技术与方法 文章编号:0253-3626(2011)03-0323-04

稳定表达 β1、β2 及 β3 肾上腺素受体细胞株的鉴定

曾凡新[1],董 志[2],傅洁民[1],邓 杰[1],刘晓海[2],杨佳丹[2]
(1. 重庆医药工业研究院创新药物研发部,重庆 400061;2. 重庆医科大学药学院药理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:对稳定转染有携带人 β1、β2 或 β3 肾上腺素受体基因质粒的 CHO-K1 细胞(β1-CHO、β2-CHO 和 β3-CHO 细胞)进行鉴定,以为将这几种细胞用于 β3 肾上腺素受体激动剂的筛选奠定基础。方法:采用免疫细胞化学、免疫荧光、western blott 和放射性配体结合法对 3 种细胞进行鉴定。结果:β1-CHO、β2-CHO 和 β3-CHO 3 种细胞经免疫细胞化学检测,细胞内均出现明显的棕黄色免疫阳性反应;经免疫荧光检测,3 种细胞内均有明显的荧光;3 种细胞提取的蛋白质经 Western blot 检测均出现预期的受体蛋白条带,且均可与不同浓度的放射性核素标记配体 ^{125}I-cyanopindolol 呈饱和结合。结论:β1-CHO、β2-CHO 和 β3-CHO 细胞分别稳定表达有 β1、β2 或 β3 肾上腺素受体蛋白,可以用于特异性 β3 肾上腺素受体激动剂的筛选。

【关键词】肾上腺素受体;β1 肾上腺素受体;β2 肾上腺素受体;β3 肾上腺素受体;激动剂
【中国图书分类法分类号】R965.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2009-09-03

Identification of CHO cell lines stably transfected by β1, β2 or β3 adrenoceptor gene respectively

ZENG Fan-xin, et al
(*Department of Innovative New Drug R&D, Chongqing Pharmaceutical Research Institute*)

【Abstrract】*Objective*: To identify the CHO cell lines stably transfected by β1, β2 or β3 adrenergic receptor gene plasma respectively (named β1-CHO, β2-CHO or β3-CHO cell), so that to use these cell lines for the screening of potential β3 agonists. *Methods*: The cell lines were identified by the methods of immunocytochemistry, immunofluorence, western blot and radioactive ligand binding assay. *Results*: β1-CHO, β2-CHO or β3-CHO cells showed positive staining by immunocytochemistry assay and obvious green fluorescence by immunofluoresence assay. The proteins extracted from these three cell lines showed predicted strap of β1, β2 or β3 receptor protein when detected by western blotting, and these cells can bind with a non-specific adrenergic radioligand ^{125}I-cyanopindolol at a saturable binding way. *Conclusion*: β1-CHO, β2-CHO or β3-CHO cell lines stably expressed β1, β2 or β3 adrenoceptor separately and can be used for the screening of β3 adrenoceptor agonists.

【Key words】adrenergic receptor; β1 adrenoceptor; β2 adrenoceptor; β3 adrenoceptor; agonist

β3 肾上腺素受体为 β 肾上腺素受体(β adrenergic receptor,β3-AR)的一种亚型。大量研究表明,β3-AR 可介导多种药理与生理效应(如白色脂肪组织的脂肪分解,棕色脂肪组织的产热,膀胱逼尿肌的舒张)[1]。因此,β3-AR 的选择性激动剂有望成为肥胖、2 型糖尿病及尿频的治疗药物。早期的 β3-AR 激动剂都是在啮齿动物 β3-AR 的基础上开发出来的,代表药物如 CL316243、BRL37344 与 CGP12177A[2]等。在非胰岛素依赖性糖尿病动物模型中,这些化合物也表现出显著的抗高血糖效应[3]。但这些早期的 β3-AR 激动剂在人体临床实验中要么因为副作用太大,要么因为疗效太差而都令人失望。对人体疗效差的原因之一可能与这些化合物对人体 β3-AR 的激动活性并不强有关,因为受体克隆研究表明,人和啮齿动物的 β3-AR 基因序列虽有 80%~90%同源,但在功能上却有较大差异。另外,这些化合物对人 β3-AR 的选择性太低,兼具 β1-AR 和 β2-AR 激动(或拮抗)作用,因而具有较严重的副作用如心动过速(β1-AR 效应),震颤(β2-AR 效应)等。

