

## 荧光共振能量转移法对细胞 cAMP 含量的实时检测

汪龙生, 吴莉, 胡珊珊, 王瑞, 张梅, 韩陈陈, 马旻, 汪庆童, 魏伟

**摘要** 大鼠成纤维样滑膜细胞(FLS)转染 pcDNA3-ICUE3 质粒,用荧光共振能量转移(FRET)法观察前列腺素(PGE<sub>2</sub>)刺激下大鼠 FLS 环磷酸腺苷(cAMP)水平的实时变化,与放免法检测进行比较。FRET 检测到 FLS 在 PGE<sub>2</sub> 刺激后 1 min, cAMP 升高 14.93%,且不同批次实验差异较小;放免法检测到 cAMP 升高 7.79%;FRET 可检测到 PGE<sub>2</sub> 受体拮抗剂对 cAMP 产生的抑制,可观察到 1 nmol/L PGE<sub>2</sub> 促进 cAMP 产生,放免法检测 PGE<sub>2</sub> 产生效应最低浓度为 0.1 μmol/L。提示 FRET 法检测灵敏、重复性高,为 G 蛋白偶联受体信号通路研究的可靠技术手段。

**关键词** 荧光共振能量转移; cAMP; G 蛋白偶联受体; 荧光探针; 活细胞研究

中图分类号 R 34; R 312; R 965.2; R-331

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)11-1726-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.032

荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)可检测两种荧光分子之间纳米级距离的变化<sup>[1]</sup>。基本原理为:当供体荧光蛋白 A 被激发后,会产生发射荧光,当受体荧光蛋白 B 距离在 5~10 nm 范围内时,就会吸收 A 的发射荧光,继而被激活产生新的发射荧光,当检测到 B 的发射光时,说明这两个荧光蛋白发生了相互作用<sup>[2]</sup>。ICUE3 质粒是 2004 年在 EPAC1 序列基础上构建出的环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)含量检测探针,包含青色荧光蛋白(cyan fluorescent protein, CFP)和黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)<sup>[3]</sup>。由图 1 可见,在静息状态

下,ICUE3 为环状结构,YFP 与 CFP 靠近在一起,当 435 nm 激光照射 CFP 后,CFP 产生 480 nm 发射波,这个波段正是 YFP 的激发波长,YFP 随后被激活产生 535 nm 发射光,可以被显微镜捕捉到。当有 cAMP 存在时,cAMP 与 EPAC 上的相应位点结合,ICUE3 探针发生构象改变,YFP 与 CFP 分离,YFP 不能被 CFP 的发射光激发,因此 535 nm 信号减弱。由此,静息状态下 cAMP 可使相邻的 YFP 与 CFP 分离,二者荧光强度比值降低用以反映 cAMP 水平<sup>[4]</sup>。成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synovocyte, FLS)存在大量前列腺素受体 2(E type prostaglandin E<sub>2</sub>, EP2)和 EP4,均与 G<sub>αs</sub> 偶联,在前列腺素(prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>)刺激下可产生大量 cAMP<sup>[5]</sup>。该研究在大鼠 FLS 中转染 ICUE3 探针,与传统放免法进行比较,评价 FRET 法在检测细胞内 cAMP 水平中的应用。

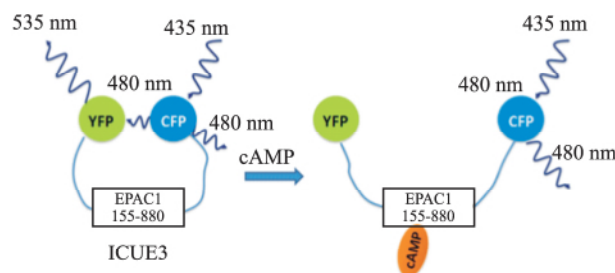


图 1 ICUE3 荧光探针工作原理示意图

### 1 材料与方法

**1.1 试剂及仪器** DMEM 和 Opti-MEM(美国 Gibco 公司);胎牛血清(美国 HyClone 公司);胰酶(南京 Wisent 公司);Lipofectamine 3000(美国 Thermo Fisher 公司);pcDNA3-ICUE3 质粒由美国加州大学戴维斯分校 Yang K. Xiang 教授馈赠;EP2 拮抗剂 AH6809 和 EP4 拮抗剂 L-461982(美国 Sigma 公司);莱卡 SP8 激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 大鼠 FLS 分离培养** 组织块培养法培养正

