

Tách dòng cDNA mã hóa cho thụ thể neurokinin-1 từ mô não người Việt Nam

Võ Thị Thương Lan^{1,*}, Phan Hà My¹, Đinh Đoàn Long^{1,2}

¹Phòng thí nghiệm trong điếm Công nghệ enzyme-protein, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Khoa Y Dược, Đại học Quốc Gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 08 tháng 8 năm 2013

Chỉnh sửa ngày 22 tháng 8 năm 2013; chấp nhận đăng ngày 05 tháng 9 năm 2013

Tóm tắt. Thụ thể neurokinin-1 (NK-1R) thuộc nhóm các thụ thể xuyên màng liên kết với G protein (GPCR). NK-1R đóng vai trò quyết định sự sống còn của các tế bào thần kinh, tham gia vào việc điều hòa các phản xạ nôn, các chức năng về tim mạch, hô hấp và điều chỉnh các hành vi phản xạ. ái lực liên kết với phối tử phụ thuộc vào sự đa dạng trình tự amino acid của NK-1R. NK-1R tái tổ hợp được biểu hiện trong hệ thống tế bào động vật được sử dụng để sàng lọc các chất đối kháng cạnh tranh (chất đối vận) với phối tử trong sản xuất các biệt dược. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả phân lập cDNA hoàn chỉnh từ mô não, trình tự nucleotide và trình tự amino acid suy diễn của NK-1R của người Việt. Sự sai khác ở 4 amino acid so với dữ liệu gốc trong Databank không làm ảnh hưởng đến tính xuyên màng của thụ thể nhưng có thể có ái lực liên kết khác nhau với các loại phối tử. Do đó, cDNA hoàn chỉnh của người Việt tạo cơ sở để biểu hiện NK-1R trong tế bào động vật để sàng lọc được liệu Việt Nam.

Từ khóa: Thụ thể neurokinin-1 (NK-1R), Thụ thể kết cặp G-protein (GPCR), Chất đối kháng thụ thể, người Việt Nam.

1. Tổng quan

Thụ thể neurokinin-1 (NK-1R) thuộc nhóm các thụ thể xuyên màng liên kết với G protein và được biểu hiện nhiều nhất ở não [1]. NK-1R liên kết chủ yếu với chất P ở ngoài tế bào và G protein ở trong tế bào, từ đó truyền tải các tín hiệu đau đớn và gây đáp ứng sinh lí cho tế bào [2]. NK-1R đóng vai trò quyết định sự sống còn của các tế bào thần kinh, tham gia vào việc điều

hòa các phản xạ nôn, các chức năng về tim mạch, hô hấp và điều chỉnh các hành vi phản xạ khác nhau [3]. Ngoài ra, NK-1R còn tham gia vào sự bài tiết đường ruột, điều tiết miễn dịch hay co bóp của cơ trơn trong cơ thể [4, 5]. Đặc biệt, Rosso và cộng sự đã chứng minh vai trò của NK-1R liên quan đến phát triển khối u ác tính [6].

Gen mã hóa cho NK-1R là gen đơn bản. Ở người, gen này nằm trên nhiễm sắc thể số 2, có 5 exon. Trình tự nucleotide của gen *NK1* được Takahashi và cộng sự công bố năm 1991. Trong

* Tác giả liên hệ. ĐT. 84-0988551068
E-mail. vothuthuonglan@bus.edu.vn

thời gian này, trình tự cDNA mã hóa cho thụ thể NK1 ở người cũng được công bố bởi Hopkins và cộng sự [7]. Trình tự protein của thụ thể NK-1R có 407 amino acid ở cả ba đối tượng là người, chuột nhà và chuột đồng. Trình tự amino acid của NK-1R ở người và chuột có độ tương đồng cao 99%, chỉ sai khác 22 amino acid. Sự sai khác này không ảnh hưởng nhiều đến liên kết với chất P hoặc một số chất tín hiệu khác. Tuy nhiên, ái lực liên kết giữa các dạng NK-1R này với các loại thuốc hoặc dược liệu có sự thay đổi rõ rệt [8, 9]. Vì vậy, phân lập các gen mã hóa cho NK-1R từ các tộc người ở các vùng địa lý khác nhau đặc biệt có ý nghĩa trong nghiên cứu chất đối kháng thụ thể.

