

胰升血糖素样肽-1受体激动剂 高通量筛选细胞模型研究^{*}

范益军^{1,2}, 欧阳克清¹, 王贵学¹, 罗傲雪²

(1 重庆大学生物工程学院, 重庆 400044

2 四川农业大学资源与环境系, 四川 都江堰 611830)

摘 要: 为建立 GLP-1 受体激动剂的高通量筛选方法, 将 GLP-1 受体质粒和报告基因质粒 (3×CRE/3×MRE/SRE-LUC/pGL3) 按照 1:5 的比例共转染到 CHO 细胞中, 建立 GLP-1 受体激动剂筛选细胞株。利用 GLP-1 内源激动剂探索和优化每孔细胞接种密度、荧光素酶表达时间、Bright-GloTM 试剂用量、DM SO 浓度等筛选条件, 建立可靠的筛选方法。当细胞数目为 4×10⁴ 个/孔, 激动剂孵育时间为 8 h, Bright-GloTM 试剂 4 倍稀释, 每孔 DM SO 终质量分数小于 1% 时, 系统 Z'¹ 因子为 0.75。利用此模型对中药提取物库进行检测, 发现有 5 个样品显示出活性。结果表明, 该模型能够用于 GLP-1 受体激动剂的高通量筛选。

关键词: 胰升血糖素样肽-1 受体; 2 型糖尿病; 高通量筛选; 报告基因

中图分类号: R587.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2007) 05-0083-05

胰升血糖素样肽-1 (Glucagon Like Peptide 1, GLP-1) 是一种前胰升血糖素 (Proglucagon) 衍生出来的多肽激素, 能使正常人口服或静脉注射葡萄糖后增加胰岛素的分泌, 因此也被称为肠促胰岛素 (Incretin); GLP-1 受体属于 G 蛋白偶联受体中的 G_s 受体, 是一种选择性和组织特异性蛋白质。GLP-1 通过激发其受体 (GLP-1R) 产生生理功能, 能明显刺激胰岛素分泌、增加胰岛素敏感性、抑制胰升血糖素水平和减慢胃的排空, 对 2 型糖尿病和 1 型糖尿病均有效, 而且将其用于治疗不会产生低血糖^[1]。因此, 研究其受体的小分子化合物激动剂, 是 2 型糖尿病治疗的一种新途径。

高通量药物筛选技术 (high throughput screening, HTS) 是近年发展起来的一项新的药物发现技术, 它结合自动化操作系统和微量灵敏的生物反应及检测系统, 利用分子或细胞水平的药物筛选模型来评价化合物的生物活性, 其筛选速度快、规模大、消耗量小, 能实现一药多筛^[2-3]。

G 蛋白偶联受体是高通量药物筛选的重要靶, 在对其激动剂和拮抗剂的高通量药物筛选中, 引入基于基因重组技术的报告基因筛选方法, 将第二信使的变化与报告基因相偶联, 通过报告基因的表达量, 反映第二信使的变化与配体的功能, 能极大的提高筛选通量, 高效而且节省成本。

本实验建立了一个 GLP-1 受体激动剂的高通

量筛选模型, 利用其内源性激动剂 GLP-1 对筛选条件进行了摸索和优化, 建立了可靠的筛选方法。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

转染试剂 CytoPueTM 购自 Nitto Denko Technical Corporation, Bright-GloTM 荧光试剂、pGL3 载体、Human cDNA 购自 Promega 公司。G418 购自 GibcoTM 公司。GLP-1 购自 Sigma 公司。pCDNA3.1 载体购于 Invitrogen 公司。细胞培养材料购自 BiocloneTM 公司。DM SO 等化学试剂购于成都科龙化工试剂厂。

1.2 实验仪器

多功能酶标仪 GENios (TECAN), Bionphotometer (Enppendorf), PCR 仪 (PE 公司), 超纯水系统 (MILLIPORE), 96 孔分析板 (Coming Coatar)。