2016-05-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81173075、81330081、81202541);安徽省自然科学基金(编号:1208085QH146);安徽医科大学青年拔尖人才支持计划(2013);安徽医科大学第三批中青年学术技术带头人

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所、抗炎免疫药物教育部重点实验室、安徽抗炎免疫药物协同创新中心,合肥 230032

作者简介:汪龙生,女,硕士研究生;

汪庆童,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: hf-wq727@163.com;

魏伟,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

常大鼠 FLS 3~7 代细胞用于本实验。1 × 10<sup>5</sup> 个细胞/ml 接种于内置圆形盖玻片的 24 孔板中,用不含抗生素、含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养。

### 1.2.2 大鼠 FLS ICUE3 荧光探针转染和预处理

在 EP 管内分别将 1.5 μl Lipofectamine 3000 和 1 μg pcDNA3-ICUE3 与 50 μl Opti-MEM 混匀,加入 2 μl P3000 试剂至 pcDNA3-ICUE3 的稀释液中,将包含 P3000 的质粒稀释液加入 Lipofectamine 3000 稀释液中,充分混匀,室温孵育 5 min。然后将近 100 μl 的混合液加到含有细胞的 24 孔板中,培养 48 h 后进行 FRET 检测。在检测前 12 h,部分细胞给予 AH6809(终浓度 10 μmol/L)、L-61982(终浓度 10 μmol/L) 或二者联合预处理。

### 1.2.3 FRET 法检测大鼠 FLS cAMP 含量实时变化

取出细胞爬片置于玻底培养皿中,加入 2 ml PBS,20 倍物镜下观察。应用莱卡 SP8 激光共聚焦显微镜 FRET 模块,根据文献<sup>[6-7]</sup>报道设定各项参数。442 nm 氩离子激光器激发,CFP 接收(480 ± 20) nm 波长信号,YFP 接收(535 ± 20) nm 波长信号。选择 xyt 获取模式,每次拍摄间隔时间设为 20 s,根据实验需要设定拍摄次数。设置比率 = 002 通道/001 通道。在 CFP 图片中圈取细胞,扣除背景荧光。记录 CFP 和 YFP 两个通道的实时荧光强度值和荧光强度比值。

### 1.2.4 放免法检测大鼠 FLS cAMP 含量

2 × 10<sup>4</sup> 个细胞/ml 接种于 24 孔板中,1 μmol/L PGE<sub>2</sub> 刺激后立刻吸弃培养基,加入 50 mmol/L 醋酸缓冲液终止反应,刮下细胞,移入 1.5 ml EP 管中,冰浴超声破碎,4 °C、2 920 r/min 离心 10 min,取上清液,-80 °C 保存<sup>[8]</sup>。采用<sup>125</sup>I-cAMP 检测试剂盒测定 cAMP 浓度,按试剂盒说明书操作,样品在 γ-911 全自动放免计数仪(中国科技大学实业总公司生产)上读取每分钟计数值。

1.3 统计学处理 将 FRET 数据以 EXCEL 格式从激光共聚焦显微镜中导出,采用 GraphPad Prism version 6.0 软件进行分析。由于每个细胞的基础 YFP/CFP 比值不一致,因此分析时将给药时的基础 YFP/CFP 比值设为 K,Y 值转化为 Y/K,此时每个细胞的基础比值均为 1,给药后 Y 值下降的百分比间接反映细胞内 cAMP 产生水平。多组间均数比较采用 One-way ANOVA,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PGE<sub>2</sub> 作用下大鼠 FLS 内 cAMP 浓度发生瞬

