

以中链脂肪酸受体 GPR84 为靶点的药物高通量筛选模型的建立和应用*

张庆¹⁾ 杨慧²⁾ 李佳^{1, 2)} 谢欣²⁾ 李静^{2)**}

(¹⁾ 华东师范大学科学与技术跨学科高等研究院, 上海 200062; (²⁾ 中国科学院上海药物研究所国家新药筛选中心, 上海 201203)

摘要 G 蛋白偶联受体 84(GPR84)是 C9-C14 的中链脂肪酸受体, 不仅在脂肪酸代谢和机体免疫反应中发挥着重要作用, 而且与多发性硬化症、内毒素血症等炎症性免疫疾病有着密切联系. 因此, 找到以 GPR84 为靶点的配体, 可能为治疗这些疾病提供一种有效的方法. 构建稳定过表达 GPR84 受体蛋白的细胞系, 为筛选 GPR84 为靶点的配体和研究这些免疫疾病提供了重要途径. 本文将含 GPR84 和 Gα16 基因质粒共转染到 HEK293 细胞中, 经过抗生素抗性筛选, 挑取稳定表达 GPR84 蛋白的 HEK293 细胞系. 用 RT-PCR、免疫荧光染色等实验方法检测了 GPR84 基因和其编码受体蛋白的表达; 用钙流实验、环腺苷酸实验、蛋白质印迹分析、流式细胞分析证实了表达的 GPR84 具有完整的生物学活性, 并利用该细胞系进行了药物高通量筛选, 得到了新的 GPR84 拮抗剂, 为进一步阐明 GPR84 的生物学功能, 研究并治疗与其相关免疫疾病奠定了基础.

关键词 GPR84, 稳定表达, 钙流实验, 高通量筛选

学科分类号 R965.1, Q257

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0333

游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)既是人和动物的一种重要能量来源, 同时也是一种信号分子, 具有多种生理功能^[1]. FFA 主要是通过结合游离脂肪酸受体(free fatty acid Receptors, FFARs), 引发下游信号通路, 进而影响机体生理活动. 研究表明, 游离脂肪酸受体在维持机体内的葡萄糖稳态^[2]、脂肪形成^[3]、免疫功能^[4]等生理过程中都有重要的作用, 对于调控人或动物的营养代谢及疾病发生具有重要生理意义. 目前已发现的脂肪酸受体有 GPR40、GPR41、GPR43、GPR84、GPR119 和 GPR120, 都属于 G 蛋白偶联受体(G protein coupled receptor, GPCR)超家族.

GPR84 是 Wittenberger 等^[5]利用序列表达标签(expressed sequence tag, EST)数据挖掘技术发现的新基因, 定位于 12q13.13, 是 C9~C14 的中链脂肪酸受体, 直接联系脂肪酸代谢和机体免疫反应^[6], 与松弛素受体 1/2(RLN1/2)等非脂肪酸受体也有一定亲源性^[7]. 人源 GPR84 是由单独阅读框编码, 共 396 个氨基酸组成^[5]. 在小鼠中, GPR84 主要在骨髓中表达, 同样在人体内, GPR84 也主要在骨髓

中, 其次是在外周白细胞和肺中表达^[8]. GPR84 可以调节 Th1 细胞免疫应答, 起着促进炎症发生的作用, 其在免疫细胞与非免疫细胞如脂肪细胞之间的交叉影响中也发挥了重要功能^[9]. 此外, 它在多发性硬化症(multiple sclerosis, MS)、内毒素血症等炎症性免疫疾病发病进程中也起着重要的作用^[9]. 2006 年, 研究人员成功发现 GPR84 的天然配体, 使其去孤儿化, 并确证中链脂肪酸(C9-C14)为其内源性配体, 其中癸酸(C10)、十一酸(C11)、月桂酸(C12)活性最好^[6]. 随后又发现活性更好的外源性激动剂二吡啶基甲烷^[10]和 6-n-octylaminouracil(6-OAU)^[10], 这为进一步研究其功能提供了帮助. 本研究正是为了更加方便、高效地筛选查找其配体, 并进一步研

* 国家科技重大专项(2012ZX09301001-005, 2013ZX09507001), 国家重点基础研究发展计划(973)(2014CB541900), 国家自然科学基金(81202341)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 021-50801313-193, E-mail: lijing@mail.shcnc.ac.cn

收稿日期: 2015-01-22, 接受日期: 2015-03-05

究其生物学功能, 因此通过一系列方法构建稳定表达 GPR84 的细胞系, 为以 GPR84 为靶点的药物高通量筛选和研究相关免疫疾病奠定了良好的基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和细胞株

编码人中链脂肪酸受体 GPR84 和 $G\alpha 16$ 蛋白的质粒购自美国 UMR cDNA 资源中心. 带 HA 标签的 HA-pcDNA3.0 质粒由本实验室构建. HEK293 细胞株来源于人胚胎肾细胞, 该细胞由美国标准菌种收藏所(ATCC)购买.

1.1.2 试剂

细胞培养液粉末 DMEM 完全培养基购自 GIBCO 公司. 胎牛血清购自 Hyclone 公司. 荧光染料 Fluo-4 AM 和 RNA 抽提细胞裂解液 TRIzol 购自 Invitrogen 公司. G418、杀稻瘟素(blasticidin)、苯磺唑酮(sulfinpyrazone)、Hoechst 33342、异硫氰酸荧光素标记的抗人流感血凝素(FITC-conjugated anti-HA)抗体、青霉素 (penicillin)、链霉素 (streptomycin)、多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA) 购自 Sigma-Aldrich 公司. 兔抗细胞外信号调节性激酶(rabbit anti-Erk1/2)抗体、兔抗磷酸化细胞外信号调节性激酶(rabbit anti-phospho-Erk1/2)抗体、兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(rabbit anti-GAPDH)抗体及辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔(HRP-GAR IgG)抗体均购自 Cell Signal Technology 公司. 牛血清白蛋白(BSA)购自上海捷信思基因技术有限公司. 聚偏二氟乙烯树脂(PVDF)膜购自 Millipore 公司. 化学发光试剂(amsersham ECL Plus Western blotting 显色液)购自 GE Healthcare 公司. PrimeScript™ RT reagent Kit 购自 TAKARA 公司. HTRF cAMP dynamic 2 1000 tests Kit 购自 Cisbio 公司. GPR84 阳性激动剂 6-OAU 由中国科学院上海药物研究所南发俊老师课题组合成. 磷酸盐缓冲液(1×PBS 缓冲液)(10 mmol/L Na_2HPO_4 、2.7 mmol/L KCl、2 mmol/L KH_2PO_4 、137 mmol/L NaCl, 调 pH 至 7.2)和汉克平衡盐缓冲液(Hank's balanced salt solution, HBSS 缓冲液)(8 g/L NaCl、0.4 g/L KCl、1 g/L 葡萄糖、60 mg/L KH_2PO_4 、47.5 mg/L Na_2HPO_4 , 调 pH 至 7.2)由本实验室配制. 所有引物均由上海生工生物工程技术服务有限公合成.

