

文章编号: 1000-5641(2012)06-0073-08

GPR41 稳定细胞株的建立及受体激动剂筛选

吴 璿, 董素珍

(华东师范大学 脑功能基因组学教育部重点实验室、上海市脑功能基因组学重点实验室, 上海 200062)

摘要: 构建 GPR41 稳定细胞株, 从 RNA、蛋白水平验证了 GPR41 的表达并利用 cAMP 和钙流检测验证了 GPR41 的生物活性. 实验结果表明, 该细胞株可以用于筛选受体激动剂. 从海藻来源的黄曲霉中提取到的次级代谢产物用于筛选 GPR41 的激动剂. 实验结果还表明, 2-吡喃酮类化合物(37 号)在 $1\mu\text{mol/L}$ 浓度条件下即可具有 GPR41 受体激动活性. 这是首次报道 2-吡喃酮类化合物具有 GPR41 受体激动活性.

关键词: GPR41; 稳定细胞株; 海洋真菌次级代谢产物; 配体

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1000-5641.2012.06.008

Establishment of GPR41 stable cell line and agonist screening of GPR41 receptor

WU Jin, DONG Su-zhen

(Key Laboratory of Brain Functional Genomics, Ministry of Education, Shanghai Key Laboratory of Brain Functional Genomics, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: In this study, a stable GPR41 receptor cell model was established. The GPR41 expression was detected by RT-PCR and western blot, while the function of GPR41 was confirmed by cAMP and Ca assays. These results have shown that we have successfully established GPR41 cell line which can be used for screening the agonists of the receptor in vitro. GPR41 receptor binding activity was tested by cAMP assay using secondary metabolites extracted from gulf seaweed aflatoxin c-f-3 in Putian Fujian. The results have also shown that the No. 37 compound, a new compound belonging to 2-Pyrones, has GPR41 receptor agonist activity with high affinity. This is the first report on 2-Pyrones with GPR41 receptor agonist activity.

Key words: GPR41; stable cell line; secondary metabolites of marine fungi; agonist

0 引 言

GPR40 家族包含 4 个成员(GPR40、GPR41、GPR42 和 GPR43), 该家族在人、小鼠及大鼠等物种间的氨基酸序列高度保守^[1]. 其中 GPR41 的表达分布较为广泛, 在脂肪组织中的

收稿日期: 2011-11

基金项目: 国家自然科学基金(31000574); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(78210042)

第一作者: 吴璿, 女, 博士研究生. E-mail: ecnuwujin@hotmail.com.

通信作者: 董素珍, 女, 助理研究员. E-mail: szdong@brain.ecnu.edu.cn.

表达量最高,在单核细胞和嗜中性粒细胞中也有表达^[2].自1997年发现GPR41受体以来,因未发现其配体故GPR41一直被归为孤儿GPCR.直到2003年,Brown等人发现GPR41的配体是短链脂肪酸^[3].短链脂肪酸是指碳原子数小于6个的有机脂肪酸,乙酸盐(C2)、丙酸盐(C3)和丁酸盐(C4)是最主要的短链脂肪酸,主要由食物中不被消化的碳水化合物经厌氧菌酵解生成,为胃肠道上皮细胞提供了主要的能量来源^[2].短链脂肪酸除了作为能量来源,还可以参与诱导细胞分化和促进细胞凋亡等生理现象.GPR41的去孤儿化,促使人们重新思考短链脂肪酸在体内发挥作用的方式.已有研究表明GPR41参与调节瘦素的分泌,这表明GPR41可参与能量代谢过程^[4].鉴于GPCRs在制药领域占有极其重要的地位,对于创新药物研究意义重大,而且目前对GPR41的配体筛选以及功能所知甚少,因此本实验构建了GPR41稳定细胞株,用于筛选GPR41的激动剂或拮抗剂.

