

黑色素皮质素受体激动剂的高通量筛选模型研究*

郑旭煦^{1,2)} 欧阳克清¹⁾ 高虹¹⁾ 许治良¹⁾ 胡应和¹⁾ 蔡绍哲¹⁾**

(¹⁾重庆大学生物工程学院, 生物力学与组织工程教育部重点实验室, 重庆 400044;

(²⁾重庆工商大学环境与生物工程学院, 重庆 400033)

摘要 为了建立黑色素皮质素受体 (MC4R) 激动剂的高通量筛选方法, 将人的 MC4R 基因质粒 (hMC4R/pCDNA3.1) 与报告基因质粒 (3×CRE/3×MRE/SRE-LUC) 按 1:5 的比例共转染到 HEK293 细胞, 通过 G418 筛选, 建立了稳定的 MC4R 激动剂筛选细胞株. 利用 MC4R 内源激动剂 α -MSH 探索和优化了每孔接种细胞数目、激动剂孵育时间、溶剂 DMSO 终浓度、荧光素酶底物浓度等筛选条件, 建立了可靠的筛选方法. 实验表明: 当细胞数目为 4×10^4 个/孔, 激动剂孵育时间为 8 h, 每孔 DMSO 终浓度小于 1% 和 α -MSH 终浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 时, 系统 Z' -因子接近 0.7, 能够用于 MC4R 激动剂的高通量筛选.

关键词 黑色素皮质素受体 (MC4R), 报告基因, 激动剂, 高通量筛选

学科分类号 R965

黑色素皮质素 (MC) 中研究最多的是 α -MSH, 它由 13 个氨基酸组成, 为 POMC 基因编码, 在下丘脑区广泛分布. α -MSH 的食欲抑制作用受到 MC4R 的调节. Huszar 等^[1]用敲除 MC4R 基因的小鼠进行 15 周的饲养试验, 结果雌鼠、雄鼠体重分别比对照组增加 1 倍和 0.5 倍, 血胰岛素水平分别高出 60 倍和 14 倍, 血糖水平亦显著升高, 并出现肥胖表型. Fan 等^[2]给 ob/ob 小鼠注射黑色素皮质素的拮抗物可增加小鼠的摄食量, 而脑室中注射黑色素皮质素的类似物则抑制摄食. 此外, Seeley 等^[3]在基因型肥胖小鼠中发现, 瘦素-POMC- α -MSH-MC4R 信号轴存在缺陷是出现食欲亢进的部分原因. 因此, 黑色素皮质素受体 MC4R 激动剂的研究将可能为治疗肥胖、糖尿病等能量代谢失衡性疾病提供有效的手段.

随着生物学和电子技术的发展, 药物高通量筛选 (high throughput screening, HTS) 成为药物发现早期的重要手段. 它是利用药靶的分子或细胞水平的生物学机制, 以微孔板为基础, 进行大量筛选, 找到能选择性地作用于药靶的有生物活性的化合物^[4-6].

G 蛋白偶联受体是高通量筛选中重要的药靶, 在对其激动剂和拮抗剂的功能测定中, 传统的功能检测方法, 如直接检测第二信使, 其手段繁琐、通量低、不适用于高通量筛选. 而引入基于重组技术的报告基因方法, 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, 间接反映第二信使的变化和配体的功能, 能极大地提高筛选通量, 高

效而且节省成本^[7,8].

本实验建立了一个 MC4 受体激动剂的高通量筛选方法. 先用对第二信使变化敏感的响应元件 (MRE、CRE、SRE) 和荧光素酶报告基因构建报告基因质粒, 然后将报告基因和受体基因共转染到 HEK293 细胞株, 建立了人 MC4 受体激动剂高通量筛选模型——hMC4R 稳定细胞株. 利用 MC4R 内源激动剂 α -MSH 探索和优化筛选条件, 建立了可靠的筛选方法.

