

法尼醇 X 受体激动剂细胞筛选体系的建立与优化

郑志民[#], 黄晓霞[#], 庞碧滢, 黄娜娜, 孔波^{*}, 李馨, 熊文婷

广州大学生命科学学院, 广东 广州 510006

郑志民, 黄晓霞, 庞碧滢, 黄娜娜, 孔波, 李馨, 熊文婷. 法尼醇 X 受体激动剂细胞筛选体系的建立与优化[J]. 生物工程学报, 2023, 39(1): 359-371.

ZHENG Zhimin, HUANG Xiaoxia, PANG Biying, HUANG Nana, KONG Bo, LI Xin, XIONG Wenting. Development and optimization of a cell screening system for farnesoid X receptor agonist[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(1): 359-371.

摘要: 本研究旨在建立一种基于双荧光素酶报告基因检测体系的法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)激动剂细胞筛选体系, 以满足对 FXR 激动剂先导化合物的高通量筛选。通过在报告基因质粒 pGL4-luc2P-Hygro 中的萤火虫荧光素酶(firefly luciferase, Luc)基因上游克隆并插入来自 FXR 靶基因的 FXR 反应元件(FXR response element, FXRE)片段, 构建用于筛选 FXR 激动剂的报告基因质粒, 并结合海肾荧光素酶内参质粒, 建立能够有效反映药物对 FXR 激动效应的双荧光素酶报告基因细胞检测体系。通过一系列优化实验, 比较了过表达 RXR、鼠源和人源 FXR、不同的 FXRE 片段、FXR 过表达质粒与报告基因质粒的混合比对筛选体系诱导效率和灵敏度的影响。根据上述结果, 最终确定了优化条件, 优化后体系 Z 因子达到 0.83。本研究建立了一种用于 FXR 激动剂筛选的改良的基于双荧光素酶报告基因检测体系的细胞筛选体系, 其主要特征在于, 使用多段 FXR 靶基因上的 FXRE 片段叠加组成一种新型的增强型 FXRE 元件, 而非传统的反向重复序列-1 (inverted repeats-1, IR-1)片段的叠加, 为 FXR 激动剂的发现提供了更好的手段和工具。

关键词: FXRE; 双荧光素酶报告基因系统; 高通量筛选; 核受体

资助项目: 国家自然科学基金(81973376)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81973376).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: Kongbo@gzhu.edu.cn

Received: 2022-04-11; Accepted: 2022-08-15

Development and optimization of a cell screening system for farnesoid X receptor agonist

ZHENG Zhimin[#], HUANG Xiaoxia[#], PANG Biying, HUANG Nana, KONG Bo^{*}, LI Xin, XIONG Wenting

School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, Guangdong, China

Abstract: This study aims to develop an improved cell screening system for farnesoid X receptor (FXR) agonists based on a dual luciferase reporter gene system. FXR response element (FXRE) fragments from FXR target genes were cloned and inserted into upstream of firefly luciferase (Luc) gene in the plasmid pGL4-luc2P-Hygro. In combination with the internal reference plasmid containing renilla luciferase, a dual luciferase reporter gene system was developed and used for high throughput screening of FXR agonists. After studying the effects of over-expression of RXR, mouse or human FXR, various FXRE fragments, and different ratio of FXR plasmid amount to reporter gene plasmid, induction efficiency of the screening system was optimized by the known FXR agonist GW4064, and Z factor for the system reached 0.83 under optimized conditions. In summary, an improved cell screening system based on double luciferase reporter gene detection system was developed to facilitate the discovery of FXR agonists, where a new enhanced FXRE element was formed by a superposition of multiple FXRE fragments from FXR target genes, instead of a superposition of traditional IR-1 (inverted repeats-1) fragments.

Keywords: FXR response element; dual-luciferase report system; high throughput screening; nuclear receptor

法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)属于核受体超家族,是参与调控多种生理功能的转录因子,高量表达于肝脏、小肠、肾脏和肾上腺中。胆汁酸(bile acids, BAs)是 FXR 的生理性配体。FXR 与 Bas 结合后被激活,通过与 RXR α 形成异源二聚体,识别并结合于其下游靶基因的 FXR 反应元件(FXR response element, FXRE),从而调控靶基因的转录^[1]。FXR 在体内调节胆汁酸稳态和胆固醇代谢,并参与脂肪酸代谢和糖代谢,促进肝脏再生等重要生理功能^[2]。此外,FXR 基因功能的降低与胆汁淤积、肝癌、大肠癌和非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)等疾病密切相关^[3-6],因此 FXR 是重要的药物靶标,医

药工业界已有多种进入临床实验 FXR 激动剂类药物正在开发,如奥贝胆酸(obeticholic acid)、Cilofexor 和 Tropifexor 等^[7-9]。

高通量筛选技术是药物筛选的重要手段^[10],建立高效灵敏的高通量筛选体系在基础研究和药物开发等方面都有重要的意义。基于细胞的 FXR 活性检测的双荧光报告基因筛选模型,较接近生理状态,通过将双荧光素酶报告基因共转染至细胞内,当配体与相应受体结合,荧光素酶表达量发生变化,通过检测荧光素酶活性以反映配体的诱导活性,从而进行药物的高通量筛选。高灵敏度是高通量筛选体系用于药物筛选的前提,现有的研究中缺乏对相关细胞筛选体系的深入优化及比较。

FXR 靶基因转录活性的强弱与 FXRE 的数量有关, 也与 FXRE 到转录起始位点 (transcription start site, TSS) 的距离有关。反向重复序列-1 (inverted repeats-1, IR-1) 是已知的 FXRE 序列, 包含由 1 个核苷酸分隔的 2 个 AGGTCA 反向同源序列^[11]。现有的研究中通常使用 3 个 IR-1 序列简单叠加组成 FXRE 元件^[12-15], 这种叠加没有考虑生理状态下 FXRE 相邻序列对 FXR 结合的影响。本研究利用 FXR 靶基因的 FXRE 反应元件, 并将其叠加串联构建得到一种新型的增强型 FXRE 反应元件, 用以构建报告基因质粒, 达到了提高筛选体系灵敏度的目的。并通过研究视黄醇 X 受体 (RXR)、不同种属来源的 FXR, 以及 FXR 与报告基因比例等方面对筛选体系做了更深一步地改进和优化, 建立了一种改良的基于双荧光素酶报告基因的高效灵敏的细胞筛选体系, 可以满足对 FXR 激动剂先导化合物的高通量筛选。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和试剂