在现代药物研究中,天然产物的开发和利用占据着重要的位置.而海洋资源的开发逐渐成为热点,因为海洋环境具有高盐、高压、低温等特点,海洋生物为了适应这样独特的生存环境,渐渐进化出了与之相适应的代谢系统和机体防御系统.在海洋生物及其代谢产物中,已经发现了许多新颖的生物活性物质,如抗肿瘤药物、生物毒素、酶抑制剂、抗病毒化合物以及抗菌素等^[5].在海洋生物资源中,海洋真菌具有种类繁多、分布广泛、次级代谢产物量大、生物活性物质种类丰富等特点,研究海洋真菌次级代谢产物逐渐成为开发海洋药物资源的重要内容.将GPR41受体稳转细胞模型用于筛选从福建莆田平海湾海藻来源的黄曲霉 *c-f-3* (*Aspergillus flavus*)中提取到的次级代谢产物.通过cAMP检测法对上述单体化合物进行受体结合活性的筛选,希望能够找到GPR41潜在的受体激动剂,为后续的研究奠定基础.

1 材料与amp;方法

1.1 材料

人类基因组DNA、DNA连接试剂盒和Lipofectamine 2000转染试剂购自Invitrogen公司;Taq酶、脱氧三磷酸核苷酸(dNTP)、限制性内切酶和Trizol试剂购自TaKaRa公司;质粒及核酸片段纯化试剂盒、Western显影用BCIP/NBT显影液购自Promega公司;RP-MI-1640培养基、胎牛血清、青霉素、链霉素和G418购自Gibco公司;Blasticidin和兔抗c-Myc多克隆抗体购自Sigma;cAMP检测试剂盒购自法国CIS生物公司;钙流检测试剂盒购自Molecular Devices公司;大肠杆菌*E. coli* DH5 α 感受态细胞、pcDNA3.1-N-myc和G α 载体由本实验室保存;用于cAMP测试的单体化合物为中国海洋大学分离提纯并提供^[6];其余化学试剂均为国产分析纯试剂.

1.2 实验仪器

PTC100 PCR仪购自东胜创新生物科技有限公司;凝胶成像仪购自基因公司;紫外分光光度计购自Eppendorf公司;CO₂培养箱购自Thermo Life sciences公司;Analyst HTTM仪和FlexStation II Reader读板仪购于Molecular Devices公司.

1.3 方法

1.3.1 GPR41-pcDNA3.1质粒的构建

参照GenBank中提供的人GPR41的序列(序列号NM_005304)设计并合成PCR扩增引物,以人类基因组DNA为模板扩增得到GPR41全长序列.

引物序列如下:

上游引物: 5'-GGGGTACCATGGATACAGGCCCGAC-3';

(斜体表示上游酶切位点 KpnI)

下游引物: 5'-CCGCTCGAGCTAGCTTTCAGCACAGGCA-3'

(斜体表示下游酶切位点 XhoI)

运用酶切连接等基因工程手段将 GPR41 序列插入 pcDNA3.1-N-myc 载体, 构建 GPR41-pcDNA3.1 重组质粒. 经酶切和测序鉴定确认重组子的序列.

1.3.2 细胞培养

野生型中国仓鼠卵巢细胞(CHO)购自中科院上海生物研究所细胞库. 该细胞用含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 RPMI-1640 培养基培养. 待实验用细胞处于对数生长期, 且细胞密度达到 80%~90% 时进行转染实验.

1.3.3 GPR41 稳定细胞株的建立

将 GPR41-pcDNA3.1 重组质粒与 pcDNA3.1 空载体分别转染 CHO 细胞, 操作方法按脂质体转染试剂 Lipofectamine2000 说明书进行. 转染 48 h 后, 用含有 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 抗生素的筛选培养基进行筛选. 将 $G\alpha$ 质粒与 GPR41-pcDNA3.1 或 pcDNA3.1 空载体共转染 CHO 细胞, 操作方法如上所述. 转染 48 h 后, 用含有 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 和 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Blastidin 的筛选培养基进行筛选. 以野生型 CHO 细胞作为筛选的阴性对照. 待野生型 CHO 细胞全部死亡后, 将具有抗生素抗性的稳定转染细胞株, 进行单克隆筛选. 经筛选的单克隆细胞株(GPR41-CHO)或(GPR41- $G\alpha$ -CHO)用于后续检测鉴定.