时变化 在 CFP 通道圈取荧光较强的细胞(用不同颜色表示每个细胞)和背景(图 2A、B)。记录每个细胞 YFP 和 CFP 的荧光强度变化曲线图(图 2C),及 YFP/CFP 荧光强度比值(图 2D),曲线颜色与图 2A 所圈细胞颜色一致。当比值稳定后,加入终浓度为 1 μmol/L 的 PGE<sub>2</sub>,1 min 后可见比值迅速降低,6 min 左右信号逐渐恢复至正常(图 2D)。原始数据经转化,得到每个细胞基础 YFP/CFP 为 1 的比值转化图,下降的数值反映细胞内 cAMP 增加的百分比。PGE<sub>2</sub> 作用下,正常大鼠 FLS 中 YFP/CFP 比值平均降低 14.93%,提示 cAMP 水平升高了 14.93%,见图 3。

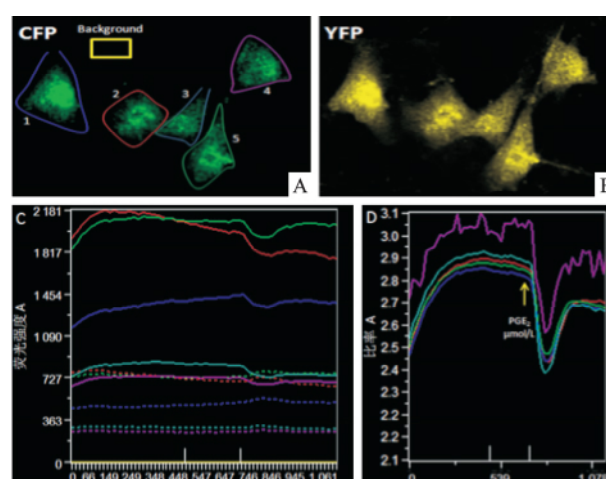


图2 PGE<sub>2</sub> 刺激下 FLS 内 cAMP 含量的实时变化

A: 在 CFP 通道圈取细胞,设背景区域对照; B: FLS 相应的 YFP 图像; C: 每个细胞 CFP(虚线)和 YFP(实线)荧光强度变化曲线; D: 每个细胞 YFP/CFP 比值变化曲线