人胚胎肾细胞 HEK293T 由广州大学精准基因编辑中心乔云波课题组馈赠, 本实验室保存; 人肝癌细胞 HepG2 由本实验室保存; FXR 过表达质粒 pCI-T7-mFXR、pCI-T7-hFXR, 萤火虫荧光素酶报告基因质粒 pGL4.29-3×FXRE-Luc、pGL4.29-2×FXRE-Luc、pGL4.29-1×FXRE-Luc、pGL4.29-3×IR1-Luc, RXR 表达质粒 pGL4.73-hRXR 由本实验室构建; 海肾荧光素酶内参质粒 pRL-TK-intronless (P1685) 购自武汉森灵质粒平台; 质粒 pGL4-luc2P-Hygro (101788)、pHR-Luc (139644) 购自 Addgene 平台; 质粒 pCI-T7-EGFP 由广州大学精准基因编

辑中心王刚课题组馈赠, 本实验室保存。FXR 激动剂 GW4064、萤火虫荧光素酶检测试剂和海肾荧光素酶检测试剂购自上海碧云天公司; 培养基 DMEM、Opti-MEM 培养基、胎牛血清、penicillin-streptomycin 双抗和胰酶购自 Invitrogen 公司; Exfect[®] 转染试剂、2×Taq Master Mix PCR 试剂、T4 DNA 连接酶、DH5 α 感受态细胞、dNTP Mix RNA 酶抑制剂、M-MLV (H-) 逆转录酶、RNA-easy 总 RNA 提取试剂、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 购自南京诺唯赞公司。

1.1.2 主要仪器

SW-CJ-1FD 型超净工作台, 苏州苏净集团安泰公司; BPN-150CW 型二氧化碳培养箱, 上海一恒公司; Infinite M Plex 多功能酶标仪, Tecan 公司; CKX-41 型倒置显微镜, OLYMPUS 公司; ABI miniAMP PCR 扩增仪, Thermofisher 公司; NanoDrop 微量分光光度计, Thermofisher 公司; ABI QuantStudio 3 定量 PCR 仪, Thermofisher 公司。

1.2 方法

1.2.1 基因克隆

本文所使用的 DNA 序列克隆信息如表 1 所示, *Shp*、*Bsep*、*Mdr2*、*Osta*、*Ibabp* 是已知的 FXR 靶基因, 前期的生物信息学分析在其上游发现 FXRE 调控序列。按照诺唯赞 2×Taq Master Mix PCR 试剂说明书进行 PCR 克隆。

1.2.2 质粒构建

通过在报告基因质粒 pGL4-luc2P-Hygro 中的荧光素酶基因上游插入 FXRE 片段, 构建用于筛选 FXR 激动剂的报告基因质粒。本文构建的报告基因质粒以及其他过表达质粒的信息如表 2 所示, 按照相应内切酶、T4 DNA 连接酶、DH5 α 感受态细胞的说明书进行酶切、连接和转化。

表 1 DNA 克隆引物序列

Table 1 Primer sequences for DNA cloning

Name	Template	Primer sequence (5'→3')
mFXR-F	mcDNA ^c	TGCTCTAGATCCTTCTCAGTTGCCGTGAG
mFXR-R		TAATGCGGCCGCCCTCCAACCTCAATAAGATTC
hFXR-F	hcDNA ^d	TGCTCTAGAATGGGATCAAAAATGAATCTCATTG
hFXR-R		TAATGCGGCCGCTCACTGCACGTCCCAGATTTACACAG
hRXR-F	hcDNA	CTGTGCTAGCGCAGACATGGACACCAAAAC
hRXR-R		CTAGTCTAGAGCAGTGACAGGCTGTGC
hSHP_FXRE-F ^a	hgDNA	GCGGAGCTCGGTCAATATCTGTGCCTCACTG
hSHP_FXRE-R ^a		GAGCAGAGTGGGCTAGCGGTACCATAATGGGTACGAG
hBSEP_FXRE-F ^a	hgDNA	GGTGACCGCTAGCCCACTCTGCTCAATTTGCCTC
hBSEP_FXRE-R ^a		CTGACGTGGGATCCGCGTTGTTTACTGGACAAGAG
hMDR2_FXRE-F ^a	hgDNA	GTAAACAACGCGGATCCCACGTCAGCATTTGGACACAG
hMDR2_FXRE-R ^a		CCCAAGCTTGTCTTGCAATAGCCCATGTGC
hOSTa_FXRE-F ^a	hgDNA	TGCGAGCTCCCCACTGTGTCTGAAGTTTC
hOSTa_FXRE-R ^a		ATGCCTGGAGAAGAGATCTCCAGACACCTCAAAGTCTCTCC
hOSTa_FXRE2-F	hgDNA	GCGGAGCTCCCCACTGTGTCTGAAGTTTC
hOSTa_FXRE2-R		CCCAAGCTTCCAGACACCTCAAAGTCTCTCC
hIBABP-FXRE-F ^a	hgDNA	TTGAGGTGTCTGGAGATCTCTTCTCCAGGCATTACTCTGAG
hIBABP-FXRE-R ^a		CCCAAGCTTCTTCTGCACGGTCAGAGCTG
3×IR1-F ^b	—	CAGGTCAATGACCTAGGTCAGTGACCTAGGTCAGTACTGACCTA
3×IR1-R ^b		TCGAGTCCAGTTACTGGATCCAGTCACTGGATCCAGTGACTGGATTCTGA

The prefix “h” or “m” in the “Name” and “Template” indicates that it comes from mouse or human, respectively. gDNA: Genomic DNA; cDNA: Complement DNA. F: Forward primer sequence; R: Reverse primer sequence. The bold sequence in the primer represents the restriction enzyme site with protective bases, or the overlapping sequence for overlap PCR. a: Used for overlap PCR as 1.2.3; b: See 1.2.4 for the method; c: Reverse transcription of total RNA extracted from mouse intestinal tissue; d: Reverse transcription of total RNA extracted from HepG2 cells. —: No template required for this clone, see 1.2.4 for the method.

表 2 已构建的质粒列表

Table 2 List of constructed plasmids

Recombinant plasmid	Original plasmid	Inserted gene ^b	Restriction site
pCI-T7-mFXR	pCI-T7-EGFP	mFXR	<i>Xba</i> I, <i>Not</i> I
pCI-T7-hFXR	pCI-T7-EGFP	hFXR	<i>Xba</i> I, <i>Not</i> I
pGL4.29-3×FXRE-Luc	pGL4-luc2P-Hygro	hSHP_FXRE, hBSEP_FXRE, hMDR2_FXRE ^a	<i>Sac</i> I, <i>Hind</i> III
pGL4.29-2×FXRE-Luc	pGL4-luc2P-Hygro	hOSTa_FXRE, hIBABP_FXRE ^a	<i>Sac</i> I, <i>Hind</i> III
pGL4.29-1×FXRE-Luc	pGL4-luc2P-Hygro	hOSTa_FXRE2	<i>Sac</i> I, <i>Hind</i> III
pGL4.29-3×IR1-Luc	pGL4-luc2P-Hygro	3×IR1	<i>Sac</i> I, <i>Hind</i> III
pGL4.73-hRXR	phR-Luc	hRXR	<i>Nhe</i> I, <i>Xba</i> I

a: Multiple fragments were combined as one fragment by overlap PCR, b: Same as Table 1.