1.3.4 用 RT-PCR 方法检测稳转单克隆 GPR41 的表达

提取 GPR41-CHO 总 RNA, 经反转为 cDNA 后, 用 PCR 方法检测 GPR41 的表达. 设计并合成检测 GPR41 基因的引物, 以 GAPDH 基因作为内参.

GPR41 引物序列 上游引物: 5'-ttcttcaccaccatctatctacc-3';

下游引物: 5'-aattctatgacgtagaccacgctg-3'.

GAPDH 引物序列 上游引物: 5'-catcatccctgcattccactg-3';

下游引物: 5'-tgcttgcctcaccaccttct-3'.

1.3.5 Western Blot 检测稳转单克隆 GPR41 的表达

根据 RT-PCR 的结果挑选稳转单克隆, 用 Western 及 IP 细胞裂解液、1 mmol/L PMSF 和 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的 Cocktail 蛋白酶抑制剂提取细胞总蛋白. 经 BCA 法测定总蛋白浓度后, 用于 Western Blot 检测. 经 SDS-PAGE 电泳、转膜后, 用丽春红染色. 经双蒸水或 TBST 充分漂洗后, 在 5% BSA 中室温封闭 1 h. 按 1:1 000 的比例稀释一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜. 经漂洗后孵碱性磷酸酶连接的二抗, 充分漂洗后用 BCIP/NBT 显影.

1.3.6 cAMP 法检测稳转单克隆 GPR41 的活性

根据 RT-PCR 和 Western Blot 的结果筛选部分 GPR41-CHO 稳转单克隆, 以每孔 10^3 个细胞的密度铺 384 孔板(孔底和孔壁均为黑色)培养 24 h. 因为 GPR41 属于 G_i 偶联的受体, 受体激活后会导导致 cAMP 水平降低, 故需要先用 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Forskolin 孵育细胞 30 min 后, 再进行 cAMP 检测. 按照法国 CIS-Bio 公司 cAMP 检测试剂盒的说明书操作, 细胞内源 cAMP 与 XL665 标记的 cAMP 竞争结合 cAMP 抗体, 根据 665 nm/620 nm 的荧光值计算并分析细胞内 cAMP 水平的变化情况.

1.3.7 钙流检测稳转单克隆 GPR41 的活性

筛选部分 GPR41-G α -CHO 稳转单克隆,以每孔 3×10^4 个细胞的密度铺 96 孔板(透明底黑色壁),37 °C 培养 24 h. 按照 Molecular Devices 公司钙流检测试剂盒的说明书配制 Loading Buffer,并加入终浓度 1.25 mmol/L Probenecid 和 2.5 μ mol/L 的 Fluo-3 AM 荧光染料. 混匀后,按照每孔 100 μ L 加入细胞孔内. 37 °C 孵育 1 h 后,利用 FlexStation II Reader 读板仪收集细胞孔内的荧光信号.

1.3.8 GPR41 稳定细胞株受体激动剂的筛选

用 cAMP 方法从海洋真菌次生代谢产物中筛选 GPR41 受体激动剂,cAMP 检测方法如前所述,用于测试的单体化合物的浓度为 10 μ mol/L,1 μ mol/L 和 100 nmol/L,每个浓度做 3 个平行孔.

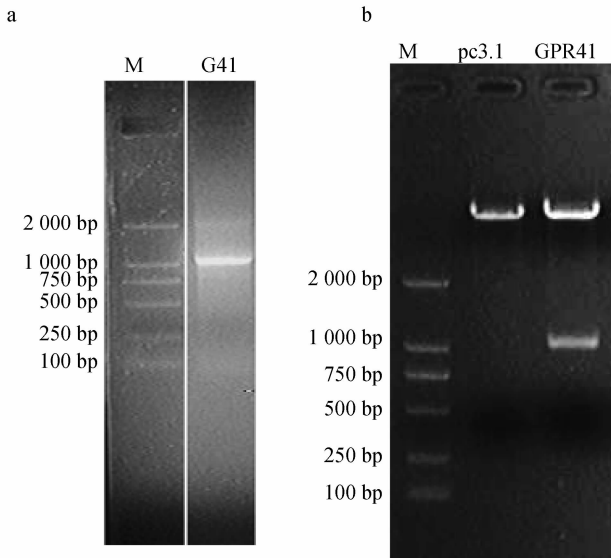
1.3.9 数据处理及分析

本实验所有数据及作图均用 Sigma-Plot 9.0 软件处理,每组实验均重复 3 次. 结果用平均值 \pm 标准误差表示.