1.3 质粒构建

报告基因质粒 (3×CRE/3×MRE/SRE-LUC/pGL3) 的构建: 将 cAMP 响应元件 CRE、多重响应元件 MRE 和血清响应元件 SRE 插入到含荧光素酶基因 (Luciferase gene, LUC) 的 pGL3 载体上, 从而构建了报告基因质粒 3×CRE/3×MRE/SRE-LUC/pGL3^[4]。

* 收稿日期: 2006-09-01

基金项目: 国家 973 计划资助项目 (2003CB716601)

作者简介: 范益军 (1980 年生), 男, 讲师; 通讯联系人: 欧阳克清; E-mail: qingke201@126.com

GLP-1受体质粒的构建: 根据 GLP-1受体基因序列设计引物, 以 Human cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 将扩增产物克隆到 pCR2.1载体, 再亚克隆到 pCDNA 3.1载体, 得到 GLP-1受体质粒 (GLP-1R/pCDNA3.1), 测序。

1.4 稳定细胞株的建立

将 CHO 细胞消化, 接种于 6孔板中, 接种密度为 $0.8 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$ 个/mL, RPM I1640完全培养基 (RPM I1640基本培养基、w = 10%胎牛血清、w = 1%非必需氨基酸、w = 1%青霉素 + 链霉素), 置 37℃、φ = 5% CO₂ 孵箱中培养。

待细胞融合度达到 60% ~ 80%时, 将 GLP-1R质粒和报告基因质粒按照 1 : 5 的比例共转染到 CHO 细胞中, 转染试剂为 CytotoPure™, 用筛选培养基 (RPM I1640完全培养基, 600 mg/L 的 G418) 继续培养, 及时除去死细胞。挑取单克隆, 并用 CRE 的激活剂 Forskolin 和内源配体 GLP-1检测荧光素酶的表达, 选取荧光素酶表达量最高的单克隆 (细胞内含有 GLP-1R质粒和报告基因质粒) 作为筛选细胞株。

建立阴性对照株: 将 pCDNA3.1载体和报告基因按照 1 : 5 的比例共转染到 CHO 细胞中, 用筛选培养基筛选, 挑取单克隆, 并用 CRE 的激活剂 Forskolin检测荧光素酶的表达, 选取荧光素酶表达量最高的单克隆作为阴性细胞株。

1.5 荧光素酶报告基因的检测

用含血清量为 w = 3% 的 RPM I1640培养基收集细胞, 接种于 96孔板中, 每孔 90 μL。置 37℃、φ = 5% CO₂ 孵箱中培养 24 h后, 每孔加入 10 μL 化合物样品, 通过检测其信号来优化筛选模型。

2 实验结果

2.1 筛选条件的优化

2.1.1 细胞接种密度 为了检验不同细胞接种数目对筛选的影响, 我们分别接种了 2×10^4 孔, 4×10^4 孔, 6×10^4 孔, 8×10^4 孔, 10×10^4 孔 5 个密度的细胞于 96孔板, 利用 GLP-1刺激, 培养 8 h后检测, 结果见图 1。随着细胞密度的增加, 荧光素酶的信号值逐渐增大, 到密度为 8×10^4 孔时达到最大值, 超过 8×10^4 孔后其值下降。

荧光素酶的表达与受体的数量有密切关系, 当 GLP-1浓度一定时, 受体越少即细胞数目越小, 结合的 GLP-1就越少, 则信号值就越弱。反之, 受体越多即细胞数目越大, 结合的 GLP-1就越多, 则信号值就越高。但是细胞密度过大, 会造成孔内细胞生长受阻以及细胞死亡, 受体的表达也会相应