1.2 方法

1.2.1 细胞转染和稳转细胞系构建

将 HA-GPR84-pcDNA3.0 重组质粒与 $G\alpha 16$ 质粒(各 2 μg)与 2×10^6 个 HEK293 细胞混合于 200 μl 电转缓冲液并转移至电转杯中, 用基因导入仪在电容 25 F, 电压 900 V 的条件下进行共转. 将转染后的细胞放置于含 10 ml DMEM 培液的 100 mm 细胞培养皿中. 培养 24 h 后, 添加 800 mg/L G418 和 10 mg/L blasticidin, 每隔 3~4 天更换培养液直到形成单个的细胞克隆团, 挑选检测, 将经钙流实验检测鉴定后的混合克隆梯度稀释成单克隆种于 96 孔板中, 2~3 周左右单克隆细胞团形成. 单克隆经钙流实验检测鉴定后, 扩大培养, 此即 HEK293/HA-GPR84-pcDNA3.0/ $G\alpha 16$ 稳转细胞系(简称 HEK293/GPR84 细胞株). HA-pcDNA3.0 质粒空载体与 $G\alpha 16$ 质粒转染 HEK293 细胞方法与上述方法一致.

1.2.2 RT-PCR

a. mRNA 抽提: 用 TRIzol 试剂裂解 HEK293/GPR84 细胞, 并按说明书的操作步骤抽提细胞总 RNA. b. 反转录: 按 PrimeScript™ RT reagent Kit 的要求进行反转录, 得到 cDNA. c. PCR 反应: 以逆转录获得的 cDNA 为模板扩增, 参照 GenBank 中提供的人源 GPR84 序列(序列号 NM_020370), 我们设计了人源 GPR84 基因引物, GAPDH 基因为本次 PCR 的内参, 本实验引物均由软件 primer 5 设计. GPR84 基因的引物: 上游引物的序列为 5' GGATCCATGTGGAACAGCTCTGACG 3', 下游引物的序列为 5' CTCGAGCTAATGGAGCCTATGGAAAC 3'; GAPDH 基因的引物: 上游引物的序列为 5' AGGTCGGTGTGACGGATTG 3', 下游引物的序列为 5' TGTA-GACCATGTAGTTGAGGTCA 3'. PCR 反应体系: cDNA 模板 5 μl 、上下游引物共 1 μl 、10×reaction buffer 2 μl 、2.5 mmol/L dNTPs 2 μl 及 rTaqDNA 聚合酶 0.2 μl , 加水补足至 20 μl . 反应条件为: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 30 个循环后, 再 72℃ 终延伸 10 min, PCR 产物用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.2.3 钙流实验

将细胞按 4×10^4 个 / 孔的密度接种于 96 孔 Greiner 平板中, 培养 24 h 后, 去除培养基, 每孔加入 40 μl 含 2 $\mu\text{mol/L}$ Fluo-4 AM 的钙流缓冲液

(Ca²⁺ buffer: HBSS 中加入 BSA 0.5%, sulfinpyrazone 250 μ mol/L, D-glucose 5.6 mmol/L, 现用现配)于培养箱中孵育 45 min. 吸弃染料后, 加入 50 μ l Ca²⁺ buffer, 然后用 Molecular Devices 公司的 Flex Station 3 微孔板检测仪加入 25 μ l/孔含不同浓度(0~10 μ mol/L)6-OAU 的 Ca²⁺ buffer 进行刺激, 同时用 485 nm 光激发并于 525 nm 波段检测细胞内钙离子浓度变化引起的染料荧光强度的改变.

1.2.4 环腺苷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)实验

将细胞种于 100 mm 细胞培养皿中, 培养 24 h 后, 用胰酶消化后, 无血清 DMEM 重悬, 加入 IBMX(终浓度为 0.5 mmol/L), 按 2×10^3 个细胞/孔细胞密度接种至 384 孔板, 然后加入 2.5 μ l 含不同浓度(0~10 μ mol/L)的 6-OAU, 混合均匀, 室温避光孵育 30 min. 然后加入 2.5 μ l 10 μ mol/L Forskolin(腺苷酸环化酶激活剂)混合均匀, 室温避光孵育 30 min. 最后分别加入稀释好的 5 μ l cAMP-d2 和 5 μ l anti-cAMP-Cryptate, 离心混合均匀. 室温避光反应 1 h. 最后在 Envision2101 多功能微孔板酶标仪读数.

1.2.5 免疫荧光染色

细胞用预热无血清 DMEM 洗 3 遍, 然后加抗体 HA-FITC 至 96 孔板, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵育 20 min, 用预热无血清 DMEM 洗 3 遍. 若为内吞实验, 需在不同时间点用 10 μ mol/L 6-OAU 刺激. 吸掉培养液, 用 1 $\times$ PBS 洗 3 遍, 加 80 μ l 预热的 4% PFA, 室温固定 15 min. 吸掉固定液, 用 1 $\times$ PBS 洗 3 遍, 然后加 80 μ l Hoechst, 室温染核 10 min. 吸掉染核液, 用 1 $\times$ PBS 洗 3 遍, 加 100 μ l 1 $\times$ PBS. 最后显微镜观察及拍照.

1.2.6 流式细胞分析(FACS)

细胞用 0.04% EDTA 消化细胞并计数, 用 1 $\times$ PBS 洗涤 3 遍, 等体积分装至 6 支 1.5 ml 离心管. 然后用 10 μ mol/L 6-OAU 分别刺激 0、5、15、30、60、90 和 120 min, 刺激后立即置于冰上. 用冰 FACS buffer(含 0.5% BSA 的 1 $\times$ PBS)重悬细胞, 4 $^{\circ}$ C 1000 r/min 离心 3 min, 弃上清. 重复此步骤 3 次. 加入预冷的 4% paraformaldehyde, 冰上固定 15 min 后, 4 $^{\circ}$ C 1000 r/min 离心 3 min, 弃上清. 重复此步骤 3 次. 加入抗体 FITC-conjugated anti-HA 在冰上孵育 1 h, 4 $^{\circ}$ C 1000 r/min 离心 3 min, 弃上清. 重复此步骤 3 次. 最后用冰 FACS buffer 重悬, 流式细胞仪检测.