2 实验结果

2.1 GPR41-pcDNA3.1 质粒的构建

从人基因组中用 PCR 扩增人 GPR41 基因全长片段,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,符合预期片段大小(1 041 bp). 琼脂糖凝胶电泳结果见图 1a. GPR41-pc3.1 重组质粒经酶切后电泳结果见图 1b,酶切片段大小符合预期. 将重组质粒测序后,测序结果与 GenBank 检索的 GPR41 基因序列(序列号 NM_005304)完全一致.



注: a PCR 反应获得全长的 GPR41 基因的电泳结果;b 酶切鉴定重组质粒 GPR41-pcDNA3.1

图 1 GPR41-pcDNA3.1 质粒的构建

Fig. 1 Construction of GPR41-pcDNA3.1 plasmid

2.2 RT-PCR 法检测 GPR41 的表达

提取细胞总 RNA 反转录为 cDNA,从 RNA 水平检测稳定细胞株中 GPR41 的表达. 图

2 的 RT-PCR 结果表明在空载体转染的 CHO 细胞中,无 GPR41 的扩增条带;而 GPR41-CHO 细胞中有明亮的扩增条带,说明在 RNA 水平上检测到 GPR41 的表达.

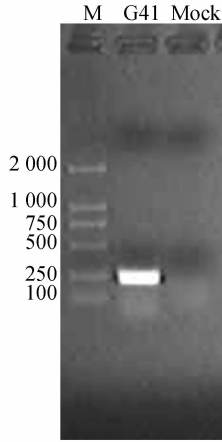
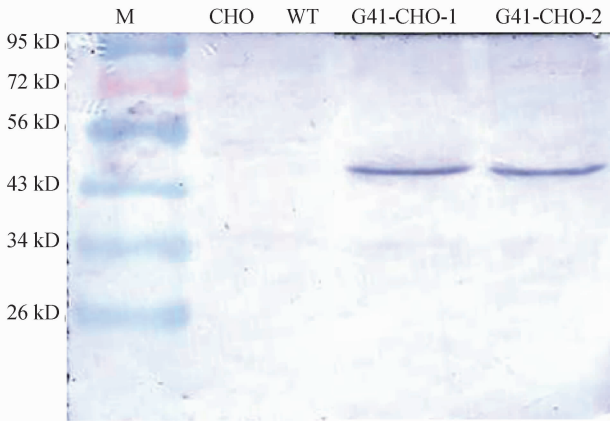


图 2 RT-PCR 检测 RNA 水平 GPR41 的表达结果

Fig. 2 RT-PCR results to detect the RNA expression of GPR41

2.3 Western Blot 检测 c-Myc 标签的表达

选取部分定量结果较好的细胞克隆,用 Western Blot 检验 GPR41 质粒所带的 c-Myc 标签的表达,间接反应 GPR41 的蛋白的表达水平. 目的蛋白的大小应为 GPR41 与 c-myc 融合蛋白的大小. 图 3 的 Western Blot 结果表明在野生型 CHO 细胞中,无目的条带的表达;而 GPR41-CHO 不同的单克隆细胞株中有蓝紫色的显色条带,说明在蛋白水平上检测到 GPR41 的表达.