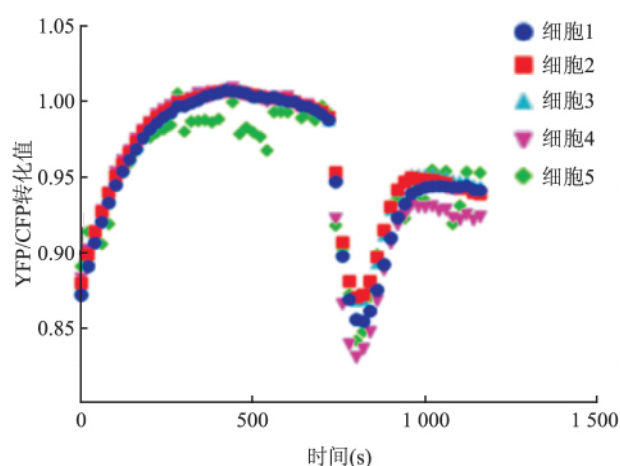


图3 PGE<sub>2</sub> 刺激下 FLS 内的 YFP/CFP 比值转化图

### 2.2 EP 受体拮抗剂可减少 PGE<sub>2</sub> 刺激后大鼠 FLS 内 cAMP 的产生

正常大鼠 FLS 在 1 μmol/L PGE<sub>2</sub>

刺激下 cAMP 升高 ( $14.930 \pm 1.127$ )% , $10 \mu\text{mol/L}$  EP2 选择性拮抗剂 AH6809 预处理 12 h 后 ,FLS 在 PGE<sub>2</sub> 作用下 ,cAMP 产生明显减少 ,比值仅下降 ( $5.353 \pm 1.509$ )% ( $F = 75.210 ,P < 0.001$ ) , $10 \mu\text{mol/L}$  EP4 选择性拮抗剂 L-161982 预处理后 ,PGE<sub>2</sub> 刺激使比值下降 ( $7.862 \pm 1.213$ )% ( $P < 0.001$ ) 联合使用受体拮抗剂 ,PGE<sub>2</sub> 引起的比值下降仅为 ( $2.663 \pm 0.938$ )% ( $P < 0.001$ )。单独激动 EP2 或 EP4 受体 ,产生 cAMP 比同时阻断 EP2 和 EP4 多 ( $P < 0.05 , P < 0.01$ )。以上数据证实了 FRET 法检测细胞内 cAMP 水平变化的准确性。见图 4。

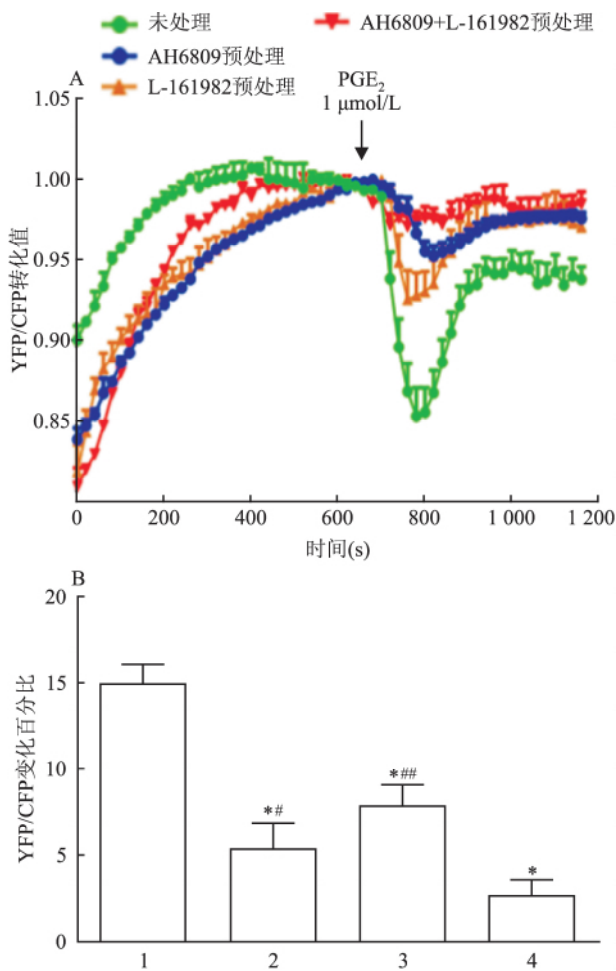


图4 EP受体拮抗剂对PGE<sub>2</sub>作用下FLS产生cAMP的影响

A: 各给药组 PGE<sub>2</sub> 刺激下 FLS 的 YFP/CFP 比值转化图; B: 各给药组 FLS 内 cAMP 产生水平统计图; 1: PGE<sub>2</sub>; 2: EP2 选择性拮抗剂 AH6809 和 PGE<sub>2</sub> 共同作用; 3: EP4 选择性拮抗剂 L-161982 和 PGE<sub>2</sub> 共同作用; 4: AH6809、L-161982 和 PGE<sub>2</sub> 共同作用; 与 PGE<sub>2</sub> 组比较: \*  $P < 0.001$ ; 与 AH + L-161982 + PGE<sub>2</sub> 组比较: #  $P < 0.05$  ,###  $P < 0.01$

