

高通量筛选瞬时受体势 V3 通道调节剂细胞模型的建立

王少鹏^{1,2}, 李际仙^{1,2}, 彭志刚^{1,2}, 曹婧^{1,2}

1 中国科学院北京基因组研究所, 北京 101300

2 中国科学院研究生院, 北京 100039

摘要: 为发现 TRPV3 调节剂, 通过荧光成像分析系统检测钙浓度, 建立高通量筛选瞬时受体势 V3 通道(Transient receptor potential V3, TRPV3)调节剂的细胞模型。将 TRPV3 表达载体转染人胚肾(HEK-293)细胞, 抗生素筛选稳定表达 TRPV3 的细胞系, 选取 TRPV3 特异性调节剂作用于细胞模型, 应用荧光成像分析系统测钙实验检测 TRPV3 高表达细胞系药理学特征, 同时优化实验条件, 考察模型的稳定性, 并评估应用于 96 孔板及 384 孔板进行高通量筛选的可靠性及准确性。获得了高表达 TRPV3 的 HEK-293 稳定细胞系, 通过 TRPV3 离子通道调节的钙流信号与 TRPV3 特异性调节剂成剂量依赖关系, 优化得到了最适筛选条件, 该模型稳定, 灵敏, 通过 Z 因子及 Spiking 检测, 完全符合高通量筛选需求。利用此细胞模型通过检测钙信号可筛选 TRPV3 调节剂。

关键词: TRPV3, 高通量筛选, 细胞模型

Establishment of a Cell Based High Throughput Screening Model for Transient Receptor Potential V3 Modulators

Shaopeng Wang^{1,2}, Jixian Li^{1,2}, Zhigang Peng^{1,2}, and Jing Cao^{1,2}

1 Beijing Genomics Institute, Chinese Academy of Sciences, Beijing 101300, China

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Abstract: We established a cell based high throughput screening model by calcium assay on fluorometric imaging plate reader for finding modulators of TRPV3. The TRPV3 expression vector was transfected into HEK-293 and stable cell line expressing TRPV3 was selected with antibiotics. Upon TRPV3 specific modulators stimulated, pharmacological characteristics of TRPV3 over expression cell line were detected by calcium assay on fluorometric imaging plate reader. Assay conditions were optimized and stability of the model was observed. The reliability and accuracy of application to 96 and 384 well format high throughput screening were also evaluated. A stable HEK-293 cell line highly expressing TRPV3 was established. TRPV3 specific modulators could modulate calcium signal through TRPV3 in dose dependent manner. Optimized screening condition was established by assay development. This model is stable and sensitive, and meets the requirement of high throughput screening by Z'factor validation and Spiking test. This cell model can be applied to screening TRPV3 modulators by calcium assay.

Keywords: TRPV3, high throughput screening, cell model

瞬时受体势(TRP)通道是人类感觉系统的先驱, 应答温度、触觉、疼痛、渗透压、味觉等, 可以响

应从细胞内至细胞外的多种刺激。而且其功能比传统的感觉传递更加广泛^[1]。通常被普遍接受的 TRP

Received: March 28, 2008; Accepted: May 30, 2008

Corresponding author: Shaopeng Wang. Tel: +86-10-80481755; Fax: +86-10-80498676; E-mail: wangshp@genomics.org.cn

命名法是把 28 种 TRP 基因根据其序列相似性分为 7 个亚家族: TRPA、TRPC、TRPM、TRPML、TRPN、TRPP 及 TRPV^[2]。而 TRPV 亚家族又包括 6 个成员 (TRPV1/2/3/4/5/6), 其中, TRPV3 于 2002 年在角化细胞中被首次发现, 因其可能具有人们尚未发现的功能, 很可能与身体组织对受伤或炎症的响应有关, 该发现立刻成为了当时该领域的焦点倍受关注^[3-5]。

TRPV3 不仅表达在角化细胞中, 也在皮肤、舌、背根神经节、三叉神经节、脊髓和大脑等组织中有表达^[5]。33°C~35°C 左右的温度, 2-氨基乙氧基联苯硼酸盐(2-APB), 联苯硼酐(DPBA), 樟脑等都可以使其激活, 而钆红(RR)是 TRPV3 的抑制剂, 可以抑制该通道的活性^[4-8]。TRPV3 通过提高细胞内二价钙离子(Ca²⁺)水平来响应温度或化合物的不同刺激。敲除 TRPV3 的小鼠丧失对温暖及高温的响应, 而对其他感觉模型反应正常^[8]。因此, TRPV3 在哺乳动物热感知过程中具有极其重要的作用。目前对于 TRPV3 在生理及病理中的作用研究刚刚起步, 因其可能对疼痛、炎症等疾病的认识及药物开发具有重要价值, TRPV3 成为了当今相关研究的热点。由此可见, 筛选 TRPV3 特异性调节剂具有重要科研意义和新药开发价值。

