jiaping Zhong¹, Zekai Cui¹, Yanxu Yang¹, and Huahua Zhang²

¹ Institute of Biological Engineering, School of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510630, Guangdong, China

² Department of Medical Genetics, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, Guangdong, China

Abstract: PAC1 is the neuropeptide pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) preferring receptor, which belongs to class B G protein-coupled receptors (GPCR) family. PAC1 mediates the most effects of PACAP as neurotransmitter, neuroregulator and neuroprotectant, while its high expression has close relationship with some physiological and pathological processes such as nerve-injury and tumor. To further understand the function of PAC1, a cell line that expressed inducible PAC1 was constructed to achieve Doxycycline (Dox) dependent expression of PAC1 in CHO (Chinese hamster ovary) cell using the improved Tet (tetracycline)-on Advanced System. First, the *PAC1-EYFP* fusion gene composed of *PAC1* gene and gene encoding *EYFP* (enhanced yellow fluorescent protein) was sub-cloned to the tetracycline response element pTRE-Tight vector to construct the recombinant vector pEYFP-PAC1-EYFP by double enzyme digestion. Second, the tetracycline regulation components pTet-On advanced vector and the response element pTRE-PAC1-EYFP vector were both introduced into CHO cells successively and the positive clones were screened with G418 and hygromycin respectively. Third, the controlled expression of PAC1-EYFP in CHO was induced by tetracycline analogues Dox in different concentrations and the different levels of receptor PAC1-EYFP were detected. The results of fluorescence analysis and western blotting show that the cell strain with Dox dependent expression of PAC1-EYFP named PAC1-Tet-CHO was obtained. Moreover, in PAC1-Tet-CHO cells the expression of PAC1-EYFP was induced by Dox in a dose-dependent manner. The inducible expression of PAC1 still was stable after sub-culturing for more than 10 passages. It was also found by MTT assay that the higher expression level of PAC1 endowed the cells with higher proliferative viabilities. The construction of controlled expression system of PAC1 will lay a foundation for the further research on PAC1 profiles.

Keywords: pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), receptor, PAC1, tet-on expression system, doxycycline

B 族 G 蛋白偶联受体 (G-protein coupled receptor, GPCR) PAC1 是神经肽垂体腺苷酸环化酶激活多肽 (Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, PACAP) 的特异受体^[1-2]。PAC1 主要分布在中枢神经系统, 周围神经系统及神经内分泌系统 (如脑, 丘脑, 耳蜗, 视网膜, 肾上腺及胰岛等); 主要介导 PACAP 的神经递质^[3]、神经调质^[4]、神经保护^[5-6]、抗神经损伤^[7]及调控神经再生的功能^[2-8], 是开发治疗帕金森病、老年痴呆症、手足舞蹈症等神经损伤药物的首

选靶受体。PAC1 除了在神经组织及神经内分泌器官特异性高表达外, PAC1 的高表达还被发现与某些生理病理过程密切相关。如: 在神经肿瘤细胞及神经内分泌瘤细胞高表达^[9]; PAC1 在老年大鼠的脑部表达水平显著随龄升高^[10]; PAC1 在受到辐射损伤及毒素损伤的胸腺显著表达上调^[11]; 慢性压力导致 PAC1 在脑部终纹床核的表达水平上调^[12], 最新的 *Nature* 报道: 恐惧导致 PAC1 在小鼠杏仁核表达显著上调, 表明 PAC1 成为压力症的分子标签^[13]。鉴于 PAC1

介导了 PACAP 的多种生物学功能且其表达水平与某些生理病理过程密切相关, 因此构建 PAC1 可调控表达的体系对于进一步研究 PAC1 介导的生物学功能的作用机制有重大的价值。