基于此,新型 β3-AR 激动剂的筛选必须解决两个问题:高效性和高选择性。受体克隆技术的发展与兴起,弥补了早期 β3-AR 激动剂研究中的不足,为筛选高效、高选择性人 β3-AR 激动剂提供了可能。本实验我们对 3 种分别稳定转染有人 β1-AR,β2-AR 和 β3-AR 基因的 CHO-K1 细胞株(β1-CHO, β2-CHO 和 β3-CHO 细胞)进行鉴定,为将此 3 种细胞株用于筛选高效、高选择性 β3-AR 激动剂奠定基础。

作者介绍:曾凡新(1972-),男,高级工程师,博士,
研究方向:新药筛选与临床前药理毒理评价。
通信作者:董 志,男,教授,Email:zhidong073@hotmail.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞培养 β1-CHO 细胞、β2-CHO 细胞和 β3-CHO 细胞均由日本 Kitasato 大学分子药理教研室 Tsutomu Nakahara 教授惠赠。β1-CHO 细胞、β2-CHO 细胞和 β3-CHO 细胞均以含 300 μg/ml G418 的 DMEM 高糖培养液(含 10%胎牛血清)培养于 37℃ 5%CO_2 浓度的 CO_2 培养箱(饱和湿度)。细胞以 0.25%的胰酶消化传代。

1.1.2 主要试剂与材料 G418(硫酸盐)为 Merk 公司产品;^{125}I-Cyanopindolol(^{125}I-CYP)购自 PerkinElmer 公司,2200 μCi/mmol,放化纯度≥95%;硝酸纤维素膜购自 Amersham 公司;兔抗人 β1-AR 抗体,兔抗人 β2-AR 抗体,兔抗人 β3-AR 抗体和FITC 标记羊抗兔 IgG 均购自武汉博士德公司;蛋白质定量试剂盒购自北京中山公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫细胞化学 将 β1-CHO 细胞,β2-CHO 细胞和 β3-CHO 细胞分别以含 300 μg/ml G418 的 DMEM 高糖培养液(含 10%胎牛血清)培养于 24 孔培养板,常规制作细胞爬片,以 4%多聚甲醛固定后,PBS 洗片,3%的 H_2O_2 去离子水室温孵育 20 min。同法 PBS 洗细胞,以 5%封闭用羊血清封闭,加 1:50 稀释的一抗(阴性对照组滴加 PBS),湿盒内 4℃作用过夜。次日加 1:50 稀释的二抗(生物素标记山羊抗兔 IgG)作用后,加辣根过氧化物酶标记链酶卵白素工作液室温孵育,DAB 显色后封片,光学显微镜下观察,拍照。

1.2.2 免疫荧光检测 按 2.1 中所述方法制作细胞爬片,4%多聚甲醛固定,以 5%封闭用羊血清封闭 30 min。倾去血清,滴加 1:25 稀释的一抗(阴性对照组滴加 PBS),湿盒内 4℃作用过夜。第二日以 PBS 洗细胞后,加 1:25 稀释的二抗(FITC 标记山羊抗兔 IgG),湿盒内室温孵育 1 h 后,再以 PBS 洗细胞,50%甘油封片,激光共聚焦扫描显微镜下观察,拍照。

1.2.3 Western blotting 检测受体蛋白的表达 分别提取 β1-CHO,β2-CHO 和 β3-CHO 细胞中的蛋白,以 SDS-PAGE 凝胶电泳,一抗(β1-AR,β2-AR 和 β3-AR 抗体)按 1:50 稀释,以 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 Ig 抗体(二抗)进行 Western blotting 检测转染细胞中的受体蛋白,DAB 显色,拍照。

1.2.4 放射性配体结合实验验证 β-CHO 细胞中靶受体蛋白的表达 饱和性 β1-AR,β2-AR 和 β3-AR 结合实验以同位素标记的 ^{125}I-cyanopindolol(^{125}I-CYP)在反应缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4,10 mmol/L $MgCl_2$)中进行,反应总体积 200 μl。饱和性实验在 8 个不同浓度范围的 ^{125}I-CYP 作用下进行。测定饱和曲线时,总结合管中加入不同浓度的 ^{125}I-CYP(比活度 2 200 μCi/mmol)。非特异性结合管中除加入不同浓度的 ^{125}I-CYP 外,同时加入 10^{-3} mol/L 的普萘洛尔。反应于 96 孔细胞培养板中进行,每孔加入细胞数为 1×10^5 个/ml(β1 或 β2-AR)或 5×10^5 个/ml(β3-AR)。将培养板置于 37℃水浴保温反应 60 min。反应结束时迅速以多头细胞过滤器负压抽滤,收集滤纸于 γ 记数仪上测定滤纸上的放射性强度。同时取已知浓度的 ^{125}I-CYP 直接点样于滤纸上,γ 记数仪测定其放射性强度。特异性结合 = 总结合 - 非特异性结合,以特异性结合为纵坐标,配体浓度为横坐标进行非线性拟合,绘制饱和曲线,计算所得的 B、B/F 值。通过 scatchard 作图,求受体最大结合容量 Bmax 和解离平衡常数 Kd。

