基础研究 文章编号:0253-3626(2010)06-0805-05

基于脂代谢靶点蛋白 hPPARγ-LBD 的抗肿瘤药物筛选模型的研究

段 雯[1],李 伟[1],靳红卫[2],夏 铸[3],程训官[3],张昕宇[2],郑小红[2],余 瑜[1]

(1.重庆医科大学药学院药物化学教研室,重庆 400016;2.重庆市生物化学与分子药理学重点实验室,重庆 400016;3.重庆市药物工程研究中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立一种以脂代谢靶点蛋白 hPPARγ-LBD 重组蛋白进行抗肿瘤药物筛选的方法。方法:采用 pReceiver-B01-PPARγ-LBD 表达质粒转至 *E.coli* $BL_{21}(DE_3)$细胞,进行表达与纯化得到可溶性靶点蛋白 hPPARγ-LBD 重组蛋白,以罗格列酮为 hPPARγ-LBD 的阳性配体,以 GW9662 作拮抗剂,采用分子排阻色谱-高效液相色谱法(SEC-HPLC)测定 hPPARγ-LBD 重组蛋白与配体药物的结合活性。结果:在优化条件(16℃、0.6 mmol/L IPTG、诱导 20 h)下,能可溶性表达 hPPARγ-LBD 重组蛋白;经镍亲和色谱纯化后,以每升 LB 培养基计可获得 41 mg、纯度为 95%的 hPPARγ-LBD 重组蛋白;该重组蛋白与罗格列酮特异性结合率约 65%,K_d 值为 625 nmol/L;与德氮吡格(Tetrazanbigen,TNBG)特异性结合率约 60%,K_d 值为 1 000 nmol/L。结论:本文基于脂代谢靶点蛋白 hPPARγ-LBD 建立了抗肿瘤药物体外筛选模型的方法,该方法快速、稳定、安全及简便,能应用于抗肿瘤药物的筛选。

【关键词】脂代谢;靶点蛋白;hPPARγ-LBD;抗肿瘤药物;药物筛选模型;罗格列酮;德氮吡格

【中国图书分类法分类号】R965.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-07

Research of drug screening model based on recombinant hPPARγ-LBD as a target protein for lipid metabolism

DUAN Wen, et al

(*Chongqing Key Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a method of antitumor drug screening model based on recombinant hPPARγ-LBD as a target protein for lipid metabolism. *Methods*: pReceiver-B01-PPARγ-LBD expression plasmid was constructed and transferred into *Escherichia coli* $BL_{21}(DE_3)$ competent cells. Growth conditions

作者介绍:段 雯(1986-),女,硕士,研究方向:重组蛋白的表达、纯化和功能表征以及药物构效关系。

通讯作者:余 瑜,男,教授,E-mail:yuyu3519@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30371632 和 30772595)。

[4] Faijerson J, Tinstey R B, Aprico K, et al. Reactive astrogliosis induces astrocytic differentiation of adult neural stem/progenitor cells vitro [J]. Neurosci Ras, 2006, 84(7): 1415-1424.

[5] Choi C B, Cho Y K, Prakash K V, et al. Analysis of neuron-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Biochem Biophys Ras Commun, 2006, 350(1): 138-146.

[6] Tropel P, Platet N, Platel J C, et al. Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells, 2006, 24(12): 2868-2876.

[7] Phinney D G, Kopen G, Isaacson R L, et al. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: Variations in yield, growth and differentiation[J]. Cell Biochem, 1999, 72(4): 570-585.

[8] Guo Z K, Li H, Li X S, et al. Invitro characteristics and invivo immunosuppressive activity of compact bone-derived murine mesenchymal progenitor cells[J]. Stem Cells, 2006, 24(5): 992-1000.

[9] 纪家武,王 玮.神经干细胞在修复脊髓损伤中的应用[J].局解手术学杂志,2004,9(3):445-452.