Các chất đối kháng thụ thể là phối tử (có thể là các thuốc có bản chất hóa học khác nhau) liên kết với thụ thể nhưng không gây ra các phản ứng sinh học hoặc làm giảm hay khóa các phản ứng trung gian của chất chủ vận. Thuốc đối kháng thụ thể cạnh tranh với các phối tử nội sinh để liên kết với thụ thể. Tương tự như vậy, chất đối kháng NK-1R là các hợp chất hay các dược liệu có ái lực liên kết cao với NK-1R, tranh chấp vị trí liên kết của chất P và không gây ra các đáp ứng của cơ thể khi liên kết với thụ thể này [10].

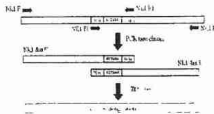
Vào năm 1980, chất đối kháng với các phối tử gắn thụ thể NK1 đầu tiên được tổng hợp thúc đẩy mạnh mẽ các nghiên cứu về thuốc đối kháng NK-1R [3]. Hiện nay, các thuốc đối kháng NK-1R tham gia vào hỗ trợ điều trị lâm sàng các bệnh chủ yếu liên quan đến thần kinh trầm cảm, stress, chứng đau nửa đầu, giảm đau, các triệu chứng của tâm thần rối loạn thần kinh hoặc trong hỗ trợ bệnh nhân hóa trị liệu [8, 9]. Mặc dù NK-1R và chất đối kháng NK-1R có ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực y, được, nhưng các nghiên cứu về NK-1R ở Việt Nam

vẫn còn rất ít hoặc chưa được công bố. Nghiên cứu này của chúng tôi trình bày kết quả phân lập cDNA hoàn chỉnh mã hóa cho NK-1R từ người Việt Nam nhằm mục đích chủ động biểu hiện thụ thể này cho các nghiên cứu tiếp theo về sàng lọc các chất đối kháng từ dược liệu Việt Nam.

2. Nguyên liệu và phương pháp

Mẫu u não sau phẫu thuật được giữ ngay trong nitơ và được sử dụng để tách chiết ARN tổng số bằng PureLink Kit (Invitrogen). Hai µg RNA tổng số được dùng làm khuôn trong phản ứng phiên mã ngược tổng hợp cDNA sử dụng ứng oligoT và enzyme *Reverse Transcriptase* (Invitrogen). Phản ứng được thực hiện theo quy trình hướng dẫn của Invitrogen.

Phản ứng RT-PCR được thực hiện để khuếch đại riêng biệt hai đoạn 5' và 3' của cDNA bằng các cặp mỗi NK1 F: 5' CGAAATGGATAACGTCCT CCC 3' và NK1 R1: 5' GCCAGCAGATGGCGA AGG 3' (nhân bản đoạn 5'), cặp mỗi NK1 F1: 5' GATCTACTTCCCTCCCCTGC 3' và NK1 R: 5' CAAGTCCCAGTGTGAGGGTG 3' (nhân bản đoạn 3'). Phản ứng sử dụng 5 µl cDNA với chu trình nhiệt lặp lại 40 chu kỳ (94°C 5 phút; 60°C 30"; 72°C 90"). Sản phẩm sau đó được xử lý với enzyme *SmaI* và nối với nhau nhờ DNA ligase tạo nên cDNA hoàn chỉnh để tách dòng trong vector pJET1.2 và biến nạp vào *E. coli* DH5. Các phản ứng PCR đều sử dụng enzyme Pfu Taq polymerase có hoạt tính đọc sửa để đảm bảo tính chính xác trong quá trình nhân bản. Trình tự cDNA được xác định trên máy tự động. Sơ đồ phản ứng được trình bày trên Hình 1.

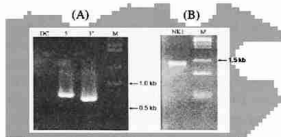


Hình 1. Sơ đồ phân lập cDNA thụ thể NK1 sử dụng các cặp mỗi nhân bản vùng 5' và vùng 3' riêng biệt.

3. Kết quả

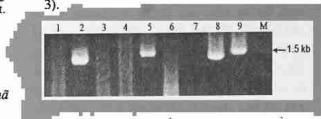
3.1. Phân lập hai đoạn 5' và 3' của cDNA mã cho thụ thể NK-1R.

