

甲状旁腺素通过磷脂酶 C 非依赖途径 激活蛋白激酶 C

李俊青 江建明 冯瑞强 蒋晖 闫文娟 杨德鸿

中图分类号: R683 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2012)04-0295-05

摘要: 目的 利用基于荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)技术的检测 PKC 激活或 PKC-delta 激活的报告分子来确定 PTH 是否可以通过 PLC 非依赖途径激活 PKC 和 PKC-delta。方法 将表达 PKC 激活报告分子(CKAR)的质粒和表达 PKC-delta 激活报告分子的质粒转染 HEK293 细胞,培养 72h 后通过共聚焦显微镜检测 FRET 的改变,并以此判断佛波酯(TPA)是否激活 PKC 和 PKC-delta。将表达甲状旁腺素 1 型受体(PTH1R)的质粒与 CKAR 质粒或 PKC-delta 质粒共转染 HEK293 细胞,培养 72h 后通过共聚焦显微镜检测 FRET 的改变,并判断 PTH(1-34)、G1R19(1-34)和 0.1% 的三氟乙酸(TFA)对 PKC 和 PKC-delta 的作用。结果 在转染 CKAR 质粒或 PKC-delta 质粒的 HEK293 细胞,TPA 均使青色荧光与黄色荧光的强度之比(C/Y)增加。在共转染 PTH1R 质粒与 CKAR 质粒或 PKC-delta 质粒的 HEK293 细胞,PTH(1-34)和 G1R19(1-34)均增加了 C/Y 的值,而 0.1% TFA 未引起 C/Y 的改变。结论 PTH 与 PTH1R 结合后通过 PLC 非依赖途径激活 PKC/PKC-delta。

关键词: 甲状旁腺素; 荧光共振能量转移; PKC 激活报告分子; PKC-delta 激活报告分子; 甲状旁腺素 1 型受体

Parathyroid hormone activates protein kinase C via phospholipase C-independent signaling pathway

Li Junqing, JIANG Jianming, FENG Ruiqiang, et al. Department of Spinal Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Corresponding author: YANG Dehong, Email: drmyang@yahoo.com

Abstract: Objective To determine whether PTH activates PKC/PKC-delta via PLC-independent pathway using the reporter of PKC or PKC-delta activation based on fluorescence resonance energy transfer (FRET).

Methods HEK293 cells were transfected with C kinase activity reporter (CKAR) or C-delta kinase activity reporter (PKC-delta). After incubation for 72h, FRET was measured with or without stimulation of phorbol esters (TPA). The activation of PKC or PKC-delta could be judged by the change in FRET. HEK293 cells were co-transfected with either CKAR or PKC-delta plasmid or PTH1R plasmid. Stimulation of PKC or PKC-delta by PTH(1-34) or G1R19(1-34) or 0.1% trifluoroacetic acid(TFA) were demonstrated by monitoring the change in FRET after 72 h. **Results** TPA increased the CFP/YFP emission ratio (C/Y) in HEK293 cells transfected with CKAR or PKC-delta plasmid. PTH (1-34) and G1R19 (1-34), but not 0.1% TFA, increased C/Y in HEK293 cells co-transfected with either CKAR or PKC-delta plasmid or PTH1R plasmid.

Conclusion PTH binding to PTH1R can activate PKC and PKC-delta via PLC-independent signaling pathway.

Key words: Parathyroid hormone; Fluorescence resonance energy transfer; C kinase activity reporter; C-delta kinase activity reporter; Type I PTH receptor

基金项目: 广东省自然科学基金项目(9151051501000087), 国家自然科学基金(30973061)

作者单位: 510515 广州, 南方医科大学南方医院脊柱骨科(李俊青、江建明、冯瑞强、蒋晖、杨德鸿); 南方医科大学南方医院口腔科(闫文娟)