2.3 放免法检测 PGE<sub>2</sub> 刺激下 FLS 内 cAMP 的动态变化 放免法检测  $1 \mu\text{mol/L}$  PGE<sub>2</sub> 刺激后 0、1、2、4、6、10 min 大鼠 FLS 内 cAMP 水平的变化 ,显示 PGE<sub>2</sub> 刺激 1 min 时细胞内 cAMP 含量显著升高 ( $F = 3.013 ,P < 0.05$ ) ,但升高幅度为 7.79% ,低于 FRET 法检测得到的 14.93% (图 3) ,之后细胞内 cAMP 水平虽仍高于正常细胞 ,但差异无统计学意义。见图 5。

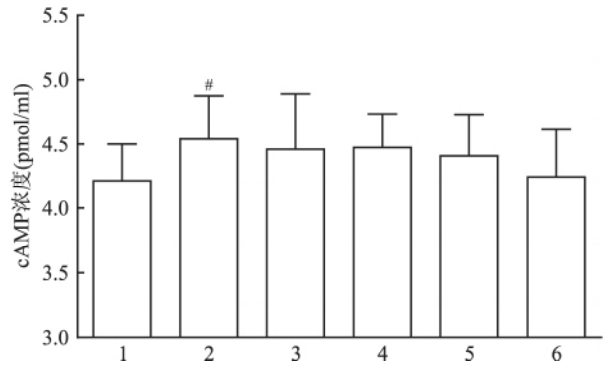


图5 PGE<sub>2</sub> 刺激大鼠 FLS 不同时间点细胞内 cAMP 含量的变化

1: 正常 FLS; 2:  $1 \mu\text{mol/L}$  PGE<sub>2</sub> 刺激 1 min; 3:  $1 \mu\text{mol/L}$  PGE<sub>2</sub> 刺激 2 min; 4:  $1 \mu\text{mol/L}$  PGE<sub>2</sub> 刺激 4 min; 5:  $1 \mu\text{mol/L}$  PGE<sub>2</sub> 刺激 6 min; 6:  $1 \mu\text{mol/L}$  PGE<sub>2</sub> 刺激 10 min; 与正常 FLS 比较: #  $P < 0.05$

2.4 FRET 和放免法检测不同浓度 PGE<sub>2</sub> 刺激下大鼠 FLS cAMP 水平变化 分别用 FRET 法和放免法检测  $1 \mu\text{mol/L}$ 、100、10、1 nmol/L PGE<sub>2</sub> 刺激下 ,大鼠 FLS 内 cAMP 的变化情况 ,结果显示 FRET 法可以观察到 1 nmol/L PGE<sub>2</sub> 使细胞内 cAMP 水平升高 ( $4.600 \pm 0.730$ )% (图 6A、B) ,变化明显 ,而传统的放免法能观察到 PGE<sub>2</sub> 刺激大鼠 FLS 内 cAMP 的升高的最低浓度为  $0.1 \mu\text{mol/L}$  ( $F = 8.051 ,P < 0.05$ ) (图 6C)。提示 FRET 法的检测灵敏度较高。

2.5 FRET 检测 PGE<sub>2</sub> 刺激下大鼠 FLS cAMP 水平变化的重复性实验 转染 3 批细胞 ,进行 3 次重复 FRET 实验 ,用  $1 \mu\text{mol/L}$  PGE<sub>2</sub> 刺激大鼠 FLS ,每次检测 15 ~ 17 个细胞的数据并进行比较 ,结果显示每次实验之间 ,在保持相同的参数、操作步骤和 PGE<sub>2</sub> 浓度时 ,大鼠 FLS 内 cAMP 的变化差异无统计学意义。转染 3 批细胞 ,用  $1 \mu\text{mol/L}$  PGE<sub>2</sub> 刺激 ,分别进行 3 次 FRET 检测 ,所得数据之间差异无统计学意义(图 7) 提示 FRET 法的重复性较好。