减少, 所以其荧光素酶的表达量较低, 信号值降低。故只有当细胞数目在一个合适的范围内时, 其生长量才与荧光素酶的表达成正比。

本实验发现当细胞密度为 4×10^4 孔时所检测到的信号值已经较高, 完全能适应分析要求, 故为不浪费细胞资源, 本实验采用 4×10^4 孔的细胞密度。

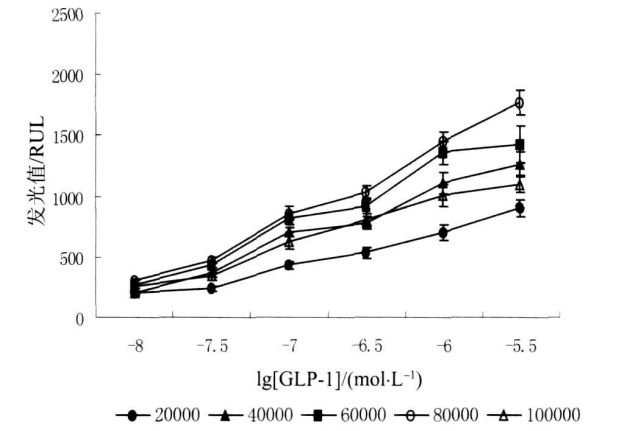


图 1 不同细胞接种数目对报告基因检测的影响
F ig. 1 The effect of different cell numbers on the reporter gene assay

2.1.2 荧光素酶的表达时间 激动剂与受体作用后, 会启动一系列的反应, 引发荧光素酶的表达。为了确定荧光素酶的最佳表达时间, 我们将细胞以 4×10^4 孔的密度接种于 96孔板中, 加入 100 nmol/L 的 GLP-1, 分别在 2 4 6 8 10 12 h 时测量其信号值, 结果见图 2。在 8 h内随着时间增加, 荧光素酶的表达增加, 在 6 ~ 8 h内荧光素酶的表达较高且信号稳定, 至 8 h时达到最大值, 而 8 h后随时间增加其信号明显下降。因此在实验中我们选择 8 h作为荧光素酶的表达时间。

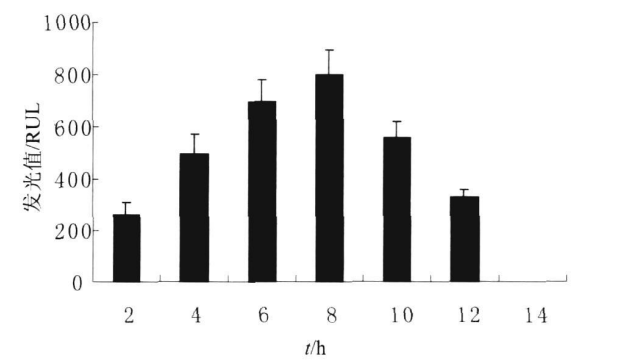


图 2 不同表达时间对报告基因检测的影响
F ig. 2 Effect of incubation times on the reporter gene assay

2.1.3 BrightG bTM 试剂的用量 在荧光素酶报告基因分析中, 为降低筛选成本, 我们比较不同浓度的 BrightG bTM 试剂: 原液、2 倍稀释、4 倍稀释、8 倍稀释, 以选定最佳的试剂浓度, 结果见图 3。随着稀释度的增加, 信号值呈下降趋势, 但是 2 倍稀释和 4 倍稀释时与原浓度相比, 信号值没有很明显的变化, 8 倍稀释时有所下降。因此在实验中我们采用 4 倍稀释。

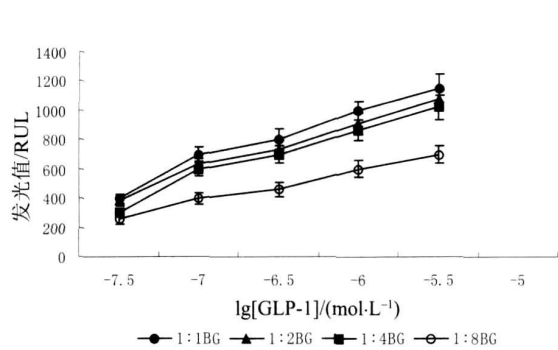


图 3 不同底物浓度对报告基因检测的影响
Fig 3 Effect of different substrate concentrations on the reporter gene assay

2.1.4 DMSO 的用量 由于二甲亚砜 (DMSO) 对细胞生长和信号传导有影响, 因此我们分析了不同质量分数 DMSO 对 GLP-1 受体细胞株的荧光素酶表达的影响, 结果见图 4。当 DMSO 质量分数低于 1% 时, 对细胞株的荧光素酶表达影响较小, 而超过 1% 时其表达量急剧下降。因此在实验中每个孔所加的 DMSO 其终极质量分数均应小于 1%。