1.2.7 蛋白质印迹分析(Western blot)

将细胞种于 12 孔培养板, 培养 24 h. 实验前, 将培养液换为无血清培养液, 使细胞饥饿 2 h, 然后用 10 μ mol/L 6-OAU 分别刺激 0、2、5、10、20、30、60 和 120 min. 以 DMSO(0.1%)为阴性对照. 刺激后立即将细胞置于冰上, 并用 1 $\times$ SDS 裂解液收集样品并经超声裂解. 最后 98 $^{\circ}$ C 水浴加热 5 min 使蛋白变性后上样进行 SDS-PAGE, 电泳完成之后转膜, 之后根据 marker 分子质量分别定位裁剪 PVDF 膜, 5%脱脂奶粉封闭液(1 $\times$ TBST 缓冲液配制)室温封闭 1 h, 1 $\times$ TBST 缓冲液洗 3 遍, 每遍 5 min; 将封闭好的 PVDF 膜加一抗, 即 5% TBST-BSA 稀释的 Rabbit anti-Erk1/2 抗体(1:2000)、Rabbit anti-phospho-Erk1/2 抗体(1:2000)和 Rabbit anti-GAPDH (1:5000), 4 $^{\circ}$ C 过夜, 1 $\times$ TBST 缓冲液洗 3 遍; PVDF 膜二抗室温孵育 1 h(5% TBST-BSA 稀释的 HRP-GAR IgG 抗体, 1:10000); 1 $\times$ TBST 缓冲液洗 3 遍; 用平头镊将膜取出, 用吸水纸吸去过多的液体, 置于洁净保鲜膜上, 每 10 cm² 膜加 1 ml Amersham ECL Plus Western blotting 显色液, 放置 1 min; 倒去 ECL 显色液, 用吸水纸吸去过多的液体, 将膜放在两片保鲜膜中间, 立即显影.

1.2.8 GPR84 拮抗剂的高通量筛选

用于筛选 GPR84 拮抗剂的化合物库包含约 160 000 个不同结构的化合物. 方法如下: 将细胞种于 100 mm 细胞培养皿中, 培养 24 h 胰酶消化后, 用含 2 μ mol/L Fluo-4 AM 的 Ca²⁺ buffer 重悬, 在培养箱中孵育 45 min. 离心弃染料后, 按 4×10^4 个细胞/孔/25 μ l 细胞密度接种至 384 孔板, 加入 25 μ l 含不同化合物的 Ca²⁺ buffer, 混合均匀, 室温避光孵育 10 min. 用 FDSS 7000EX 高通量 CCD 读板机加入 5 μ l/孔含 6-OAU 的 Ca²⁺ buffer 进行刺激, 同时用 485 nm 光激发并于 525 nm 波段检测细胞内钙离子浓度变化引起的染料荧光强度的改变. 检测时, 对于每块 384 孔细胞板, 设 24 个阳性对照孔(1 μ mol/L 6-OAU), 24 个阴性对照孔(1% DMSO), 待测化合物初筛浓度为 10 μ mol/L. 待测化合物的拮抗活性用荧光强度的反应率来表示, 阳性对照的荧光强度检测值被定义为 0%(100%抑制), 而阴性对照的荧光强度检测值被定义为 100%(0%抑制). 待测化合物的拮抗活性反应率以上述两者作为基准计算. 初筛时挑选拮抗活性大于 70%(即荧光强度的反应率小于 30%)的化合物为阳性化

合物. 根据初筛结果再进行复筛.

1.2.9 数据处理

本文所用计算公式如下:

信噪比(Signal/Background Ratio, S/B)=信号平均值 / 本底平均值

Z' 因子= $1 - (3 \times \text{信号标准差} + 3 \times \text{本底标准差}) / |\text{信号平均值} - \text{本底平均值}|$

拮抗化合物反应率=(待测化合物值-阳性对照值)/(阴性对照值-阳性对照值) $\times 100\%$

拮抗活性= $1 - \text{拮抗化合物反应率}$

所有实验至少重复 3 次, 结果用 GraphPad Prism 5 软件统计分析, 数据用平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm s$)表示, 由 t 检验进行分析, $P < 0.05$ 为具有统计学意义.

2 结果与分析

2.1 构建稳定表达 GPR84/G α 16 蛋白的 HEK293 细胞株

HA-GPR84-pcDNA3.0 和 G α 16 的质粒上分别含有 G418 与 blasticidin 抗性基因, 因此只有稳定表达了这两种质粒的细胞, 才能长期存活于两种抗

生素同时存在的环境中. 用浓度为 800 mg/L G418 和 10 mg/L blasticidin 筛选 30 天左右, 将存活下来的细胞挑选混合克隆进行钙流检测, 将检测得到的阳性克隆稀释成单个细胞种于 96 孔细胞培养板中, 逐步扩增至形成克隆, 再次进行检测, 最后获得稳定表达 GPR84 和 G α 16 的 HEK293 细胞株 (HEK293/GPR84 细胞株).

2.2 RT-PCR 检测 GPR84 基因的表达

将 HEK293/GPR84 细胞株中提取的 RNA 经反转录得到的 cDNA, 以其为模板, 用扩增 GPR84 基因的引物, 通过 PCR 扩增出与目的片段大小一致的条带(图 1a). 这说明该细胞株的确有 GPR84 mRNA 表达.

2.3 稳定表达 GPR84 受体细胞株的受体定位及功能确定

免疫荧光染色法检测结果显示, 在构建的 HEK293/GPR84 细胞株的膜表面上, 可清楚地观察到 GPR84 受体蛋白的表达(图 1b). 以不同浓度的 6-OAU 处理后进行钙流检测, 即获得稳定表达 GPR84 的 HEK293 细胞内 Ca^{2+} 水平的变化, 且与激动剂 6-OAU 呈剂量依赖的效应关系(图 1c),

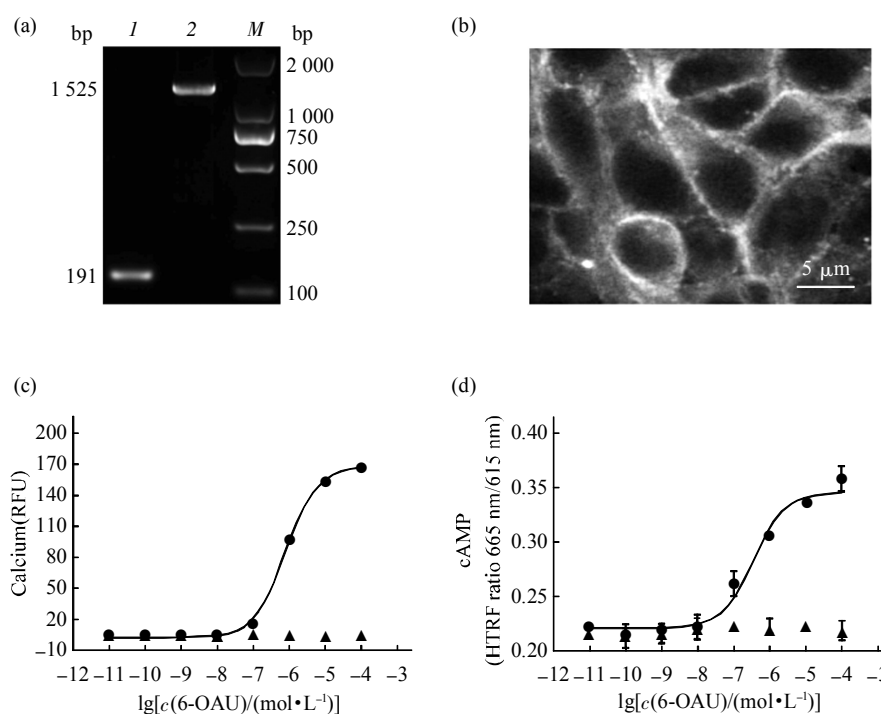


Fig. 1 Characterization and Function of HEK293/GPR84/G α 16 cell line

(a) RT-PCR results to detect expression of GPR84. M : DL 2000 marker; I : PCR product of GAPDH (control); 2: PCR product of GPR84. (b) Immunofluorescent image of HEK293 cells stably expressing GPR84 on membrane. (c) Dose response of 6-OAU in inducing calcium response in HEK293/GPR84 cells and control HEK293/empty vector cells. (d) Dose response of 6-OAU in inducing intracellular cAMP change in HEK293/GPR84 cells and control HEK293/empty vector cells. Data are presented as the $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). $\bullet$ — $\bullet$: GPR84; $\blacktriangle$: Empty vector.