四环素表达调控系统 (Tet-on expression system) 是由 Gossen 等^[14]建立的基因诱导表达系统, 可以实现用四环素及其衍生物强力霉素 (Doxycycline, Dox) 来调控目的基因的表达。在 Tet-On 控制表达系统中, 当 Dox 存在时, 可诱导目的基因的表达; 当 Dox 从系统中除去后, 目的基因转录关闭, 可以实现目的基因的定时、定点、定量表达和关闭^[15]。Tet-On 系统操作方便, 适于临床应用^[16], 并已被广泛应用于多种疾病的基因治疗研究中^[17-18], 被认为是目前理想的真核生物基因表达调控系统。本研究中的 Tet-On 控制表达系统由两部分组成: 一个是四环素调节元件载体 pTet-on advanced, 含有抗 G418 基因, 表达四环素抑制子; 另一个是反应质粒 pTRE-PAC1-EYFP, 表达目的基因 *PAC1-EYFP*, 并位于四环素操纵子控制的启动子下游。因此, 利用此系统调控基因表达时, 需将 2 个质粒转染同一个细胞中。本研究选择中国仓鼠卵巢 (Chinese hamster ovary, CHO) 细胞系 CHO-K1, 此细胞已被证明既不表达 PACAP, 也不表达 PAC1^[19]。此外, 为了方便检测和示踪, 本研究采用了 *PAC1* 的 C 端融合增强型黄色荧光蛋白 (EYFP, enhanced yellow fluorescent protein) 的融合蛋白 PAC1-EYFP。本研究拟利用 Tet-On 控制表达系统建立 PAC1-EYFP 体外可调控表达的细胞系 PAC1-Tet-CHO, 实现 PAC1-EYFP 的 Dox 依赖的可控表达, 为 PAC1 生物学活性的深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

含有 *PAC1-EYFP* 基因的质粒 pEYFP-PAC1-EYFP 为本实验保存^[20]。pTet-on advanced, pTRE-tight 载体购自 Clontech 公司。G418 为 Gibco BRL 产品。潮霉素 (Hygromycin) 为 Roche 产品。强力霉素 (Doxycycline, Dox), MTT (Methylthiazolotetrazolium bromide) 均为 Sigma 产品。Lipofectamine LTX 购自美国生命技术公司 (GIBCO BRL)。限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 购自美国 New England Biolabs (NEB) 公司。

1.2 方法

1.2.1 pTRE-PAC1-EYFP 表达载体的构建和鉴定

本研究的 *PAC1* 基因大小为 1 407 bp, *EYFP* 基因大小为 750 bp, 融合基因 *PAC1-EYFP* 大小为 2 157 bp, 通过限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 对质粒 pEYFP-PAC1-EYFP 进行双酶切, 将酶切后的 *PAC1-EYFP* 基因片段再亚克隆入 pTRE-Tight 载体的 *EcoR* I 和 *Not* I 位点间, 构建重组表达载体 pTRE-PAC1-EYFP。将重组质粒转化 *E. coli* DH5 α , 针对 *PAC1* 基因编码框的 1-300 bp 的设计并合成鉴定引物 (F1: 5'-ATGGCCAGAACCCTGCAGCTC-3', F2: 5'-AAAGCCAGAATCCCC TATGGT-3'), 用 PCR 对重组子进行初步鉴定, 阳性克隆将扩增出对应于 *PAC1* 基因的一条 300 bp 的 PCR 产物, 并通过利用位于 pTRE-Tight 质粒多克隆位点上游的引物进行基因测序, 鉴定重组质粒 pTRE-PAC1-EYFP 中 *PAC1-EYFP* 基因的存在及其序列的正确性。

1.2.2 四环素调节元件载体 pTet-on advanced 的转染、筛选及鉴定

用含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基 (无抗生素)

在6孔细胞培养板中培养CHO细胞,待细胞80%成片时,采用脂质体转染方法按说明书操作,将四环素调节元件载体pTet-on advanced转入CHO细胞。细胞在37℃、CO₂孵箱中培养6–10 h后,换含5% FBS的DMEM培养液。转染48 h后,将细胞1–5传代,待细胞贴壁后换10% FBS、800 μg/mL G418的DMEM培养液培养,用梯度稀释法筛选抗G418的细胞克隆Tet-CHO。