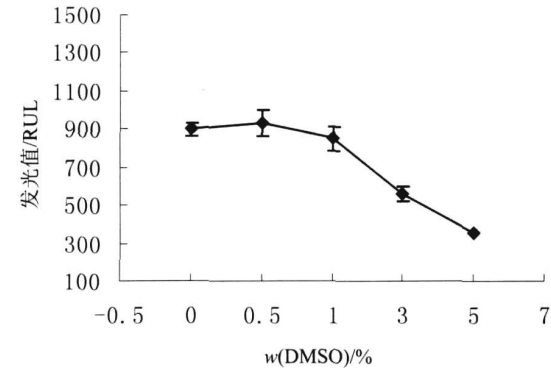


图 4 DMSO 质量分数对报告基因的影响
Fig 4 Effect of concentration of DMSO on the reporter gene assay

2.2 GLP-1 受体细胞株内源干扰性的检测

CHO 细胞株是常用的研究 G 蛋白偶联受体的细胞株, 但由于其内部信号通路不清楚, 利用该细胞株作为 GLP-1 受体宿主时, 需要检验其内源性

受体是否会干扰最终的信号检测。
我们用不同浓度的 GLP-1 分别刺激 GLP-1R 细胞株和阴性对照株, 结果见图 5。在 GLP-1R 细胞株中荧光素酶的表达与 GLP-1 的浓度呈正比关系, 而用不同浓度 GLP-1 刺激阴性细胞株时, 发现其响应值非常低, 与空白对照接近。因此内源干扰性可以排除, 表明 GLP-1R 细胞株完全可用于高通量筛选。

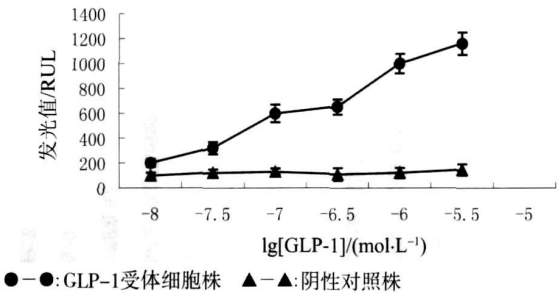


图 5 GLP-1R 细胞株和阴性细胞株响应的比较
Fig.5 The compare of GLP-1R stable cell line and negative cell line

2.3 筛选方法的评估

Z 因子是一个常用于判断高通量筛选模型稳定性的统计学参数^[5], 其公式为:

$$Z' = 1 - \frac{3S_{\text{阳性}} + 3S_{\text{空白}}}{X_{\text{阳性}} - X_{\text{空白}}}$$

如果 $Z' < 0.5$ 则说明分析条件还需要进一步优化, 或者该检测形式无法得到有效的数据。如果 $Z' \geq 0.5$ 说明该系统有良好的稳定性, 适用于高通量筛选。

为了评估本筛选模型是否稳定地适用于高通量筛选, 我们随机选取 96 孔板的 60 个孔, 其中 30 个孔加入 GLP-1 作为阳性对照, 另外 30 个孔作为空白对照, 连续检测 3 d 从而计算出 $Z' = 0.75$ 大于 0.5 表明该模型适合高通量筛选。

结果阳性对照与空白对照的 $\bar{X} \pm s$ /RUL 分别为 967.3 ± 45.5 236.5 ± 15.3 而 CV /% 分别为 4.7 6.5

2.4 中药筛选

以 200 种 2 型糖尿病治疗中草药为研究对象, 对其进行提取, 利用优化后的 GLP-1 受体激动剂筛选模型对中药醇提物进行检测, 有 10 种中药激活荧光素酶表达的读数超过背景值的 2 倍, 接近 100 nmol/L 的 GLP-1 刺激时的读数 (见图 6); 在这 10 个样品中, 有 5 个样品能激活阴性对照细胞株 (见图 7), 即为假阳性, 而其它 5 种中药中就有直接激活 GLP-1 受体的活性物质。