经典研究离子通道活性及评估化合物对其药理学作用的方法是利用电生理技术进行检测, 因其直接、灵敏的优点而成为了检测离子通道的“金标准”。但该方法操作复杂、成本昂贵, 无法适用于高通量药物筛选。随着新一代钙离子敏感荧光指示剂 Fluo-3 的发明, 以及自动化检测平台的出现, 使检测细胞内的钙离子浓度变化更加简便快捷, 为研究钙选择性离子通道提供了技术上的另一选择。

因此, 本试验应用基于荧光成像分析系统检测钙浓度的方法, 利用 TRPV3 可以调节细胞内钙离子浓度的特性, 建立了一种高通量筛选 TRPV3 调节剂的细胞模型, 能极大的提高筛选通量, 高效而且节省成本。通过验证和优化, 该模型可靠适用于高通量筛选 TRPV3 调节剂, 为体外研究 TRPV3 生理病理功能, 开发相关先导药物奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

人 TRPV3 cDNA 购自 ORIGENE; pcDNA3.1/

Hygro(+)载体, 选择抗生素 Hygromycin B 及转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen; 人胚肾 (HEK-293)细胞由本实验室保存; 联苯硼酐(DPBA), 2-氨基乙氧基联苯硼酸盐(2-APB), 聚醚 F-127 及二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma-Aldrich; 钆红(RR)购自 Tocris; MatriGel 基质购自 BD Bioscience; 钙离子指示剂 Fluo-3/AM 购自 Molecular Probes; 96 孔及 384 孔板(黑壁透明底)购自 Costar; FLEX Station 荧光成像分析系统购自 Molecular Devices。

1.2 实验方法

1.2.1 稳定细胞系的建立

采用加有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37°C、5% CO₂ 孵箱中培养 HEK-293 细胞, 转染操作前将细胞以 50% 的密度接种于 6 孔板并培养过夜。将构建的含有抗性标记的 TRPV3 真核表达质粒 pcDNA3.1/Hygro(+)/TRPV3 转染入 HEK-293 细胞, 转染方法依据 Lipofectamine 2000 标准操作流程进行。转染 24 h 以后, 将细胞以 1:20、1:30 和 1:40 的稀释比例接种至 10 cm 培养皿中培养。隔天加入选择抗生素 Hygromycin, 终浓度 100 μg/mL, 筛选培养约 2 周时间, 直至阴性对照细胞(未转染的 HEK-293 细胞)全部死亡。挑取获得的细胞单克隆团入 96 孔细胞培养板进行培养并扩大。当单克隆细胞扩大培养至足够数量, 通过检测 TRPV3 激活剂 DPBA 作用于细胞克隆所引起的钙流信号挑选阳性克隆。选择 DPBA 刺激后可明显引发钙信号的克隆(此时定义为第 0 代)继续扩大培养, 并进行进一步的验证。每当细胞汇合率约达到 90% 时, 以 1:8 至 1:12 之间的稀释比例传代培养, 控制在 1 周不超过 2 代的传代速度, 培养至 25 代以上, 整个传代培养过程不添加任何抗生素。最终选取出信噪比高, TRPV3 表达稳定, 细胞生长状态好的克隆作为药物筛选用稳定细胞系, 命名为 TRPV3-HEK。

1.2.2 钙流检测实验

钙流检测实验是应用钙离子指示剂 Fluo-3/AM 进行检测, 通过 FLEX Station 荧光成像分析系统获得数据。细胞以 3 × 10⁴/孔的浓度接种于预先经 MatriGel 基质包被过的 96 孔或 384 孔板(黑壁透明底)中, 37°C、5% CO₂ 孵箱中培养过夜。钙流检测实验前, 小心去除培养基, 100 μL/96 孔或 30 μL/384 孔加入 1 × 钙离子敏感荧光染料, 于 37°C 避光孵育至