1.2.3 四环素反应元件载体pTRE-PAC1-EYFP和线性潮霉素基因的共转染、筛选及鉴定

同1.2.2采用脂质体转染法,将带有荧光基因的反应质粒pTRE-PAC1-EYFP和线性潮霉素基因(the Linear Hygromycin Marker),共转染至上述带有质粒pTet-on advanced的阳性细胞克隆Tet-CHO中,线性潮霉素基因用来标化该载体,用10% FBS、500 μg/mL潮霉素的DMEM培养液培养,梯度稀释法筛选抗潮霉素的阳性克隆PAC1-Tet-CHO。

1.2.4 Dox诱导PAC1-EYFP的表达及检测

将PAC1-Tet-CHO细胞系培养至60%–70%成片时,分别加入不同浓度强力霉素(Dox)诱导,Dox的终浓度分别为0、10、100、1 000 μg/mL,每个浓度做5个重复;在37℃、5% CO₂培养箱诱导培养48 h。分别用倒置荧光显微镜IX71下观察不同浓度Dox诱导的细胞中表达荧光蛋白的细胞数量;用生物多功能发光仪(激发波长为465 nm±30 nm,发射波长为525 nm±30 nm)检测不同浓度Dox诱导的细胞的荧光强度;分别提取不同浓度Dox诱导的细胞中的蛋白,经BCA法定量后,进行SDS-PAGE电泳分离并转印至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭后,用抗兔源抗PAC1一抗(购自Satacus公司)、二抗孵育。用TBS清洗后显色,检测PAC1-EYFP蛋白的表达情况。

1.2.5 转染细胞稳定性的鉴定

将筛选出的表达PAC1-EYFP蛋白的细胞株分别在含有或不含有潮霉素的培养基中连续传10代,期间监测目的蛋白的Dox诱导表达,以判断转染细胞的稳定性。

1.2.6 MTT法检测细胞的生长曲线

用MTT法检测Tet-on表达控制系统中PAC1-EYFP的不同表达水平对细胞增殖活性的影响,在96孔板中培养PAC1-Tet-CHO细胞至60%–70%成片时,加入梯度浓度(0–1 000 μg/mL)的Dox,每个浓度设置5个复孔,培养48 h,弃掉培养基,PBS清洗2遍,饥饿2–6 h,加入MTT的终浓度为0.5 mg/mL,37℃孵育4 h,终止反应,每孔加150 μL异丙醇,37℃避光孵育10 min,于酶标仪570 nm处检测,630 nm为参考波长,测定各孔光吸收值,设置无细胞孔为对照,连续测5 d。

2 结果

2.1 pTRE-PAC1-EYFP表达载体的构建

PAC1基因大小为1 407 bp,融合基因PAC1-EYFP大小为2 157 bp,将质粒pEYFP-PAC1-EYFP用EcoR I和Not I双酶切后电泳回收2 157 bp的目的片段,连接到pTRE-Tight载体上,得到重组表达载体pTRE-PAC1-EYFP。采用方法1.2.1中针对PAC1基因编码框1–300 bp的引物,用PCR的方法对重组质粒pTRE-PAC1-EYFP进行初步鉴定,发现重组载体pTRE-PAC1-EYFP可扩增出与预计相符的300 bp产物(图1),然后利用位于pTRE-Tight质粒多克隆位点上游的引物进行基因测序,经测序确定重组质粒pTRE-PAC1-EYFP中PAC1-EYFP的基因序列与预期结果一致(图略),说明成功构建了pTRE-PAC1-EYFP的真核表达载体。

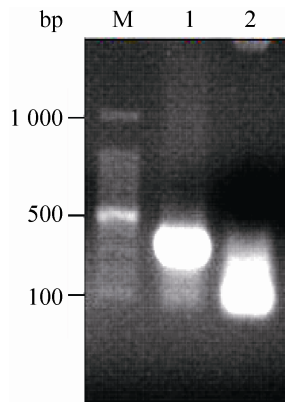


图1 PCR 鉴定载体 pTRE-PAC1-EYFP 的构建
Fig. 1 Identification of vector pTRE-PAC1-EYFP by PCR. M1: DNA marker DL2000; 1: pTRE-PAC1-EYFP; 2: pTRE-Tight.