注:PC3.1 载体上携带有 c-myc 标签,通过检测 c-myc 的表达,间接反映 GPR41 的在蛋白水平上的表达

图 3 Western Blot 方法检测蛋白水平 c-myc 的表达结果

Fig. 3 Determination of GPR41 protein levels in CHO WT and transfected cells using western blot

2.4 GPR41 稳转细胞株中 GPR41 功能的检测

根据 Western Blot 结果,选取部分 GPR41-CHO 克隆用 cAMP 方法检测 GPR41 受体的功能. 前人研究已经证实 GPR41 属于 Gi/o 偶联受体^[7],因此需要先用腺苷酸环化酶的激

活剂 forskolin 诱导细胞内 cAMP 水平升高,当 GPR41 受体与其配体结合后,引起 cAMP 浓度降低,以此来测定 GPR41 的活化情况.如图 4cAMP 实验结果显示,10 $\mu\text{mol/L}$ forskolin 在 GPR41 过表达细胞和 Mock 细胞中引起 cAMP 水平上升 3 倍左右.500 $\mu\text{mol/L}$ 丁酸钠引起 G41 过表达的细胞株 cAMP 水平降低且有显著差异($P < 0.05$),而在 mock 细胞中 cAMP 水平未见明显变化($P > 0.05$).选取部分 GPR41-G α -CHO 克隆用于检测钙流.实验结果如图 5 所示.500 $\mu\text{mol/L}$ 丁酸钠作用于对照组细胞没有引起钙流的变化,而作用于 GPR41-G α -CHO 细胞株时引起了钙流的变化.上述实验结果表明 GPR41 稳定细胞株构建成功可以用于筛选 GPR41 受体的激动剂.

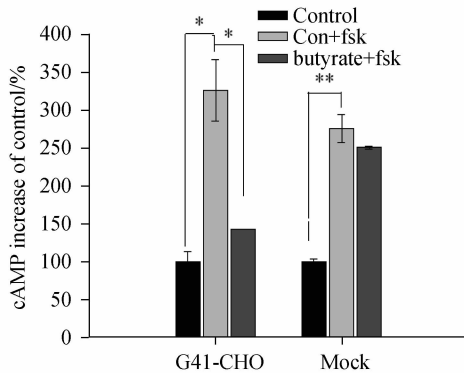


图 4 500 $\mu\text{mol/L}$ 丁酸钠和 10 $\mu\text{mol/L}$ forskolin 分别作用于 G41-CHO 和 Mock 细胞引起的 cAMP 水平变化

Fig. 4 Effect of butyrate (500 $\mu\text{mol/L}$) and forskolin (10 $\mu\text{mol/L}$) on the release of cAMP in GPR41-CHO and the mock cells