1.2.3 Overlap PCR

于 PCR 反应管中分别加入 ddH₂O、待连接片段、2×*Taq* Master Mix, 按照常规 PCR 设置反应程序, 反应完成后, 将上述反应产物稀释 1 000 倍, 得到稀释反应产物; 于新的 PCR 反

应管中加入 ddH₂O、稀释反应产物、第一个片段的正向引物、最后一个片段的反向引物、2×*Taq* Master Mix, 按照常规 PCR 设置反应程序, 反应完成后, 通过胶回收得到最终连接在一起的目的片段。

1.2.4 Oligo DNA 退火

按照下述体系设置退火反应体系：无核酸酶 ddH₂O 70 μL, oligo DNA annealing buffer (10×) 10 μL, DNA oligo A (100 μmol/L) 10 μL, DNA oligo B (100 μmol/L) 10 μL, 按照上述顺序依次加入各种试剂, 混匀。Oligo DNA annealing buffer (10×): 100 mmol/L Tris pH 8.0, 500 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA。95 °C 孵育 5 min 后, 每 8 s 下降 0.01 °C, 降至 25 °C。

1.2.5 细胞培养

HEK293T 细胞培养于高糖 DMEM 培养基中(含 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin 双抗), 37 °C、5% CO₂ 环境下。

1.2.6 质粒转染

取处于对数生长期的 HEK293T 细胞, 以每孔 5×10^5 – 10×10^5 个细胞接种于 6 孔板中, 待细胞生长至覆盖率达到 80%–85% 时进行转染。按每孔 3–5 μg 总量的质粒和 10 μL 转染试剂进行瞬时转染, 质粒和转染试剂分别用 200 μL opti-MEM 培养基稀释, 稀释后将质粒和转染试剂稀释液均匀混合, 于室温放置 15–20 min 后, 滴加到细胞培养孔中, 轻轻摇匀。分别将下列质粒按照一定比例共转染进 HEK293T 细胞中: (1) pCI-T7-mFXR 或 pCI-T7-hFXR; (2) pGL4.29-3×FXRE-Luc 或 pGL4.29-2×FXRE-Luc 或 pGL4.29-1×FXRE-Luc 或 pGL4.29-3×IR1-Luc; (3) 内参质粒 pRL-TK-intronless; (4) pGL4.73-hRXR。

1.2.7 药物处理

转染 6–8 h 后, 用胰酶将 6 孔板中的细胞消化收集, 转染了相同质粒的细胞收集在一起并混匀, 以每个 6 孔板孔接种于 16 个 96 孔板孔的比例将细胞均匀分到 96 孔板中, 并换上含有药物的培养基。体系诱导效率检测: 设置以相同体积 DMSO 处理的溶剂对照组、

2 μmol/L GW4064 处理的阳性对照组, 每组 3 个重复。药物处理 32 h 后进行双荧光素酶报告基因检测。GW4064 是已知常用的 FXR 特异性激活剂, 已有研究报道显示 GW4064 在体外细胞实验中在浓度 1–5 μmol/L 时具有 FXR 激活的最大效应^[16], 本文采用 2 μmol/L 的 GW4064 处理浓度。

1.2.8 双荧光素酶报告基因检测

药物处理后, 吸去培养基, 用磷酸缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS) 溶液洗涤细胞 1 次, 小心吸去 PBS, 每孔加入 50 μL 报告基因细胞裂解液 (RG006-1) 处理 5 min, 吹打并吸取细胞裂解产物至 1.5 mL 离心管中, $12\ 000 \times g$ 常温离心 2 min, 取上清用于后续检测。取 2 次 10 μL 细胞裂解上清液加入 96 孔检测板的 2 个孔中, 分别加入 50 μL 萤火虫萤光素酶检测试剂 (RG006-2) 和现配的海肾萤光素酶检测试剂 (RG017-2、RG017-3), 使用 Infinite M Plex 多功能酶标仪检测萤火虫和海肾萤光素酶荧光值以显示萤火虫萤光素酶和海肾萤光素酶表达量的多少, 从而表征转录活性的强弱。检测软件为 Infinite[®] 200 PRO, 使用 Luminescence 模式默认选项。

1.2.9 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)

参考总 RNA 提取试剂说明书从细胞中提取总 RNA, 用 NanoDrop 测定其浓度用于后续逆转录。参考 M-MLV (H-) 逆转录酶说明书将提取的总 RNA 逆转录成 cDNA (complement DNA), 逆转录所用引物为 6 碱基随机引物 (5'-NNNNNN-3')。参考 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 说明书, 用得到的 cDNA 在 ABI QuantStudio 3 定量 PCR 仪中进行实时荧光定量 PCR 检测, qPCR 所用引物如表 3 所示。

表 3 qPCR 所用引物序列

Table 3 Primer sequences for qPCR

Gene	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')
hβ-actin	AATGAGCTGCGTGTGGCT	GATAGCACAGCCTGGATAGCA
hFXR	AGGGGTGTAAAGGTTTCTTCAGGA	ACACTTTCTTCGCATGTACATATCCAT
hRXR	ACATGCAGATGGACAAGACG	TCGAGAGCCCCTTGAGT

以 β -actin 作为内参基因, 通过检测目的基因相对于内参基因的 mRNA 水平变化来定量。以 HEK293T 细胞的 FXR mRNA 水平为对照组, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算实验组相对于对照组的相对转录水平。

$\Delta C_t = C_t$ (目的基因) - C_t (内参基因)
 $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ (实验组) - ΔC_t (对照组)

1.2.10 数据分析

每孔以使用 Infinite M Plex 多功能酶标仪检测到的萤火虫萤光素荧光值 (FLuc) 和海肾萤光素荧光值 (RLuc) 的比值表示萤光素酶活性值 (FLuc/RLuc), 即萤光素酶活性 = FLuc/RLuc。以 GW4064 处理为阳性对照组, DMSO 处理为溶剂组, 筛选体系诱导效率 = 阳性对照组萤光素酶活性/溶剂组萤光素酶活性 (GW/Veh), 诱导效率越高则认为体系的灵敏度越高。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 GraphPad Prism 9 软件进行数据处理, 两组间显著性分析比较采用 t 检验。