半数反应浓度(EC_{50})值为 $0.795 \mu\text{mol/L}$. 而转染了 HA-pcDNA3.0 空载体与 G α 16 质粒的 HEK293 细胞没有任何反应.

为了进一步验证表达 GPR84 的稳转细胞系的功能, 还利用其进行了 cAMP 实验. GPR84 受体蛋白是与 G α i 蛋白相偶联的 GPCR, 此类受体被激活后通过 G α i 蛋白抑制下游信号通路的腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC)活性, 下调 cAMP 水平^[11]. 因此用不同浓度的 6-OAU 预先孵育后, 再加入 $10 \mu\text{mol/L}$ Forskolin 处理后进行 cAMP 检测, 同样检测到稳定表达 GPR84 的 HEK293 细胞内 cAMP 水平的变化, 且与 6-OAU 呈剂量依赖的效应关系(图 1d), 半数反应浓度(EC_{50})值为 $0.360 \mu\text{mol/L}$, 与文献报道的相当^[10]. 同样转染了空载体的 HEK293 细胞也没有任何反应.

2.4 6-OAU 通过激活 GPR84 导致 ERK 磷酸化

GPCR 常常通过 MAPK 信号转导通路的三级激酶级联反应将细胞外刺激转导至细胞内并完成相应的生物学效应. 细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)包括 ERK1 和

ERK2, 其为将信号从表面受体传导至细胞内的关键激酶. 磷酸化激活的 ERK1/2 由胞质转位到核内, 进而介导 Elk-1、ATF、NF- κ B、Ap-1、c-fos 和 c-Jun 等转录因子的转录活化, 从而参与细胞增殖与分化、细胞形态维持、细胞骨架的构建、细胞凋亡和细胞的恶变等多种生物学反应^[12].

我们检测了 6-OAU 是否通过 GPR84 调节 ERK 磷酸化水平. 实验结果表明, 在表达 GPR84 的 HEK293 细胞中, 阳性对照 PMA(佛波酯, $1 \mu\text{mol/L}$)能导致 p-ERK 的增加. 而用 $10 \mu\text{mol/L}$ 6-OAU 刺激后, p-ERK 水平也有明显增加, 此现象在刺激后 2 min、5 min 后最为明显, 并呈时间依赖性下降(图 2a). 而在不表达 GPR84(转染空载体)的 HEK293 细胞中, 除阳性对照 PMA 外, $10 \mu\text{mol/L}$ 6-OAU 均不能导致明显的 ERK 磷酸化(图 2b). PMA 是蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)的激活剂, 其对 ERK 的激活不依赖于 GPR84. 这些实验结果说明 6-OAU 可以通过 GPR84 激活 ERK 介导下游的信号通路.

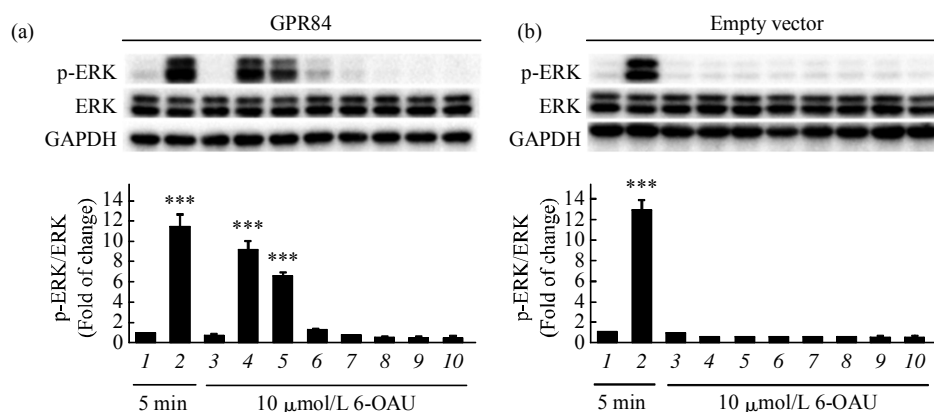


Fig. 2 The activation of GPR84 with 6-OAU led to the phosphorylation of ERK

(a) HEK293/GPR84 cells were stimulated with 6-OAU or PMA for indicated time, and the phosphorylation level of ERK was observed by Western blot. (b) HEK293 cells transfected with empty vector were stimulated with 6-OAU with or PMA for indicated time, and the phosphorylation level of ERK was observed by Western blot. GAPDH served as loading control. Data are presented as the $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). *** $P < 0.001$ vs Vehicle(DMSO control). 1: Vehicle; 2: $1 \mu\text{mol/L}$ PMA; 3: 0 min; 4: 2 min; 5: 5 min; 6: 10 min; 7: 20 min; 8: 30 min; 9: 60 min; 10: 120 min.

2.5 6-OAU 诱导 GPR84 发生脱敏现象

许多 GPCR 在激动剂的长时间或反复刺激下会发生脱敏现象(desensitization). 在 HEK293/GPR84 细胞中用 6-OAU 刺激时会明显提高细胞内的钙离子浓度(图 1c). 因此我们利用钙流实验检测了 6-OAU 是否会引起 GPR84 脱敏. 实验包括两次

钙流检测, 第一次钙流实验分别用 1% DMSO(阴性对照), $10 \mu\text{mol/L}$ 6-OAU 进行刺激. 与阴性对照相比, 6-OAU 在第一次刺激时(0~180 s)显著激起钙流信号, 而 1% DMSO(阴性对照)不能激起钙流信号(图 3a, 左); 之后 37°C 条件下继续孵育 10 min, 进行第二次钙流检测, 这两组实验都分别加入

10 $\mu\text{mol/L}$ 6-OAU 进行刺激 180 s, 1% DMSO 阴性对照组明显激起钙流信号, 而 10 $\mu\text{mol/L}$ 6-OAU 虽然激起一定的钙流信号, 但相对于第一次钙流信号, 第二次钙流信号明显减弱(图 3a, 右), 说明

GPR84 在 6-OAU 的持续刺激下发生了脱敏(图 3b). 综上所述, GPR84 经配体持续重复刺激后的确发生了脱敏现象.

