

PPAR δ 激动剂高通量筛选模型的建立

Establishment of a Cell-based High-throughput Screening Model for PPAR δ Agonists

吕国平¹, 郑智慧^{2*}, 赵宝华^{1*}, 向四海², 董悦生², 王富强², 张 华²

LÜ Guo-Ping¹, ZHENG Zhi-Hui^{2*}, ZHAO Bao-Hua^{1*}, XIANG Si-Hai², DONG Yue-Sheng², WANG Fu-Qiang² and ZHANG Hua²

¹ 河北师范大学 生命科学学院, 石家庄 050016

² 华北制药集团 新药研发中心天然药物室, 石家庄 050015

¹ College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

² Drug Research & Development Center of North China Pharmaceutical Group Corporation, National Microbial Medicine Engineering & Research Center, Shijiazhuang 050015, China

摘 要 为建立基于细胞瞬时转染的过氧化物酶体增殖物激活受体 δ (peroxisome proliferator-activated receptor delta PPAR δ) 激动剂高通量筛选模型, 用 RT-PCR 技术从肝的总 RNA 中扩增 PPAR δ 基因序列, 将其连至 T 克隆载体进行测序。将序列正确的 PPAR δ 片段连接至 pTARGET 载体上构建表达载体 pTARGET-ppAR δ ; 将合成的 3 个拷贝的 PPRE (peroxisome proliferator receptor response element) 插入 pGL3-promoter 构成报告质粒 pGL3-PPRE \times 3-luc。用脂质体转染技术将表达载体与报告质粒共转染细胞系, 通过检测荧光素酶基因的表达状况评价化合物对 PPAR δ 的激动活性。通过多种条件的优化, 得到了最佳的共转染条件。阳性药苯扎贝特明显提高荧光素酶的表达, 最大上调倍增数可达 10 倍, 并且在一定浓度下阳性药与相对荧光酶的活性表达有较好的量效关系。该筛选模型灵敏、稳定, 为对 PPAR δ 激动剂进行药物研发和 PPAR δ 机理的研究打下基础。

关键词 PPAR δ , 激动剂, 共转染, 高通量筛选

中图分类号 R91 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2007)02-0343-04

Abstract To establish a new high-throughput screening model for the agonist of PPAR δ , PPAR δ gene was obtained by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), and subcloned to pGEM-T Vector for sequencing, then the PPAR δ fragment was excised by restriction enzymes, and inserted into pTARGETTM Vector to construct expression vector pTARGETTM-ppAR δ . Insert three copies of PPRE into pGL3-promoter vector to construct expression vector pGL3-PPRE \times 3-luc. The vector pTARGETTM-ppAR δ was transiently cotransfected with pGL3-PPRE \times 3-luc into different cell lines to assay the expression levels of luciferase. The PPAR δ agonist screening model was established and optimized. Bezafibrate and linoleic acid can induce the expression of luciferase significantly and in a dose-dependent manner. This method can be used for high throughput screening for the agonist of PPAR δ , which might become lead compounds for new anti-atherosclerosis or anti-adiposity drugs.

Key words PPAR δ , agonist, cotransfection, high-throughput screening

Received: September 18, 2006; Accepted: October 12, 2006.

This work was supported by the grant from the National Sciences and Technologies R&D Program (No. 2004AA2Z38784).

* Corresponding author. E-mail: zhaobaohua86178@sohu.com; z-zhihui2003@yahoo.com.cn

国家“十五”重大攻关项目 (No. 2004AA2Z38784)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

过氧化物酶体增植物激活受体(peroxisome proliferators activation receptor, PPARs)属于核受体超家族的成员,在体内配体的激活下与维甲酸X受体(RXRs)形成异源二聚体,与其响应元件(PPRE)结合,调控下游靶基因的转录,从而调控参与糖代谢、脂类代谢和炎症反应等过程^[1]。因此,PPAR与心血管疾病、糖尿病、肥胖和某些肿瘤细胞的生长均有密切关系^[2]。