通讯作者: 杨德鸿, Email: drmyang@yahoo.com

甲状旁腺素(PTH)是由84个氨基酸组成的多肽激素,是骨代谢和钙稳态的重要调节者^[1,2]。目前,PTH(1-84)和PTH(1-34)在欧美国家已经用于有骨折风险的老年男性和绝经后妇女的骨质疏松症的临床治疗^[3]。尽管如此,但它们的疗效仍未达到理想的效果。原因在于PTH对骨代谢具有双重作用,既促进骨合成作用又促进骨吸收作用^[4]。PTH的双重作用首先与其注射模式有关,低剂量间断注射促进骨形成,连续大剂量注射促进骨吸收^[4,6]。还与其调节成骨细胞分化、增殖和凋亡以及促进破骨细胞功能有关^[6,7]。而与所有这些作用相关的更深层次的原因是PTH所引起的多个信号通路。PTH在成骨细胞主要与1型PTH受体(PTH1R)结合,这个G蛋白偶联受体又与多个G蛋白结合进而激活多个信号通路,主要是Gs/cAMP/PKA信号转导系统和Gq/PLC/PKC信号系统^[8-11]。但有研究表明,不激活PLC的hPTH(3-34)却激活了PKC,并认为PTH可以经PLC非依赖通路激活PKC^[9]。而一种新的只激活cAMP/PKA和non-PLC/PKC通路的PTH类似肽G1R19(1-34),可以模拟PTH(1-34)激活PKC-delta^[10]。综合表明,PTH可以经PLC非依赖途径激活PKC和PKC-delta,但以往检测PKC激活的方法主要有PKC分子在细胞内转位^[10,12],PKC分子丝/苏氨酸残基的磷酸化^[10],特殊底物磷酸化时³²P的掺入^[10,14]等,上述方法要么不能直接反应PKC的活性,要么需要高剂量的同位素,且灵敏度差。

本研究运用新的直接而灵敏的检测方法——以荧光能量共振转移(FRET)为基础的检测PKC激活的报告分子(CKAR)和PKC-delta激活的报告分子来研究PTH的PLC非依赖信号通路。CKAR分子首先由Newton等^[14]报道,在CFP和YFP之间插入了特异性PKC作用底物和FHA2磷酸化肽段的结合域;PKC-delta激活报告分子与其类似,插入了特异性PKC-delta作用底物和FHA2磷酸化肽段的结合域。当转染了两种质粒的细胞表达出CKAR分子和PKC-delta报告分子时,在共聚焦显微镜下根据荧光强度的相对改变(青色荧光与黄色荧光的强度比值(C/Y))就可以判断刺激物是否激活了PKC或PKC-delta。本研究还使用了两种PTH肽:PTH(1-34)和G1R19(1-34)。前者具有与天然PTH相同的信号通路激活活性^[11];后者则激活cAMP/PKA和non-PLC/PKC信号通路^[10]。通过两种肽对表达PTH1R的HEK293细胞内CKAR分子和PKC-delta

激活报告分子的作用来判断PTH是否经PLC非依赖途径激活PKC或PKC-delta,这将为此信号通路提供更直接并有说服力的证据。

1 材料方法

1.1 材料

HEK293细胞株购自武汉博士德公司,胎牛血清和DMEM培养基购自GIBCO公司,Fugene6购自Roche公司,TPA购自北京四正柏公司,PTH(1-34)和G1R19(1-34)由上海波泰生物公司合成,PKC-delta质粒、CKAR质粒由Newton教授赠送,PTH1R质粒由哈佛大学Jun Guo教授提供,细胞培养箱购自RS Biotech公司,共聚焦培养皿购自NEST公司,激光共聚焦显微镜(Leica TCS SP2 AOBs)购自德国Leica仪器公司。

1.2 细胞培养

转染前后的HEK293细胞均培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,置于37℃、含5%CO₂的培养箱中生长。

1.3 质粒转染

将HEK293细胞悬液($10^4/150\mu\text{l}$)接种于共聚焦培养皿的中心,细胞贴壁后加入1ml含10%胎牛血清的DMEM培养基。24h后进行转染,吸出培养基,PBS洗涤细胞2次,然后向培养皿中心加入100 μl 无血清DMEM。根据Fugene6转染试剂操作指南,将0.9 μl Fugene6加入10 μl 无血清DMEM,室温放置5min,然后再加入0.3 μg CKAR质粒或PKC-delta质粒,并补充无血清DMEM致总体积达20 μl 。室温放置15min后,将上述混合物加入培养皿中心的培养基中,5h后再向培养皿中加入1ml含10%胎牛血清的DMEM培养基,培养72h后进行FRET比值分析。