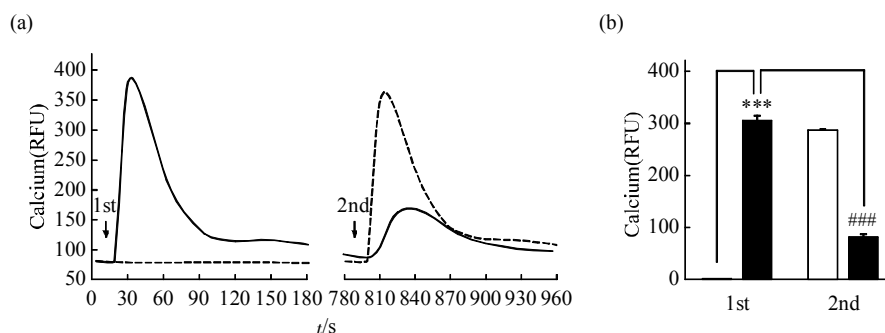


Fig. 3 Desensitization of GPR84 induced by 6-OAU

(a) HEK293/GPR84 cells were stimulated (first arrow) with 10 $\mu\text{mol/L}$ 6-OAU and DMSO (negative control). Intracellular calcium was measured. After a 10 min stimulation, cells were washed and restimulated (second arrow) with 10 $\mu\text{mol/L}$ 6-OAU. Intracellular calcium levels were remeasured. Representative calcium signals are presented. ----: Vehicle; —: 10 $\mu\text{mol/L}$ 6-OAU. (b) Statistical analysis of the calcium peak value presented in (a). Data are presented as the $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). *** $P < 0.001$ vs Vehicle (first white bar). ### $P < 0.001$ vs 6-OAU (first black bar). □: Vehicle; ■: 10 $\mu\text{mol/L}$ 6-OAU.

2.6 6-OAU 诱导 GPR84 发生内吞现象

GPCR 在激动剂作用下, 能够从细胞膜上转位至胞内, 即受体内吞现象(internalization). 受体内吞在 GPCR 受体脱敏和复敏过程中扮演了重要角色^[13]. 因此我们利用流式细胞分析技术检测了 6-OAU 是否会引起 GPR84 内吞. 在稳定表达 GPR84 的 HEK293 细胞系中用 10 $\mu\text{mol/L}$ 6-OAU 在 37°C、5% CO_2 条件下刺激 0、15、30、60、90 和 120 min, 然后用带有荧光的 HA 标签的抗体进行染色, 最后用 Guava easyCyte™ 8HT 流式细胞仪检测细胞表面 GPR84 表达水平. 当刺激延长至 5 min 后细胞表面的受体开始减少, 此后至刺激时间达到 60 min 时, 细胞表面受体明显减少, 随着刺激时间的推延而越来越明显(图 4a). 同样用免疫荧光染色法可以得到相同的结果, 用 10 $\mu\text{mol/L}$ 6-OAU 处理细胞 60 min, 与未刺激(0 min)相比(图 4b, 左), 细胞表面 GPR84 发生明显的内吞现象, 胞质内有许多荧光小点, 即为内吞的 GPR84(图 4b, 右, 白色箭头所示). 这两个实验充分说明了在 6-OAU 作用下, GPR84 发生了内吞现象, 随着刺激时间的推移而越来越明显.

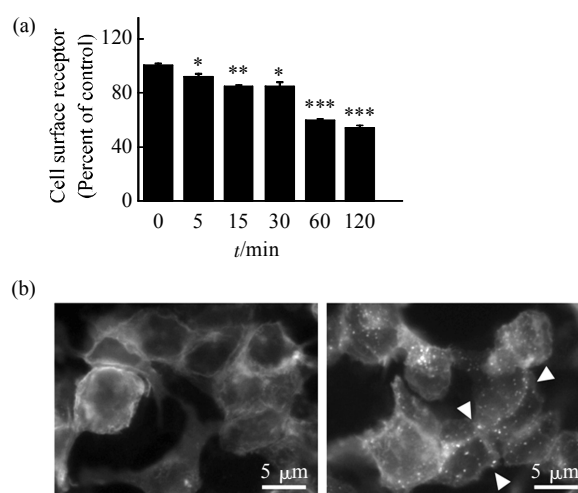


Fig. 4 Internalization of GPR84 induced by 6-OAU

(a) HEK293/GPR84 cells were stimulated with 10 $\mu\text{mol/L}$ 6-OAU for indicated time, and the internalization level of GPR84 was measured by Flow Cytometer. Statistical Histograms are presented. (b) Immunofluorescent image of GPR84 internalization. Left, HEK293/GPR84 cells were stimulated with 10 $\mu\text{mol/L}$ 6-OAU for 0 min; Right, HEK293/GPR84 cells were stimulated with 10 $\mu\text{mol/L}$ 6-OAU for 60 min. Data are presented as the $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control(0 min).

2.7 GPR84 拮抗剂的高通量筛选及功能活性验证

鉴于钙流检测在以 GPCR 为靶点的药物筛选中应用广泛、操作方便、稳定性好等优点, 我们利用构建的稳定表达 GPR84/G α 16 蛋白的 HEK293 细胞株进行了高通量筛选的优化。在实验的优化过程中, 包括细胞密度、孵育时间等许多因素必须考虑。Z' 因子和信号 / 背景比(S/B)被用于验证整个实验体系是否符合高通量筛选的要求。Z' 因子是常用于判断高通量筛选模型稳定性和可靠性的统计参数, Z' 因子综合考虑了信号的变化和波动范围, 与筛选源无关, 只与筛选方法本身有关, 反映了筛选方法的稳定性与可靠性^[4]。如果 $Z' \geq 0.5$, 说明筛选方法适用于高通量筛选; 如果 $Z' < 0.5$, 则筛选

方法尚需调整。我们所进行的优化方法的 Z' 因子为 0.94, 信号 / 背景比(S/B)为 3.74, 说明整个系统符合高通量筛选的要求(图 5a)。我们利用该高通量筛选模型对中国科学院上海药物研究所国家化合物样品的 160 000 个化合物开展了大规模随机筛选, 由于暂无 GPR84 拮抗剂报道, 以 1 $\mu\text{mol/L}$ 6-OAU 为阳性对照(脱敏), 1% DMSO 为阴性对照, 300 nmol/L 6-OAU 为激动剂, 部分化合物的初步筛选结果如图 5b 所示。然后对 GPR84 拮抗活性大于 70%(即荧光强度的反应率小于 30%)的阳性化合物进行单浓度四复孔复筛, 得到 20 个对 GPR84 有拮抗活性的候选化合物(图 5c)。