少 1 h。配制 $5 \times$ 测试浓度(96 孔板)或 $3 \times$ 测试浓度(384 孔板)的激活剂于化合物板中。在 FLEX Station 荧光成像分析系统激发波长 485 nm, 发射波长 525 nm, 温度 31°C 设置下开始读数, 18 s 时, 以 $26 \mu\text{L/s}$ (96 孔板)或 $20 \mu\text{L/s}$ (384 孔板)的加样速度, 将激活剂从化合物板加入至待测细胞板中, 同时采集数据直至 120 s 以上。而抑制剂的活性检测是通过二次加样的方式实现的, 先 $25 \mu\text{L}/96$ 孔或 $15 \mu\text{L}/384$ 孔加入抑制剂, 避光孵育 10 min 后开始检测荧光值, 18 s 时, 加入激活剂($35 \mu\text{mol/L}$ DPBA), 并采集数据直至 120 s 以上。

2 结果

2.1 阳性克隆的筛选

将构建的含有抗性标记的 TRPV3 真核表达质粒 pcDNA3.1/Hygro(+)/TRPV3 转染入 HEK-293 细胞中, 经抗生素筛选后, 共获得 46 个单细胞克隆。用 $100 \mu\text{mol/L}$ DPBA 进行刺激, 通过检测被激活钙流信号的强弱挑选 TRPV3 高表达阳性克隆(图 1)。DPBA 激活 TRPV3 通道打开, 可引发显著的钙流信号。其中 30 个克隆都可检测到该现象, 而母细胞系 HEK-293 胞内钙水平没有变化, 因此可见, 细胞内外源性 TRPV3 整合入基因组的效率较高。最终挑选了信号最强的 5 号克隆作为药物筛选用稳定细胞系, 命名为 TRPV3-HEK, 进行扩大及传代培养, 进一步考察模型的稳定性, 同时鉴定其应用于高通量药物筛选的可靠性及准确性。

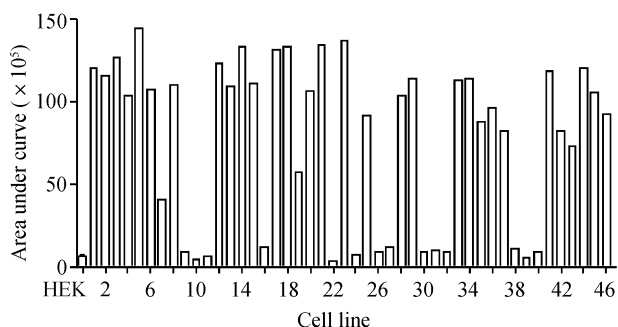


图 1 TRPV3 阳性细胞克隆筛选

Fig. 1 Screening of TRPV3 positive cell clones

Each cell clone was challenged $100 \mu\text{mol/L}$ DPBA

2.2 筛选条件优化

2.2.1 钙离子敏感荧光染料的优化

通常情况下, 酯化的钙离子指示剂在生理性介

质中溶解性较差, 这一问题可通过加入非离子化去污剂聚醚 F-127 来改进^[9]。因此, 本研究检测了聚醚 F-127 在 TRPV3-HEK 钙流检测实验中的作用(图 2)。将聚醚 F-127 直接和钙离子指示剂(Fluo-3)混合后, 共同加入钙离子敏感荧光染料试剂缓冲液中, 可显著增强钙信号。在测钙染料中加入终浓度为 0.4 g/L (0.04% , W/V)的聚醚 F-127 呈现出最强的钙信号及最佳信噪比, 因此, 本试验选择该条件作为 TRPV3-HEK 钙流检测实验的钙离子敏感荧光染料配方。

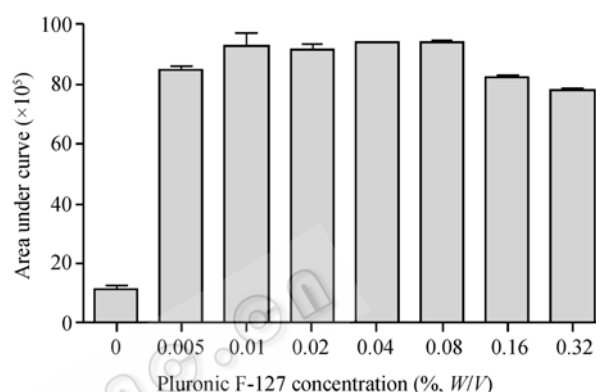


图 2 聚醚 F-127 加入测钙试剂中的效果

Fig. 2 Effects of Pluronic F-127 added in Dye-loading solution

TRPV3-HEK response induced by $100 \mu\text{mol/L}$ DPBA at different concentration of Pluronic F-127 used for Dye-loading solution

