论著

文章编号:1000-5404(2006)16-1644-04

一种高通量筛选 PAC_1 受体激动剂的细胞模型的建立

张素行[1],蔡绍皙[2],许治良[1,2] ([1]华东师范大学教育部脑功能基因组学重点实验室,上海 200062;[2]重庆大学教育部生物力学和组织工程重点实验室,重庆 400044)

提 要:目的 建立垂体腺苷酸环化酶激活肽Ⅰ型受体(pituitary adenylate cyclase activating peptide Ⅰ receptor, PAC_1-R)激动剂的高通量筛选模型,筛选 PAC_1-R 受体的激动剂,开发用于治疗神经系统疾病和能量代谢疾病的药物。**方法** 将人的 PAC_1-R cDNA 克隆到哺乳动物细胞表达载体 pCDNA3.1 构成质粒 $hPAC_1R$/pCDNA3.1,将这种质粒与报告基因质粒(SRE/3×MRE/CRE/VIP/Luci)共转染到 CHO 细胞,通过 G418 筛选,建立稳定细胞株,利用 PAC_1-R 内源激动剂 PACAP-27 探索和优化了筛选条件。**结果** 建立了稳定表达 $hPAC_1$-R 的筛选细胞株和可靠的筛选方法,Z'因子大于 0.7。**结论** 该系统成功适合于 PAC_1-R 激动剂的高通量筛选。

关键词: PAC_1-R;报告基因;激动剂;高通量药物筛选

中图法分类号: Q503;Q591.2;Q78 **文献标识码:** A

Establishment of a cell-based assay for PACAP Ⅰ receptor agonist screening

ZHANG Su-xing[1], CAI Shao-xi[2], XU Zhi-liang[1,2] ([1]Key Laboratory of Brain Functional Genomics of Ministry of Education, Key Laboratory of Brain Functional Genomics of Shanghai, East China Normal University, Shanghai 200062, [2]Key Laboratory of Biomechanics & Tissue Engineering of Ministry of Education, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: Objective To generate a cell-based functional assay for human pituitary adenylate cyclase activating peptide Ⅰ receptor (PAC_1-R) agonist screening. **Methods** The human PAC_1-R cDNA was cloned into a mammalian expression vector pCDNA3.1 ($hPAC_1R$/pCDNA3.1). This cDNA plasmid was co-transfected with a reporter gene construct (SRE/3×MRE/CRE/VIP/Luci) in CHO cells. Stable cell line expressing the human PAC_1-R and the reporter gene was selected with G418. The assay condition was optimized with PAC_1-R ligand PACAP-27. **Results** We have generated a stable cell line and reliable functional assay for PAC_1-R agonist screening. Our results demonstrated that the Z'-factor value was more than 0.7. **Conclusion** This technology can be optimized for high throughput screening and successfully applied to identify agonist for PAC_1-R.

Key words: PAC_1-R; reporter gene; agonist; high throughput screening

垂体腺苷酸环化酶激活肽(pituitary adenylate cyclase activating peptide, PACAP)是一种与广泛生理过程有关的多功能神经肽,属于胰高血糖素超家族,在体内以27个氨基酸组成的较短多肽和38个氨基酸组成的较长多肽两种形式存在,与血管活性肠肽(VIP)有68%的同源性。PACAP 有3种受体:PAC_1-R、$VPAC_1$-R 和 VPAC2-R。PAC_1-R 特异性的与 PACAP 结合激活腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC)和磷脂酶C(phospholipase C, PLC),与神经、内分泌、心血管、肌肉和免疫系统的一系列功能有关[1]。

PACAP 主要表达于中枢神经系统(如嗅球、丘脑、下丘脑、海马齿状回、中脑黑质致密区、小脑颗粒细胞),在神经系统发育分化中起重要作用[2]。一定剂量的 PACAP 可以保护多巴胺能神经元,增加多巴胺摄入,改善帕金森症模型动物的行为表征[3]。PACAP 在不同的神经细胞类型里都具有神经营养和神经保护的功效[2],能减轻谷氨酸引起的海马神经元损伤凋亡[4],对抗 Aβ25-35 的致神经元凋亡作用[5]。实验证明在分化的 PC12 细胞(证明表达 PAC_1-R)上,PACAP-27 能有效的抑制鱼藤酮诱导的细胞凋亡和损伤,加入 PAC_1-R 的拮抗剂 PACAP6-27 能使这种保护作用