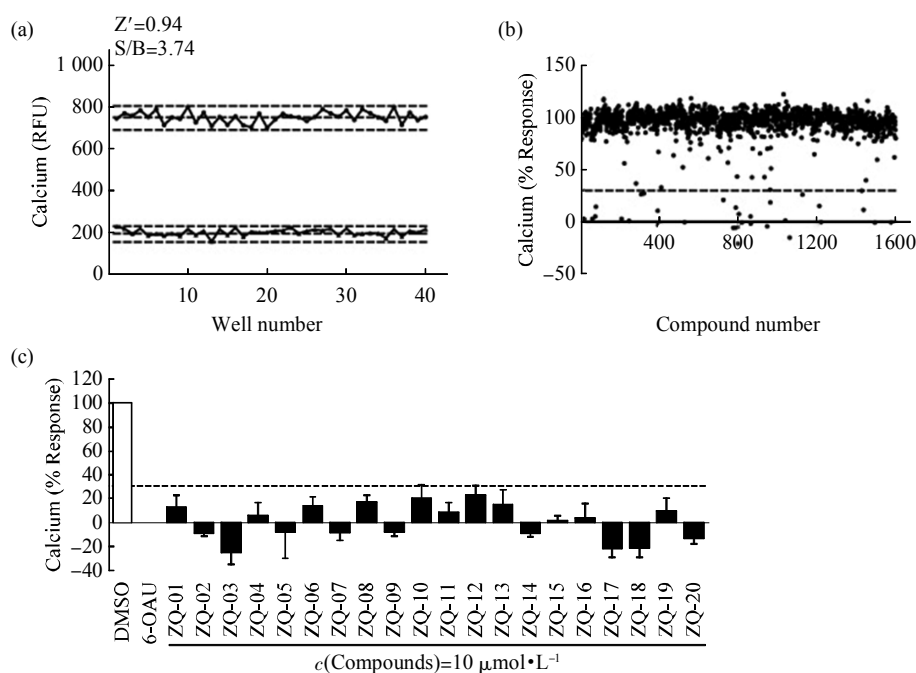


Fig. 5 High-throughput screening and discovery of novel small molecule antagonists of GPR84

(a) Z' factor determination. At the optimized conditions, 40 replicates of positive and negative signals were studied. Dashed lines indicate means $\pm$ 3SD of 40 data points. Z' value for the assay was 0.94, and the signal-to-background ratio (S/B) was 3.74. (b) Results of the primary screening of 1600 compounds using the calcium assay. DMSO (1%) and 6-OAU (1 $\mu\text{mol/L}$) were used as the negative and positive controls, respectively. Dashed lines indicate 30% response of controls. (c) Twenty compounds that induced a lower than 30% Response in calcium mobilization activity in the primary screening were further tested in quadruplication (10 $\mu\text{mol/L}$). DMSO (1%) and 6-OAU (1 $\mu\text{mol/L}$) were used as the negative and positive controls, respectively. Dashed lines indicate 30% response of controls. Data are presented as the $\bar{x} \pm s$ ($n=3$).

将复筛获得的对 GPR84 有拮抗活性的候选化合物, 以不同浓度处理 GPR84 细胞系后用 3 $\mu\text{mol/L}$ 6-OAU 刺激进行钙流检测, 进一步筛选得到 4 个拮抗活性较好的化合物 ZQ-02、ZQ-06、ZQ-13、ZQ-20, 它们的半数反应抑制浓度(IC_{50})值分别为 0.976、0.361、1.754、0.696 $\mu\text{mol/L}$ (图 6a~d)。同

时, 检测了这些拮抗剂对 GPR84 受体下游信号通路的影响。ERK 磷酸化实验结果表明, 表达 GPR84 的 HEK293 细胞分别在 20 $\mu\text{mol/L}$ ZQ-02、ZQ-06、ZQ-13、ZQ-20 中孵育 30 min 后, 再加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 6-OAU 刺激 5 min, ZQ-02、ZQ-06、ZQ-13 均能明显下调 6-OAU 激活 GPR84 导致的

ERK 磷酸化水平, 但 ZQ-20 的作用并不明显, 或许它是通过其他的信号通路发挥作用(图 6e). 这些实验结果说明 GPR84 的拮抗剂可以抑制激动剂引

起的细胞内钙流变化和 ERK 磷酸化, 从而调控下游的信号通路.

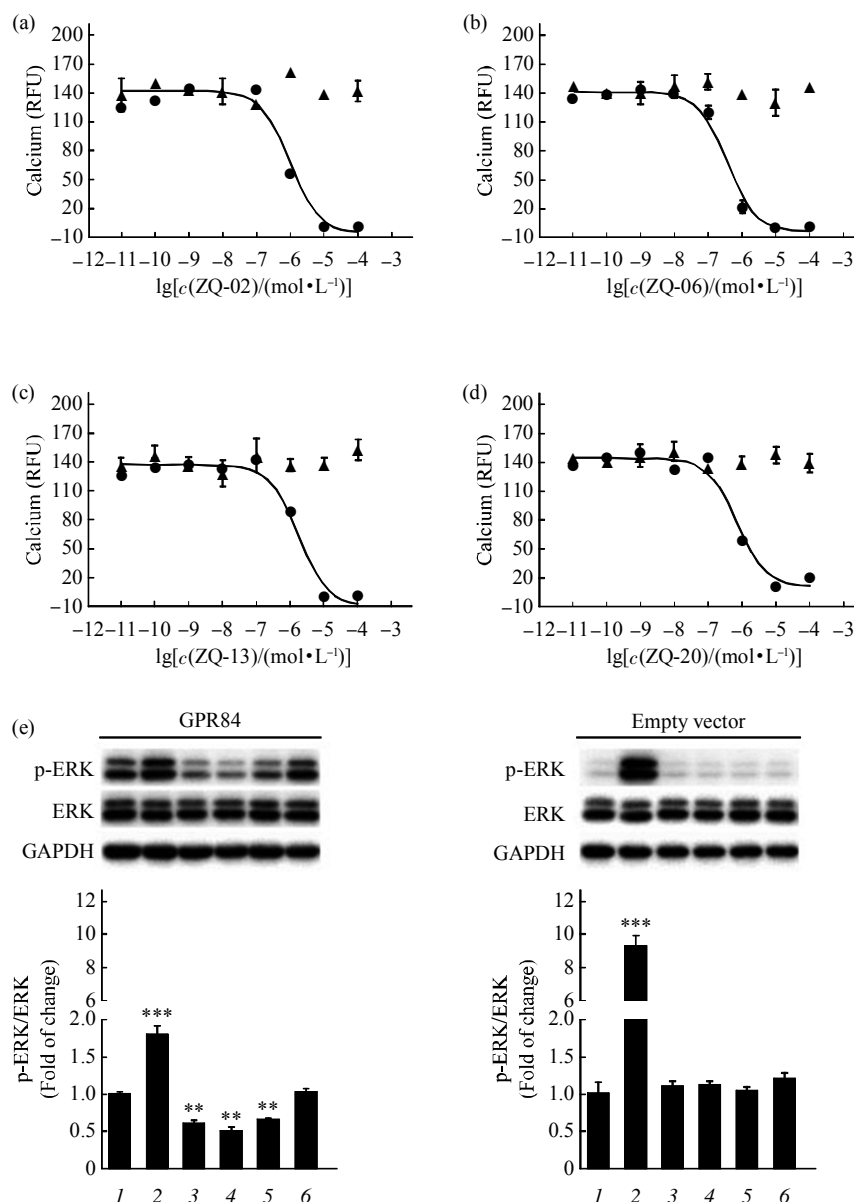


Fig. 6 Inhibition of intracellular signal transduction in HEK293 cells expressing GPR84 by ZQ-02, -06, -13 and -20