2.2 梯度浓度 Dox 诱导 PAC1-EYFP 的表达和检测

将 pTet-on-advance 质粒转染至 CHO 细胞，经 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 筛选获得 Neo^{r} 阳性细胞克隆 Tet-CHO，而后将重组质粒 pTRE-PAC1-EYFP 和线性潮霉素基因共转染至 Tet-CHO 细胞，经 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素筛选，挑取新的阳性细胞克隆 PAC1-Tet-CHO 扩大培养。用梯度浓度 (0–1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) Dox 诱导 PAC1-EYFP 表达 48 h 后在倒置荧光显微镜下观察黄色荧光蛋白的表达 (图 2A)，发现 Dox 诱导 PAC1-EYFP 的表达有显著的浓度依赖性；没有 Dox 诱导的细胞中检测不

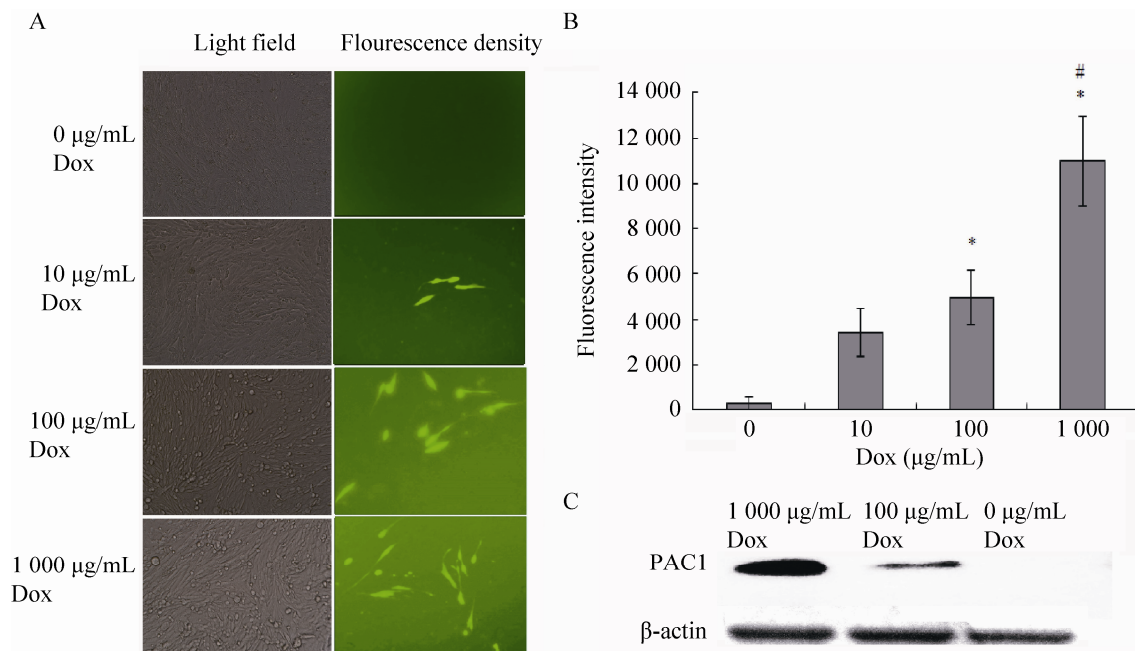


图2 荧光显微观察、荧光定量检测和 Western 印迹检测梯度浓度 Dox 诱导表达 PAC1-EYFP

Fig. 2 Induced expression of PAC1-EYFP by different concentrations of Dox in PAC1-Tet-CHO cells detected by fluorescence metry assay and Western blotting. (A) The fluorecence microscope showed that the fluorecence signals representing the expression of EYFP-tagged PAC1 increased following the increase of the concentration of Dox (0–1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (B) The fluorecence metry assay showed that the fluorecence density of the PAC1-Tet-CHO cells representing the expression of EYFP-tagged PAC1 increased following the increase of the concentration of Dox (0–1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (* $P < 0.01$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dox or 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dox compared with 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dox; # $P < 0.01$, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dox compared