Sử dụng hai cặp mỗi NK1 F/NK1 R₁; NK1 F₁/NK1 R trong phản ứng PCR, chúng tôi phân lập hai đoạn NK1- 5' và NK1- 3' tương ứng với hai vùng 5' và 3' của NK1, sử dụng khuôn là cDNA. Kết quả khuếch đại hai đoạn rõ nét có kích thước như tính toán là 788 bp và 728 trình bày trong Hình 2A Hai đoạn NK1-5' và NK1-3' được cắt với *Sma*I, được tinh sạch bằng Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) và được nối với nhau bằng DNA ligase. Sản phẩm nối được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp mỗi NK1 F/NK1 R để khuếch đại đoạn DNA 1,4 kb tương ứng với cDNA-NK1 hoàn chỉnh (Hình 2B).



Hình 2. Điện di sản phẩm PCR phân lập NK1-5' và NK1-3' (A) và NK1 hoàn chỉnh (B). Giếng 5': đoạn NK1-5'; Giếng 3': đoạn NK1-3'; DC: đối chứng âm không có khuôn cDNA; Giếng NK1: cDNA hoàn chỉnh của NK1. M: Thang chuẩn SY-500.

Sản phẩm 1,4 kb được tinh sạch bằng Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), được tách dòng trong vector pJet1.2 (Fermentas) và được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5α. Các khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch LB bổ sung Ampicillin được chọn để sàng lọc plasmid tái tổ hợp mang cDNA-NK1 bằng PCR (Hình 3).



Hình 3. Điện di sản phẩm PCR sàng lọc khuẩn lạc với cặp mỗi pJET F/R. Giếng 45-53: Các khuẩn lạc được sàng lọc; DC: Đối chứng âm không có khuôn ADN; M: Thang chuẩn SY – 500.

3.2. Xác định trình tự nucleotide cDNA hoàn chỉnh của thụ thể NK-1R

Plasmid tái tổ hợp được tách chiết từ dòng khuẩn lạc (số 5, 9 – Hình 3) và được xác định trình tự trên máy đọc tự động. Kết quả so sánh với dữ liệu trong Databank cho thấy trình tự protein suy diễn của thụ thể NK1 phân lập ở người Việt Nam có 4 amino acid sai khác so với trình tự trong Databank (Hình 4 và Bảng 1).



Hình 4. So sánh trình tự amino acid suy diễn của thụ thể NK1 ở người Việt Nam với trình tự gốc trong Databank.

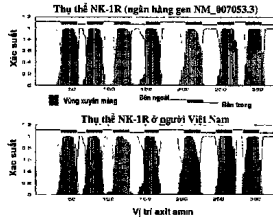
Bảng 1. Sai khác về trình tự amino acid giữa thụ thể NK1 của người Việt với trình tự protein trên NCBI

Acid amin (NM_007053.3)	Acid amin (Mẫu người Việt Nam)
κ - Arginine (62)	G - Glycine
I - Threonine (124)	A - Alanine
Y - Tyrosine (214)	C - Cysteine
E - Glutamic acid (332)	G - Glycine

(Chú thích: (62), (124), (214) và (332) là vị trí của các amino acid trong trình tự protein gốc).

4. Thảo luận

Khi đối chiếu những sai khác về acid amin trên cấu trúc 2D của thụ thể NK-1R, chúng tôi nhận thấy rằng ba vị trí quan trọng liên quan đến chức năng của thụ thể [1] đều không bị thay đổi. Cho đến nay vẫn chưa có tài liệu nào công bố về cấu trúc 3D của thụ thể NK-1R. Vì vậy, những chuyển động hay những biến đổi của thụ thể NK-1R khi liên kết với chất P cũng như G-protein đều chưa được biết rõ [4]. Hiện tại, những thay đổi trong cấu trúc 3D của thụ thể NK-1R được so sánh với thụ thể GPCR β_1 -adrenergic khi xem xét những biến đổi trong quá trình được hoạt hóa. Với thụ thể NK-1R ở người Việt Nam, chỉ một amino acid sai khác được cho có thể liên quan đến quá trình hoạt hóa thụ thể NK-1R. Tuy nhiên amino acid sai khác này vẫn là amino acid ưa nước giống như amino acid tại cùng vị trí trong trình tự gốc [7]. Sử dụng phần mềm **TMHMM server 2.0** [11] để kiểm tra tính xuyên màng của trình tự protein suy diễn thu được, chúng tôi nhận thấy cả 4 sai khác amino acid nhiều khả năng không ảnh hưởng đến tính xuyên màng (Hình 5).



Hình 5. Kiểm tra tính xuyên màng của protein thụ thể NK1 gốc (Databank) và protein suy diễn của thụ thể NK1 phân lập từ người Việt Nam bằng phần mềm TMHMM server 2.0 [11].