2.2.2 DMSO 耐受性检测

在进行药物筛选时, 常用二甲基亚砜(DMSO)作为溶剂溶解样品。为避免 DMSO 可能引起的非特异性本底影响后续实验, 本试验检测了 TRPV3-HEK 细胞系对 DMSO 的耐受能力(图 3)。结果表明, DMSO 终浓度 $\leq 1\%$, 对 TRPV3-HEK 测钙实验不会产生显著的影响, 而通常筛选用化合物溶剂 DMSO 终浓度为 0.5% , 因此确定 DMSO 溶剂对于该 TRPV3-HEK 模型在高通量药物筛选中的应用基本无影响。

2.3 TRPV3 功能验证

2.3.1 TRPV3 激活剂的检测

为了证明 TRPV3 筛选模型的功能活性, 分别用不同浓度的 TRPV3 特异性激活剂 DPBA 及 2-APB 作用于 TRPV3-HEK 细胞系, 检测细胞内钙离子浓度的变化(图 4)。结果显示, 随着激活剂浓度增加, 荧光钙信号不断增强, 表现出剂量依赖效应, DPBA 的 EC_{50}

值为 29.17 $\mu\text{mol/L}$, 2-APB 的 EC_{50} 值为 14.72 $\mu\text{mol/L}$, 与文献报道相符^[6, 7]。

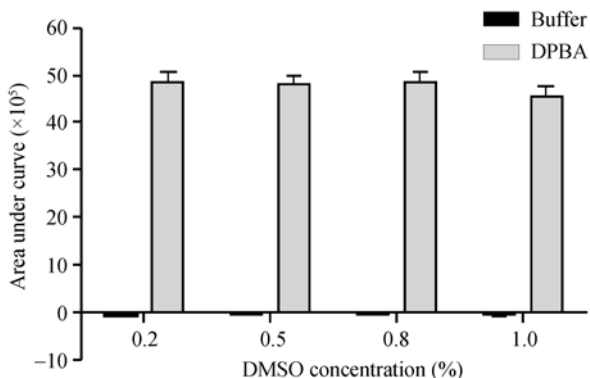


图 3 DMSO 耐受性检测

Fig. 3 DMSO tolerance detection

The calcium signal of stimulated (100 $\mu\text{mol/L}$ DPBA with DMSO, Grey) and un-stimulated (Assay buffer with DMSO, Black) on TRPV3-HEK

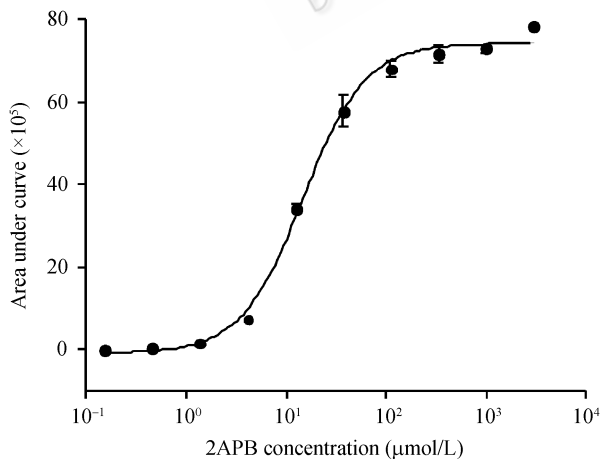
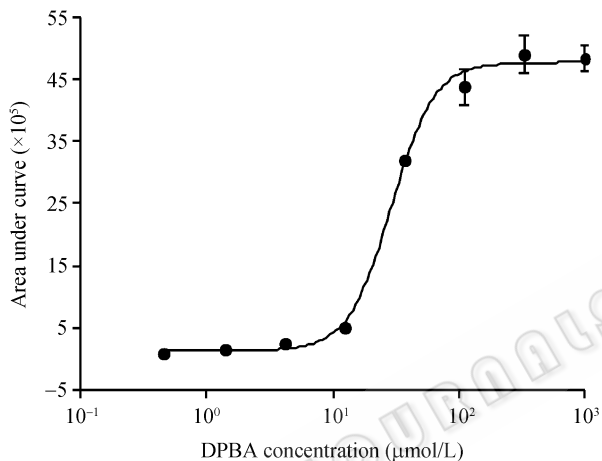


图 4 激活剂对 TRP-HEK 细胞的剂量效应

Fig. 4 Dose response of agonist on TRPV3-HEK cell line EC_{50} value was determined using GraphPad Prism 5 software