with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dox). (C) Western blotting assayed showed the expression of PAC1-EYFP using β -Actin as a control. PAC1-Tet-CHO cells treated with various concentrations Dox 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively.

到黄色荧光蛋白,而随着 Dox 浓度的递增则检测到黄色荧光蛋白的量相应增高。生物多功能发光仪检测和 Western 印迹检测结果也显示,随着 Dox 浓度的增加, PAC1-EYFP 的荧光强度(图 2B)和蛋白表达水平(图 2C)均相应增加。结果表明,利用 Tet-on 控制表达系统实现了 PAC1-EYFP 的 Dox 依赖的可控表达。

2.3 可调控表达细胞系 PAC1-Tet-CHO 的稳定性评价

将筛选的细胞株 PAC1-Tet-CHO 在含 Hygromycin 的培养基中连续传 10 代,每代细胞均用 Dox 诱导并在荧光显微镜下观察,发现细胞仍能高效地可诱导表达 PAC1-EYFP,且表达水

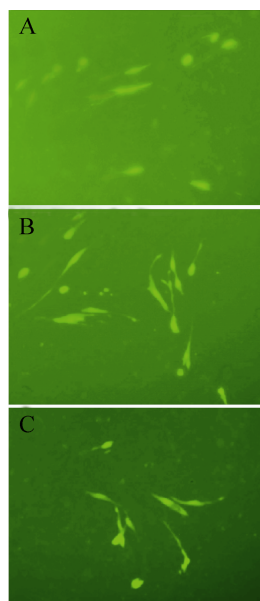


图 3 细胞连续传代后可诱导表达 PAC1-EYFP 的荧光检测

Fig. 3 Detection of inducible PAC1-EYFP protein expressed in the transfected CHO cells after serial passage. (A) The fifth passage with Hygromycin. (B) The tenth passage with Hygromycin. (C) The tenth passage without Hygromycin.

平没有明显变化,说明我们构建的细胞系稳定性很好。其中第 5 代和第 10 代细胞的表达检测结果见图 3A、B。此外,即使将细胞株 PAC1-Tet-CHO 在未加 Hygromycin 的培养基中连续传代培养 10 代,发现细胞仍能高效保持 Dox 依赖的可诱导表达 PAC1-EYFP,结果见图 3C,说明该细胞株具有传代稳定性。

2.4 MTT 检测不同浓度 Dox 诱导的细胞生长曲线

用 MTT 法于酶标仪 570 nm 处检测,630 nm 为参考波长,测定各孔光吸收值,设置无细胞孔为对照,连续测 5 d,并绘制生长曲线图发现, PAC1-EYFP 的表达水平与细胞的增殖活性密切相关(图 4);其中, Dox 诱导组(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的增殖活性显著高于非 Dox 诱导组(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$),高浓度 Dox(1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)诱导的细胞增殖活性明显高于低浓度 Dox(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)诱导组。