[10] Faijerson J, Tinstey R B, Aprico K, et al. Reactive astrogliosis induces astrocytic differentiation of adult neural stem/progenitor cells vitro [J]. Neurosci Ras, 2006, 84(7): 1415-1424.

[11] Deng Y B, Yuan Q T, Liu X G, et al. Functional recovery after rhesus-monkey spinal cord injury by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cell derived neurons[J]. Chin Med J (Engl), 2005, 118(18): 1533-1541.

[12] Cho K J, Trzaska K A, Greco S J, et al. Neurons derived from human mesenchymal stem cells show synaptic transmission and can be induced to produce the neurotransmitter substance P by interleukin-1 alpha[J]. Stem Cells, 2005, 23(3): 383-391.

[13] 邓 均,艾国平,王军平,等.C3H1OT 1/2 细胞向神经元诱导分化的方法研究[J].中国修复重建外科杂志,2007,21(7):1221-1227.

[14] Romanov Y A, Darevskaya A N, Merzlikina N V, et al. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: islation, characterization and diferentiation potentialities [J]. Bull Exp Biol Med, 2005, 140(1): 138-143.

(责任编辑:关蕴良)

were optimized to induce soluble expression of hPPAR γ -LBD recombinant protein. Purification was carried out by Nickel affinity chromatography. Ligand binding activity of the recombinant protein was determined by novel size exclusion chromatography and high performance liquid chromatography(SEC-HPLC) method with rosiglitazone as reference ligand and GW9662 as antagonist. ***Results***: Under optimal conditions (16℃, 0.6 mmol/L IPTG and induction time 20 h), the soluble recombinant protein was expressed successfully. After one-step purification with Nickel affinity chromatography, 41 mg of recombinant protein with more than 95% purity could be obtained from per liter Luria-Bertani (LB) medium. The K_d and percentage of specific binding of rosiglitazone and tetrazanbigen to hPPAR γ -LBD are 625 nmol/L, 65% and 1 000 nmol/L, 60%, respectively. *Conclusion*: In this study, a fast, stable and simple method could be used successfully to screen antitumor drug.

【Key words】Lipid metabolism; Target protein; hPPAR γ -LBD; Antitumour drugs; Drug screening model; Rosiglitazone; Tetrazanbigen; TNBG

癌症是人类面临的最难攻克的顽症之一。2000 年我国新发癌症患病数约 180~200 万，死亡 140~150 万，癌症已成为我国居民死因的首位。目前有许多种抗肿瘤药物用于临床，取得一定的疗效，但仍存在毒性大、耐药性等问题，尚需开发新作用机制或新结构类型的高效低毒抗肿瘤药物。国内外针对抗肿瘤药物的研究正从传统的细胞毒性抗肿瘤药物转向针对肿瘤信号转导途径中多环节作用靶点的抗肿瘤药物，其中以脂代谢信号传导途径中关键蛋白 PPAR γ (Peroxisome proliferater-activated receptor γ)亚型作为药物靶点进行抗肿瘤药物研究[1]，有望成为肿瘤化疗的一条新途径。

过氧化物酶体增殖物激活受体 PPARs 是一类由英国科学家 Issemann 和 Green 于 1990 年首先发现的配体依赖性Ⅱ型核激素受体超家族转录因子[2]。PPARs 包括 3 种亚型：PPAR α 、PPARβ/δ 和 PPAR γ [3]，其中 PPAR γ 与肿瘤的关系已引起人们的高度关注，近年来有文献报道，PPAR γ 激动剂配体通过 PPAR γ 依赖或非依赖方式抑制肿瘤增殖、诱导分化和凋亡，产生抗肿瘤效应[4-6]。