2 结 果

2.1 β1-CHO、β2-CHO 和 β3-CHO 细胞中靶受体蛋白的免疫细胞化学鉴定

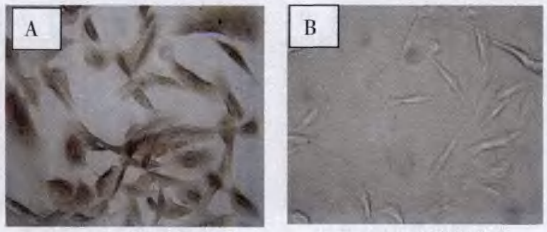
以特异性抗体进行免疫细胞化学鉴定的结果显示,β1-CHO 细胞、β2-CHO 细胞和 β3-CHO 细胞内均出现明显的棕黄色免疫阳性反应(如图 1~3A),而阴性对照则呈现免疫反应阴性(如图 1~3B)。表明这 3 种细胞中均有其特异性受体蛋白的表达。

2.2 β1-CHO,β2-CHO 和 β3-CHO 细胞中靶受体蛋白的免疫荧光鉴定

β1-CHO,β2-CHO 和 β3-CHO 3 种细胞经 FITC 标记的特异性二抗免疫荧光染色后,都可见细胞中有明显的绿色荧光(如图 4~6A),而阴性对照则未见明显荧光(如图 4~6B)。

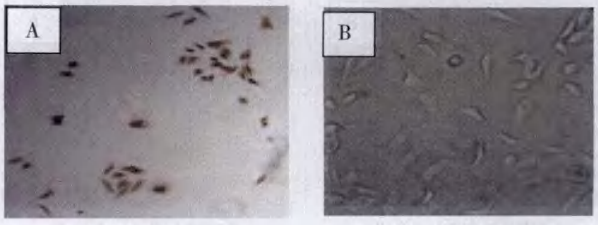
2.3 Western blotting 鉴定受体蛋白表达

β1-CHO 细胞,β2-CHO 细胞和 β3-CHO 细胞经蛋白提取后,以 Western Blotting 检测相应受体蛋白的表达。结果显示,3 种细胞均出现预期大小的特异性条带(3 个条带的大小分别为 64、47 kD 和 40 kD),表明 β1-CHO 细胞,β2-CHO 细胞和 β3-CHO 细胞上分别表达有 β1-AR,β2-AR 和 β3-AR 特异性受体蛋白(如图 7)。



A. β1-AR 免疫细胞化学染色阳性　B. β1-AR 免疫细胞化学染色阴性

图 1 β1-CHO 细胞的 β1-AR 免疫细胞化学鉴定(×400)



A. β2-AR 免疫细胞化学染色阳性(×100)　B. β2-AR 免疫细胞化学染色阴性(×400)

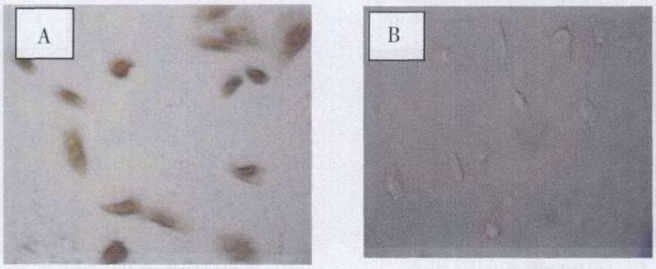
图 2 β2-CHO 细胞的 β2-AR 免疫细胞化学鉴定

2.4 放射性配体结合实验验证 β-CHO 细胞中靶受体蛋白的表达

通过以不同浓度的放射性核素标记的 ^{125}I-cyanopindolol (^{125}I-CYP)与 β1-CHO、β2-CHO 和 β3-CHO 细胞膜上相应的受体进行饱和结合实验,我们得到了 3 种细胞中相应受体的饱和结合特征。经饱和结合曲线和 Scatchard 作图分析,β1-CHO 细胞膜上 β1-AR 的最大结合容量 Bmax 和解离平衡常数 Kd 分别为:22.93 fmol/10^5 个细胞和 144.46 pmol/L。β2-CHO 细胞膜上 β2-AR 的最大结合容量 Bmax 和解离平衡常数 Kd 分别为:22.67 fmol/10^5 个细胞和 133.05 pmol/L。而 β3-CHO 细胞膜上 β3-AR 的最大结合容量 Bmax 和解离平衡常数 Kd 分别为:56.25 fmol/5 × 10^5 个细胞和 1 513.84 pmol/L (见表 1)。这些结果再次表明,β1-CHO,β2-CHO 和 β3-CHO 细胞膜上分别表达有相应的特异性受体。