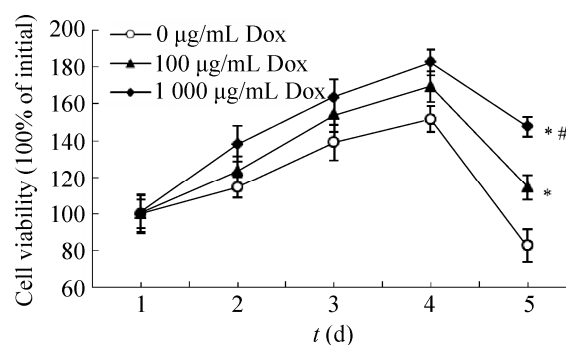


图 4 MTT 检测不同浓度 Dox 诱导的细胞生长曲线图

Fig. 4 Grow curves of PAC1-Tet-CHO cells incubated with different concentrations of Dox. The cells viabilities assayed by MTT showed that 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dox and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dox led to the higher cells viabilities ($*P < 0.01$, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dox and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dox compared with 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dox), while 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dox produced significantly higher cells viabilities than 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dox ($\#P < 0.01$, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dox compared with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dox).

3 讨论

在真核细胞的调控表达系统中, Tet-on 控制表达系统具有严密性、特异性、高效性等优点^[21-22], 诱导剂即为常用的抗生素四环素及其衍生物, 在低于其毒性剂量时就能发挥诱导作用, 加之则可人为控制目的基因的表达水平, 有利于模拟该基因在生理、病理等不同状态下的作用特点和机制。本研究利用 Tet-on 控制表达系统成功建立可控表达 PAC1-EYFP 的细胞系 PAC1-Tet-CHO, 不仅表达水平有显著的 Dox 浓度依赖性, 而且体系非常稳定, 从图 3 中可以看到细胞连续培养 10 代仍能高效地可诱导表达 PAC1-EYFP。这样可调控且稳定表达 PAC1-EYFP 的细胞系完全可以满足今后对 PAC1 生物学功能研究的需要。

PAC1 参与了介导 PACAP 促神经细胞增殖和抗凋亡的功能^[2-8], 本研究发现 PAC1 赋予细胞其表达水平依赖的增殖活性——用 MTT 法检测细胞的生长曲线, 图 4 中显示同样培养条件下, 加 Dox 浓度高时, 细胞的增殖活性较高, 未加 Dox 的对照组增殖活性显然低于加 Dox 实验组, 表明 PAC1 表达水平越高, 其赋予细胞的增殖活性越强。结合 PAC1 在受损细胞及肿瘤中高表达的发现^[9-11], 这些结果提示, 细胞可能通过调节的受体 PAC1 的表达水平实现对配体的反应程度, 从而调节细胞的增殖和抗凋亡的活性。本研究首次揭示了 PAC1 表达水平与细胞增殖活性的正相关性。

总之, 本研究首次利用了 Tet-on 控制表达系统成功实现了 Dox 依赖的 PAC1-EYFP 在 CHO 细胞的可控表达, 构建了遗传稳定的 PAC1-Tet-CHO 细胞系, 并且首次获得了 PAC1

表达水平与细胞增殖活性正相关的数据, 这些研究不仅有助于诠释高表达 PAC1 的生理学与病理学的作用和意义, 而且为以 PAC1 为靶点的药物开发提供了新的理论依据和研究基础。例如, 或许可以用提高 PAC1 自身表达水平的方法替代原有的配体激活的方法来开启 PAC1 所介导的信号通路, 实现以 PAC1 为靶点的相关神经系统疾病的治疗, 借此避免 PACAP 等多肽配体激活非特异受体而造成的副作用; 还或许对于和肿瘤或某些病理过程密切相关的 PAC1 的高表达, 可以通过抑制其高表达实现对某些肿瘤(神经内分泌肿瘤)或某些病理过程(如创伤后应激障碍, 压力性应激障碍等)的干预和治疗等。