药物靶点蛋白 PPAR γ 在体内的作用是 PPAR γ 亚型与视黄醇类 X 受体(RXR)形成异二聚体，允许 PPAR γ 亚型的配体结合区域(PPAR γ -LBD)与两种蛋白相互作用，再与所调节基因启动子上游的一段特定 DNA 序列即 PPAR γ 反应元件(PPREs)结合，调控下游靶基因的转录活化，从而发挥一系列生物活性而产生作用。在体外以 PPAR γ 亚型的配体结合区域(PPAR γ -LBD)作为配体药物作用靶点可建立药物筛选模型，进行抗肿瘤药物筛选研究，为此，展开对人 PPAR γ -LBD(hPPAR γ -LBD)的研究，获得纯度高且量大的 hPPAR γ -LBD 重组蛋白是建立以脂代谢靶点蛋白 hPPAR γ -LBD 为药物筛选模型的关键。随着基因重组技术的发展，大量重组蛋白在各种细菌中被成功表达，加之各种融合表达亲和标签的应用，不仅改善了融合表达重组蛋白的溶解性，而且简化了纯化过程。目前常用的主要融合表达亲和标签有谷胱甘肽 S 转移酶(Glutathione S-transferase, GST)[7]、麦芽糖结合蛋白(Maltose binding protein, MBP)[8]和 6 个组氨酸(His_6)等[9]，其中 GST 和 MBP 标签虽然能提高融合产物的溶解性，但由于其分子体积大，易干扰蛋白质的功能，进行功能性分析时必须先切掉标签，这有可能导致重组蛋白质失活；而 His_6 标签因其分子体积小、对蛋白活性影响较小、无免疫源性、亲和纯化方便等优势而被广泛用于重组蛋白的融合表达。因此，本文拟采用 His_6 为标签，构建 pReceiver-B01-PPAR γ -LBD 表达载体，通过其表达与纯化制取可溶性靶点蛋白 hPPAR γ -LBD 重组蛋白；采用分子排阻色谱 - 高效液相色谱法(SEC-HPLC)，建立 hPPAR γ -LBD 重组蛋白与配体药物结合的药物筛选模型，评价药物的抗肿瘤活性。

1 材料和方法

1.1 材料及仪器

表达载体 pReceiver-B01-PPAR γ -LBD 购自广州复能基因有限公司。低分子量蛋白质 Marker、感受态细胞大肠杆菌 *Escherichia coli* $BL_{21}(DE_3)$购自北京 TianGen。HisLink protein purification resin 购自 Promega 公司。异丙基 -β -D-硫代半乳糖苷(Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside, IPTG)、HEPES 和咪唑(Imidazole)购自 Merck 公司。酵母膏、蛋白胨购自英国 OXOID 公司。琼脂、低熔点琼脂糖购自 Lvshengyuan Biotchnolgoy。所有聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂、氨苄青霉素和溶菌酶购自 Sigma。牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)购自 Roche。拮抗剂 GW9662(批号：20090201，自制)，罗格列酮(批号：20080506)购自北京高盟化工有限公司。德氮吡格(Tetrazanbigen, TNBG，批号：20090102，为本课题组研制的具有分子靶向作用于脂代谢信号转导途径中的 SREBPs、SCAP 以及 PPAR 等靶点的抗肿瘤新药)。其他化学试剂均为分析纯。YJ-1450 型超净工作台购自苏州净化设备厂，DYY-2C 蛋白质电泳仪、TS-1 脱色摇床购自北京六一仪器厂，H-1750R 高速低温冷冻离心机购自湖南湘仪公司，RH-Q 全温摇床购自江苏恒丰仪器制造有限公司，LDZ-30KBS 灭菌锅购自上海申安医疗器械厂。

1.2 方法

1.2.1 表达载体的构建 将编码 PPAR-γ 配体结合域的 *cDNA* 克隆到 pReceiver-B01 质粒，限制性酶切位点为 *Bstb* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ，T7 为启动子，N- 端带 6×His，整个核苷酸序列进行 DNA 序列，鉴定克隆的正确性。质粒的构建由广州复能基因有限公司协助完成，最后的表达载体命名为：pReceiver-B01-PPAR γ -LBD。