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

Bright-GloTM 荧光试剂、pGL3 载体购自 Promega 公司. 人下丘脑 cDNA 购自 ClonTech 公司. pCR2.1-TOPO 和 pCDNA3.1 载体购自 Invitrogen 公司. 转染试剂 Eugene 6 购自 Roche 公司. G418 购自 GibcoTM 公司. α -MSH 和 Forskolin 购自 Sigma 公司. 细胞培养材料购自 BiocloneTM 公司. 野生型 HEK293 细胞购自第三军医大学. 二甲亚砜 (DMSO) 等化学试剂为市售分析纯.

1.2 仪器

PCR 基因扩增仪 (PE2400), Reporter 检测系统 (Turner Design), 96 孔分析板 (Corning[®] Costar[®]).

* 重庆市科委攻关项目 (渝科发计字 [2002] 1 号) 和重庆市计委重点高新技术项目 (渝计委计 [2001] 1192 号).

** 通讯联系人.

Tel: 023-65102507, E-mail: sxcai@equ.edu.cn

收稿日期: 2003-05-26, 接受日期: 2003-07-28

1.3 质粒构建

报告基因质粒 (3 × CRE/3 × MRE/SRE-LUC): 将 c-AMP 响应元件 (c-AMP response element, CRE)、多重响应元件 (multiple response element, MRE)、血清响应元件 (serum response element, SRE) 插入含荧光素酶基因 (luciferase gene, LUC) 的 pGL3 载体, 构建报告基因质粒 (3 × CRE/3 × MRE/SRE-LUC/pGL3)^[9].

hMC4 受体质粒: 根据 hMC4R 受体基因序列设计引物, 以人的下丘脑 cDNA 为模板, PCR 扩增, 扩增产物克隆到 pCR2.1-TOPO 载体, 再亚克隆到 pCDNA3.1 载体, 构建成为 hMC4R 质粒 (MC4R/pCDNA3.1), 测序.

1.4 稳定细胞株的建立

HEK293 细胞株接种于 6 孔板, 密度为 $0.5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^5$ 个/ml, 采用 DMEM 完全培养基 (DMEM 培养基、10% 胎牛血清、0.1 mmol/L 非必需氨基酸和双抗), 置于 37℃, 5% CO₂ 孵箱中孵育 18 ~ 24 h.

hMC4R 筛选细胞株: 将 hMC4R 受体质粒和报告基因质粒以 1:5 的比例共转染到野生型 HEK293 细胞中, 转染试剂为 Fugene 6, 加入浓度为 800 mg/L 的 G418 筛选, 挑取单克隆, 并用 CRE 的激活剂 Forskolin 和 MC4R 内源激动剂 α-MSH 检测荧光素酶的表达, 选取二者荧光素酶表达量最高的单克隆作为筛选细胞株.

阴性细胞株: 将 pCDNA3.1 空载体和报告基因质粒 (3 × CRE/3 × MRE/SRE-LUC/pGL3) 以 1:5 的比例共转染到 HEK293 细胞中, 转染试剂为 Fugene 6, 加入浓度为 800 mg/L 的 G418 筛选, 挑取单克隆, 并用 CRE 激活剂 Forskolin 检测荧光素酶的表达, 选取荧光素酶表达量最高且背景值较低的单克隆作为阴性细胞株.

1.5 荧光素酶报告基因检测

用含 3% 血清的 DMEM 培养基收集细胞, 按每孔 100 μl 的量接种于 96 孔板, 控制每孔细胞密度, 孵育过夜. 然后每孔加入一定量样品, 培养 6 ~ 8 h 后, 加入与孔中液体相等体积的 Bright-Glo 试剂 (含荧光素, ATP 等), 使用 reporter 仪读取信号.

2 实验结果

2.1 筛选条件的优化

我们首先用 MC4R 的内源性激动剂 α-MSH 探索和优化筛选条件.

2.1.1 96 孔板细胞接种数目: 无论是自动还是人工接种细胞于 96 孔板中, 每孔中的细胞数目都不会完全相同, 为了检验不同细胞数目对筛选的影响, 我们接种了不同密度的细胞于 96 孔板, 并用 α-MSH 刺激 8 h. 实验发现: 当细胞数目小于 10×10^4 个/孔时, 随着细胞数目增加, 荧光素酶表达值增大; 在 $3 \times 10^4 \sim 8.5 \times 10^4$ 个/孔范围内, 各种细胞数目在不同浓度 α-MSH 中的荧光素酶表达值差异不大, 尤其是 α-MSH 浓度等于 1 μmol/L 时的表达值最接近 (图 1). 实验中, 我们选取细胞接种数目为 4×10^4 个/孔.