1.2.11 稳定性分析

选择 Z 因子 (Z factor) 分析以确认筛选体系的质量以及是否符合高通量筛选的要求。当 $Z=1$ 时表明筛选模型是理想的, $Z>0.5$ 时表明筛选模型是比较理想的^[17]。 Z 因子分析的计算公式如下:

$$Z = -3(\sigma_p + \sigma_n) / |\mu_p - \mu_n|$$

其中 σ_p 表示阳性对照组萤光素酶活性值标准差, σ_n 表示阴性对照组萤光素酶活性值标准差, μ_p 表示阳性对照组萤光素酶活性值平均值, μ_n 表示阴性对照组萤光素酶活性值平均值。

2 结果与分析

2.1 筛选体系的优化

为有效测量比较不同药物之间诱导效率的差异, 要求筛选体系具有高灵敏度, 现有的研究中通常使用 3 个 IR-1 FXRE 序列的简单叠加以构建报告基因质粒, 这种叠加没有考虑生理状态下 FXRE 相邻序列对 FXR 结合的影响, 存在进一步优化的空间。为满足 FXR 小分子配体筛选的需求, 本文对基于双萤光报告基因的筛选体系进行了进一步的改进和优化。

2.1.1 细胞株相关基因转录水平分析

所用细胞株中的内源性 FXR 和 RXR 表达水平可能对筛选体系的优化产生影响, 为此我们用实时萤光定量 PCR (qPCR) 分析了 HEK293T 和肝癌细胞株 HepG2 中的 FXR 和 RXR 的转录水平, 结果如图 1 中所示, 2 种细胞中的 FXR 转录水平均较低, 而 RXR 则有较高的转录水平, 且 HEK293T 细胞中的 RXR 转录水平远高于 HepG2 中的 RXR 转录水平。

2.1.2 可靠性验证

将 3 个 IR-1 序列以首尾串联的方式叠加在一起, 插入报告基因载体萤光素酶启动子上游 (表 1, 图 2A), 构建 pGL4.29-3×IR1-Luc 报告基因载体。为确认筛选体系对 FXR 激动活性的特异性检测, 以未插入 FXRE 片段的原始质粒 pGL4-luc2P-Hygro 为对照。图 3A 中, 对照组和 3×IR1 组分别共转染 2 μ g pGL4-luc2P-Hygro+1 μ g pGL4.73-hRXR+1 μ g pCI-T7-EGFP+

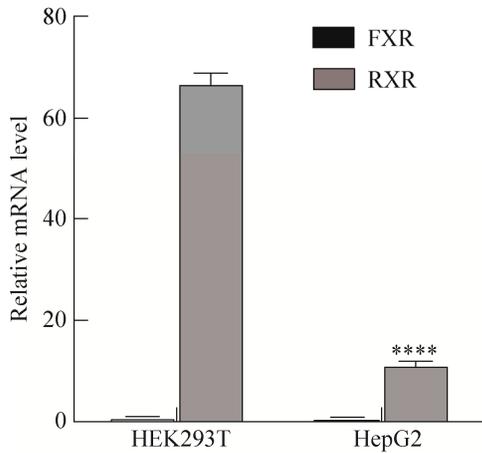


图1 HEK293T和HepG2细胞中的FXR和RXR mRNA水平

Figure 1 The mRNA level of FXR and RXR in HEK293T and HepG2 cells. The result represents as $\bar{x} \pm s$, $n=3$; ****: $P<0.0001$ represent significance, HepG2 vs. HEK293T on RXR, determined by *t* test.

60 ng pRL-TK-intronless 和 2 μg pGL4.29-3 \times IR1-Luc+1 μg pCI-T7-EGFP+60 ng pRL-TK-intronless, 由图 3A 可知, 3 \times IR1 组的诱导效率显著高于对照组, 表明构建得到的筛选体系具有特异检测 FXR 激动活性的能力。

2.1.3 过表达 RXR 对筛选体系灵敏度的影响

FXR 与 RXR 以形成异源二聚体的形式对下游靶基因进行调控^[18], 若内源性 RXR 表达不足, 增加 RXR 的表达量则有可能能够提高

体系的诱导效率。尝试通过共转染 pGL4.73-hRXR 以过表达 RXR, 比较过表达 RXR 与否对筛选体系灵敏度的影响。如图 3A 所示, 对照组、3 \times IR1 组和 3 \times IR1+hRXR 组均转染了 60 ng 海肾荧光素酶报告基因质粒、1 μg hFXR 过表达质粒和 2 μg 报告基因质粒(分别为 pGL4-luc2P-Hygro、pGL4.29-3 \times IR1 和 pGL4.29-3 \times IR1)到 HEK293T 细胞中, 除了 3 \times IR1 组, 其余两组均共转染了 1 μg hRXR 过表达质粒, 结果表明, 转染了 RXR 表达质粒的实验组与未转染 RXR 的实验组之间没有明显的统计学意义。我们还比较了不同 RXR 和 FXR 比例对体系灵敏度的影响, 结果如图 3B 所示, 3 组均转染了 2 μg 报告基因载体、hRXR 和 hFXR 过表达质粒(共 2 μg , 比例分别为 0:1、1:1、2:1)以及 60 ng 内参质粒。与预期相反的是, 增大 hRXR 和 hFXR 过表达质粒比例反而有降低体系诱导效率的趋势, 其原因可能是 RXR 与 FXR 表达质粒之间的相互竞争, 也可能是过多过量表达外源蛋白反而造成细胞的代谢压力。以上结果说明所用 HEK293T 细胞内源性 RXR 表达量已足够与 FXR 形成异二聚体以促进下游基因的转录, 因此过表达 RXR 不能继续提高体系的灵敏度。

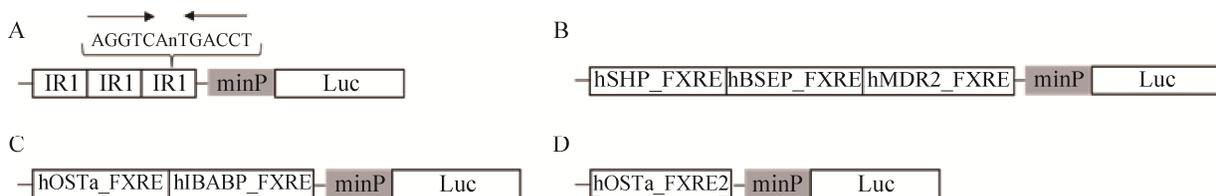


图2 已构建的报告基因载体结构

Figure 2 The structure of constructed reporter gene plasmids. FXRE was inserted upstream of the reporter gene in the pGL4-luc2P-Hygro, which contains a minimal promoter (minP) linked to the luciferase (Luc) reporter gene. A: pGL4.29-3 \times IR1-Luc. B: pGL4.29-3 \times FXRE-Luc. C: pGL4.29-2 \times FXRE-Luc. D: pGL4.29-1 \times FXRE-Luc.