1.2.2 hPPAR γ -LBD 重组蛋白的表达 将 pReceiver-B01-PPAR γ -LBD 表达质粒转化至 *E.coli* $BL_{21}(DE_3)$感受态细

胞，置于含 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 固体平板上，培养过夜，挑选单克隆菌落接种于含 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中，37℃、250 r/min 振荡、培养过夜。再按 1:50 的比例将过夜菌接种于含 100 μg/ml 氨苄青霉素的新鲜 LB 液体培养基中，37℃振荡培养至 OD_{600} 值为 0.3~0.4，加入 IPTG 诱导细胞表达。4℃离心收集菌体，向每克湿细胞加入 25 ml 细菌裂解液(10 mmol/L Tris、1 mmol/L EDTA、150 mmol/L NaCl、0.5% Tritonx-100、1 mg/ml 溶菌酶，pH8.0)，重悬菌体。搅拌，4℃放置 1 h。冰浴超声后，4℃、10 000 r/min离心 40 min，收集上清液和沉淀，进行 SDS-PAGE 分析。上清液用 0.22 μm 滤膜过滤，-80℃保存备用。

1.2.3 hPPAR γ-LBD 重组蛋白的纯化 按产品说明要求装柱，首先用 20 倍柱体积的平衡液(100 mmol/L HEPES、10 mmol/L imidazole、300 mmol/L NaCl，pH7.5)平衡；将细胞裂解上清液直接上柱；用 10 倍柱体积的洗涤液(100 mmol/L HEPES、100 mmol/L imidazole、300 mmol/L NaCl，pH7.5)洗涤柱子；最后用 5 倍柱体积的洗脱液(100 mmol/L HEPES、500 mmol/L imidazole、300 mmol/L NaCl，pH7.5)洗脱重组蛋白。收集洗涤液和洗脱液，进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.4 hPPAR γ-LBD 重组蛋白浓度的测定 以 BSA 为标准品，采用 Bradford 法对重组蛋白质进行定量[10]。

1.2.5 SDS-PAGE 分析[11] 按比例配制 12%的分离胶和 5%的浓缩胶，灌胶。将样品和上样缓冲液混合，煮沸 3~5 min，按需要体积上样。以甘氨酸电极缓冲溶液为电泳缓冲液，在 100 V 电压下进行电泳。电泳完毕后，用固定液 (10%醋酸(v/v)、50%乙醇(v/v))固定，再用考马斯亮蓝 R-250 染色，最后用脱色液(10%醋酸(v/v)、5%乙醇(v/v))脱色。

1.2.6 配体药物结合模型考察 罗格列酮(Rosiglitazone，Ros)属于噻唑烷二酮类(Thiazolidinediones，TZDs)，是PPAR γ高亲和力的特异性配体药物，因此，本文以 Ros 作为 PPAR γ的阳性配体，以 GW9662 作为 PPAR γ 的拮抗剂，采用 SEC-HPLC 法[8,9]体外测定 hPPAR γ-LBD 重组蛋白与配体药物的结合活性。其具体方法是以 PBS 为反应缓冲液和流动相，超声脱气。取 2 组反应管，第 1 组为总结合管，向各管中依次加入 hPPAR γ-LBD 重组蛋白 400 μg，Ros 浓度分别为 1、5、10、15、20、25、30 μmol/L；第 2 组为非特异性结合管，向各管中依次加入 hPPAR γ-LBD 重组蛋白 400 μg、Ros 及 80 倍 Ros 量的 GW9662。各反应管均置于 4℃下孵育 16 h。然后，取 20 μl 反应混合液直接注入 Agilent GF-250 分析凝胶柱(4.6 μm × 250 mm)，流速为 0.5 ml/min，游离配体药物 Ros 被分离，并用 HPLC 在线测定游离药物 Ros 的量，测定波长为 247 nm。用 Ros 的总量减去非特异性结合量，即得到特异性结合量。特异性结合量用 Bound 表示，游离药物 Ros 的量用 Free 表示，通过 Scatchard 分析计算得 K_d 值。