### 3 讨论

用 FRET 法观察显示 ,FLS 被 PGE<sub>2</sub> 刺激后 ,细

胞内 cAMP 含量在 1 min 内发生了瞬时改变, 6 min 左右又恢复正常, 且具有较好的重复性。传统的放免法仅检测到 PGE<sub>2</sub> 刺激 1 min 后的 cAMP 水平轻度上升, 可能因为反应的终止需要一定时间, 未能捕捉到 cAMP 的产生高峰。EP 受体拮抗剂的使用, 证

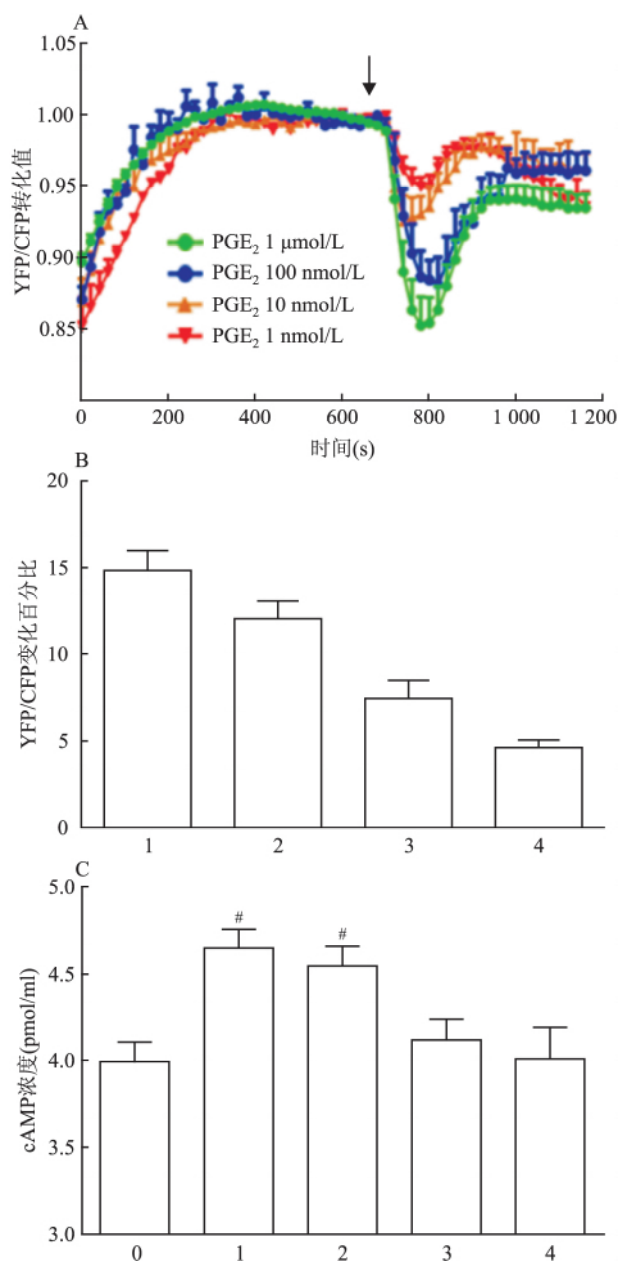


图6 FRET和放免法检测不同浓度 PGE<sub>2</sub>刺激下大鼠 FLS cAMP 水平变化

A: 不同浓度 PGE<sub>2</sub> 刺激下 FLS 的 YFP/CFP 比值转化图; B: FRET 法检测不同浓度 PGE<sub>2</sub> 刺激下 FLS 内 cAMP 含量变化柱状图; C: 放免法检测不同浓度 PGE<sub>2</sub> 刺激下 FLS 内 cAMP 产生水平变化; 0: 正常 FLS; 1: 1 μmol/L PGE<sub>2</sub> 刺激; 2: 100 nmol/L PGE<sub>2</sub> 刺激; 3: 10 nmol/L PGE<sub>2</sub> 刺激; 4: 1 nmol/L PGE<sub>2</sub> 刺激; 与正常 FLS 比较: <sup>#</sup>P < 0.05