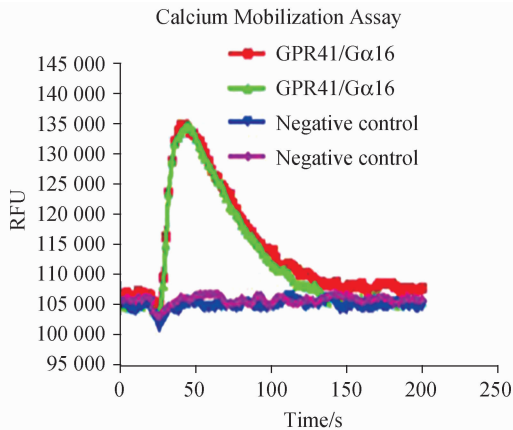


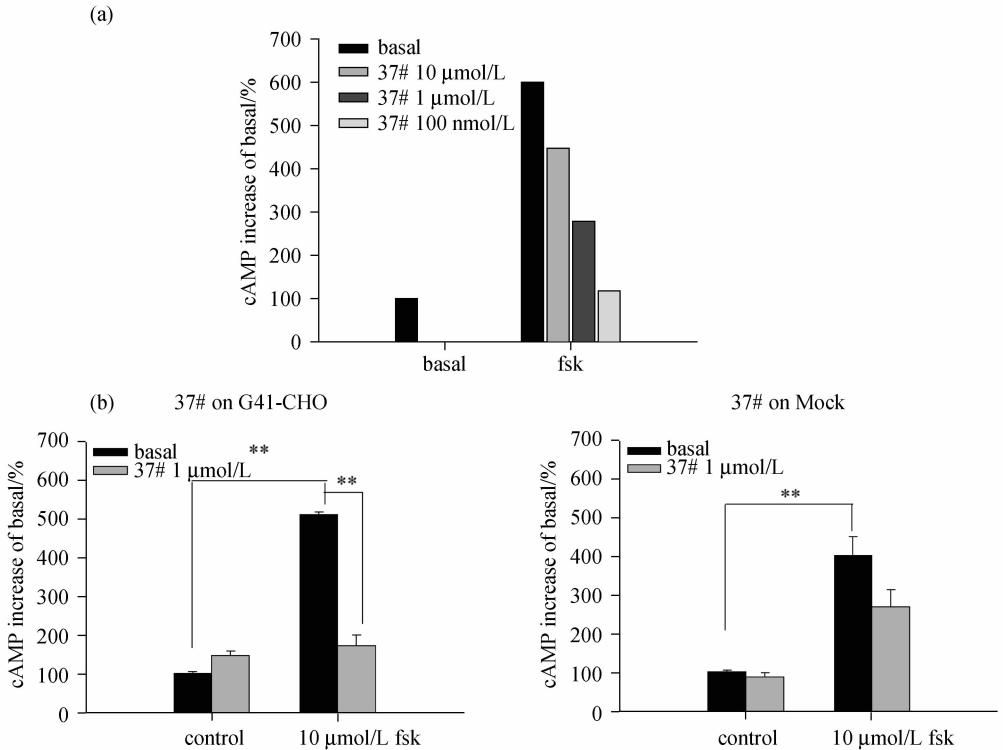
图 5 500 $\mu\text{mol/L}$ 丁酸钠作用于 GPR41-G α -CHO 和 Mock 细胞引起钙流变化

Fig. 5 Effect of butyrate (500 $\mu\text{mol/L}$) on the release of calcium in GPR41-G α -CHO and the mock cells

2.5 GPR41 稳定细胞株受体激动剂的筛选结果

每种单体化合物在初筛过程中选取 3 个作用浓度 10 $\mu\text{mol/L}$, 1 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 nmol/L, 根据初筛结果, 选取有响应的化合物进行复筛, 每组设置 3 个平行孔, 以确保筛选结果的准确. 实验结果如图 6 所示, 10 $\mu\text{mol/L}$ forskolin 可以显著提高 GPR41-CHO 和 mock 细胞

中 cAMP 的水平,37 号化合物可以显著降低 GPR41-CHO 细胞的 cAMP 水平($P < 0.01$),而 mock 细胞中 cAMP 水平则没有明显变化($P > 0.05$).该实验结果说明,37 号化合物可能是 GPR41 受体的潜在激动剂,在 $1 \mu\text{mol/L}$ 的浓度下即可引起细胞内 cAMP 水平的降低.其余化合物未见类似作用.



注: $10 \mu\text{mol/L}$ forskolin 预处理 GPR41-CHO 细胞后, $10 \mu\text{mol/L}$, $1 \mu\text{mol/L}$ 和 100 nmol/L 37 号化合物作用于 GPR41-CHO 细胞引起 cAMP 水平降低, 具有剂量依赖效应; 以 $1 \mu\text{mol/L}$ 37 号化合物作用于 GPR41-CHO 细胞, 引起 cAMP 水平降低, 而将 $1 \mu\text{mol/L}$ 37 号化合物作用于 mock 细胞, cAMP 水平无显著差异

图 6 (a) 37 号化合物作用于 G41-CHO 初筛结果; (b) 37 号化合物作用于 G41-CHO 和 Mock 细胞引起 cAMP 水平变化

Fig. 6 (a) Primary screen results of No. 37 compound on cAMP accumulation in GPR41-CHO cells; (b) Effect of No. 37 compound on cAMP accumulation in GPR41-CHO and Mock cells

3 讨 论

G 蛋白偶联受体 GPR41 在多种组织中均有表达, 而且在人、小鼠及大鼠等物种间的氨基酸序列高度保守. 自从 2003 年发现 GPR41 的配体是短链脂肪酸后, 已有研究表明 GPR41 与能量代谢密切相关. 但是目前关于 GPR41 受体的功能和 GPR41 受体激动剂的研究仍需深化, 因此本实验将研究目的确定为 GPR41 受体激动剂的筛选, 为后续研究该受体的功能, 以及揭示 GPR41 在生理和病理条件下扮演的角色打下基础.