基金项目:国家"863"计划项目(2003AA221061)
Supported by the National "863" Key Research Project of China (2003AA221061)

作者简介:张素行(1981-),女,上海市人,硕士,主要从事分子药理学方面的研究。电话:(021)62232919

通讯作者:许治良,电话:(021)62233953,E-mail:zlxu@brain.ecnu.edu.cn
蔡绍皙,电话:(023)65108077,E-mail:sxcai@cqu.edu.cn

收稿日期:2005-09-19;修回日期:2005-12-09

消失[6]。PAC_1-R 也在肾上腺、睾丸的生殖细胞和胰腺等表达，PAC_1 受体敲除小鼠有 60% 在出生后 4 周内死亡，血糖激活的胰岛素分泌下降，显示 PAC_1 受体在体内新陈代谢过程中起重要作用[7]。

因此，PAC_1 受体激动剂的研究可能为治疗神经损伤或退行性疾病（如：阿尔茨海默症和帕金森症）和治疗能量代谢方面疾病（如糖尿病）等提供有效手段。

为了建立一个 PAC_1 受体激动剂的高通量筛选方法，用对第二信使变化敏感的响应元件（SRE、MRE、CRE）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中国仓鼠卵细胞（CHO 细胞），建立了 $hPAC_1R$ 激动剂高通量筛选细胞模型，利用 PAC_1 受体的内源激动剂 PACAP-27 探索和优化了筛选条件，建立了可靠的筛选方法。

1　材料与方法

1.1　试剂和仪器

Bright-Glo™荧光试剂购自 Promega 公司，人下丘脑 cDNA 购自 ClonTech 公司，T 载体购自 Takara 公司，pcDNA3.1 载体购自 Invitrogen 公司，转染试剂 Fugene 6 购自 Roche 公司，G418 购自 GibcoTM 公司，Forskolin 购自 Sigma 公司，细胞培养材料购自 Bioclone M 公司，PACAP-27 购自 AMERICAN PEPTIDE 公司，二甲亚砜（DMSO）等化学试剂为市售分析纯。

PCR 基因扩增仪（MJ Research），分析检测系统 Analyst HTTM（Molecular Device），白色 96 孔板（平底，底部透明）购自 Corning 公司。

1.2　质粒的构建

报告基因质粒（SRE/3 × MRE/CRE/VIP/Luci），由 1 个 SRE、3 个 MRE 和含有 1 个 CRE 等响应元件与肠血管活性肽基因的最小化启动子 VIP 相连，并连接到 pGL3 载体的荧光素酶基因（Luciferase）的上游，本质粒由胡应和[8]提供，该质粒能有效地响应细胞内 cAMP 和 Ca^{2+} 的变化。

PAC_1 基因的克隆，用以下两对引物：5′-GTGTCATGGCTG-GTGTCGTG-3′ 和 3′-GGAGCATGGCTCAGGTGG-5′ 为引物，以人下丘脑 cDNA 文库为模板进行 PCR 扩增，扩增产物克隆到 T 载体，再亚克隆到 pCDNA3.1 载体，构建成为 $hPAC_1R$ 质粒（$hPAC_1R$/pCDNA3.1），并经测序确认。

1.3　稳定细胞株的建立

CHO 细胞用 1640 培养基（含 10% FBS 和 1% 双抗）培养，以密度 2×10^5 个/ml 接种到 6 孔板，于 37 ℃，5% CO_2 孵箱中培养过夜，细胞达到 50% 的融合度后，用 Fugene 6，按说明书，将受体基因和报告基因按 1∶5 共转染细胞，培养过夜后，用含 G418（600 mg/L）的选择培养基筛选细胞，3 周后长满，分别用 Forskolin 和 PACAP-27 刺激细胞，进行活性检测，选择荧光素酶的表达较好的细胞，用有限稀释法挑选单克隆。挑选活性最高细胞，供药物筛选用（命名为：S3MC/Luci/PAC_1/CHO）。