2.3.2 TRPV3 抑制剂的检测

RR 是 TRPV3 的抑制剂, 可阻断其通道的功能,

抑制钙离子的通过。不同浓度的 RR 作用于 TRPV3-HEK 细胞系 10 min, 之后用相同浓度的 DPBA 刺激, 检测细胞内钙离子浓度的变化(图 5)。结果显示, 随着抑制剂 RR 浓度增加, 流入 TRPV3-HEK 细胞内的钙流不断减少, 表现出剂量依赖效应, IC_{50} 值为 1.05 $\mu\text{mol/L}$, 与文献报道相符^[6, 7]。

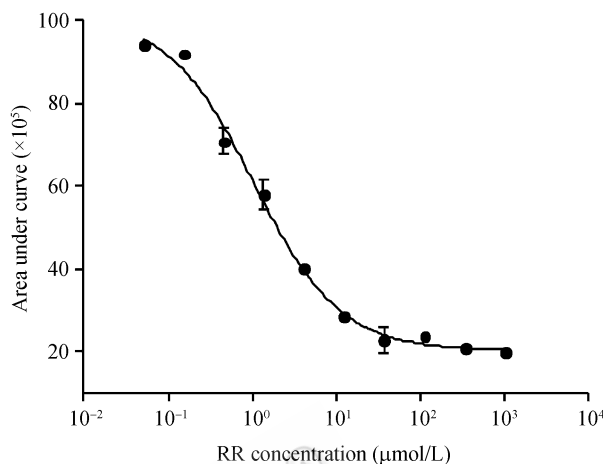


图 5 抑制剂 RR 对 TRP-HEK 细胞的剂量效应

Fig. 5 Dose response of blocker RR on TRPV3-HEK cell line

Agonist DPBA (35 $\mu\text{mol/L}$) was used to induce calcium influx. IC_{50} value was determined using GraphPad Prism 5 software

2.4 模型稳定性考察

为考察构建的 TRPV3 筛选模型的稳定性, 将 TRPV3-HEK 细胞在不添加任何抗生素的条件下培养至 25 代以上。之后同时检测 DPBA 或 RR 在每隔 5 代的 TRPV3-HEK 细胞上的作用(图 6)。通过 DPBA 的检测可以看出, 激活剂 DPBA 引起的钙流信号在不同代数的细胞上基本没有改变, 得到的 EC_{50} 值没有明显变化(表 1)。抑制剂 RR 对不同代 TRPV3-HEK 细胞的作用也是同样的, IC_{50} 值基本保持一致(表 1)。由此可见, 该 TRPV3 细胞模型是稳定的。

表 1 激活剂 DPBA 及抑制剂 RR 作用于 TRPV3-HEK 不同代细胞所呈现的药理强度汇总

Table 1 Summary of the compound potencies for agonist DPBA and blocker RR at TRPV3-HEK different cell passages

Passage	1	5	10	15	20	25
EC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)	25.51	24.28	35.19	33.44	32.02	29.13
IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)	3.09	3.32	1.71	1.59	1.21	1.51

The EC_{50} or IC_{50} values of the dose response were determined using GraphPad Prism 5 software

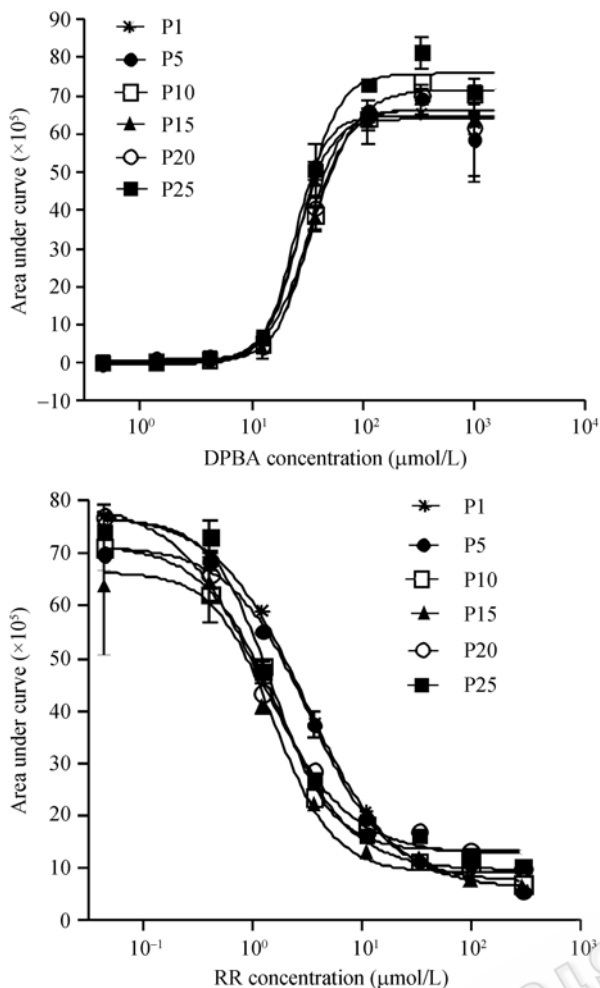


图 6 TRPV3-HEK 细胞系稳定性检测

Fig. 6 Stability of the TRPV3-HEK cell line

Dose response curves of DPBA and RR (DPBA is 35 μmol/L) for every 5 passages (P1-P25)