在PTH1R质粒与CKAR质粒或PKC-delta质粒共转染的试验中,PTH1R和CKAR质粒(或PKC-delta质粒)的质量比为9:1,即0.4 μg CKAR质粒(或PKC-delta质粒)和3.6 μg PTH1R质粒加入到含6.0 μl Fugene6的无血清DMEM后转染,细胞转染前后的培养方法与单独转染CKAR质粒或PKC-delta质粒相同。

1.4 FRET比值分析

用PBS冲洗细胞,加入100 μl Hanks液后在室温暗室下进行细胞成像和FRET分析。Leica共聚焦显微镜设置:Mode-xyt, Speed-400Hz, Zoom-1, Objective-HCX PL APO CS 40.0x0.85 UV。以

405nm 入射光激发 CFP, 选择 CFP 和 YFP 两通道, CFP 和 YFP 的发射光范围分别设为 460 ~ 500nm 和 520 ~ 560nm。为减少荧光漂白, 扫描速度为 400Hz, 每 15s 扫描一次。首先定 5min 的基线, 然后根据实验在不同的时间点加入刺激物。扫描完成后选择 ROI 区域, 并计算 $C/Y = (\text{channel 1 ROI 1} - \text{channel 1 ROI 2}) / (\text{channel 2 ROI 1} - \text{channel 2 ROI 2})$ 。ROI 1 为荧光区域, ROI 2 为背景区域, 也可不选择背景区域。软件可得到时间序列的 C/Y 的值和曲线。

2 结果

2.1 CKAR 分子和 PKC-delta 分子在活细胞内有活性

在只转染 CKAR 质粒或 PKC-delta 质粒的 HEK293 细胞, 当给予终浓度为 200nmol/L 的 TPA 时, 青色荧光与黄色荧光的强度比值 (C/Y) 明显升高 (图 1)。CKAR 分子和 PKC-delta 分子是将 CFP 和 YFP 连接在 PKC 或 PKC-delta 特异性底物分子的两端, 当激活后的 PKC 或 PKC-delta 磷酸化特异性底物时, 整个报告分子的构象将发生改变, 进而引起 CFP 和 YFP 空间距离的改变, 这直接表现为青色荧光强度和黄色荧光强度的改变 (C/Y 的改变)。因此, C/Y 的升高表明 PKC 和 PKC-delta 被激活。这表明 CKAR 分子或 PKC-delta 分子在活细胞内具有报告 PKC 或 PKC-delta 激活的功能。

2.2 PTH 通过与 PTH 受体结合而发挥作用

TPA 是特异性 PKC 激活剂, 不需要与受体结合便可直接激活 PKC 和 PKC-delta, 那么 PTH 是否能

直接激活 PKC 或 PKC-delta。在只转染 CKAR 质粒而没有转染 PTHR1 质粒的 HEK293 细胞, 即使 PTH (1-34) 的终浓度达到 10 μ mol/L, 也未能改变 C/Y 的值, 即没有激活 PKC (图 2)。在只转染 PKC-delta 质粒的 HEK293 细胞, 10 μ mol/L 的 PTH (1-34) 同样不能引起 C/Y 的改变, 不能激活 PKC-delta (图 2)。然而, 在共转染了 PTHR1 质粒的 HEK293 细胞, 100nmol/L 的 PTH (1-34) 或 G1R19 (1-34) 就可使 C/Y 升高 (图 3 和 4)。这些表明, PTH 是通过与 PTHR1 结合而间接发挥作用。

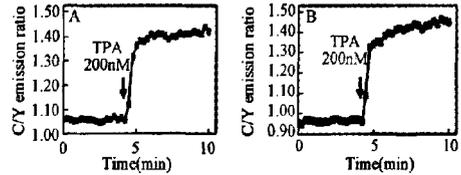


图 1 CKAR 分子和 PKC-delta 分子在活细胞内有活性 A: 在转染 CKAR 质粒的 HEK293 细胞, 终浓度 200nmol/L 的 TPA 使 C/Y 明显增加; B: 在转染 PKC-delta 报告分子质粒的 HEK293 细胞, TPA 增加了 C/Y 的值。