本文首先选择中国仓鼠卵巢细胞(CHO)作为细胞表达系统, 因为 CHO 细胞具有转染效率高、细胞容易操作、背景干净、内源性干扰小等特点^[2]. 在构建 GPR41-CHO 稳定细胞株后, 首先运用 RT-PCR 和 Western Blot 检测了 RNA 水平和蛋白水平上 GPR41 的表达,

但是上述检测的阳性结果并不足以说明构建的 GPR41 具有活性. 随后利用 cAMP 和钙流检测, 从功能水平上进行了验证. 实验结果显示, 当配体丁酸钠与 GPR41 受体相结合时, 可以通过 cAMP 水平的高低来评估受体激动剂的活性. 本实验构建的 GPR41 具有受体活性, 过表达细胞株构建成功. 短链脂肪酸作为 GPR41 低亲和力的配体, 短链脂肪酸激活 GPR41 的浓度范围在微摩尔数量级(几百微摩尔至毫摩尔)^[8]. 短链脂肪酸相对的“低效”可能与它在血液中浓度较高以及其生理功能相关. GPR41 作为短链脂肪酸的低亲和力受体, 只在短链脂肪酸水平异常升高的情况下才会被激活, 因此可以避免受体的持续活化^[9]. 除此之外, 短链脂肪酸也并非 GPR41 特异性的配体, 不同碳链长度的短链脂肪酸, 对于 GPR41 激活有不同的效力. 因此筛选特异性高、亲和力强的配体成为本课题的研究目标. 筛选的范围锁定在从福建平海湾海藻来源的黄曲霉中提取的一系列次级代谢产物^[10], 因为海洋真菌次生代谢产物种类繁多, 生物活性物质丰富. 近年来已经从海洋真菌次生代谢产物中发现了多种抗肿瘤药物、生物毒素和酶抑制剂等生物活性物质, 研究海洋真菌次级代谢产物逐渐成为开发天然药物资源的重要内容.

cAMP 筛选结果表明, 在 GPR41 细胞中, 1 $\mu\text{mol/L}$ 37 号化合物能够降低由 forskolin 引起的 cAMP 水平升高, 在 mock 细胞中则不会引起这种变化趋势. 在另外一种 GPCR-CHO 过表达细胞株(GPR12-CHO)未发现 cAMP 水平的变化. 这一现象表明 37 号化合物具有 GPR41 受体激动活性, 有可能成为 GPR41 的潜在配体. 经结构解析后发现, 37 号化合物是一种新化合物, 属于吡喃酮类化合物^[11]. 这是首次报道 2-吡喃酮类化合物具有 GPR41 受体激动活性. 但是这种化合物是否是该受体特异的激动剂, 仍需要进一步实验证明.

综上所述, GPCR 作为新药靶点的意义备受关注, 但是仍有一些重要问题亟待解决, 例如对 GPR41 生理功能的认识和病理意义的研究, 又如对初筛得到的化合物进行构效关系研究. 利用 cAMP 检测方法对海洋真菌次级代谢产物活性成分进行研究, 并对初筛得到的化合物进行化学结构的修饰和优化, 并研究化学结构与生物活性之间的关系, 开发出有针对性和高效性的化合物, 将对新药的开发和对 G 蛋白偶联受体的功能研究将产生重要的影响. 针对 GPCR 开发更多特异性强、副作用小的全新天然小分子化合物, 将为药物开发带来新的突破.