2.5 高通量筛选系统的评估

2.5.1 Z'因子评估

为验证该 TRPV3 高通量筛选系统的稳定性和可靠性, 我们采用了 Z'因子法来评估。Z'因子综合考虑了信号的变化和波动范围, 反映了方法的信噪比以及数据的偏差, 因此可作为高通量筛选系统的衡量标准。它与筛选源无关, 只与筛选方法本身有关, 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优化。其计算公式为:

$$Z' = 1 - 3X(|SD_{\text{maximum signal}}| + |SD_{\text{minimum signal}}|) / (|Mean_{\text{maximum signal}}| - |Mean_{\text{minimum signal}}|)$$

我们首先检测了 96 孔板整板的 Z'因子值, 将一块 96 孔板的 6 列加入 100 μmol/L DPBA 作为阳性对照(Maximum signal), 同时另外 6 列加入缓冲液作为阴性对照(Minimum signal), 各孔中 DMSO 的终浓度

均为 0.5%, 测试结果 Z'因子值为 0.80(图 7)。

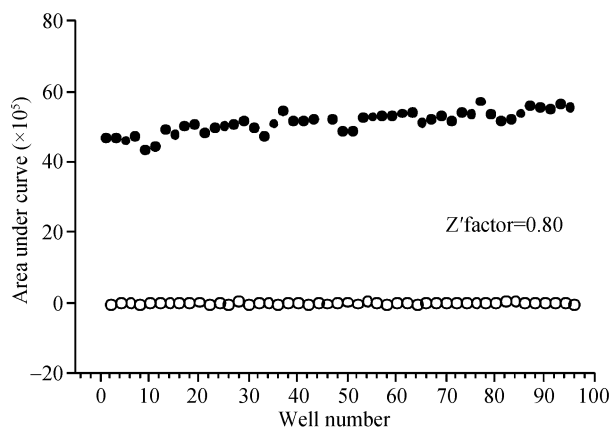


图 7 96 孔板 Z 因子检测

Fig. 7 Z'factor determination in 96-well plate format TRPV3-HEK cell line was stimulated with 100 μmol/L of DPBA (black) and assay buffer (white) respectively

接着, 为评估筛选不同板间的差异性, 我们连续测试了 10 块 96 孔板的 Z'因子值, 每块板随机选择 2 列进行测试, 其中 1 列加入 100 μmol/L DPBA 作为阳性对照, 另 1 列加入缓冲液作为阴性对照, 各孔中 DMSO 的终浓度均为 0.5% (表 2)。各次检测 Z'因子均大于 0.5, 因此, 该 TRPV3-HEK 模型适于应用 96 孔板进行 TRPV3 调节剂的高通量筛选。

表 2 连续检测 10 块 96 孔板的各板 Z'因子值

Table 2 Individual plate Z'factor in ten consecutive 96-well Plates

Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Z'	0.75	0.75	0.84	0.80	0.68	0.76	0.83	0.87	0.85	0.65

为评估该模型是否适用于更高通量的筛选, 我们进一步检测了 384 孔板的 Z'因子值。将 384 孔板中的 6 列加入 100 μmol/L DPBA 作为阳性对照, 同时另外 6 列加入缓冲液作为阴性对照, 各孔中 DMSO 的终浓度均为 0.5%, 测试结果 Z'因子值为 0.72。由此说明, 建立的 TRPV3 筛选系统稳定可靠, 可以用于 96 孔及 384 孔板规模的 TRPV3 调节剂高通量筛选。

2.5.2 Spiking 验证

为检测该 TRPV3 高通量筛选系统的灵敏性及有效性, 我们采用了 Spiking 实验进行实际评估和验证。Spiking 实验是一种利用已知调节剂和与靶体作用未知的随机化合物对筛选系统进行检测的方法, 可以验证高通量筛选系统及方法的可行性。将一块