PPARs有3种亚型:PPAR α 、PPAR δ 和PPAR γ ^[3]。PPAR δ 虽然为PPAR家族中表达比较广泛的一个亚型,在脂肪组织、骨骼肌、心脏、神经胶质细胞、巨噬细胞、胚胎组织、肿瘤组织、皮肤等均有表达。自1992年发现PPAR δ 以来,对于PPAR δ 的研究还不是很透彻,PPAR δ 的药用靶点也是近年来才受到关注。研究表明PPAR δ 对于脂肪代谢和能量平衡具有重要的调节作用^[4,5],PPAR δ 的激动剂也被证明可以降低低密度脂蛋白(LDL)的水平^[6],增加HDL的水平^[7,8],所以PPAR δ 已经作为治疗肥胖和代谢紊乱等相关的心血管疾病和II型糖尿病的药物靶点^[9,10]。因此一些大的医药公司纷纷开展了以PPAR δ 为靶点的药物研发,其中Glaxo Wellcome开发的GW-2433^[11]作为动脉硬化症的预防和治疗药用,Merck开发的L-165041^[12]作为糖尿病治疗药和抗肥胖药的用途,日本山之内制药开发的YM-16638^[13]具有血清胆固醇和LDL胆固醇降低作用。而且最近报道PPAR δ 的配体有望作为抗痛剂和抗炎剂应用^[14,15]。因此,找到PPAR δ 新的激动剂并检测其可能的药用活性成为医药界关注的焦点。

本研究的目的是以人PPAR δ 为靶点构建PPAR δ 激动剂的药物筛选模型,为进一步研究PPAR δ 的机理及其激动剂的药用活性打下基础。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌种与细胞株

pGEM-T Vector, pTARGETTM Vector, pG3-promoter vector 购于Promega公司;3T3L1细胞和Hela细胞由本实验室保存;人正常肝细胞株L02购自上海细胞所。

1.2 主要仪器

GeneAmp PCR System 9600(Backman)凝胶成像系统FUJIFILM LAS-3000(富士);CO₂培养箱(美国科峻仪器公司);1420 VICTOR² Multilabel Counter(美国PE公司)。

1.3 工具酶与主要试剂

Ex-Taq, DL2000 marker, λ DNA/Hind III marker,

DNA Ligation Kit(TaKaRa);限制性内切酶BamH I, Kpn I, Luciferase Assay System(Promega);胎牛血清、PRMI 1640培养液(Hyclone);lipofectamine 2000, SuperscriptII Reverse Transcriptase(Invitrogen), 肝总RNA(Clontech)。

1.4 ppAR δ 片段的扩增

用SuperscriptII Reverse Transcriptase试剂盒对肝总RNA进行反转录,再以cDNA为模板进行PCR, ppAR δ 基因的上游引物和下游引物分别为:5'-AATGGATCCAGATCAGCCATGGAGCA-3', 5'-ACCGGTACCTTAGTACATGTCCTTGTAG-3'。ppAR δ 片段PCR扩增程序:94℃预变性5min;94℃变性30s, 64℃退火45s, 72℃延伸90s, 20个循环;降0.5℃/循环, 94℃变性30s, 54℃退火45s, 72℃延伸90s, 20个循环;72℃延伸7min;反应终止4℃。

1.5 pTARGETTM-ppAR δ 质粒的构建、转化和提取

将PCR产物连接到pGME-T Vector, 送上海生工测序。将序列正确的ppAR δ 基因片段用BamH I、Kpn I双酶切并与pTARGETTM Vector连接, 然后进行Kpn I、BamH I双酶切鉴定。并用QIAGEN-tip 100进行大提质粒, 电泳检测所提的质粒, 测260nm和280nm处的OD进行质粒的定性和定量。

1.6 报告载体pG3-PPRE \times 3-luc的构建

将含有三个5'-AGGACAAAGGTCA-3'拷贝的PPRE DNA片段连接到pG3-promoter载体上构建pG3-PPRE \times 3-luc报告载体。