同法，测定配体抗肿瘤药物 TNBG 的结合活性。

2 结 果

2.1 hPPARγ-LBD 重组蛋白的表达

对 pReceiver-B01-PPAR γ-LBD 表达质粒中编码 PPAR γ-LBD(191-477 aa)的 *cDNA* 进行测序，结果与 GenBank 中的序列一致，无突变。pReceiver-B01-PPAR γ-LBD表达质粒能成功转入 *E.coli* $BL_{21}(DE_3)$细胞，经诱导表达，SDS-PAGE 分析发现，重组蛋白的分子量约为 32 kDa，与根据氨基酸序列计算的理论分子量相一致(见图 1)。

2.2 hPPARγ-LBD 重组蛋白的纯化

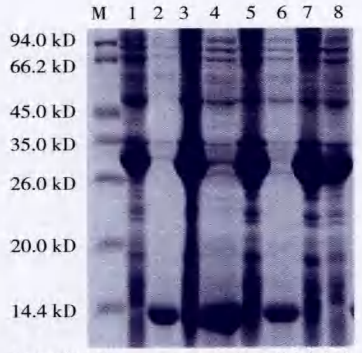
带有 His_6 标签的 hPPAR γ-LBD 重组蛋白很容易通过镍亲和色谱纯化，hPPAR γ-LBD 重组蛋白纯化的影响如图 2 所示。

经影响因素研究，在优化的细胞生长条件(16℃，IPTG 浓度为 0.6 mmol/L，诱导时间 20 h)下，能较好地表达可溶性 hPPAR γ-LBD 重组蛋白，经镍亲和色谱一步纯化后，从每升菌液中可得到 41 mg、纯度约 95%的 hPPAR γ-LBD 重组蛋白。

2.3 hPPARγ-LBD 重组蛋白与配体药物结合分析

照 1.2.6 项方法，利用 SEC-HPLC 法测定 hPPAR γ-LBD 重组蛋白的配体药物 Ros 结合活性。特异性结合量用 Bound 表示，游离配体药物 Ros 量用 Free 表示。通过 Scatchard 分析计算 K_d 值，其结果如图 3 所示。

由图 3 可见，hPPAR γ-LBD 重组蛋白能与配体药物 Ros 特异性结合，其结合率为 65%。通过 Scatchard 分析，解离常数 K_d 值为 625 nmol/L。



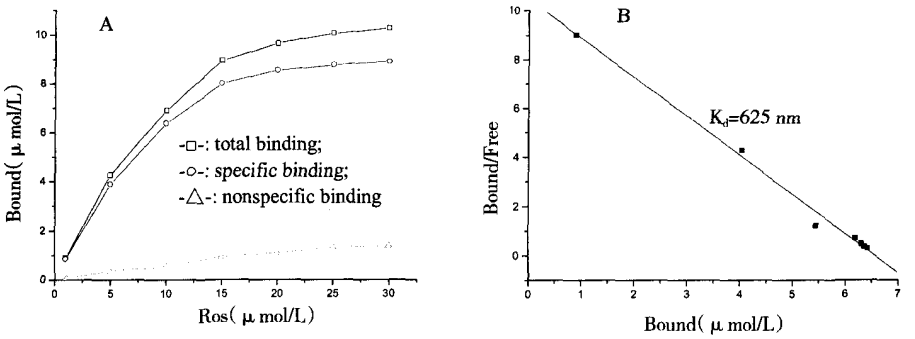
Lane M. 蛋白质标准；Lane 1、3、5 和 7 分别为在 37℃、30℃、25℃和 16℃时全细胞裂解液的沉淀；Lane 2、4、6 和 8 分别为在 37℃、30℃、25℃和 16℃时全细胞裂解液的上清液。