3 讨 论

β3-AR 属 7 跨膜 G 蛋白耦联受体超家族成员。激动 β3-AR 可导致腺苷酸环化酶系统的活化及细胞内 cAMP 水平升高[4]。因此,通过检测胞内第二信使 cAMP 的含量,就可



A. β3-AR 免疫细胞化学染色阳性　　B. β3-AR 免疫细胞化学染色阴性

图 3　β3-CHO 细胞的 β3-AR 免疫细胞化学鉴定(×400)

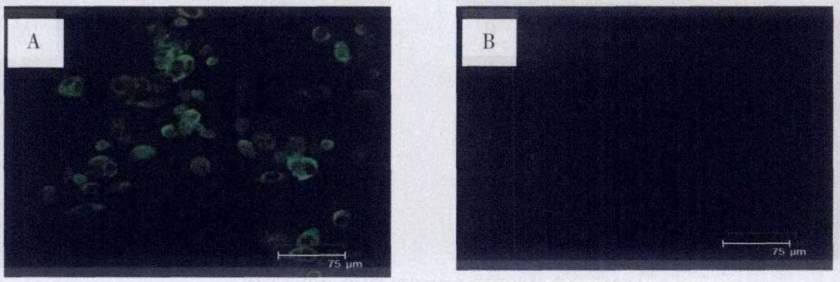


图 4　β1-CHO 细胞的免疫荧光染色(×400)

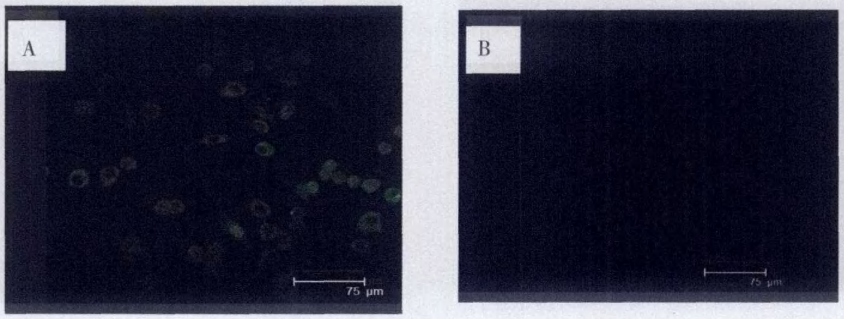


图 5　β2-CHO 细胞的免疫荧光染色(×400)

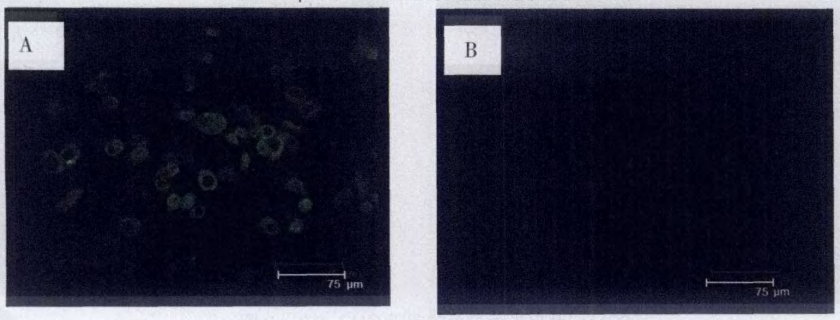


图 6　β3-CHO 细胞的免疫荧光染色(×400)



A. β 1-CHO　　B. β 2-CHO　　C. β 3-CHO

图 7　Western blotting 鉴定 β 1、β 2、β 3-CHO 细胞中的相应受体蛋白表达

表 1　^{125}I-CYP 与表达 β -AR 的 CHO 细胞结合的 Kd 与 Bmax 值

受体	Kd(pmol/L)	Bmax
β 1-AR	144.46	22.93 (fmol/10^5 cells)
β 2-AR	133.05	22.67 (fmol/10^5 cells)
β 3-AR	1 513.84	56.25(fmol/5 × 10^5cells)