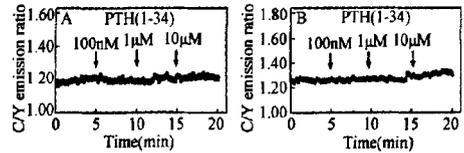


图 2 A&B, 在未转染 PTHR1 而只转染 CKAR 或 PKC-delta 的 HEK293 细胞, PTH (1-34) 未能引起 C/Y 的改变。

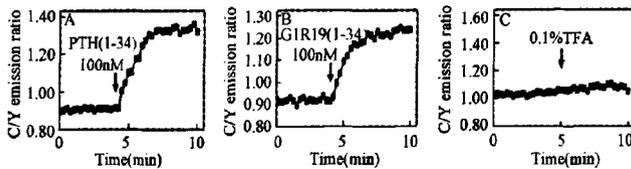


图 3 PTH 可激活 PKC。A&B, 在共转染 PTHR1 和 CKAR 的 HEK293 细胞, 100nmol/L 的 PTH (1-34) 和 G1R19 (1-34) 均可使 C/Y 增加; C, 在共转染 PTHR1 和 CKAR 的 HEK293 细胞, 0.1% TFA 未增加 C/Y。

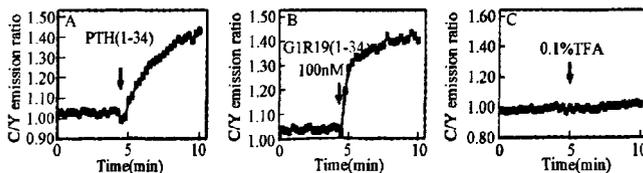


图 4 PTH 可激活 PKC-delta。A&B, 在共转染 PTHR1 和 PKC-delta 的 HEK293 细胞, 100nmol/L 的 PTH (1-34) 和 G1R19 (1-34) 均可使 C/Y 增加; C, 在共转染 PTHR1 和 PKC-delta 的 HEK293 细胞, 0.1% TFA 未增加 C/Y。

2.3 PTH 经 PLC 非依赖途径激活 PKC 和 PKC-delta

在共转染了 PTHR1 质粒和 CKAR 质粒的 HEK293 细胞, 100nmol/L 的 PTH(1-34) 和 G1R19(1-34) 均增加了 C/Y 的值(图 3A 和 3B), 而 0.1% 的 TFA 却不能引起 C/Y 的改变(图 3C)。PTH(1-34) 具有天然 PTH 的信号通路激活功能, G1R19(1-34) 则只激活 cAMP/PKA 和 non-PLC/PKC 信号通路, 而 0.1% 的三氟乙酸(TFA) 是两种肽的溶剂。因此, G1R19(1-34) 与 PTH1R 结合后经 PLC 非依赖途径激活了 PKC。同样, 在共转染了 PTHR1 质粒和 PKC-delta 质粒的 HEK293 细胞, 100nmol/L 的 PTH(1-34) 和 G1R19(1-34) 均使 C/Y 升高(图 4A 和 4B), 而 0.1% 的 TFA 却未能改变 C/Y 的值(图 4C)。这表明, G1R19(1-34) 与 PTHR1 结合后经 PLC 非依赖途径激活了 PKC-delta。

3 讨论

PTH 对骨代谢具有双重作用, 既促进骨形成又促进骨吸收。这主要是由于 PTH 通过与 PTHR1 结合而激活了多重信号通路, 主要包括 Gs/cAMP/PKA 信号途径、Gq/PLC/PKC 信号途径和 non-PLC/PKC 信号途径。PTH(1-34) 由 PTH 的 N 端的前 34 个氨基酸组成, 并且具有全长 PTH 的信号通路激活活性。G1R19(1-34) 是在 PTH(1-34) 的基础上, 改变了第 1 位和第 19 位氨基酸而人工合成, 已经证明其只激活 PKA 和 non-PLC/PKC 信号途径而不激活 PLC/PKC 途径。但在以往信号通路研究中, 检测 PKC 激活的方法主要是 PKC 分子在细胞内转位^[10,12], PKC 分子丝、苏氨酸残基的磷酸化^[10], 特殊底物磷酸化时³²P 的掺入^[10,14]等, 上述方法要么不能直接反应 PKC 的活性, 要么需要高剂量的同位素, 且灵敏度差。本研究运用了更直接灵敏且不具有放射性的新的检测 PKC 和 PKC-delta 激活的方法——基于荧光能量转移技术的检测 PKC 和 PKC-delta 激活的报告分子, 并且更直接的证明了 PTH 与 PTHR1 结合后可通过 PLC 非依赖途径激活 PKC 和 PKC-delta, 与前人的研究结果一致。