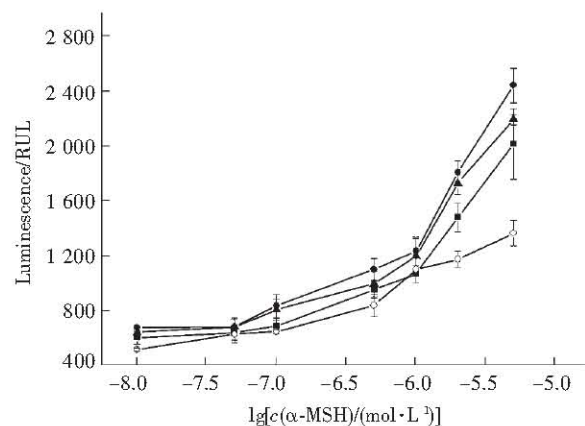


Fig. 1 Effects of cell number on the reporter gene assay
●—●: 8 500; ▲—▲: 5 000; ■—■: 3 000; ○—○: 15 000.

2.1.2 荧光素酶表达时间: 激动剂与受体作用后, 启动一系列反应, 引发荧光素酶表达. 为了确定荧光素酶的最佳表达时间, 我们在细胞数目为 4×10^4 个/孔的微孔中, 加入浓度为 1 μmol/L 的 α-MSH, 测定孵育时间为 4 h、5 h、6 h、7 h、8 h、9 h 和 10 h 的信号值. 由图 2 可见, 孵育时间为

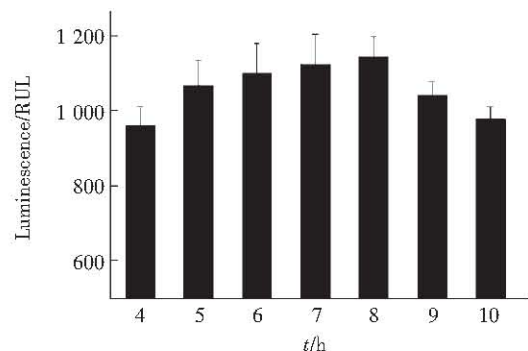


Fig. 2 Effects of incubation times on the reporter gene assay

4 h、9 h 和 10 h 时荧光素酶表达量较低，孵育时间为 5~8 h 时表达量较高。图 3 表明，在孵育时间为 5~8 h 范围内，不同浓度 α -MSH 的影响规律基本一致。为了获得较高信号值，我们选择筛选实验的表达时间为 8 h。

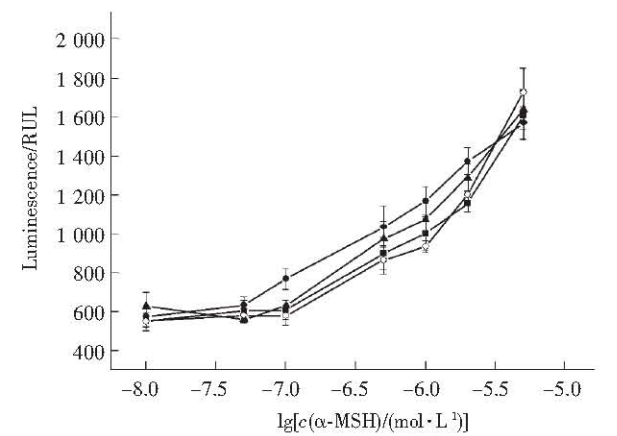


Fig. 3 Effects of incubation times on the reporter gene assay
●—●: 8 h; ▲—▲: 7 h; ■—■: 6 h; ○—○: 5 h.