用同样的方法建立对照细胞株，将 pCDNA3.1 空载体和报告基因质粒以 1∶5 的比例共转染到 CHO 细胞中建立稳定的细胞株，用 Forskolin 刺激细胞，检测荧光素酶的表达，选取活性最高且背景值较低的单克隆作为对照细胞株（命名为：S3MC/Luci/CHO）。

1.4　荧光素酶报告基因检测

用含 5% 血清的 1640 培养基将细胞按一定密度接种到 96 孔板，每孔 100 μl，37 ℃，5% CO_2 孵箱中培养过夜后，每孔加一定量的样品，37 ℃，5% CO_2 孵箱中培养 6 h 后，每孔加 100 μl荧光酶底物 Bright-Glo™，用 Analyst HT™检测活性。

1.5　统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间差异采用 t 检验。

2　实验结果

2.1　细胞株（S3MC/Luci/PAC_1/CHO）的表征

用于筛选的细胞株其中的报告基因必须能有效的响应 PAC_1 受体激活下的细胞信号变化，为了评估和挑选用于药物筛选的细胞株，以 3×10^5 个/ml S3MC/Luci/PAC_1/CHO 细胞密度铺 96 孔板，培养过夜，分别加入 10 μl 浓度为 10 mmol/L 的 forskolin 和 10 μl 浓度 5 mmol/L PACAP-27，孵育 8 h 时后，测定荧光素酶活性，结果表明，S3MC/Luci/PAC_1/CHO 细胞在 forskolin 和 PACAP-27 的刺激下，报告基因的表达都有显著增加［对照组（375 ± 26），forskolin（2 483 ± 23），PACAP-27（1 454 ± 64），（$P < 0.01$）］。用不同浓度的 PACAP-27 处理 S3MC/Luci/PAC_1/CHO 细胞株，结果表明，在一定的浓度范围内，荧光酶素的表达浓度依赖性地随配体浓度增加而增加（EC_{50} = 62.46 nmol/L）（图 1）。说明这个系统能正确地反映受体与配体相互作用，以及受体激活后细胞内的信号变化。

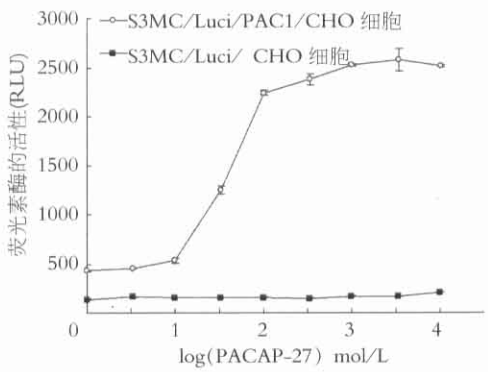


图 1　不同的浓度的 PACAP-27 对 S3MC/Luci/PAC1 /CHO 细胞和 S3MC/Luci/CHO 细胞荧光素酶活性的影响

为了检测宿主细胞中是否有内源性受体的干扰，以细胞密度为 3×10^5 个/ml 的 S3MC/Luci/CHO 细胞铺 96 孔板，培养过夜，加入 10 μl 不同浓度 PACAP-27，孵育 8 h 时后，测定荧光素酶活性，结果表明，没有转入受体的 S3MC/Luci/CHO 对照细胞株对内源性配体的响应极低（图 1），说明在 CHO 细胞中内源受体的干扰较小，S3MC/Luci/CHO 细胞可以用对照细胞株。由于细胞内信号的复杂性，药物筛选中的阳性不一定是受体与药物相互作用的结果，该细胞株主要用于排除假阳性。