图 1 温度对重组蛋白表达的影响图



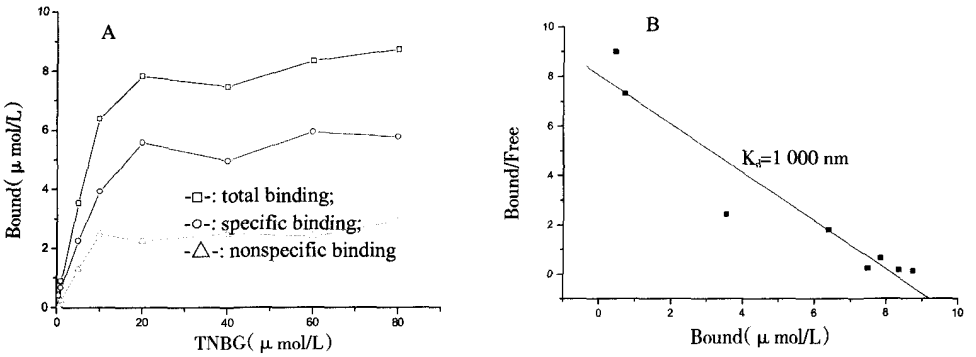
Lane M. 蛋白质标准；Lane 1. 裂解上清液；Lane 2. 流穿液；Lane 3~4. 洗涤液；Lane 5~12. 洗脱液.

图 2 重组蛋白纯化图



A. hPPAR γ-LBD 重组蛋白与配体药物 Ros 的饱和结合曲线；B. Scatchard 分析

图 3 hPPAR γ-LBD 重组蛋白与配体药物 Ros 结合分析图



A. hPPAR γ-LBD 重组蛋白与配体药物 TNBG 的饱和结合曲线；B. Scatchard 分析

图 4 hPPAR γ-LBD 重组蛋白与配体药物 TNBG 结合分析图

2.4 hPPARγ-LBD 重组蛋白与配体抗肿瘤药物结合分析

照 1.2.6 项方法，利用 SEC-HPLC 法测定 hPPAR γ-LBD 重组蛋白的配体药物 TNBG 结合活性。特异性结合量用 Bound 表示，游离配体药物 TNBG 量用 Free 表示。通过 Scatchard 分析计算 K_d 值，其结果如图 4 所示。

由图 4 可见，hPPAR γ-LBD 重组蛋白能与配体药物 TNBG 特异性结合，其结合率为 60%。通过 Scatchard 分析，解离常数 K_d 值为 1 000 mmol/L。

3 讨 论

细菌表达外源性蛋白质时，重组蛋白经常会形成无生物活性的包涵体，需经复性才能恢复重组蛋白质的生物学活性。而复性过程不仅繁琐，而且有时难以恢复到蛋白质的天然构象。因此，通过优化细胞生长条件产生可溶性蛋白变得十分重要[12]。为了实现可溶性 hPPAR γ-LBD 重组蛋白的表达和获得高表达量，本文主要从温度、IPTG 浓度和诱导时间等方面优化细胞生长条件。其中温度对表达量有较大影响，在 37℃至 16℃范围内，随温度降低，可溶性重组蛋白表达量逐渐增多。当温度为 16℃时，可溶性重组蛋白表达量最高。这主要是由于低温有利于减弱蛋白质疏水键间的相互作用，降低了重组蛋白的表达速度，有利于重组蛋白的正确折叠而形成可溶性的蛋白质[13,14]。IPTG 浓度对表达量也有显著影响，若没有 IPTG 是不能表达 hPPAR γ-LBD 重组蛋白的，在 0.2~0.8 mmol/L范围内，随 IPTG 浓度增大，表达量逐渐增大，但当 IPTG 超过 0.6 mmol/L时，表达量反而下降，这可能是由于高浓度 IPTG 对细菌的毒性所致；在温度 16℃和 IPTG 浓度 0.6 mmol/L时，诱导时间对表达量也有一定的影响，随诱导时间的延长，表达量提高，当诱导时间达 20 h，重组蛋白表达量达最高，再延长诱导时间其表达量并无明显变化，这可能是由于细菌处于生长后期，降解增加所致。