2.1.3 溶剂 DMSO 的用量: 我们分析了溶剂 DMSO 终浓度对 MC4R 细胞株荧光素酶表达的影响。实验结果表明 (图 4)，以空白对照组为例，当 DMSO 终浓度小于 1% 时，DMSO 能使荧光素酶响应值有所增加；当 DMSO 终浓度等于 1% 时，荧光素酶响应值有所降低。因此，我们认为每孔加入溶剂 DMSO 终浓度应该小于 1%。

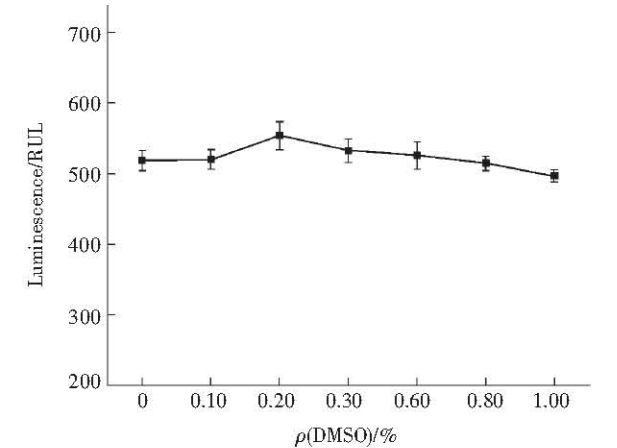


Fig. 4 Effects of final concentration of DMSO on the reporter gene assay

2.1.4 Bright-Glo 试剂用量: 在荧光素酶报告基因分析中，荧光素酶底物 Bright-Glo 试剂非常昂贵。

为了降低筛选成本，我们比较了不同浓度 Bright-Glo 试剂 (原浓度、2 倍稀释、4 倍稀释、8 倍稀释) 对荧光素酶信号值的影响 (图 5)。实验发现，随着稀释倍数的增加，信号响应值降低，但 2 倍稀释和 4 倍稀释时的读数与原浓度的读数相差不大，而 8 倍稀释时，读数明显降低。因此，实验采用 4 倍稀释的 Bright-Glo 试剂检测荧光素酶信号。

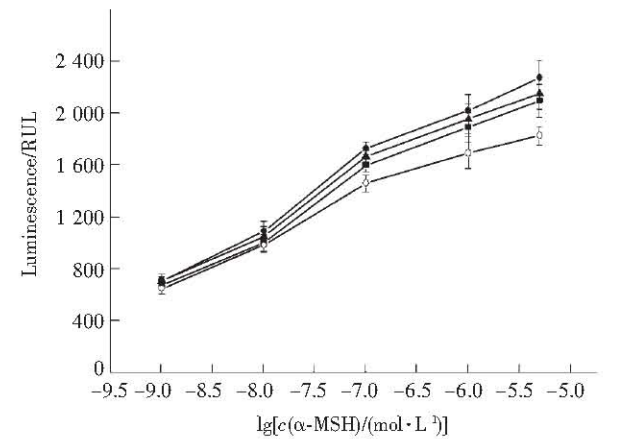


Fig. 5 Effects of luciferase substrate concentration on the reporter gene assay
●—●: 1/1 BG; ▲—▲: 1/2 BG; ■—■: 1/4 BG; ○—○: 1/8 BG. BG: Bright-Glo reagent.

2.2 筛选方法的评估

Z' -因子法常用于评估高通量筛选系统的稳定性和可靠性^[10]。

$$Z' = 1 - \frac{3S \text{ of positive control} + 3S \text{ of basical control}}{\bar{X} \text{ of positive control} - 3\bar{X} \text{ of basical control}}$$

Z' -因子是一个统计学参数，它与筛选源无关，只与筛选方法本身有关，反映了方法的稳定性与可靠性。如果 $Z' \geq 0.5$ ，说明筛选方法适用于高通量筛选。如果 $Z' < 0.5$ ，则说明筛选方法尚需调整。为了评估本筛选方法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 个孔加入浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 的 α -MSH 作为阳性对照，另外 30 个孔为空白对照，连续检测 3 天。实验发现，不同天数间的影响不大，阳性对照和空白对照信号平均值和标准误差分别为 (1162.7 ± 63.9) RUL 和 (414.9 ± 19.1) RUL，变动系数 CV 分别为 5.5% 和 4.6%，利用 Z' -因子法计算得 $Z' = 0.67$ ，接近 0.7，因此，已建立的 hMC4R 细胞株适用于 MC4R 激动剂的高通量筛选。

2.3 MC4R 细胞株内源性干扰的检测

我们用不同浓度 α -MSH 刺激 MC4R 细胞株, 发现荧光素酶表达与 α -MSH 的浓度相依赖. 而用不同浓度 α -MSH 刺激不含 MC4R 的阴性细胞株, 发现阴性对照株的响应极低, 几乎与空白对照组的响应值一致, 且与 α -MSH 浓度无关 (图 6), 说明 MC4R 细胞株完全可以用作 MC4R 的激动剂筛选.