5. Kết luận

Chúng tôi đã phân lập được cDNA hoàn chỉnh mã hóa cho thụ thể NK1 ở người Việt Nam. Trình tự amino acid suy diễn cho thấy có 4 sai khác so với trình tự gốc trong Databank. Tuy nhiên phân tích mô phỏng cho thấy sự sai khác này có lẽ không ảnh hưởng đến tính xuyên màng của thụ thể mà chúng tôi phân lập được. cDNA hoàn chỉnh sẽ được biểu hiện trong tế bào động vật nuôi cấy, xây dựng hệ thống thử thuốc mới nhằm sàng lọc các chất đối kháng từ nguồn dược liệu nước ta.

Lời cảm ơn

Chúng tôi trân trọng cảm ơn sự tài trợ của Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam cho đề tài ĐT-PTNTĐ.2011-G/04 để thực hiện nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

- [1] T.A Almeida, J. Rojo, P.M Nieto, F.M. Pinto, M. Hernandez, J.D. Martín, M.L. Candenas. Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. Bentham Science Publishers 11 (2004), 2045
- [2] E.W. Greeno, P. Mantyh, G.M. Vercellotti, C.F. Moldow. Functional neurokinin 1 receptors for substance P are expressed by human vascular endothelium. *The Journal of Experimental Medicine* 177 (1993), 1269.
- [3] L. Quartara, C.A Maggi. The tachykinin NK₁ receptor. Part I: Ligands and mechanisms of cellular activation. *Neuropeptides* 31(1997), 537.
- [4] J. InHae, H.J. Tae. Differential roles of exolooop 1 of the human follicle-stimulating hormone receptor in hormone binding and receptor activation. *J Biological Chemistry* 270 (1995), 15970.
- [5] T. Kincy-Cain, K.L Bost. Increased susceptibility of mice to *Salmonella* infection following *in vivo* treatment with the substance P antagonist, spantide II. *The Journal of Immunology* 157 (1996), 255.
- [6] M Rosso, M. Munoz, M. Berger. The Role of Neurokinin-1 Receptor in the Microenvironment of Inflammation and Cancer. *The Scientific World Journal* (2012), Doi.10.1100/2012/381434
- [7] B. Hopkins, S.J. Powell, P. Danks, I. Briggs, A. Graham. Isolation and characterization of the human lung NK-1R cDNA. *Biochemical and Biophysical Research Comm.* 180 (1991), 1110.
- [8] I. Marriot, K.L Bost. Substance P. *University of North Carolina.* (2001), DOI: 10.1006/rwcy.2001.13005.
- [9] M.P. Rogers, L. Blackburn, MS, et al. Use of Neurokinin - 1 receptor antagonists in patients receiving moderately or highly emetogenic chemotherapy. *Clinical Journal of Oncology Nursing* 14 (2010), 500.
- [10] M.J.N Ruptnigak, M.S Kramer. Substance P and related tachykinins. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress* 8 (2002), 169.
- [11] <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>

Isolation of full Length cDNA Encoding NK1 Receptor from Vietnamese Brain Tissue

Võ Thị Thương Lan¹, Phan Hà Mỹ¹, Đinh Đoàn Long^{1,2}

¹Key Lab for Enzyme-Protein Technology, VNU University of Science,
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hanoi, Vietnam

²School of Medicine and Pharmacy, Vietnam National University,
144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hanoi, Vietnam

Abstracts: The NK1 receptor (NK-1R) is a member of family I of G-protein coupled receptors (GPCR). NK-1R is widely distributed in both the central and peripheral nervous system. It plays an important role in pain and inflammation, and mediating chemotherapy-induced nausea and vomiting. High affinity of receptor - ligands and receptor activation are associated with the diverse and differential roles of the amino acids of NK1 receptors. The recombinant NK-1R has been used for pharmacological studies and in methods of screening candidate compounds for the ability to antagonize the binding of specific ligands to NK-1R. In this study, we isolated full length cDNA encoding NK-1R from Vietnamese brain tissue. Nucleotide sequencing and deduced peptide sequence revealed 4 different amino acids as compared to that presented in databank and that these variant acids did not appear to influence transmembrane domains. However, these variants might alter the affinity interaction between NK-1R and its ligands. Recombinant NK1R corresponding to cDNA isolated from Vietnamese people expressed in mammalian cells would be useful for pharmacological studies and in screening candidate compounds extracted from Vietnamese herbal medicines.

Keywords: Neurokinin-1 receptor (NK-1R), G-Protein coupled receptor, antagonist, Vietnamese.