1.7 细胞培养

细胞用含10%胎牛血清、1 \times 10⁵u/L青霉素和100mg/L链霉素的PRMI 1640培养基, 37℃, 5% CO₂培养箱中培养。

1.8 瞬时转染和报告基因检测

将待转染的细胞株以3 \times 10⁵个/mL细胞数接种细胞于96孔板, 24h后, 将培养液换成含10%胎牛血清的无双抗的PRMI 1640培养基, 用lipofectamine 2000将重组质粒pTARGETTM-ppAR δ 、pG3-PPRE \times 3-luc共转染入细胞中。6h加入不同浓度的阳性药诱导刺激, DMSO作为空白对照。给药24h后裂解细胞, 1420 Multilabel Counter检测荧光素酶的表达活性。荧光素酶的表达诱导倍数为加药组的荧光素酶的活性与空白对照(DMSO)的比值。

2 结果

2.1 PPAR δ 基因序列的克隆

利用RT-PCR从肝的总RNA中扩增PPAR δ 基因, 电泳分析其片段约1300bp(Fig.1)与PPAR δ 基

的基因大小相符。

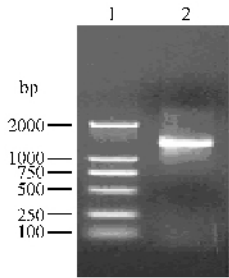


图 1 PPAR δ 基因 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR product of PPAR δ fragenent
1 :DL2000 marker 2 :PCR product of PPAR δ .

2.2 表达载体 pTARGET™-ppAR δ 的构建

将 PCR 产物与 pGME-T 载体连接后 ,进行 *Kpn* I、*Bam*H I 双酶切鉴定 ,分别切下 3kb 和 1300bp 的片段(见 Fig. 2) ,将此阳性克隆送测序 ,测序的结果与报道的序列(NM-006238)一致。将 pGEM-T-PPAR δ 经 *Kpn* I、*Bam*H I 双酶切切下的 PPAR δ 基因片段与 pTARGET™ 载体连接。构建表达载体 pTARGET™-ppAR δ 。

2.3 模型的优化

由于细胞的共转染效率受多种因素的影响 :脂质体的量、脂质体与 DNA 的比 ,两种质粒之间的比例和宿主细胞等。所以本研究对转染的最佳条件进行了多方面的优化。由于脂质体对细胞有毒性作用 ,量不易过大 ,但是 ,脂质体量少的话则降低转染效率。所以本试验取 lipofectamine 2000 脂质体的推荐量 0.5 μ L/well。优化过程均用 10 μ mol/L 阳性药苯扎贝特刺激 ,并用 DMSO 作为阴性对照。

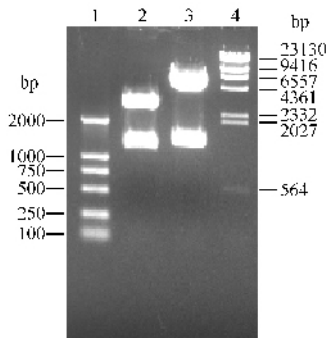


图 2 重组质粒的酶切分析

Fig. 2 Restriction enzymatic analysis of recombinant vector pGEMT-PPAR δ and pTARGET™-ppAR δ

1 : DL2000 marker ; 2 : pGEM-T-PPAR δ /*Kpn* I , *Bam*H I ; 3 : pTARGET™-ppAR δ /*Kpn* I , *Bam*H I ; 4 : λ DNA/*Hind* III marker.

2.3.1 共转染过程中质粒的优化 按照 lipofectamine 2000 脂质体关于 96 孔板转染推荐的 DNA 量范围 ,分别取报告质粒与表达质粒 0.18 μ g/0.02 μ g , 0.1 μ g/

0.1 μ g , 0.02 μ g/0.18 μ g , 0.2 μ g/0.1 μ g 和 0.2 μ g/0.05 μ g 共转染 L02 细胞系 结果见 Fig.3。从结果看出报告质粒与表达质粒在 0.2 μ g/0.05 μ g 时的转染效率较好 ,荧光素酶的诱导倍增数可以到 6.1 ,高于其它几组值 ,所以以下的转染均采用每孔 0.2 μ g 报告质粒与 0.05 μ g 表达质粒。