[参 考 文 献]

- [1] BROWN A J, JUPE S, BRISCOE C P. A family of fatty acid binding receptors[J]. *DNA Cell Biol*, 2005, 24(1): 54-61.
- [2] LE POUL E, LOISON C, STRUYF S, et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(28): 25481-25489.
- [3] BROWN A J, GOLDSWORTHY S M, BARNES A A, et al. The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(13): 11312-11319.
- [4] XIONG Y, MIYAMOTO N, SHIBATA K, et al. Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(4): 1045-1050.
- [5] DREYFUSS M, MCHAPELA I H. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals[J]. *Biotechnology*, 1994, 26: 49-80.

- ning Hoechst 33342 transfer the dye into the nuclei of living cells: A fluorescence study[J]. *J Fluoresc*, 2008, 18(2): 319-328.
- [7] SUSSMAN M. Cultivation and synchronous morphogenesis of *Dictyostelium* under controlled experimental conditions[G]//PHILLIP SHEELER, DONALD E BIANCHI. *Methods in Cell Biology*. New York: Wiley, 1987, 28: 9-29.
- [8] RATNER D, BORTH W. Comparison of differentiating *Dictyostelium discoideum* cell types separated by an improved method of density gradient centrifugation[J]. *Exp Cell Res*, 1983, 143(1): 1-13.
- [9] 侯连生. gp150 蛋白在盘基网柄菌发育中的作用及粘附分子间关系的分析[J]. *动物学报*, 2004, 50(1): 75-82.
- [10] LOUISE F, ROB K, FRANCISCO V. *Dictyostelium*[J]. *Current Biology*, 2010, 20: R1008-R1010.
- [11] HIROSE S, BENABENTOS R, HO H I, et al. Self-recognition in social amoebae is mediated by allelic pairs of tiger genes[J]. *Science*, 2011, 333(6041): 467-470.
- [12] YAMAMOTO A, TAKEUCHI I. Vital staining of autophagic vacuoles in differentiating cells of *Dictyostelium discoideum*[J]. *Differentiation*, 1983, 24: 83-87.
- [13] STRASSMANN J E, QUELLER D C. Sociobiology goes micro[J]. *ASM News*, 2004, 70: 526-532.
- [14] EICHINGER L, PACHEBAT J A, GLÖCKNER G, et al. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*[J]. *Nature*, 2005, 435: 43-57.
- [15] PARKER J E, COLEMAN M J, SZABO V, et al. The Arabidopsis downy mildew resistance gene RPP5 shares similarity to the Toll and Interleukin-1 receptors with N and L6[J]. *The Plant Cell*, 1997, 9(6): 879-894.
- [16] EULGEM T. Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome[J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10: 71-78.
- [17] LEE S W, HAN S W, BARTLEY L E, et al. Unique characteristics of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* AvrXa21 and implications for plant innate immunity[J]. *Science*, 2006, 103(49): 18395-18400.
- [18] SOLOMON J M, RUPPER A, CARDELLI J A, et al. Intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*, a system for genetic analysis of host-pathogen interactions[J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(5): 2939-2947.

(上接第 80 页)

- [6] LIN A, LU X, FANG Y, et al. Two new 5-hydroxy-2-pyrone derivatives isolated from a marine-derived fungus *Aspergillus flavus*[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2008, 61(4): 245-249.
- [7] MENG L H, SHANKAVARAM U, CHEN C, et al. Activation of aminoflavone (NSC 686288) by a sulfotransferase is required for the antiproliferative effect of the drug and for induction of histone gamma-H2AX[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(19): 9656-9664.
- [8] MILLIGAN G, STODDART L A, BROWN A J. G protein-coupled receptors for free fatty acids[J]. *Cell Signal*, 2006, 18(9): 1360-1355.
- [9] STODDART L A, SMITH N J, MILLIGAN G. International union of pharmacology. LXXI. Free fatty acid receptors FFA1, -2, and -3: pharmacology and pathophysiological functions[J]. *Pharmacol Rev*, 2008, 60(4): 405-417.
- [10] 林爱群. 三株海洋真菌次级代谢产物活性成分的研究[D]. 山东青岛:中国海洋大学,2008.
- [11] 杜林. 五株真菌次级代谢产物的结构和生物活性研究[D]. 山东青岛:中国海洋大学,2009.