研究中, PKC 激活报告分子和 PKC-delta 激活报告分子是在 CFP 和 YFP 之间插入了 FHA2 磷酸化肽段的结合域与特异性 PKC 作用底物或特异性 PKC-delta 作用底物。由于 CFP 的发射光谱和 YFP 的激发光谱有重叠, 所以当 CFP 和 YFP 的空间距离足够近时, CFP 受激所发射的光将激发 YFP 发光,

这一过程就是荧光共振能量转移(FRET)。CFP 和 YFP 空间距离的改变将直接改变 CFP 和 YFP 的荧光强度, 二者的比值 C/Y 也随之改变。因此, 当激活的 PKC 或 PKC-delta 磷酸化其特异性底物时, 报告分子的空间构象发生改变, CFP 和 YFP 的空间距离也随之改变, 那么 C/Y 也将改变。因此, C/Y 的改变指示 PKC 或 PKC-delta 的激活。

TPA 诱导的 C/Y 的改变表明了两个报告分子在活细胞内具有报告 PKC 或 PKC-delta 激活的功能。而在只转染 CKAR 质粒和 PKC-delta 质粒的 HEK293 细胞, 高浓度的 PTH(1-34) 也未能引起 C/Y 的改变, 但在共转染 PRHR1 质粒的 HEK293 细胞, 低浓度的 PTH(1-34) 既可以使 C/Y 升高。这些表明, PTH(1-34) 与 PTH1R 结合而发挥作用。在共转染 PTHR1 质粒与 CKAR 质粒或 PKC-delta 质粒的 HEK293 细胞, 激活 cAMP/PKA 和 non-PLC/PKC 却不激活 PLC/PKC 信号途径的 G1R19(1-34) 同样增加了 C/Y 的值, 这表明 G1R19(1-34) 可通过 PLC 非依赖途径激活 PKC 和 PKC-delta。这些结果与前人的研究结果一致。hPTH(3-34) 没有在表达足够多 PTH 受体的细胞内直接激活 PLC^[9], 但在多种细胞内证明了 PTH(3-34) 可以激活 PKC^[15-18]。而且, 只激活 cAMP/PKA 和 non-PLC/PKC 通路的 PTH 类似肽 G1R19(1-34), 同 PTH(1-34) 一样, 可以激活 PKC-delta^[10]。在动物体内, 也证实了 G1R19(1-34) 经 PLC 非依赖途径加速了松质骨反应和增加部分骨的骨量^[19]。

本研究中, 笔者采用了瞬时转染, PTH 受体的表达数量有限而且相对不稳定, 并且受转染效率和细胞状态的影响, 但较低剂量的 PTH 类似肽依然引起了 C/Y 的改变。而且 PTHR1 质粒和报告分子质粒的转染比例为 9:1, 这也一定程度上保证了细胞表达受体的数量。再者, 虽然 CFP 的常用激发光波长为 434nm, 而研究中以 405nm 的人射光激发 CFP, 这可能对实验也有影响, 但 405nm 还是在 CFP 激发光谱范围之内, 实验中也能很好的触发 YFP 并完成 FRET 检测。

总之, 我们的结果更直接地证明了 PTH 与 PTHR1 结合并通过 PLC 非依赖途径激活 PKC 和 PKC-delta, 较传统的方法更有说服力。但有关这条信号通路的详细机制和功能仍需进一步的研究。

致谢 加州大学圣地亚哥分校 Alexandra C Newton 教授为本研究提供 CKAR 质粒, 哈佛大学 Jun Guo 教授提供 PTHR1 质粒, 哈佛大学 Richard Bringhurst 教授提供技术指导, 特此致谢。