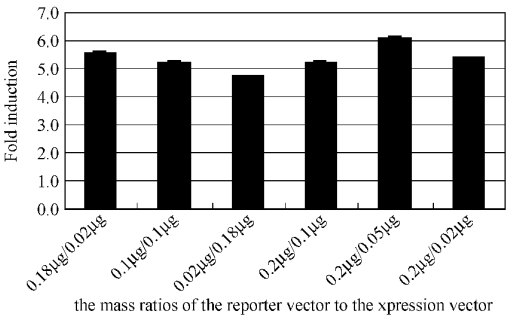


图 3 不同质粒比对转染效率的影响

Fig.3 The fold induction of luciferase activity with 10 μ mol/L bezafibrate at different mass ratios of the reporter vector to the expression vector in L02 cell

2.3.2 细胞株的比较 :利用相同的转染条件对 3T3L1 细胞系、hela 细胞系和 L02 细胞系三个细胞株进行筛选 ,10 μ mol/L 阳性药苯扎贝特刺激 ,结果见 Fig.4。该种转染条件在三个细胞株中均可得到较好的转染效果 ,相比而言 L02 细胞系中诱导表达倍增数最高 ,hela 细胞系其次 ,3T3L1 细胞系最低。

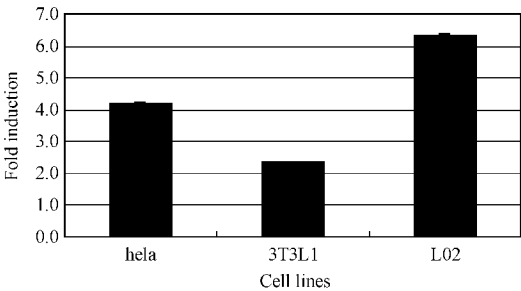


图 4 不同细胞株对转染效果的影响

Fig.4 The fold induction of luciferase activity in different cell lines at the fixed ratio of the vectors

2.4 模型灵敏性考察

利用以上优化好的转染条件 :0.5 μ L/well 的脂质体 ,0.2 μ g/well 报告质粒与 0.05 μ g/well 表达质粒分别共转染 L02 细胞系。本研究分别利用不同浓度的阳性药苯扎贝特进行模型的验证。阳性药苯扎贝特浓度分别选取 0.5 μ mol/L , 1 μ mol/L , 10 μ mol/L , 100 μ mol/L , 1mmol/L 和 10mmol/L 刺激细胞。

转染的结果见 Fig.5。阳性药在一定的浓度范围对 PPAR δ 的激活都呈较好的浓度依赖关系。阳性药苯扎贝特在 1mmol/L 的浓度时效果最佳 ,并且

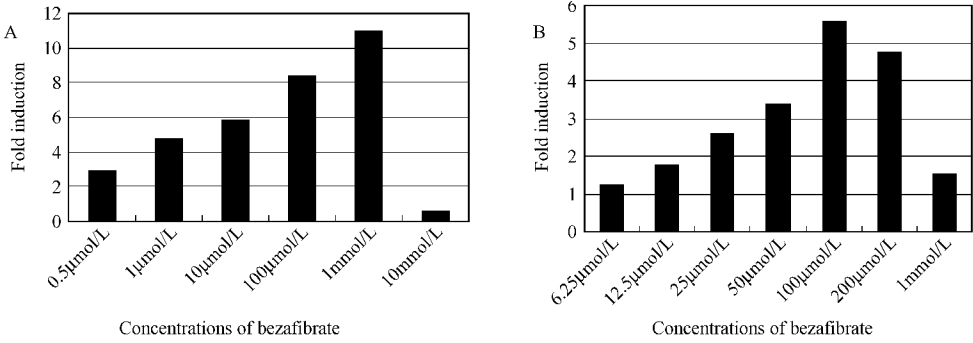


图 5 阳性药苯扎贝特对 PPAR δ 的激动活性

Fig.5 The transactivation effects at different concentrations of positive drugs

A : Bezaifibrate ; B : linoleic acid.