以反应配体对 β3-AR 的激动活性。早期的 β3-AR 激动剂(如 CL316243),就是通过将大鼠 β3-AR 基因稳定转染哺乳动物细胞(如 CHO 细胞)建立的筛选细胞株筛选得到的。由于人和啮齿动物的 β3-AR 在功能上差异很大,导致这些早期的 β3-AR 激动剂在人体临床实验中表现出疗效不佳或副作用太大的问题,因而人们开始转向研发特异性人 β3-AR 激动剂。将人体 3 种 β-AR 基因克隆后转染哺乳动物细胞(如CHO 细胞),分别建立稳定表达 β1-AR、β2-AR 和 β3-AR 3 个受体亚型的工程细胞株,通过测试受试化合物对 β3-AR 的激动活性筛选出高效 β3-AR 激动剂,同时测试受试化合物对β1-AR、β2-AR 的激动活性,并以放射性配体结合实验测试受试化合物对 3 种 β-AR 亚型的亲和力,进而衡量受试化合物对β3-AR 的选择性[5]。运用这种基于人 β-AR 的细胞筛选模型,目前已经筛选出了一系列对人 β3-AR 选择性高、且有很强激动活性的 β3-AR 激动剂,如 BMS-196085[6],GW427353[7],N-5984[8] 等。

为了证实 3 种分别稳定转染了人 β1-AR、β2-AR 和 β3-AR 基因的 CHO-K1 细胞是否表达有我们所期望的目的受体,本实验我们首先通过免疫细胞化学,免疫荧光,Western blotting 和放射性配体结合法对受体蛋白进行了鉴定。在免疫细胞化学检测中,我们成功检测到 3 种细胞内均有免疫阳性反应。以间接免疫荧光法对细胞上的目的蛋白进行 FITC 荧光标记,以激光共聚焦扫描显微镜进行表面观察和断层扫描的结果显示,β1-CHO、β2-CHO 和 β3-CHO 细胞中特异性荧光都主要位于细胞膜和细胞浆中,表明转染的目的基因已在细胞中得到稳定表达。Western blotting 检测结果显示,在预期的分子量位置出现特异性条带。以 ^{125}I 标记的非选择性β-AR 配体 ^{125}I-CYP 直接与 3 种转染有目的基因的完整细胞进行放射性配体饱和结合实验的结果显示,3 种细胞都可与 ^{125}I-CYP 进行特异性结合,进一步证实了 β1-AR、β2-AR 和β3 -AR 在 3 种细胞中的均有特异性表达。

总之,本实验我们通过从不同角度,采用不同技术方法,对 β1-CHO、β2-CHO 和 β3-CHO 细胞中相应的特异性受体蛋白的表达进行了鉴定。这些实验结果都证实,β1-CHO、β2-CHO 和 β3-CHO 细胞膜上都稳定表达有特异性的 β1-AR、β2-AR 和 β3-AR,因此表明,β1-CHO、β2-CHO 和 β3-CHO 这 3 种分别转染有相应目的基因的细胞可以用于 β-AR 激动剂的筛选。

参 考 文 献

[1] Arch J R.Beta 3-adrenoceptor agonists:potential,pitfalls and progress[J].Eur J Pharmacol,2002,440(2-3):99-107.

[2] Mills S. Beta-adrenergic receptor subtypes mediating lipolysis in porcine adipocytes. Studies with BRL-37344, a putative beta3-adrenergic agonist[J].Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol,2000,126(1):11-20.

[3] Blachere J C, Perusse F, Bukowiecki L J.Lowering plasma free fatty acids with Acipimox mimics the antidiabetic effects of the beta 3-adrenergic agonist CL-316243 in obese Zucker diabetic fatty rats[J].Metabolism,2001,50(8):945-951.

[4] Skeberdis V A.Structure and function of beta3-adrenergic receptors [J]. Medicina (Kaunas),2004,40(5):407-413.

[5] Hu B,Malamas M,Ellingboe J,et al.New oxadiazolidinedione derivatives as potent and selective human β 3 agonists[J].Bioorg Med Chem Lett,2001,11(8):981-984.

[6] Gavai A V,Sher P M,Mikkilineni A B,et al.BMS-196085: a potent and selective full agonist of the human β 3 adrenergic receptor[J].Bioorg Med Chem Lett,2001,11(23):3041-3044.

[7] Biers S M,Reynard J M,Brading A F.The effects of a new selective beta3-adrenoceptor agonist(GW427353) on spontaneous activity and detrusor relaxation in human bladder[J].BJU Int,2006,98(6):1310-1314.

[8] Yanagisawa T,Sato T,Yamada H.Selectivity and potency of agonists for the three subtypes of cloned human beta-adrenoceptors expressed in Chinese hamster ovary cells[J].Tohoku J Exp Med,2000,192(3):181-193.

(责任编辑:关蕴良)