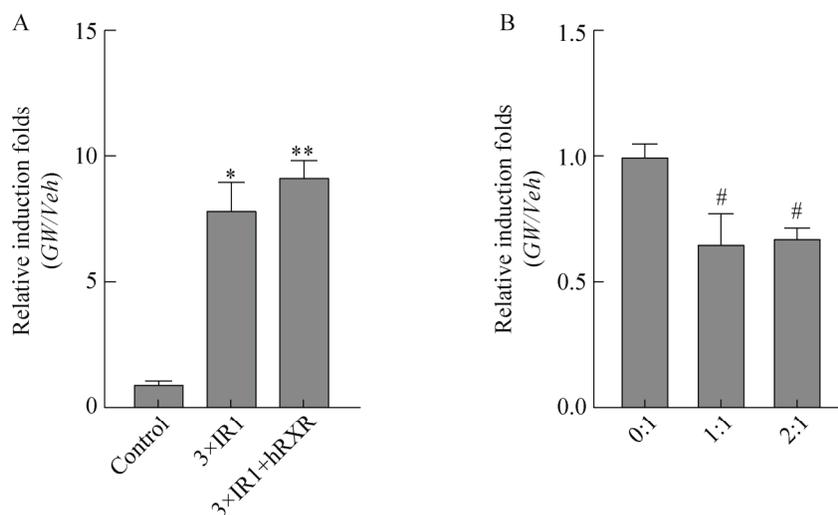


图3 RXR (A)和不同的RXR与FXR过表达质粒比例(B)对报告基因试验相对诱导效率的影响

Figure 3 Effects of RXR (A) and different over-expression plasmid ratios of RXR to FXR (B) on relative induction folds for reporter assay. The result is $\bar{x} \pm s$, $n=3$; *: $P<0.05$ represent significance, 3xIR1 vs. Control; **: $P<0.01$ represent significance, 3xIR1+hRXR vs. Control; #: $P<0.05$ represent significance, 1:1, 2:1 vs. 0:1, determined by t test.

2.1.4 不同来源的FXR对筛选体系灵敏度的影响

我们比较了过表达小鼠FXR或人FXR对筛选体系灵敏度的影响,如图4所示,mFXR组和hFXR组均转染了1.5 μg 报告基因质粒和

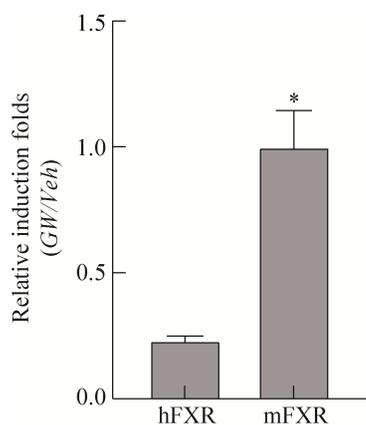


图4 人源FXR与鼠源FXR对报告基因试验相对诱导效率的影响

Figure 4 Effects of human FXR and mouse FXR on relative induction folds for reporter assay. The result represents as $\bar{x} \pm s$, $n=3$; *: $P<0.05$ represent

significance, mFXR vs. hFXR, determined by t test. 60 ng 内参质粒到 HEK293T 细胞中,另外分别还转染了 1.5 μg 人 FXR 过表达质粒和小鼠 FXR 过表达质粒,结果表明,过表达小鼠来源的 FXR 的体系比过表达人来源的 FXR 的体系的灵敏度更高,且有统计学意义。

2.1.5 FXRE 片段的优化

FXR 靶基因转录活性的强弱与 FXRE 的序列本身以及 FXRE 的数量有关,将 FXR 靶基因上的 FXRE 片段串联叠加,构成一种新型的增强型 FXRE 元件,相较于传统的 3 个 IR-1 序列的组合,这种新的 FXRE 元件组合不仅考虑了 FXRE 的数量,还考虑了相邻序列的影响。FXRE 片段信息如表 2 中所示,3xFXRE 为 hSHP_FXRE、hBSEP_FXRE 和 hMDR2_FXRE 片段的串联,2xFXRE 为 hOSTa_FXRE 和 hIBABP_FXRE 片段的串联,1xFXRE 为 hOSTa_FXRE2 (图 2B-D)。图 5 中,各组均转染了 3 μg 小鼠 FXR 过表达质粒和 60 ng 内参质粒到 HEK293T 细胞中,另外再分别同时转染了 1.5 μg pGL4-

luc2P-Hygro、pGL4.29-3×FXRE-Luc、pGL4.29-2×FXRE-Luc 和 pGL4.29-1×FXRE-Luc。

图 5A 显示了各组中 GW4064 处理组与溶剂组的相对荧光强度, 由于 FXRE 片段与细胞中内源性表达的 FXR 与培养基的潜在内源性配体相结合, 因此溶剂组表现出一定的本底 FXR 激活活性(图 5A, vehicle)。体系用于筛选 FXR 激动剂时, 不能单纯地比较相对荧光素酶活性, 而更应关注相对于本底活性的诱导效率(GW4064 相对荧光素酶活性:溶剂组相对荧光素酶活性)。图 5B 根据图 5A 中各组 GW4064 处理组与溶剂组相对荧光素酶活性相比得到相对诱导效率(见 1.2.10), 虽然 3×FXRE 组的相对荧光素酶活性(萤火虫荧光素酶:海肾荧光素酶)低于 2×FXRE 和 1×FXRE 组(图 5A, GW4064), 但 2×FXRE 和 1×FXRE 组的本底 FXR 激活活性较 3×FXRE 组高, 因此相对诱导效率反而降低

(图 5B)。由 3×FXRE、2×FXRE、1×FXRE 三组的结果对比表明, 叠加多个 FXRE 片段能够提高体系诱导效率, 从而优化筛选体系灵敏度, 其中叠加 3 个靶基因 FXRE 片段的 3×FXRE 效果更优。

2.1.6 共转染质粒比例的优化

前期的实验表明共转染质粒的比例不同会对诱导效应产生影响, 为了得到最优的诱导效应, 我们比较了不同的 FXR 过表达质粒和报告基因质粒的比例。结果如图 6 所示, 转染到 HEK293T 细胞的总质粒量固定为 5 μg , pRL-TK-intronless 的量固定为 60 ng, 各组小鼠 FXR 过表达质粒和报告基因质粒的转染比例分别为 0.5:1、0.66:1、1.33:1、2:1 和 4:1, 结果表明, FXR 过表达质粒的比例增高能够提高体系的灵敏度, FXR 过表达质粒和报告基因质粒的比例为 2:1 和 4:1 时灵敏度较优。