(a~d) Dose-response of ZQ-02(a), -06(b), -13(c) and -20(d) in inhibiting 6-OAU induced calcium response in HEK293/GPR84 cells and control HEK293/empty vector cells. ●: GPR84; ▲: Empty vector. (e) Representative Western blot analysis of ERK phosphorylation in HEK293/GPR84 cells or HEK293 cells transfected with empty vector indicated with ZQ-02, -06, -13 and -20 for 30 min, and then stimulated with 6-OAU with or PMA for 5 min, and the phosphorylation level of ERK was observed by Western blot. GAPDH served as loading control. Data are presented as the $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Vehicle (DMSO control). 1: Vehicle; 2: 1 $\mu\text{mol/L}$ PMA; 3: 20 $\mu\text{mol/L}$ ZQ-02; 4: 20 $\mu\text{mol/L}$ ZQ-06; 5: 20 $\mu\text{mol/L}$ ZQ-13; 6: 20 $\mu\text{mol/L}$ ZQ-20.

3 讨 论

G 蛋白偶联受体又称为七次 α 螺旋跨膜受体,

GPCRs 能结合和调节 G 蛋白的活性, 对各种细胞外刺激如气味、脂类、激素、细胞因子等甚至光线产生反应, 并将各类刺激所携带的信息传送到细胞

内从而启动下游信号通路, 介导多种重要生理活动, 是细胞信号传导中非常重要的受体^[15-17]. 研究表明, 细胞表面的 GPCRs 能够参与调节多种疾病的病理和生理过程, 在多种重要疾病中扮演关键的角色, 其功能失调或者结构的意外改变是许多疾病产生的根本原因^[18-19].

中链脂肪酸受体 GPR84 便是众多 GPCRs 中的一种, 其下游信号转导途径是对百日咳毒素 (pertussis toxin, PTX) 敏感的 $G_{\alpha i/o}$ 通路^[6]. GPR84 在白细胞中特异性表达, 并能被脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 在单核细胞和巨噬细胞中诱导. 在 LPS 存在的条件下, 中链脂肪酸可以通过 GPR84 刺激 IL-12 p40 亚基的分泌, 而 IL-12 在诱导和维持 Th1 细胞方面具有重要作用, 以此通过 Th1 细胞抑制 Th2 细胞来介导细胞免疫^[6, 20]. GPR84 功能基因敲除的小鼠, 其体内的 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的增殖不受影响, 而 IL-4 等 Th2 细胞分泌的细胞因子会增加, 这说明 GPR84 并不是 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞增殖分化的必须参与者, 但 GPR84 的缺失能选择性影响 IL-4 的产生^[21]. 当脂肪组织中发生炎症细胞如巨噬细胞浸润时, 脂肪细胞的 GPR84 表达会增加, 从而加重肥胖和糖尿病之间的恶性循环. 这与浸润到脂肪组织的巨噬细胞分泌 TNF- α 促进 GPR84 表达有密切关系, 同时, 相关实验也证明 TNF- α -NF- κ B 通路在调控 GPR84 的表达中起着关键作用^[22].

在实验性自身免疫性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 等神经炎症疾病的发病进程中, 大脑和脊髓中小神经胶质细胞 (microglia) 表面的 GPR84 表达会增加, 并且高表达 GPR84 的小神经胶质细胞会成簇聚集在血管周围, 随着 EAE 病情的加重, 高表达 GPR84 的小神经胶质细胞也随之增加, 这可能与 GPR84 刺激 IL-12 p40 分泌, 诱导和维持 Th1 细胞^[6], 从而加重 EAE 相关, 由此说明 GPR84 在 MS 等神经炎症疾病中可能发挥着重要的功能^[9]. 此外, GPR84 也是视网膜以及其他眼组织正常生长发育所必须^[23]. 由此可见, GPR84 在调节免疫细胞应答和代谢平衡中发挥了重要作用.

除早前报道的内源性配体中链脂肪酸及外源性激动剂如二吡啶甲烷与 6-OAU 外, 至今较少有 GPR84 的拮抗剂相关报道. 由于 GPR84 是一种促进炎症发生的受体^[10], 因此, 尽快找到其拮抗剂, 对于抑制炎症发生, 治疗多发性硬化、内毒素血症

等炎症疾病具有重大意义和广阔的应用前景.

细胞内 Ca^{2+} 是一种非常重要的 GPCR 信号通路第二信使. 通常来说只有与 $G_{\alpha q/11}$ 偶联的 GPCR 和配体结合后, 才能够显著增加细胞内的钙离子. 然而, 多功能 G 蛋白 $G_{\alpha 15/16}$ (属于 $G_{\alpha q}$ 蛋白) 可以改变 GPCR 与下游信号蛋白之间的偶联关系, 使原本与 $G_{\alpha s}$ 或 $G_{\alpha i}$ 偶联的受体也产生钙流反应^[24-27]. GPR84 原本是和 $G_{\alpha i}$ 偶联的 G 蛋白偶联受体, 其下游信号通路是抑制腺苷酸环化酶 (adenylate cyclase, AC) 活性, 下调 cAMP 水平^[11]. 因而需采用 cAMP 实验进行高通量筛选, 但此法还需加 Forskolin (腺苷酸环化酶激活剂) 另行激动, 操作繁琐且耗时太长, 该问题在高通量筛选显得尤为严重. 因此, 我们在 HEK293 细胞中共转染 GPR84 和 $G_{\alpha 16}$ 质粒, 使其过表达 $G_{\alpha 16}$ 将 GPR84 偶联的 $G_{\alpha i}$ 信号通路转移至 $G_{\alpha q}$ 上来, 这样就能用钙流方法作为 GPR84 小分子拮抗剂的高通量筛选技术, 从而避免原来 cAMP 实验的问题, 使得操作方便、省时、易于高通量筛选.

综上所述, 本研究成功构建了稳定表达 GPR84 和 $G_{\alpha 16}$ 蛋白的细胞株, 初步研究了 GPR84 生物学功能, 并将其应用于 GPR84 新型小分子拮抗剂的高通量筛选, 已经得到一些活性较好的候选化合物, 为进一步阐明 GPR84 的生物学功能, 研究并治疗与其相关免疫疾病奠定了坚实的基础.