2.2 筛选条件的优化

为了获得最佳的筛选结果，我们用 PAC_1 受体的内源性激动剂 PACAP-27 对筛选条件进行优化。

2.2.1 孵育时间对荧光素酶表达的影响 激动剂与受体作用后，启动一系列反应，引发荧光素酶表达，而其表达量与配体-受体相互作用的时间有关。为了确定荧光素酶的最佳表达时间，我们以 3×10^5 个/ml 的密度铺板，培养过夜，加入浓度为 0.1 μmol/L 的 PACAP-27，测定在孵育时间为 2、3、4、5、6、7、8、9、11 和 13 h 下细胞的荧光素酶活性。由图 2 可见，孵育时间为 8～11 h 时，荧光素酶表达量最高，而孵育时间太短或过长时，荧光素酶的表达都偏低，因此，我们选择 9 h 的孵育时间以获得较高信号值。

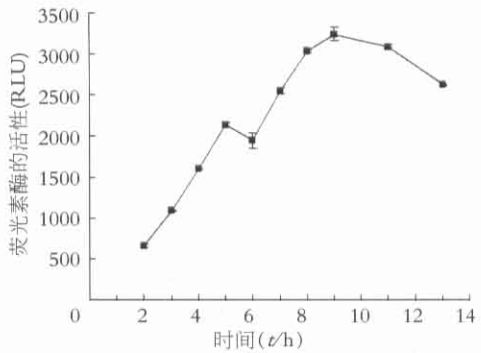


图 2 S3MC/Luci/PAC1/CHO 细胞与 PACAP－27 孵育的时间对荧光素酶活性的影响

2.2.2 细胞密度对荧光素酶表达的影响 细胞数目直接影响信号值的大小，因此，细胞数目是影响测试结果的重要因素。为了检验不同细胞数目对筛选结果的影响，我们将不同密度的细胞接种于 96 孔板，孵育过夜后，加 0.1 μmol/L 的 PACAP，再孵育 9 h，检测荧光素酶的活性，发现当用 2×10^5 个/ml 的细胞密度铺板时，响应最好（图 3），细胞数目较大时，基底值升高，但对激动剂的响应并不随着升高，可能是因为细胞数目增大时，对细胞生长不利。所以选用（1～2）$\times10^5$ 个/ml 的较低密度，在这个细胞浓度下，响应适当，而基底值较底，对筛选有利。

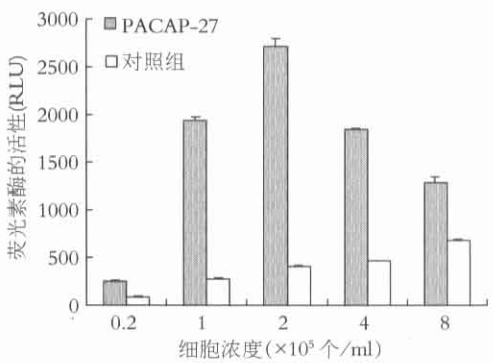


图 3 细胞浓度对 S3MC/Luci/ PAC1/CHO 细胞活性的影响

2.2.3 溶剂 DMSO 的用量 因为进行药物筛选时，常用二甲基亚砜 DMSO 作溶剂溶解样品，所以我们分析了溶剂 DMSO 浓度对 S3MC/Luci/PAC_1/CHO 细胞株荧光素酶表达的影响。将细胞以 2×10^5 个/ml 密度铺 96 孔板，培养过夜，同时加入 10 μl浓度为 0.1 μmol/L 的 PACAP-27 和不同浓度的 DMSO，孵育 9 h，检测荧光素酶的活性。结果表明（图 4），当 DMSO 终浓度≤2% 时，DMSO 对 PACAP-27 刺激下的细胞荧光素酶响应值没有很大影响，当 DMSO 浓度 > 2% 时，PACAP-27 刺激下的细胞荧光素酶响应值明显下降，可能是 DMSO 浓度过大对细胞产生毒性而使响应值减小。因此，我们认为每孔加入溶剂 DMSO 终浓度应该≤2%，使用这个浓度不会影响筛选测定。