96孔板中的75个孔分别加入10 $\mu\text{mol/L}$ 不同的化合物, 这些化合物均未报道与TRPV3有任何作用; 5个孔分别加入不同浓度的DPBA(1 $\mu\text{mol/L}$ 、3 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$); 同时8个孔加入缓冲液作为阴性对照, 8个孔加入100 $\mu\text{mol/L}$ DPBA作为阳性对照; 各孔中DMSO的终浓度均为0.5%。结果显示, 阴性对照(缓冲液)及随机化合物孔均未产生钙流信号, 而阳性对照(100 $\mu\text{mol/L}$ DPBA)产生显著钙流信号, 与预期结果相符(图8A)。同时随机加入不同浓度DPBA的5个孔产生的钙流信号, 表现出剂量依赖效应, DPBA的 EC_{50} 值为25.34 $\mu\text{mol/L}$, 与文献报道相符^[6](图8B)。综上所述, 该TRPV3-HEK筛选模型灵敏有效, 可以用于高通量药物筛选系统并有效检测出TRPV3调节剂。

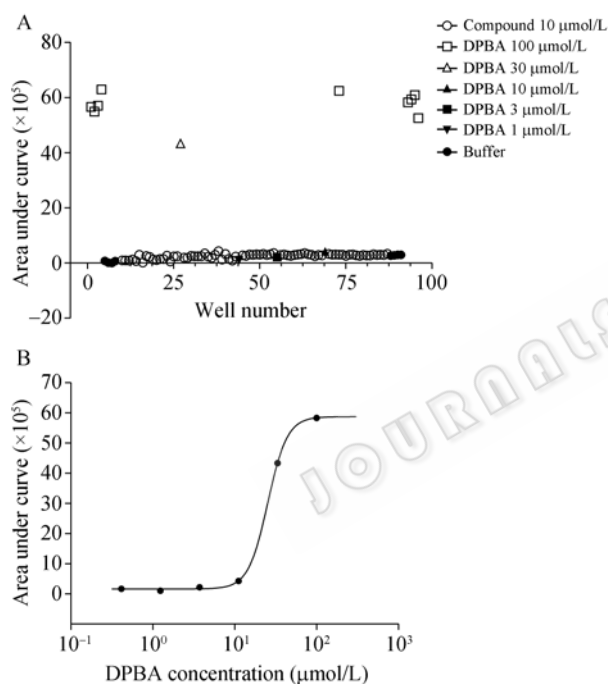


图8 Spiking 检测
Fig. 8 Spiking test

A: scatter plot of spiking data; B: dose response of the positive control (DPBA). The EC_{50} values of the dose response were determined using GraphPad Prism 5 software

3 讨论

近年来, 离子通道作为药物研发的靶点倍受关注。因其功能的异常可能对细胞功能及信号转导产生巨大影响, 且是可以与小分子药物高度亲和的少量蛋白质之一(其他包括酶, G 蛋白偶联受体和核激

素受体), 离子通道成为了非常有价值的药物靶点。但早先基于离子通道的药物研发与针对其他药靶的药物相比存在着一定差距。幸运的是, 最近几年学术界和产业界均不断发现和鉴定出了许多新的可用于药物靶点的离子通道。而且药物筛选和结构鉴定的技术不断进步, 使得研发新的离子通道药物更加快捷。众多瞬时受体势通道(TRP)的发现为人们带来了巨大的惊喜, TRP不但是感觉信号的调节因素, 而且也因其成为了最新的药物靶点扩展了传统离子通道药靶范围, 为研发与癌症、免疫病变等相关药物带来新的希望^[10]。其中2002年新发现的TRPV3可响应33 $^{\circ}\text{C}$ ~35 $^{\circ}\text{C}$ 左右的温度或特异性化合物的不同刺激, 是钙离子选择性通道, 与疼痛和炎症等有密切关系, 因此成为了相关疾病药物研发的热点药靶^[3-5]。由此可见, 如能筛选到TRPV3特异性调节剂意义重大, 而有效的发现这类化合物依赖于快速和精确评估TRPV3活性的方法。

电生理技术与药理学的结合为研究离子通道的功能提供了最准确最直接的方法, 其优点是检测灵敏, 无放射性污染, 可在精确时间分辨率下读数。因该技术必须通过钳住细胞膜来记录电流量, 因此是唯一可直接记录单通道功能的方法, 而成为了检验离子通道功能的经典技术。但该方法也有许多固有的缺点, 它是低通量的技术(一次实验一个细胞), 需要具有专门技术的高度熟练技术人员才能操作, 除标准实验室配备外需配置专用设备, 而且技术和设备需随实验细胞类型的不同而改变, 如卵母细胞电生理与哺乳动物细胞膜片钳方法的技术和设备需要就有所不同。因此, 传统电生理技术不适用于大量化合物库的高通量筛选。而后包括自动电生理技术, 二维膜片钳等新技术的不断涌现提高了基于离子通道药靶直接筛选药物的通量, 可理论上克服传统技术的壁垒, 如IonWorks (Molecular Devices), PatchXpress (Molecular Devices)等。但这些新技术还没有被证明可实际应用于检测瞬时受体势通道的实验。