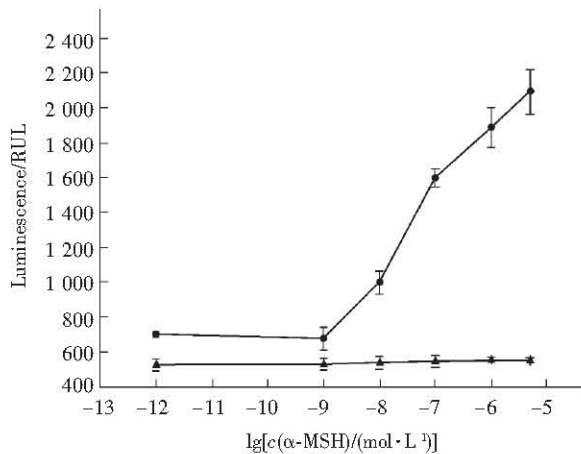


Fig. 6 HKE-293 stable cell lines with or without human MC4 receptor

●—●: MC4R; ▲—▲: CRE/MRE/SRE.

3 讨 论

本研究中, 我们利用 MC4 受体基因、响应元件 (CRE、MRE、SRE)、荧光素酶报告基因, 建立了一个适用于 MC4 受体激动剂高通量筛选的 MC4R 稳定细胞株. 当配体与 MC4 受体相结合时, 激活其相应的信号通路, 荧光素酶报告基因响应这种信号, 最终导致其表达发生变化. 通过检测细胞质中荧光素酶的表达量, 可以评估配体的功能性作用并进行高通量筛选.

在报告基因质粒的构建中, 我们选择的响应元件为 CRE、MRE 和 SRE, 其中 CRE 响应 PKA 信号通路^[11], MRE 响应 PKA 和 PKC 信号通路^[12], SRE 响应 PKC 信号通路^[13]. 结合到 MC4 受体的功能性配体通过 G_s 蛋白激活腺苷酸环化酶 AC, 使细胞内的 cAMP 含量升高, 激活 PKA 信号通路. 因此, 采用 (3 × CRE/3 × MRE/SRE-LUC/pGL3) 报告基因质粒与 hMC4R 受体质粒建立的筛选细胞株, 完全能够监控 MC4 受体激活后引发的信号变化.

虽然响应元件能够灵敏地监控第二信使的变

化, 但是, 由于影响第二信使变化的因素很多, 可能出现不通过 MC4 受体激活报告基因表达的现象, 造成假阳性. 因此, 我们同时建立了一个仅含响应元件和报告基因的稳定细胞株——阴性细胞株来排除这种干扰.

在细胞株的建立中, 有一步转染和两步转染两种方法, 由于只有 pCDNA3.1 载体自带 G418 抗性标记, 而 pGL3 载体不带抗性标记, 无法进行两步转染. 我们分别利用两种载体构建质粒, 按 1: 5 比例一步共转染到 HEK293 细胞. 当 α -MSH 作用于 MC4 受体细胞株 8h 时, 报告基因达到最大稳定表达, 而孵育 9h 后, 表达量降低, 推测可能是由于脱敏作用引起的.

总之, 我们采用报告基因检测方法, 建立了稳定的 hMC4R 筛选细胞株和可靠的筛选方法, 该筛选模型能够用来进行 MC4 受体激动剂的高通量筛选.