加药量与倍增数有很好的量效关系。苯扎贝特浓度 10mmol/L 过高对细胞有细胞毒作用。

3 讨论

在体内 PPAR δ 在天然或合成的配体的激活下与细胞内的维甲酸 X 受体(RXRs)形成异源二聚体, 并与其响应元件(PPRE)结合, 从而调控下游靶基因的转录。基于该机理我们建立了一个细胞水平的 PPAR δ 激动剂筛选模型。构建了 PPAR δ 全长基因表达质粒和含有 PPRE 报告质粒共转染, 瞬时转染进入细胞, 利用检测荧光素酶报告基因的表达, PPAR δ 的激动剂进行功能性筛选。

本研究通过对共转染多种条件如质粒浓度、细胞系和阳性药浓度进行条件优化, 寻找到了最佳的宿主细胞株以及共转染和药物诱导的最佳条件, 建立了一种基于 96 孔板的高通量细胞筛选方法。阳性对照药物在该模型上有很好的浓度依赖关系, 说明该模型定量效果。并且经过大量的筛选(结果未显示)证明该模型灵敏、稳定。

随着大规模化学物库的建立和药物筛选技术的迅猛发展, 药物的高通量筛选已成为先导药物发现的重要手段。构建适于高通量药物筛选模型是新药发现的基础。本研究建立了稳定灵敏的 PPAR δ 激动剂高通量筛选模型, 为筛选 PPAR δ 的激动剂、进行药物研发和 PPAR δ 机理的研究打下了基础。

REFERENCES(参考文献)

[1] Ehmann J, Vavrusova N, Collan Y, et al. Peroxisome proliferators-activated receptors (PPARs) in health and disease. *Biomed Papers*, 2002, **146**(2): 11 - 14.

[2] Kersten S, Desvergne B, Wahli W, et al. Roles of PPARs in health and disease. *Nature*, 2000, **405**: 421 - 424.

[3] Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, et al. The PPARs: from

orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem*, 2000, **43**: 527 - 550.

[4] Grant DB, Vihang AN, Ronald ME. PPAR δ : a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 2006, **116**(3): 590 - 597.

[5] Nehlin JO, Mogensen JP, Petterson I, et al. Selective PPAR agonists for the treatment of type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, **1067**: 448 - 453.

[6] William RO Jr, Jennifer LS, Mike R Snaith, et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 5306 - 5311.

[7] Wilson PW, Abbott RD, Castelli WP. High density lipoprotein cholesterol and mortality. The framingham heart study. *Arteriosclerosis*, 1988, **8**: 737 - 741

[8] Miller NE, Thelle DS, Forde OH, et al. The Tromso heart-study. High-density lipoprotein and coronary heart-disease: a prospective case-control study. *Lancet*, 1977, **1**: 965 - 968

[9] Gupta RA, Wang D, Katkuri S, et al. Activation of nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor-delta accelerates intestinal adenoma growth. *Nat Med*, 2004, **10**(3): 245 - 247.

[10] Saluja I, Granneman JG, Skoff RP. PPAR delta agonists stimulate oligodendrocyte differentiation in tissue culture. *Glia*, 2001, **33**(3): 191 - 204.

[11] Franzmann Karl Witold(GB), O 'connor Kevin Juliar(GB), Hawke Le(US), et al. World patent. WO9210468. 1992-06-25.

[12] Adams Alan D(US), Doebber Thomas W(US), Berger Joel P(US), et al. World patent. WO9728115. 1997-08-07.

[13] Shimokawa Teruhiko(JP), Nishijima Satomi(JP), Matsuda Koyo(JP), et al. World patent. WO9904815. 1999-02-04.

[14] Helen Vosper, Guennadi A Khoudoli, Colin NA Palmer. The peroxisome proliferator activated receptor δ is required for the differentiation of THP-1 monocytic cells by phorbol ester. *Nucl Recept*, 2003, **1**: 9.

[15] Varnat F, Heggeler BB, Grisel P, et al. PPARbeta/delta regulates paneth cell differentiation via controlling the hedgehog signaling pathway. *Gastroenterology*, 2006, **131**(2): 538 - 553.