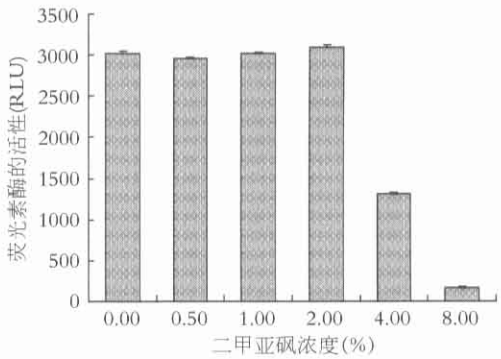


图 4 DMSO 浓度对 S3MC/Luci/PAC1/CHO 细胞荧光活性的影响

2.3 筛选系统的评估

系统经过优化后，为了确认筛选系统是否符合高通量筛选的要求，采用 Z' 因子分析法来进行评估，其计算公式为

$$Z' = \frac{|\mu_{C+} - \mu_{C-}| - (3\sigma_{C+} - 3\sigma_{C-})}{|\mu_{C+} - \mu_{C-}|} = 1 - \frac{3\sigma_{C+} - 3\sigma_{C-}}{|\mu_{C+} - \mu_{C-}|}$$

其中 μ_{C+}：阳性对照的平均值，μ_{C-}：阴性对照的平均值；σ_{C+}：阳性对照的标准偏差，σ_{C-}：阴性照的标准偏差。

Z' 因子是一个统计学参数，反映了方法的稳定性与可靠性。如果 Z' ≥ 0.5，说明筛选方法适用于高通量筛选[9]。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 0.1 μmol/L 的 PACAP-27 作为阳性对照，另外 30 个孔为空白对照，孵育 9 h，检测荧光素酶活性。实验结果是，阳性对照和空白对照信号平均值和标准偏差分别为（3 122.5 ± 177.1）RUL 和（448.9 ± 23.7）RUL，变异系数 *CV* 分别为 5.7% 和 6.2%，利用公式算得 Z' = 0.73。结果说明系统稳定，能有效区分激动剂，建立的筛选方法能用于 PAC_1 受体激动剂的高通量筛选。

2.4 药物筛选

综上所述，在筛选时，用含 5% FBS 的 1640 培养基，以细胞密度为 3×10^5 个/ml 的 S3MC/Luci/PAC_1/CHO 细胞铺 96 孔板，于 37 ℃，5% CO_2 孵箱中培养过夜，然后在细胞中加入溶于 DMSO 中的化合物（在我们实际筛选中，使用天然提取物），控制 DMSO 的浓度不超过 2%，每个样品做 3 个平行孔，以不加药物的细胞作对照，加药后，细胞于 37 ℃，5% CO_2 孵箱中孵育 9 h时后，检测荧光素酶的活性。分析加入了样品和对照的细胞的活性，如平均活性 M 样品 > M 对照 + 3SD，这样的样品就被认为可能是有活性的，然后对有活性的样品做进一步的验

证，用 S3MC/Luci/CHO 细胞排除假阳性。本研究采用这种方法，对 500 多种天然提取物进行了药物筛选，有 3 个提取物对 PAC_1 受体有活性。

3　讨论

G 蛋白偶联受体是高通量筛选中的重要药靶，有许多方法可适用于 G 蛋白偶联受体的激动剂和拮抗剂的筛选[10]。荧光酶素报告基因方法是高通量筛选技术中常用的一种基于细胞的测定方法。将荧光酶素报告基因与药靶基因共转染细胞，将药靶基因（受体）与药物作用产生的第二信使的变化与报告基因相偶联，通过报告基因的表达，间接反映第二信使的变化和配体的功能。通过检测报告基因的表达水平，就可以获知药物对特定通路的作用，广泛地用于高通量筛选生物活性的化合物[8]。

PAC_1-R 是对 PACAP 有高亲和力的选择性 G 蛋白偶联受体，属于 Gs，也与 Gq/11 偶联，但效应较弱。当配体结合到这个受体上，激活腺苷酸环化酶的活性，cAMP 的合成增加，通过 PKA 信号通路，活化 cAMP 响应元件（CRE）结合蛋白 CREB，后者结合到含有 CRE 的启动子上，促进这种启动子控制的基因表达。本研究中，我们将 PAC_1 受体质粒与含有 CRE 的荧光素酶报告基因共转染 CHO 细胞，建立了一个适用于 PAC_1 受体激动剂高通量筛选的稳定细胞株。配体与 PAC_1 受体结合时，激活 PKA 信号通路，最终导致 CRE 响应元件控制的荧光素酶报告基因的表达发生变化，通过检测裂解液中荧光素酶的表达量，就可以评估配体的活性，进行高通量筛选。