【 参 考 文 献 】

- [1] Rey A, Manen D, Rizzoli R, et al. Evidences for a role of p38 MAP kinase in the stimulation of alkaline phosphatase and matrix mineralization induced by parathyroid hormone in osteoblastic cells. *Bone*, 2007, 41(1):59-67.
- [2] Shimizu M, Carter PH, Khatri A, et al. Enhanced activity in parathyroid hormone-(1-14) and-(1-11): novel peptides for probing ligand-receptor interactions. *Endocrinology*, 2001, 142(7):3068-74.
- [3] Verhaar HJ, Lems WF. PTH-analogs: comparable or different? *Arch Gerontol Geriatr*, 2009, 49(2):e130-2.
- [4] Jeon J. H., Puleo D. A. Alternating release of different bioactive molecules from a complexation polymer system. *Biomaterials*, 2008, 29(26):3591-8.
- [5] Pettway CJ, Schneider A, Koh AJ, et al. Anabolic actions of PTH (1-34): use of a novel tissue engineering model to investigate temporal effects on bone. *Bone*, 2005, 36(6):959-70.
- [6] Valenta A, Roschger P, Fratzl-Zelman N, et al. Combined treatment with PTH (1-34) and OPG increases bone volume and uniformity of mineralization in aged ovariectomized rats. *Bone*, 2005, 37(1):87-95.
- [7] Wang YH, Liu Y, Rowe DW. Effects of transient PTH on early proliferation, apoptosis, and subsequent differentiation of osteoblast in primary osteoblast cultures. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 292(2):E594-603.
- [8] Rickard DJ, Wang FL, Rodriguez-Rojas AM, et al. Intermittent treatment with parathyroid hormone (PTH) as well as a non-peptide small molecule agonist of the PTH1 receptor inhibits adipocyte differentiation in human bone marrow stromal cells. *Bone*, 2006, 39(6):1361-72.
- [9] Takasu H, Guo J, Bringhurst FR. Dual signaling and ligand selectivity of the human PTH/PTHrP receptor. *J Bone Miner Res*, 1999, 14(1):11-20.
- [10] Yang D, Guo J, Divieti P, et al. Parathyroid hormone activates PKC-delta and regulates osteoblastic differentiation via a PLC-independent pathway. *Bone*, 2006, 38(4):485-96.
- [11] Armamento-Villareal R, Ziambaras K, Abbasi-Jarhomi SH, et al. An intact N terminus is required for the anabolic action of parathyroid hormone on adult female rats. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(3):384-92.
- [12] Dossing DA, Radeff JM, Sanders J, et al. Parathyroid hormone stimulates translocation of protein kinase C isozymes in UMR-106 osteoblastic osteosarcoma cells. *Bone*, 2001, 29(3):223-30.
- [13] Jensen TE, Maarbjerg SJ, Rose AJ, et al. Knockout of the predominant conventional PKC isoform, PKCalpha, in mouse skeletal muscle does not affect contraction-stimulated glucose uptake. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 297(2):340-8.
- [14] Violin JD, Zhang J, Tsien RY, et al. A genetically encoded fluorescent reporter reveals oscillatory phosphorylation by protein kinase C. *J Cell Biol*, 2003, 161(5):899-909.
- [15] Azarani A, Goltzman D, Orlowski J. Structurally diverse N-terminal peptides of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide (PTHrP) inhibit the Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 isoform by binding to the PTH/PTHrP receptor type I and activating distinct signaling pathways. *J Biol Chem*, 1996, 271(25):14931-6.
- [16] Janulis M, Wong MS, Favus MJ. Structure-function requirements of parathyroid hormone for stimulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ production by rat renal proximal tubules. *Endocrinology*, 1993, 133(2):713-9.
- [17] Joushohme H, Whitfield JF, Chakravarthy B, et al. The protein kinase-C activation domain of the parathyroid hormone. *Endocrinology*, 1992, 130(1):53-60.
- [18] Chakravarthy BR, Durkin JP, Rixon RH, et al. Parathyroid hormone fragment [3-34] stimulates protein kinase C (PKC) activity in rat osteosarcoma and murine T-lymphoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 171(3):1105-10.
- [19] Yang D, Singh R, Divieti P, et al. Contributions of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor signaling pathways to the anabolic effect of PTH on bone. *Bone*, 2007, 40(6):1453-61.

(收稿日期:2011-11-18)