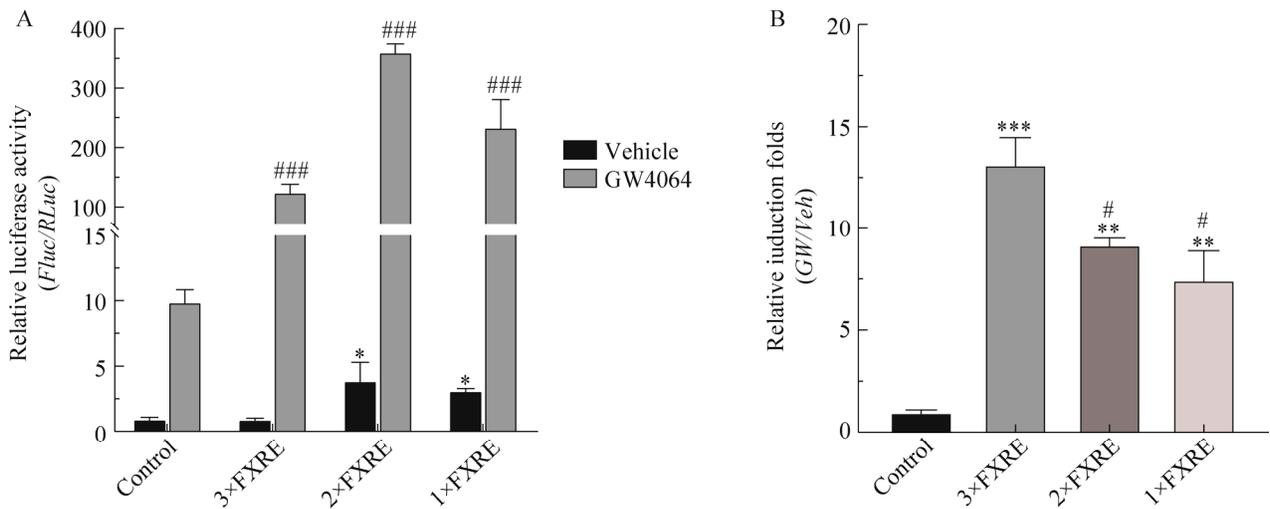


图 5 不同的 FXRE 片段对报告基因试验相对诱导效率的影响

Figure 5 Effect of different FXREs on relative induction folds for reporter assay. The result represents as $\bar{x} \pm s$, $n=3$. A: Relative luciferase activity. *: $P<0.05$ represent significance, 3×FXRE, 2×FXRE, 1×FXRE vs. control on vehicle; ###: $P<0.001$ represent significance, 3×FXRE, 2×FXRE, 1×FXRE vs. control on GW4064, determined by t test. B: Relative induction folds. **: $P<0.01$ represent significance, 3×FXRE, 2×FXRE, 1×FXRE vs. control; ***: $P<0.01$ represent significance, 3×FXRE vs. Control; #: $P<0.05$ represent significance, 2×FXRE, 1×FXRE vs. 3×FXRE, determined by t test.

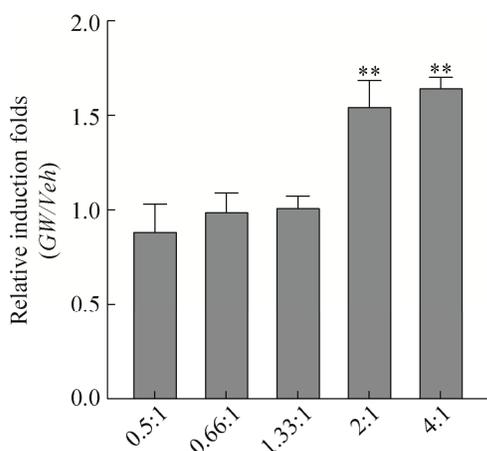


图6 不同的FXR过表达质粒与报告基因质粒的比例对报告基因试验相对诱导效率的影响

Figure 6 Effect of different ratio of FXR overexpression plasmid to reporter plasmid on relative induction folds for reporter assay. The result represents as $\bar{x} \pm s$, $n=3$, **: $P<0.01$ represent significance, 0.66:1, 1.33:1, 2:1, 4:1 vs. 0.5:1, determined by t test.

2.2 筛选体系的确定及稳定性分析

根据上述优化结果, 筛选体系最终确定为于6孔板中覆盖率达到80%–85%的HEK293T

细胞中, 每孔共转染4 μg mFXR过表达质粒, 1 μg 3 \times FXRE报告基因质粒和60 ng pRL-TK-intronless内参质粒。最终确立的筛选体系与传统的3 \times IR1体系诱导效率的比较如图7所示, 传统的3 \times IR1体系虽然相对荧光素酶活性(萤火虫荧光素酶:海肾荧光素酶)较改进后的体系高, 但由于报告基因质粒3 \times IR1转染细胞后表现的相对荧光素酶活性比3 \times FXRE (图7A, vehicle)高, FXR特异配体激活FXR后的相对荧光活性反而降低(图7B), 将图7A中的GW4064处理组与溶剂组相比, 得到图7B的相对于本底活性的相对诱导效率。筛选体系应用于FXR小分子配体筛选过程中更关注配体激活相对于溶剂对照的诱导效率, 因此该结果说明改进后的筛选体系的相对诱导效率优于原有的常用体系, 更适合用于FXR激动剂的筛选。