本实验室提供的 SRE/3 × MRE/CRE/VIP/Luci 报告基因，是一个多功能的报告基因系统，可以用于 Gs、Gi 和 Gq-偶联受体的药物筛选[8]。PAC_1 受体与激动剂结合后，能激活 PKA 信号通路，浓度较高时还会激活 PKC 信号通路，我们构建的报告基因系统，在 S3MC/Luci/PAC_1/CHO 细胞株中，能够同时响应在配体激活下细胞内 cAMP 和 Ca^{2+} 水平变化，提高了测试的灵敏度。

虽然响应元件能够灵敏地监控第二信使的变化，但是，影响第二信使变化的因素很多，由于小分子化合物与细胞作用导致的报告基因表达水平的变化，不一定是通过受体与小分子的直接结合产生的，从而造成假阳性。所以，我们建立了一个仅含响应元件和报告基因的阴性细胞株（S3MC/Luci/CHO）来排除这种假阳性，如果某化合物能使 S3MC/Luci/PAC_1/CHO 和 S3MC/Luci/CHO 两种细胞中报告基因的表达水平都发生变化，那么，这种变化可能不是这个化合物直接作用于受体产生的，因此，这个化合物就不是这个受体的配体，所得结果是假阳性，应当排除。

我们采用基于细胞的报告基因检测方法，建立了稳定可靠的适合高通量筛选的 PAC_1 受体激动剂筛选方法，并获得成功。我们使用的这种报告基因系统，不但适合 PAC_1 受体激动剂的激动剂的筛选，也可用于其它 G-蛋白偶联受体的激动剂的筛选。

近年来，随着对药物研发的不断深入，高通量筛选技术越来越多的科研机构和制药单位选用，并不断加以发展。我国的中草药资源丰富，如何有效的开发利用这宝贵的资源，从中药中筛选作用于特定的药靶，对其中的活性成分药理机制进行研究，实现中药现代化，高通量筛选技术是重要的技术之一。

参考文献：

[1] SHERWOOD N M, KRUECKL S L, McRORY J E. The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily[J]. Endocr Rev, 2000, 21(6): 619 - 670.

[2] WASCHEK J A, CASILLAS R A, NGUYEN T B, *et al*. Neural tube expression of pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and receptor: potential role in patterning and neurogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(16): 9602 - 9607.

[3] REGLODI D, TAMAS A, LUBICS A, *et al*. Morphological and functional effects of PACAP in 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats[J]. Regul Pept, 2004, 123(1-3): 85 - 94.

[4] 董　艳，倪　鑫，何　成，等. PACAP 对谷氨酸引起海马神经元损伤的保护作用[J]. 中风与神经疾病杂志，1999，16(3)：147 - 149.

[5] 桂兰润，李文彬，张炳烈，等. PACAP 受体激活对抗 Aβ25-35 致神经元凋亡作用的观察[J]. 中国应用生理学杂志，2002，18(2)：145 - 148.

[6] WANG G, QI C, FAN G H, *et al*. PACAP protects neuronal differentiated PC12 cells against the neurotoxicity induced by a mitochondrial complex I inhibitor, rotenone[J]. FEBS Lett, 2005, 579(18): 4005 - 4011.

[7] JAMEN F, PERSSON K, BERTRAND G, *et al*. PAC_1 receptor-deficient mice display impaired insulinotropic response to glucose and reduced glucose tolerance[J]. J Clin Invest, 2000, 105(9): 1307 - 1315.

[8] JIANG C, CHEN G, ZENG X, *et al*. Generation of a bioactive neuropeptide in a cell-free system[J]. Anal Biochem, 2003, 316(1): 34 - 40.

[9] 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]. J Biomol Screen, 1999, 4(2): 67 - 73.

[10] 许治良，高　虹，欧阳克清，等. G-蛋白偶联受体的功能测定和高通量药物筛选[J]. 中国药理学通报，2003，19(12)：1330 - 1336.

（编辑　陈聪连）