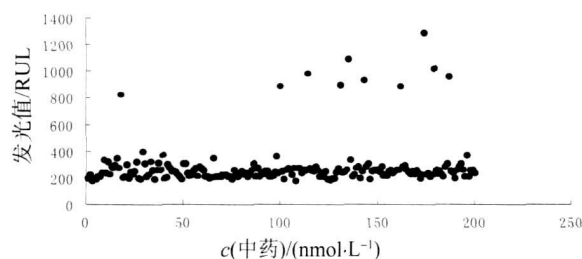


图 6 GLP-1 受体筛选结果

Fig. 6 Screening result of GLP-1R cell line

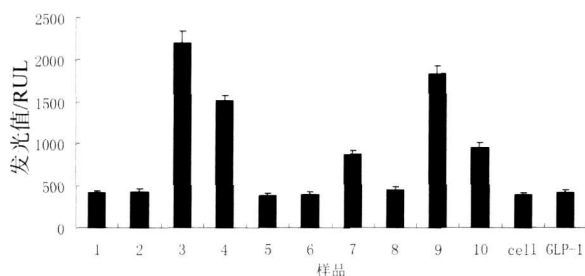


图 7 阴性细胞株筛选结果

Fig. 7 Screening result of negative cell line

3 讨论

GLP-1受体属于七跨膜区受体族,是一种选择性和组织特异性蛋白质^[6-7]。最先在大鼠的胰岛素细胞瘤的细胞株中发现,其主要第二信使是cAMP,当细胞外葡萄糖浓度增加时,葡萄糖进入β细胞被氧化使细胞内的ATP含量增加,ATP与ATP敏感的K⁺通道结合,导致K⁺通道关闭,细胞膜去极化,于是Ca²⁺通道开放,Ca²⁺内流,刺激胰岛素从β细胞排出^[8-9]。因此,GLP-1受体是2型糖尿病治疗中非常重要的药靶基因。

根据G蛋白偶联受体(GPCRs)的信号通路特性,其高通量筛选模型大致可以分为3类:第1类基于受、配体结合检测的分析方法,包括FMAT、FP和SPA;第2类是基于第二信使检测的分析方法,包括cAMP的ELISA分析、MA和Ca²⁺测定;第3类是基于受体功能反应的报告基因检测方法。在这3类方法中,基于受体功能反应的报告基因检测方法易于区分激动剂和拮抗剂,且操作简单,是筛选受体激动剂和拮抗剂的最有效也是最常用的方法。

研究中,利用GLP-1受体基因、荧光素酶报告基因和响应元件(MRE、CRE、SRE)建立了GLP-1受体激动剂的高通量筛选的稳定细胞株。当配体与GLP-1受体相结合时,就会激活其相应的信号通路,荧光素酶报告基因响应这种信号,在细

胞内大量表达,通过检测细胞质中荧光素酶的活性,可以评估配体的功能性作用和进行高通量筛选。

在报告基因质粒构建中,我们选择的响应元件为MRE、CRE和SRE。MRE为多重响应元件,响应PKA和PKC信号通路^[10];CRE为cAMP响应元件,响应PKA信号通路^[11];SRE为血清响应元件,响应PKC信号通路^[12]。GLP-1受体属于G蛋白偶联受体中G_s型受体,结合其信号通路,我们选取了3种响应元件,构建了3×CRE/3×MRE/SRE-LUC/pGL3的报告基因质粒。能够完全监控GLP-1受体激活后引发的信号变化。

虽然响应元件能灵敏监测第二信使的变化,但是引起第二信使变化的因素很多,可能出现不通过GLP-1受体激活报告基因表达的现象。因此我们同时建立了一个仅含响应元件和报告基因的细胞株,作为筛选的阴性对照来排除假阳性。

在细胞株的建立中,由于pGL3载体不带抗性标记,而pCDNA3.1载体自带G418抗性标记,无法进行二次转染,所以我们利用两种载体构建质粒,按1:5比例一步共转染CHO细胞。当GLP-1作用于其受体细胞株8h时,报告基因达到最大稳定表达,而其后,表达量降低,可能是由于脱敏作用的原因。

本实验中,我们采用了报告基因检测方法,将GLP-1受体质粒和报告基因质粒共同转染到CHO细胞中,并对筛选条件进行优化,建立了GLP-1受体激动剂高通量筛选模型,通过该模型对中药提取物进行检测,发现活性物质,通过分离纯化等进一步研究就可得到其激动剂。