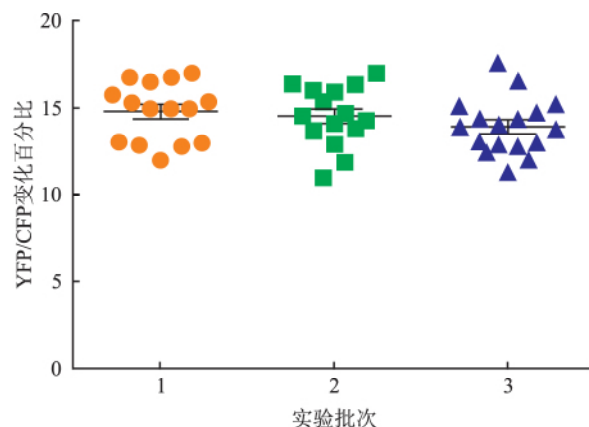


图7 3次 FRET 实验检测 PGE<sub>2</sub> 刺激下大鼠 FLS cAMP 水平变化的比较

实了 FRET 方法的准确性。FRET 法能观察到 1 nmol/L PGE<sub>2</sub> 引起的 cAMP 产生, 而放免法能检测到 cAMP 变化的 PGE<sub>2</sub> 最小浓度为 0.1 μmol/L, 可见 FRET 法的灵敏度远高于放免法。此外放免法使用的放射性元素标记需要防护, 存在环境污染等缺点。采用荧光探针进行 FRET 实验, 可以对活细胞内 cAMP 或其他激酶活性进行快速、简便、灵敏和动态的观察<sup>[9]</sup>, 实验中可反复给药, 进行多种类、多浓度梯度药物作用研究, 为 GPCR 信号通路的研究提供了强大的新手段。

虽然 FRET 法检测 cAMP 具有一定优势, 但与放免法相比, 也有自身的局限性。包括: ① FRET 是非定量的检测方法, 不能检测细胞内 cAMP 的绝对浓度, 只能用于相对的比较; ② 需要在激动剂的使用下才能观察到 cAMP 产生的变化, 不能检测细胞基础 cAMP 水平; ③ 只能检测细胞内的 cAMP 含量变化, 组织中 cAMP 浓度还需要用传统的放免法进行检测。因此, 应根据实验需要选择合适的研究方法。

近年来, 研究者又开发了大量的新型 cAMP 检测探针, 可以检测不同亚细胞结构局部的 cAMP 含量变化情况, 例如将 ICUE3 探针 N 端融合一个细胞膜锚定序列, 构建成 PM-ICUE3, 检测细胞膜上 cAMP 水平变化<sup>[10]</sup>; 将 ICUE3 探针与内质网上的受磷蛋白融合, 构建成 SR-ICUE3, 检测内质网上 cAMP 的实时变化<sup>[11]</sup>; 将 ICUE3 探针 C 末端融合一个核锚定序列, 形成 ICUE3-NLS 探针, 用于检测细胞核局部 cAMP 含量变化等<sup>[12]</sup>, 对 GPCR 信号的局部传导进行精细研究, 有助于深入的认识 cAMP 对细胞功能的调控作用及药物作用靶点。

FRET 的应用十分广泛, ICUE3 荧光探针检测细胞内 cAMP 水平实时变化只是其中一项。FRET 可以检测分子内不同结构域间的距离, 有助于揭示蛋白质结构; 将蛋白质或 DNA 结合上荧光基团后, 可以检测蛋白-蛋白、蛋白-DNA 相互作用; 可用于观察蛋白质空间分布和聚集、核酸杂交、脂质分布与转运等; 应用于各种免疫分析、实时荧光定量 PCR、单核苷酸多态性检测、膜融合实验等; FRET 也是代谢和信号转导以及细胞膜脂筏相关研究的有力工具<sup>[13-14]</sup>。