hPPAR γ-LBD 重组蛋白带有 His_6 标签，采用镍亲和色谱纯化时，离子强度和咪唑浓度是影响重组蛋白回收率和纯度的两个重要因素。其中 NaCl 离子强度对纯化的影响非常显著，不加 NaCl 时，hPPAR γ-LBD 重组蛋白纯度低，杂蛋白含量高；而加入 300 nmol/L后，hPPAR γ-LBD 重组蛋白纯度明显提高。这表明：加入 NaCl 后，可提高缓冲溶液的离子强度，降低蛋白的非特异性结合，同时也可抑制溶菌酶结合到介质，进而提高了 hPPAR γ-LBD 重组蛋白的纯度。由于镍亲和色谱纯化带 His_6 标签的重组蛋白是咪唑浓度依赖的，增加洗涤液中的咪唑浓度，能大大提高 hPPAR γ-LBD 重组蛋白的纯度，当洗脱液中咪唑浓度为 500 nmol/L时，hPPAR γ-LBD 重组蛋白纯度达到 95%；当洗脱液中咪唑浓度为 1 000 nmol/L时，hPPAR γ-LBD 重组蛋白的回收率提高了，而纯度降低到 85%，这可能是由于高浓度的咪唑将其他杂质全部洗脱出来的缘故。为了达到纯度和回收率之间的平衡，故 500 nmol/L为咪唑的最佳浓度。通过一步亲和纯化，从每升菌液中可得到 41 mg、纯度约 95%的 hPPAR γ-LBD 重组蛋白。

配体药物结合试验，对于以 hPPAR γ-LBD 重组蛋白建立药物筛选模型十分重要。在配体药物结合试验中，影响靶点蛋白与配体药物结合的主要因素有温度、pH 值、孵育时间

等,这是由于靶点蛋白 - 配体药物结合反应是一个动态的平衡过程,温度直接影响其结合速度。温度高,正向结合速率快,达到平衡时间短,但逆反应解离速率也加快,而且温度高也容易引起受体的失活。鉴于此,选用的孵育温度是 4℃;反应缓冲体系和流动相统一为 PBS (pH7.2),与细胞内环境 pH 相当,有利于保持蛋白的正确构型和稳定性,提高结合率。在靶点蛋白 - 配体药物结合测定中,目前文献常用的是放射配体结合分析方法,体外测定 TZDs 与 PPAR γ 的 K_d 值为 30~700 nmol/L之间,该解离常数 K_d 值变化很大,这可能是 PPAR γ 的配体结合域(LBD)空穴比较大(总体积在 1 300~1 400 之间,可结合不同体积的配体)所致[15,16]。抗糖尿病药 T2384 采用 RBA 法测定时,其 K_d 值为 200 nmol/L[12]。这些文献中所述的蛋白质多为 GST-PPAR γ -LBD 或 MBP-PPAR γ -LBD,并非真正的 hPPAR γ -LBD,故其测定结果可能存在一定差异。本文采用的 SEC-HPLC 方法,测定 hPPAR γ -LBD 重组蛋白与配体药物 Ros 能特异性结合,其解离常数 K_d=625 nmol/L。该测定值比文献放射标记 BRL49653 与 GST-PPAR γ -LBD 特异性结合值 43 nmol/L 大[17],这可能是由于 SEC-HPLC 方法的灵敏度较 RBA 法的灵敏度低所致,但该方法稳定、安全、简便和经济,克服了 RBA 法中放射标记配体的毒性、环境污染、高额费用和严格的场地要求等缺点。

综上所述,本文所构建可溶性表达 hPPAR γ -LBD 重组蛋白的产量比文献方法[14,18]高 2 倍,其纯度可达 95%以上,为采用 SEC-HPLC 方法用于测定 hPPAR γ -LBD 重组蛋白与配体药物结合活性的药物筛选模型奠定了基础。该模型方法具有稳定、安全和简便等优点,能应用于配体抗肿瘤药物的筛选。

参 考 文 献

[1] Vikas Chandra, Huang P X, Yoshitomo Hamuro, et al.Structure of the intact PPAR- γ -RXR- α nuclear receptor complex on DNA[J].Nature, 2008,456(7220):350-356.