参考文献:

- [1] 范益军, 欧阳克清, 王贵学, 等. 胰升血糖素样肽-1及其受体与2型糖尿病的治疗[J]. 生物化学与生物物理进展, 2005, 32(5): 393-396
- [2] 黄家学, 胡娟娟, 杜冠华. 化合物药物活性的高通量筛选[J]. 中国药理学通报, 1999, 16(5): 401-404
- [3] 梁乾的, 王升起. 药物高通量筛选分析技术[J]. 国外医学: 药理学分册, 2002, 29(1): 22-28
- [4] JIANG G, CHEN G, ZENG X, et al. Generation of bioactive neuropeptide in a cell free system[J]. Anal Biochem, 2003, 316(1): 34-40
- [5] ZHANG JH, CHUNG TD, OLDENBURG KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays[J]. J Biomol Screen, 1999, 4(2): 67-73
- [6] BAVEC A, HALIBRINK M, LANGEL U, et al. Differ

ent role of intracellular loops of glucagon like peptide 1 receptor in G-protein coupling[J]. Regul Pept 2003 111 (1-3): 137-144

[7] RUNGE S WULFF B S MADSEN K, et al Different domains of the glucagon and glucagon like peptide 1 receptors provide the critical determinants of ligand selectivity[J]. Br J Pharmacol 2003 138(5): 787-794

[8] MACDONALD P E SALAPATEK A M, WHEELER M B Glucagon-like peptide 1 receptor activation antagonizes voltage dependent repolarizing K(+) currents in beta cells: A possible glucose dependent insulinotropic mechanism[J]. Diabetes 2002 51(3): 443-447

[9] HOLZ G G. Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon like peptide 1 receptor mediated signal transduction in the pancreatic beta cell[J]. Diabetes 2004 53(1): 5-13

[10] DENORFER U OETTGEN P LIBERMANN T A. Multiple regulatory elements in the interleukin 6 gene mediate induction by prostaglandins, cyclic AMP, and lipopolysaccharide[J]. Mol Cell Biol 1994 14(7): 4443-4454

[11] ROSENBERG D GROUSSIN L JULLIAN E, et al Role of the PKA-regulated transcription factor CREB in development and tumorigenesis of endocrine tissues[J]. Ann NY Acad Sci 2002 968: 65-74

[12] STRATOW A G MACHAT H BURGER E, et al Functional characterization of the human neurokinin receptors NK1, NK2, and NK3 based on a cellular assay system[J]. J Recept Signal Transduct Res 1995 15 (1-4): 617-630

Study on Cell Model for High Throughput Screening the Agonist of Glucagon-Like Peptide 1 Receptor

FAN Yi-jun^{1,2}, OUYANG Ke-qing¹, WANG Gu-xue¹, LUO Ao-xue²

(1. College of Bioengineering Chongqing University, Chongqing 400044 China

2. Department of Resource and Environment Sichuan Agricultural University Dujiangyan 611830 China)

Abstract In order to establish high throughput screening method for identifying agonists for glucagon-like peptide 1 receptor (GLP-1R), a cell line was set up after the GLP-1 receptor plasmid (GLP-1R /pCDNA3.1) and reporter gene plasmid (3×CRE /3×MRE /SRE-LUC /pGL3) were co-transfected CHO at the ratio of 1:5. To identify and optimize the screening model, the effects of some factors were examined by using GLP-1, such as cell number per well, incubation time, dosage of BrightG bTM and concentration of DMSO. Based on a steady cell line, a reliable screening model was established for GLP-1R agonist screening. The Z'-factor value for the screening model was estimated 0.75 under the conditions that 4×10⁴ cells in each well were incubated for 8h using 4 times diluted BrightG bTM and less than 1% DMSO. The extracts of traditional Chinese medicine were assayed using the screening model and five samples of them showed activity. Experiments showed that this method could be applied to high throughput screen agonist for GLP-1 receptor.

Key words GLP-1 receptor; type 2 diabetes mellitus; high throughput screening; reporter gene