因此, 我们建立了一种有别于电生理技术的高通量筛选方法, 利用TRPV3调节钙离子流入细胞的性质, 应用钙离子敏感荧光指示剂(Fluo-3), 通过荧光成像分析系统检测钙浓度, 成功构建了高通量筛选TRPV3调节剂的细胞模型。钙离子敏感荧光指示剂的特性是可以与细胞内游离钙离子结合, 当用激

发波长激发时,可产生强烈荧光,并且荧光强度与细胞内钙离子浓度成正比。通过荧光强度来表征胞内钙离子相对浓度,便可以实现化合物对 TRPV3 不同作用的筛选。当 TRPV3 被激活时,胞外钙离子通过激活的通道进入,细胞内钙离子浓度明显升高,荧光强度显著增强。当 TRPV3 被抑制时,钙离子无法通过通道,即使用激活剂刺激,细胞内钙离子浓度也不再升高,荧光强度不变。因此,通过检测荧光强度的改变,可以间接验证 TRPV3 通道的活性,从而筛选 TRPV3 特异性调节剂。我们不但优化得到了最适筛选条件,而且验证了所构建的在 HEK-293 中稳定表达 TRPV3 的细胞模型对已知调节剂的药理学功能与报道相符,因此,该模型是可靠而有效的 TRPV3 筛选模型。另外,经反复传代至 25 代以上,该模型性状仍保持均一稳定,且经单块整板及连续多板的 Z'因子验证、Spiking 验证,该模型完全符合应用于 96 孔及 384 孔板的高通量筛选要求。

我们成功构建了高通量筛选瞬时受体势 V3 通道调节剂的细胞模型,应用钙离子敏感荧光指示剂表征细胞内钙浓度,通过荧光成像分析系统的检测实现药物筛选。该系统虽然没有传统电生理检测离子通道的方法灵敏直接,但可快速便捷的实现高通量筛选,且稳定可靠,不但可以筛选 TRPV3 调节剂,开发相关先导药物,而且也可为体外研究 TRPV3 生理病理功能提供工具,具有广阔的应用前景。

REFERENCES

[1] Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 2003, **426**(6966): 517-524.
 [2] Ramsey IS, Delling M, Clapham DE. An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol*, 2006, **68**: 619-647.
 [3] Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, et al. A heat-sensitive TRP channel expressed in Keratinocytes. *Science*, 2002, **296**(5576): 2046-2049.
 [4] Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, et al. TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature*, 2002, **418**(6894): 186-190.
 [5] Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, et al. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature*, 2002, **418**(6894): 181-186.
 [6] Chung MK, Guler AD, Caterina MJ. Biphasic currents evoked by chemical or thermal activation of the heat-gated ion channel, TRPV3. *J Biol Chem*, 2005, **280**(16): 15928-15941.
 [7] Chung MK, Lee H, Mizuno A, et al. 2-Aminoethoxydiphenyl borate activates and sensitizes the heat-gated ion channel TRPV3. *J Neurosci*, 2004, **24**(22): 5177-5182.
 [8] Moqrich A, Hwang SW, Earley TJ, et al. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science*, 2005, **307**(5714): 1468-1472.
 [9] Kao JP. Practical aspects of measuring [Ca²⁺] with fluorescent indicators. *Methods Cell Biol*, 1994, **40**: 155-181.
 [10] Xie M, Holmqvist MH, Hsia AY. Ion channel drug discovery expands into new disease areas. *Curr Drug Discov*, 2004, **4**: 31-33.

本期广告索引

企业	版位	企业	版位
GE Healthcare 公司	封底	生物谷网站	内页
Roche 诊断产品有限公司	封二	上海国强生化工程装备有限公司	内页
纽英伦生物技术(北京)有限公司	封三	镇江东方生物工程公司	内页
富士胶片(中国)投资有限公司	内页	赛默飞世尔科技有限公司	内页
美国 Promega 公司	内页	中国科学院天津工业生物技术研究所(筹)招聘启事	内页
杭州博日科技有限公司	内页	汕头大学多学科研究中心招聘启事	内页
伯乐生命医学产品(上海)有限公司	内页		