按照1.2.11的Z因子分析法对已确定的筛选体系的稳定性进行考察, 重复5次实验, 每次3组平行, 结果如表4中所示。由结果可知,

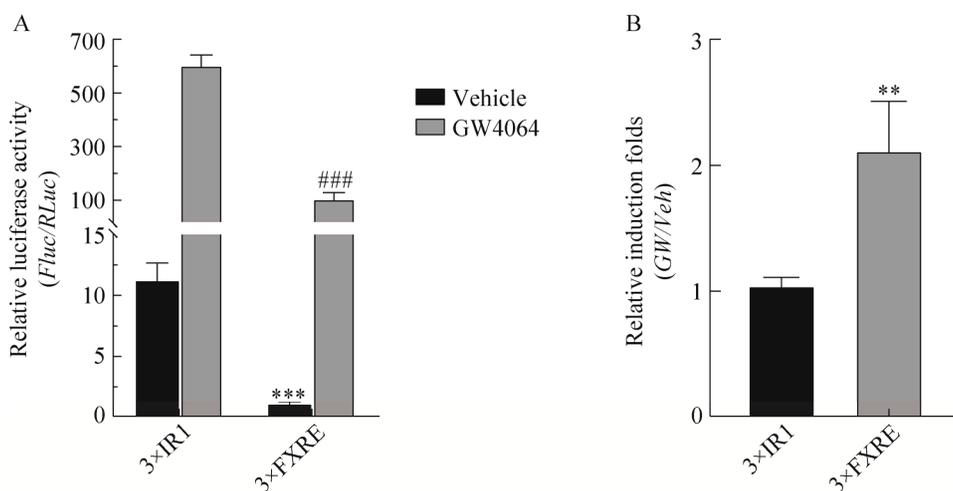


图7 最终确立的报告基因体系的FXR诱导效率

Figure 7 Relative induction folds for FXR on final reporter gene system. The result represents as $\bar{x} \pm s$, $n=3$. A: ***: $P<0.001$ represent significance, 3 \times FXRE vs. 3 \times IR1 on vehicle; ###: $P<0.001$ represent significance, 3 \times FXRE vs. 3 \times IR1 on GW4064, determined by t test. B: **: $P<0.01$ represent significance, 3 \times FXRE vs. 3 \times IR1, determined by t test.

表 4 报告基因试验 Z 因子分析

Table 4 Z factor for reporter gene assay

Assay	No.					Mean
	1	2	3	4	5	
3×IR1	0.81	0.65	0.52	0.71	0.62	0.66
3×FXRE	0.94	0.87	0.93	0.79	0.60	0.83

See 2.2 for the determined reporter gene assay system and 1.2.11 for the method.

此筛选模型的 Z 因子均大于 0.50, 平均值为 0.83, 表明此筛选体系稳定性理想, 反应强度符合高通量筛选的要求, 且稳定性优于现有的 3×IR1 体系(Z 因子平均值为 0.66)。

3 讨论与结论

FXR 是当今代谢性肝病的热门药物靶标, 已有的报道表明激活 FXR 能够延缓肝脏炎症进展以及肝纤维化进程^[19], 开发 FXR 激动类药物对非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)以及肝纤维化的治疗具有重大意义。

HEK293 细胞因其转染效率高、生长速度快、容易培养等优点^[20]被广泛应用于瞬时转染和蛋白表达等相关实验, 本文选用 HEK293T 细胞系以构建细胞筛选体系, 通过瞬时转染和过表达 FXR, 并利用已知的 FXR 激动剂 GW4064, 可在较短时间内确定和优化 FXR 激动剂筛选体系。瞬时转染的基因翻译表达为蛋白通常在转染后 48–72 h 达到最高^[21], 之后随着细胞的增殖和转染质粒的被稀释, 瞬时表达蛋白量逐渐下降, 因此构建稳定表达 FXR 的细胞株是优化和改进该系统的进一步工作。

前期的研究表明, FXR 与配体结合后被激活, 通过结合靶基因上下游的顺式作用元件 FXRE, 调控其靶基因的转录激活而且该激活效应与 FXRE 的种类、相邻序列和 FXRE 数量密切相关^[15]。本文通过克隆多个 FXR 靶基因

上的 FXRE 片段, 并以首尾串联的方式构建了一种增强型 FXRE 元件, 能极大地增强其下游的荧光素酶报告基因的转录活性和响应灵敏度。这种新型的 FXRE 元件组合相较于传统 IR-1 序列的简单叠加, 同时考虑了 FXRE 数量以及生理状态下相邻序列对 FXR 结合的影响, 图 5 的结果也表明, 与已知的 IR-1 叠加体系相比, 该新型串联组合的 FXRE 元件提高了体系灵敏度。此外, 本文还进一步优化质粒转染比例和 FXR 过表达质粒, 构建了一种改良的双荧光素酶报告基因筛选体系, 其具有高效、灵敏、快速的特点。此外, 基于细胞的筛选体系, 细胞筛选体系能够直接反映化合物激活 FXR 后产生的生物活性, 而基于分子结合的筛选体系在评价化合物分子与靶点生物大分子结合能力上更具优势。

由结果可知, 鼠源 FXR 优于人源 FXR, 这可能是由于克隆的小鼠 FXR 中 5'UTR 和 3'UTR 区域的调控作用, 而克隆的人 FXR 只有编码序列区域(coding sequence, CDS), 缺乏更多的调控序列, 这使得小鼠 FXR 相较于人 FXR 有更高的转录和翻译水平, 也可能由于小鼠 FXR 自身具有较高的转录激活效应, 具体原因还需在将来的实验中阐明。

由图 1 结果分析可知, 与 HepG2 细胞比较, HEK293T 细胞中 FXR 表达水平较低, 而 RXR 表达水平较高。图 3 结果同时证实, 过表达 RXR 并不能对提高体系的灵敏度有帮助, 其原因是所用 HEK293T 细胞系内源性 RXR 的表达在筛选体系中已处于较高水平, 足够与 FXR 形成异聚体推动其靶基因的转录激活。通过减少转染的 RXR 质粒量从而减少细胞过表达 RXR 所产生的负担, 对提高体系灵敏度反而有促进效应。但 HepG2 和 HEK293T 细胞中的内源性 FXR 表达水平都相对较低, 限制了与

进入细胞的化合物小分子配体的结合,从而降低了荧光素酶报告基因的活性。因此通过提高 FXR 过表达质粒在细胞中的表达能够提高体系的诱导效率。

除了 FXRE 的数量能对筛选体系的灵敏度产生影响, FXRE 的种类也可能是一个影响因素, 比较更多基因的 FXRE 片段对体系灵敏度的影响, 这是此筛选体系将来进一步优化的方向。优化后的筛选体系能够更灵敏地反映药物的生物活性, 在药物的筛选应用方面更具优势。除了应用于 FXR 激动剂的筛选, 本系统也可应用于筛选 FXR 抑制剂。通过用已知的 FXR 激动剂与待测化合物同时处理转染后的细胞, 可检测待测化合物对 FXR 激动剂的抑制效应。在未来进一步的工作中, 将应用于新型激动剂的发现和研究。

综上所述, 本文所构建的细胞筛选体系具有以下特点和优势: (1) 相较于传统 IR-1 叠加体系, 主要特征在于使用多段 FXR 靶基因上的 FXRE 片段叠加组成的一种新型的增强型 FXRE 元件。(2) 灵敏高效, 最终确立的筛选体系用 FXR 特异激动剂 GW4064 处理的诱导效率优于传统的 IR-1 叠加体系, 高的诱导效率在药物量效关系研究以及效应较低药物的筛出等方面更具优势。(3) 背景噪声低, 相较于现有的 3×IR1 体系, 本研究构建的筛选体系的背景荧光素酶活性更低, 更有利于待测药物激动活性的分辨。(4) 简便易行, 此筛选体系通过瞬时转染细胞的方式进行, 可快速建立并应用。(5) 模型的稳定性良好, 通过 Z 因子分析可知, 此筛选体系的平均 Z 因子达到 0.83, 优于现有的 3×IR1 体系。另外, 此筛选体系仍有以下问题需要进一步验证与优化: (1) 比较更多基因的 FXRE 序列对体系的影响。(2) 构建稳定表达 FXR 的细胞株。