REFERENCES

- [1] Laburthe M, Couvineau A, Tan V. Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. *Peptides*, 2007, 28(9): 1631-1639.
- [2] Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev*, 2009, 61(3): 283-357.
- [3] Wakade AR, Guo X, Strong R, et al. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) as a neurotransmitter in rat adrenal medulla. *Regul Pept*, 1992, 37(3): 331.
- [4] Arimura A, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors: neuroendocrine and endocrine interaction. *Front Neuroendocrinol*, 1995, 16(1): 53-88.
- [5] Braas KM, May V. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide directly stimulate sympathetic neuron neuropeptide Y release through PAC1 receptor isoform activation of specific intracellular signaling pathway. *J Biol Chem*, 1999, 274(39): 27702-27710.
- [6] Dickinson T, Mitchell R, Robberecht P, et al. The

- role of VIP/PACAP receptor subtypes in spinal somatosensory processing in rats with an experimental peripheral mononeuropathy. *Neuropharmacol*, 1999, 38(1): 167–180.
- [7] Rácz B, Gasz B, Borsiczky B, et al. Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Gen Comp Endocrinol*, 2007, 153(1/3): 115–123.
- [8] Bourgault S, Vaudry D, Dejda A, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: focus on structure-activity relationships of a neuroprotective Peptide. *Curr Med Chem*, 2009, 16(33): 4462–4480.
- [9] Lieu SN, Oh DS, Pisegna JR, et al. Neuroendocrine tumors express PAC1 receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1070(1): 399–404.
- [10] Lee JC, Cho YJ, Kim J, et al. Region-specific changes in the immunoreactivity of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC2, and PAC1 receptor) in the aged rat brains. *Brain Res*, 2010, 1351(1872/6240): 32–40.
- [11] Tokuda N, Arudchelvan Y, Sawada T, et al. PACAP receptor (PAC1-R) expression in rat and rhesus monkey thymus. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1070(1): 581–585.
- [12] Hammack SE, Roman CW, Lezak KR, et al. Roles for pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) expression and signaling in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) in mediating the behavioral consequences of chronic stress. *J Mol Neurosci*, 2010, 42(3): 327–340.
- [13] Ressler KJ, Mercer KB, Bradley B, et al. Post-traumatic stress disorder is associated with PACAP and the PAC1 receptor. *Nature*, 2011 Feb 24, 470(7335): 492–497.
- [14] Gossen M, Freundlieb S, Bender G, et al. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, 1995, 268(5218): 1766–1769.
- [15] Bichara M, Wagner J, Lambert IB. Mechanisms of tandem repeat instability in bacteria. *Mutat Res*, 2006, 598 (1/2): 144–163.
- [16] Chtarto A, Bender HU, Hanemann CO, et al. Tetracycline-inducible transgene expression mediated by a single AAV vector. *Gene Therapy*, 2003, 10: 84–94.
- [17] Zabala M, Wang L, Hernandez-Alcoceba R, et al. Optimization of the Tet-On system to regulate interleukin12 expression in the liver for the treatment of hepatic tumors. *Cancer Res*, 2004, 64(8): 2799–2804.
- [18] Qin XY, Shen KT, Zhang X, et al. Establishment of an artificial β -cell line expressing insulin under the control of doxycycline. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(2): 367–370.
- [19] Okazaki K, Kimura C, Kosaka T, et al. Expression of human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) cDNA in CHO cells and characterization of the products. *FEBS Lett*, 1992, 298(1): 49–56.
- [20] Yu R, Guo X, Zhong J, et al. The N-terminal HSDCIF motif is required for cell surface trafficking and dimerization of family B G protein coupled receptor PAC1. *PLoS ONE*, 2012, 7(12): e51811.
- [21] Urlinger S, Baron U, Thellmann M, et al. Exploring the sequence space for tetracycline dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(14): 7963–7968.
- [22] Tassaneeyakul W, Veronese ME, Birkett DJ, et al. Validation of 4-nitrophenol as an *in vitro* substrate probe for human liver CYP2E1 using cDNA expression and microsomal kinetic techniques. *Biochem Pharmacol*, 1993, 46(11): 1975–1981.

(本文责编 陈宏宇)