参 考 文 献

- Huszar D, Lynch C A, Fairchild-Huntress V, *et al.* Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, 1997, **88** (1): 131 ~ 141
- Fan W, Boston B A, Kesterson R A, *et al.* Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature*, 1997, **385** (6612): 165 ~ 168
- Seeley R J, Yagaloff K A, Fisher S L, *et al.* Melanocortin receptors in leptin effects. *Nature*, 1997, **390** (6658): 349
- Broach J R, Thorner J. High-throughput screening for drug discovery. *Nature*, 1996, **384** (6604 Suppl): 14 ~ 16
- 黄家学, 胡娟娟, 杜冠华. 化合物药物活性的高通量筛选. *中国药理学通报*, 1999, **16** (5): 401 ~ 403
Huang J X, Hu J J, Du G H. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 1999, **16** (5): 401 ~ 403
- Major J. What is the future of high throughput screening? *J Biomol Screen*, 1999, **4** (3): 119
- 梁乾德, 王升启. 药物高通量筛选分析技术. *国外医学药学分册*, 2002, **29** (1): 22 ~ 28
Liang Q D, Wang S Q. *Foreign Medical Sciences Section on Pharmacy*, 2002, **29** (1): 22 ~ 28
- Terstappen G C, Giacometti A, Ballini E, *et al.* Development of a functional reporter gene HTS assay for the identification of mGluR7 modulators. *J Biomol Screen*, 2000, **5** (4): 255 ~ 262
- Jiang C, Chen G, Zeng X, *et al.* Generation of a bioactive neuropeptide in a cell-free system. *Anal Biochem*, 2003, **316** (1): 34 ~ 40
- Zhang J H, Chung T D, Oldenburg K R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen*, 1999, **4** (2): 67 ~ 73
- Rosenberg D, Groussin L, Julian E, *et al.* Role of the PKA-regulated transcription factor CREB in development and tumorigenesis of endocrine tissues. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, **968**: 65 ~ 74
- Dendorfer U, Oettgen P, Libermann T A. Multiple regulatory elements in the interleukin-6 gene mediate induction by

prostaglandins, cyclic AMP, and lipopolysaccharide. Mol Cell Biol, 1994, **14** (7): 4443 ~4454

13 Stratowa C, Machat H, Burger E, *et al.* Functional characterization

of the human neurokinin receptors NK1, NK2, and NK3 based on a cellular assay system. J Recept Signal Transduct Res, 1995, **15** (1 ~4): 617 ~630

High Throughput Screening Method of Identifying Agonist for Melanocortin 4 Receptor *

ZHENG Xu-Xu^{1,2)}, OUYANG Ke-Qing¹⁾, GAO Hong¹⁾, XU Zhi-Liang¹⁾, HU Ying-He¹⁾, CAI Shao-Xi¹⁾ **

(¹⁾ College of Bioengineering, Key Laboratory of Biomechanics & Tissue Engineering of Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400044, China;

²⁾ College of Environment & Biological Engineering, Chongqing Technology & Business University, Chongqing 400033, China)

Abstract In order to find agonists for melanocortin 4 receptor (MC4R), an assay *in vitro* was established for high throughput screening. The MC4R receptor plasmid (MC4R/pCDNA3.1) and reporter gene plasmid (3 × CRE/3 × MRE/SRE-LUC) were cotransfected HEK293 to establish a cell line for agonist screening. To identify and optimize the assay condition, the effects of some factors were examined by using α -MSH, such as cell number per well, incubation time, final concentration of DMSO and luciferase's substrate concentration on the assay. A steady cell line and a reliable method were established for MC4R agonist screening, the *Z'*-factor value was near to 0.7 on the condition in each well that the cell number were 4×10^4 , the agonist incubation time was 8 h, the final concentration of DMSO was less than 1%, and the final concentration of α -MSH was 1 $\mu\text{mol/L}$. This technology can be applied to identify agonist for MC4R receptor.

Key words melanocortin 4 receptor, reporter gene, agonist, high throughput screening (HTS)

* This work was supported by grants from The Key Technologies R&D Program of Chongqing Science and Technology Commission and The Hi-Tech R&D Program of Chongqing Municipal Planning Commission.

** Corresponding author. Tel: 86-23-65102507, E-mail: sxcai@cqu.edu.cn

Received: May 26, 2003 Accepted: July 28, 2003