REFERENCES

- [1] MAKISHIMA M, OKAMOTO AY, REPA JJ, TU H, LEARNED RM, LUK A, HULL MV, LUSTIG KD, MANGELSDORF DJ, SHAN B. Identification of a nuclear receptor for bile acids[J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1362-1365.
- [2] ZHANG YQ, EDWARDS PA. FXR signaling in metabolic disease[J]. *FEBS Letters*, 2008, 582(1): 10-18.
- [3] YAN NN, YAN TT, XIA YL, HAO HP, WANG GJ, GONZALEZ FJ. The pathophysiological function of non-gastrointestinal farnesoid X receptor[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2021, 226: 107867.
- [4] PIGLIONICA M, CARIELLO M, MOSCHETTA A. The gut-liver axis in hepatocarcinoma: a focus on the nuclear receptor FXR and the enterokine FGF₁₉[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2018, 43: 93-98.
- [5] LÓPEZ-VELÁZQUEZ JA, CASTRO-TORRES IG, SÁNCHEZ-VALLE V, MÉNDEZ-SÁNCHEZ N. Intestinal nuclear bile acid receptor FXR and cholestasis[J]. *Annals of Hepatology*, 2012, 11(1): 152-154.
- [6] ZHU Y, LIU HX, ZHANG M, GUO GL. Fatty liver diseases, bile acids, and FXR[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2016, 6(5): 409-412.
- [7] SHAH RA, KOWDLEY KV. Obeticholic acid for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 2020, 14(5): 311-321.
- [8] TRAUNER M, GULAMHUSEIN A, HAMEED B, CALDWELL S, SHIFFMAN ML, LANDIS C, EKSTEEN B, AGARWAL K, MUIR A, RUSHBROOK S, LU XM, XU J, CHUANG JC, BILLIN AN, LI G, CHUNG C, SUBRAMANIAN GM, MYERS RP, BOWLUS CL, KOWDLEY KV. The nonsteroidal farnesoid X receptor agonist cilofexor (GS-9674) improves markers of cholestasis and liver injury in patients with primary sclerosing cholangitis[J]. *Hepatology: Baltimore, Md*, 2019, 70(3): 788-801.
- [9] LUCAS KJ, LOPEZ P, LAWITZ E, SHEIKH A, AIZENBERG D, HSIA S, BEE GGB, VIERLING J, FRIAS J, WHITE J, EGUCHI Y, LAZAS D, NEFF G, YONEDA M, AUGUSTIN S, KIM W, LOEFFLER Y, SCHAEFER F, LAMLE S, MARTIC M, BRASS C, SANYAL A. Tropifexor, a highly potent FXR agonist, produces robust and dose-dependent reductions in hepatic fat and serum alanine aminotransferase in patients with fibrotic NASH after 12 weeks of therapy:

- FLIGHT-FXR Part C interim results[J]. *Digestive and Liver Disease*, 2020, 52: e38.
- [10] BLAY V, TOLANI B, HO SP, ARKIN MR. High-Throughput Screening: Today's biochemical and cell-based approaches[J]. *Drug Discovery Today*, 2020, 25(10): 1807-1821.
- [11] LAFFITTE BA, KAST HR, NGUYEN CM, ZAVACKI AM, MOORE DD, EDWARDS PA. Identification of the DNA binding specificity and potential target genes for the farnesoid X-activated receptor[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(14): 10638-10647.
- [12] PIRCHER PC, KITTO JL, PETROWSKI ML, TANGIRALA RK, BISCHOFF ED, SCHULMAN IG, WESTIN SK. Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(30): 27703-27711.
- [13] ANISFELD AM, KAST-WOELBERN HR, LEE H, ZHANG YQ, LEE FY, EDWARDS PA. Activation of the nuclear receptor FXR induces fibrinogen expression: a new role for bile acid signaling[J]. *Journal of Lipid Research*, 2005, 46(3): 458-468.
- [14] LANGHI C, PEDRAZ-CUESTA E, HARO D, MARRERO PF, RODRÍGUEZ JC. Regulation of human class I alcohol dehydrogenases by bile acids[J]. *Journal of Lipid Research*, 2013, 54(9): 2475-2484.
- [15] HU TH, CHOUINARD M, COX AL, SIPES P, MARCELO M, FICORILLI J, LI SY, GAO H, RYAN TP, MICHAEL MD, MICHAEL LF. Farnesoid X receptor agonist reduces serum asymmetric dimethylarginine levels through hepatic dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 gene regulation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(52): 39831-39838.
- [16] WANG N, ZOU QG, XU JX, ZHANG JC, LIU JS. Ligand binding and heterodimerization with retinoid X receptor α (RXR α) induce farnesoid X receptor (FXR) conformational changes affecting coactivator binding[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(47): 18180-18191.
- [17] ZHANG XD, ESPESETH AS, JOHNSON EN, CHIN J, GATES A, MITNAUL LJ, MARINE SD, TIAN J, STEC EM, KUNAPULI P, HOLDER DJ, HEYSE JF, STRULOVICI B, FERRER M. Integrating experimental and analytic approaches to improve data quality in genome-wide RNAi screens[J]. *SLAS Discovery*, 2008, 13(5): 378-389.
- [18] FORMAN BM, GOODE E, CHEN J, ORO AE, BRADLEY DJ, PERLMANN T, NOONAN DJ, BURKA LT, MCMORRIS T, LAMPH WW, EVANS RM, WEINBERGER C. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites[J]. *Cell*, 1995, 81(5): 687-693.
- [19] CARIELLO M, PICCININ E, MOSCHETTA A. Transcriptional regulation of metabolic pathways via lipid-sensing nuclear receptors PPARs, FXR, and LXR in NASH[J]. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2021, 11(5): 1519-1539.
- [20] DEKEVIC G, TASTO L, CZERMAK P, SALZIG D. Statistical experimental designs to optimize the transient transfection of HEK 293T cells and determine a transfer criterion from adherent cells to larger-scale cell suspension cultures[J]. *Journal of Biotechnology*, 2022, 346: 23-34.
- [21] SHEIKH S, COUTTS AS, LA THANGUE NB. Transfection[M]. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, 2017: 191-209.

(本文责编 郝丽芳)