参 考 文 献

- [1] Hara T, Hirasawa A, Ichimura A, *et al.* Free fatty acid receptors FFAR1 and GPR120 as novel therapeutic targets for metabolic disorders. *J Pharm Sci*, 2011, **100**(9): 3594-3601
- [2] Covington D K, Briscoe C A, Brown A J, *et al.* The G-protein-coupled receptor 40 family (GPR40-GPR43) and its role in nutrient sensing. *Biochem Soc Trans*, 2006, **34**(5): 770-773
- [3] Gotoh C, Hong Y H, Iga T, *et al.* The regulation of adipogenesis through GPR120. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **354**(2): 591-597
- [4] Sanderson I R. Short chain fatty acid regulation of signaling genes expressed by the intestinal epithelium. *J Nutr*, 2004, **134** (9): 2450S-2454S
- [5] Wittenberger T, Schaller H C, Hellebrand S. An expressed sequence tag (EST) data mining strategy succeeding in the discovery of new G-protein coupled receptors. *J Mol Biol*, 2001, **307**(3): 799-813
- [6] Wang J, Wu X, Simonavicius N, *et al.* Medium-chain fatty acids as ligands for orphan G protein-coupled receptor GPR84. *J Biol Chem*, 2006, **281**(45): 34457-34464
- [7] Gloriam D E, Fredriksson R, Schiöth H B. The G protein-coupled

- receptor subset of the rat genome. BMC Genomics, 2007, **8**: 338
- [8] Yonezawa T, Kurata R, Yoshida K, *et al.* Free fatty acids-sensing G protein-coupled receptors in drug targeting and therapeutics. Curr Med Chem, 2013, **20**(31): 3855–3871
- [9] Bouchard C, Pagé J, Bédard A, *et al.* G protein-coupled receptor 84, a microglia -associated protein expressed in neuroinflammatory conditions. Glia, 2007, **55**(8): 790–800
- [10] Suzuki M, Takaishi S, Nagasaki M, *et al.* Medium-chain fatty acid-sensing receptor, GPR84, is a proinflammatory receptor. J Biol Chem, 2013, **288**(15): 10684–10691
- [11] Marinissen M J, Gutkind J S. GPCR and signaling networks-emerging paradigms. Trends Pharmacol Sci, 2001, **22**(7): 368–376
- [12] Pierce K L, Premont R T, Lefkowitz R J. Seven-transmembrane receptors. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, **3**(9): 639–650
- [13] Calebiro D, Nikolaev V O, Persani L, *et al.* Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. Trends Pharmacol Sci, 2010, **31**(5): 221–228
- [14] 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
- [15] Ritter S L, Hall R A. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009, **10**(12): 819–830
- [16] Woehler A, Ponimaskin E G. G protein—mediated signaling: same receptor, multiple effectors. Curr Mol Pharmacol, 2009, **2**(3): 237–248
- [17] Senderowitz H, Marantz Y. G Protein-Coupled Receptors: target-based in silico screening. Curr Pharm Des, 2009, **15** (35): 4049–4068
- [18] Thompson M D, Percy M E, McIntyre B W. G protein-coupled receptors disrupted in human genetic disease. Methods Mol Biol, 2008, **448**: 109–137
- [19] George S R, O'Dowd B F, Lee S P. G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. Nat Rev Drug Discov, 2002, **1**(10): 808–820
- [20] Talukdar S, Olefsky J M, Osborn O. Targeting GPR120 and other fatty acid-sensing GPCRs ameliorates insulin resistance and inflammatory diseases. Trends Pharmacol Sci, 2011, **32**(9): 543–550
- [21] Venkataraman C, Kuo F. The G-protein coupled receptor, GPR84 regulates IL-4 production by T lymphocytes in response to CD3 crosslinking. Immunol Lett, 2005, **101**(2): 144–153
- [22] Nagasaki H, Kondo T, Fuchigami M, *et al.* Inflammatory changes in adipose tissue enhance expression of GPR84, a medium-chain fatty acid receptor: TNF α enhances GPR84 expression in adipocytes. FEBS Lett, 2012, **586**(4): 368–372
- [23] Perry K J, Johnson V R, Malloch E L, *et al.* The G-protein-coupled receptor, GPR84, is important for eye development in *Xenopus laevis*. Dev Dyn, 2010, **239**(11): 3024–3037
- [24] Cabrera-Vera T M, Vanhauwe J, Thomas T O, *et al.* Insights into G protein structure, function, and regulation. Endocr Rev, 2003, **24**(6): 765–781
- [25] Coward P, Chan S D, Wada H G, *et al.* Chimeric G proteins allow a high-throughput signaling assay of Gi-coupled receptors. Anal Biochem, 1999, **270**(2): 242–248
- [26] Zhu T, Fang L Y, Xie X. Development of a universal high-throughput calcium assay for G-protein- coupled receptors with promiscuous G-protein Galpha15/16. Acta Pharmacol Sin, 2008, **29**(4): 507–516
- [27] Emkey R, Rankl N B. Screening G protein-coupled receptors: measurement of intracellular calcium using the fluorometric imaging plate reader. Methods Mol Biol, 2009, **565**: 145–158

Establishment and Application of a High-throughput-screening Model for Medium-chain Fatty Acid-sensing Receptor GPR84*

ZHANG Qing¹⁾, YANG Hui²⁾, LI Jia^{1, 2)}, XIE Xin²⁾, LI Jing^{2)**}

¹⁾ Institutes for Advanced Interdisciplinary Research, East China Normal University, Shanghai 200062, China;

²⁾ The National Center for Drug Screening, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract G protein coupled receptor 84(GPR84) is medium-chain fatty acid-sensing receptor(C9~C14). It plays an important role in metabolism of fatty acid and immune response, and it's also deeply involved in inflammatory immune diseases such as multiple sclerosis and endotoxemia. It may provide an effective method to treat these diseases by finding GPR84 ligands. It's important to construct a cell line stably expressing human GPR84 for screening its ligands and researching diseases. In this research, we transfected plasmids encoding GPR84 and Gα16 proteins into HEK293 cells. After selection with antibiotics, we picked out monoclones which stably expresses GPR84 to form cell lines. The permanent expression of exogenous GPR84 proteins in HEK293 cells was detected by RT-PCR, immunofluorescence staining, calcium mobilization and cAMP assay. Western blot and FACS were conducted to examine the activity of GPR84. Above all the results demonstrate that GPR84 receptor has excellent biology activity. Based on cell lines stably expressing GPR84, we conducted high-throughput assay for the screening of GPR84 ligands and found new GPR84 antagonists. We can further research on the biological functions of GPR84 and immune diseases targeted GPR84 with these antagonists.

Key words GPR84, stably expressing, calcium mobilization assay, high-throughput screening

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0333

*This work was supported by grants from National Science and Technology Major Project (2012ZX09301001 -005, 2013ZX09507001), National Basic Research Program of China (973 Program)(2014CB541900) and The National Natural Science Foundation of China(81202341).

**Corresponding author.

Tel: 86-21-50801313-193, E-mail: lijing@mail.shnc.ac.cn

Received: January 22, 2015 Accepted: March 5, 2015