### 参考文献

- [1] Sasmal D K, Pulido L E, Kasal S, et al. Single-molecule fluorescence resonance energy transfer in molecular biology [J]. *Nanoscale*, 2016, 8(48): 19928-44.
- [2] Perez-Gonzalez C, Lafontaine D A, Penedo J C. Fluorescence-based strategies to investigate the structure and dynamics of aptamer-ligand complexes [J]. *Front Chem*, 2016, 4: 33.
- [3] Klarenbeek J, Jalink K. Detecting cAMP with an EPAC-based FRET sensor in single living cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1071: 49-58.
- [4] Li S Y, Li J, Cao G L, et al. Effect of glucagon on insulin secretion through cAMP signaling pathway in MIN6 cells [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(5): 5974-80.
- [5] 汪庆童, 马昱琨, 黄蓓, 等. 芍药苷通过调节前列腺素 E2 受体抑制大鼠成纤维滑膜细胞增殖 [J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(1): 43-7.
- [6] Nagai Y, Miyazaki M, Aoki R, et al. A fluorescent indicator for visualizing cAMP-induced phosphorylation *in vivo* [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(3): 313-6.
- [7] Kim H, Han GH, Fu Y, et al. Highly sensitive and rapid fluorescence detection with a portable FRET analyzer [J]. *J Vis Exp*, 2016, 116: e54144.
- [8] 彭磊, 张茜, 李荣, 等. 橙皮苷衍生物抗炎活性的筛选研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2011, 46(1): 36-9.
- [9] Wu H, Lee J, Vincent L G, et al. Epigenetic regulation of phosphodiesterases 2A and 3A underlies compromised  $\beta$ -adrenergic signaling in an iPSC model of dilated cardiomyopathy [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(1): 89-100.
- [10] Liu R, Wang D, Shi Q, et al. Palmitoylation regulates intracellular trafficking of  $\beta$ 2 adrenergic receptor/arrestin/phosphodiesterase 4D complexes in cardiomyocytes [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42658.
- [11] Sprenger J U, Perera R K, Steinbrecher J H, et al. *In vivo* model with targeted cAMP biosensor reveals changes in receptor-microdomain communication in cardiac disease [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6965.
- [12] Haj Slimane Z, Bedioune I, Lechêne P, et al. Control of cytoplasmic and nuclear protein kinase A by phosphodiesterases and phosphatases in cardiac myocytes [J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 102(1): 97-106.
- [13] Sugawa M, Okazaki K, Kobayashi M, et al. F1-ATPase conformational cycle from simultaneous single-molecule FRET and rotation measurements [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(21): E2916-24.
- [14] Fernandes F, Coutinho A, Prieto M, et al. Electrostatically driven lipid-protein interaction: answers from FRET [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1848(9): 1837-48.

## Dynamic determination of cAMP level in cell using fluorescence resonance energy transfer assay

Wang Longsheng, Wu Li, Hu Shanshan, et al

(*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University,*

*Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine of Education Ministry of China,*

*Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032)*

**Abstract** Rat fibroblast like synoviocytes (FLSs) was transfected with pcDNA3-ICUE3, and the real time change of cAMP in FLSs upon prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) stimulation was observed by fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay, which was compared with radioimmunoassay. In FLSs, cAMP level increases up to 14.93% within 1 min after PGE<sub>2</sub> administration by FRET determination, and the variation is acceptable between different experiments. Radioimmunoassay revealed an increase of cAMP production by 7.79%. FRET could detect the inhibitory effect of PGE<sub>2</sub> receptor antagonists on cAMP production and could record the response of 1 nmol/L PGE<sub>2</sub>. However, the minimal PGE<sub>2</sub> concentration that could be detected to induce cAMP production by radioimmunoassay is 0.1  $\mu$ mol/L. The data shows that FRET has high sensitivity and repeatability, it would be a reliable method for the study of G protein coupled receptor signaling.

**Key words** fluorescence resonance energy transfer; cAMP; G protein coupled receptor; fluorescence probe; live cell research