[2] Issemann I,Green S. Activation of a member of the steroids hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators[J]. Nature, 1990, 347 (6294):645-650.

[3] Desvergne B,Wahli W.Peroxisome proliferators-activated receptors: nuclear control of metabolism [J]. Endocr Rev, 1999, 20(5):649-688.

[4] Chaffer C L,Thomas D M,Thompson E W,et al.PPAR γ -independent induction of growth arrest and apoptosis in prostate and bladder carcinoma [J]. BMC Cancer, 2006, 6(53):1-13.

[5] Kaplan J M, Cook J A, Hake P W,et al.15-Deoxy-delta (12,14) -prostaglandin J2 (15D-PGJ2), a peroxisome proliferators activated receptor γ ligand, reduces tissue leukosequestration and mortality in endotoxic shock[J]. Shock, 2005, 24(1):59-65.

[6] Takahashi S,Tanaka T,Kodama T,et al.Peroxisome proliferator-activated receptor δ (PPAR δ),a novel target site for drug discovery in metabolic syndrome[J].Pharmacological research,2006,53(6):501507.

[7] Lehmann J M., Moore L B, Smith-Oliver T A, et al.An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma)[J]. J. Biol. Chem., 1995, 270 (22):12953-12956.

[8] 李茬清. hPPARs 天然配体筛选平台的建立及应用[C].重庆医科大学博士论文.2008.

[9] 李 伟. 创新抗肿瘤药德氮吡格作用 PPARs 靶点的研究[C].重庆医科大学博士论文.2009.

[10] Bradford M M,Mcrorie R A,Williams W L.A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J].Anal.Biochem,1976,72(1-2):248-254.

[11] Laemmli U K.Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227 (5259): 680-685.

[12] Magi st relli G,Gueneau F,Muslmani M,et al . Chemokines derived from soluble fusion prot eins exp ressed in Escherichia coli are bio2 logically active. Biochem Biophys Res Commun,2005,334(2):370.

[13] J.T. Moore,A. Uppal, F. Maley,et al. Overcoming inclusion body formation in a high level expression system[J].Protein Expr. Purifi,1993,4 (12):160-163.

[14] 曹廷兵,叶治家,巩 燕,等. 人 PPAR γ -LBD *cDNA* 的克隆及其在大肠杆菌中的表达纯化[J].生命科学研究,2004,8(1):36-40.

[15] Vincent Zoete,Aurelien Grosdidier,Olivier Michielin.Peroxisome proiferator-activated receptor structures:Ligand specificity,molecular switch and interactions with regulators[J].Biochimica et Biophysica Acta, 2007,1771(18):915-925.

[16] Jonas Uppenberg, Carina Svensson, Maria Jaki, et al.Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPAR γ [J]. J. Biol. Chem., 1998, 273(47):31108-31112.

[17] Li Y, Wang Z L, Noboru Furukawa, et al.T2384, a novel antidiatetic agent with unique peroxisome proiferator-activated receptor γ binding properties[J]. J. Biol. Chem., 2008, 283(14):9168-9176.

[18] 李茬清,章 涛,袁 野,等. 人 PPAR α LBD 融合蛋白表达质粒的构建和诱导条件优化[J].生物医学工程学杂志,2008,25(4): 908-916.

(责任编辑:关蕴良)

通 知

《医学教育探索》所有投稿请登陆以下网站完成:

http://yxjyts.cqmu.edu.cn/ch/index.aspx