

基于报告基因的 PPAR- α 激动剂筛选体系的建立

唐小峦^{1,2}, 李焕德^{1*}, 袁娟³ (1.中南大学湘雅二医院临床药学研究室, 长沙 410011; 2.福建卫生职业技术学院药学院, 福州 350101; 3.湖南省劳动卫生职业病防治所综合内科, 长沙 410007)

摘要: 目的 基于 PPAR- α 受体的信号传递通路和利用双萤光素酶报告基因分析方法, 建立稳定的 PPAR- α 激动剂体外筛选体系。方法 pcDNA3.1-PPAR- α 、pGL3-PPRE-luc 及 pRL-CMV 共转染 293T 细胞后, 设 0, 0.1, 1, 10, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 非诺贝特不同浓度点进行干预后, 测定每浓度点重复 5 个样本。对转染优化试验数据, 比较均值大小选取最佳结果; 对不同转染组之间的差异性比较, 采用 *t* 检验和方差分析。结果 浓度为 0.1, 1, 10, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 非诺贝特干预组相对诱导率分别为: 0.82, 1.29, 1.72, 1.94, 表现有统计学差异($P<0.05$)。结论 成功建立基于 PPAR-信号通路及双萤光素酶报告基因分析方法的 PPAR- α 激动剂筛选药系统。

关键词: PPAR- α ; 报告基因; 转染; 药物筛选

作者简介: 唐小峦, 男, 硕士生, 主管药师 Tel: (0591)22869830 E-mail: tangxiaoluan@tom.com *通信作者: 李焕德, 男, 教授, 博导 Tel: (0731)4436720 E-mail: li53hd@medmail.com.cn

Establishment of a PPAR- α Agonist Screening System Base on Report Gene

TANG Xiaoluan^{1,2}, LI Huande^{1*}, YUAN Juan³ (1. Clinical Pharmacy Laboratory, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China; 2. Pharmacy Department, Fujian Health College, Fuzhou 350101, China; 3. Institute of Occupational Medical of Hunan, Changsha 410007, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a PPAR- α agonist screening system using a PPAR chimera system and double luciferase reporter gene assay method. **METHODS** pcDNA-hPPAR- α , pGL3-PPRE-luc and pRL-CMV (0.67 μ g each) were Co-transfected into 293T cell seeded in 96 wells plate, fenofibrate was added into different groups after 6 hours transfection, respectively, up to terminal concentration of 0, 0.1, 1, 10, 50 μ mol·L⁻¹ each. Two luciferase active were determined using Dual-Glo luciferase assay system after 24 hours incubation, and relative luciferase intensive was used to express induction activity. **RESULTS** There is significant deviation between the 0.1, 1, 10, 50 μ mol·L⁻¹ concentration point of fenofibrate, the relative induction activity of them were 0.82, 1.29, 1.72, 1.94. **CONCLUSION** A PPAR- α agonist screening system base on PPAR chimera system and double luciferase reporter gene assay method is established successfully.

KEY WORDS: PPAR- α ; report gene; transfection; drug screening

过氧化物酶体增殖物激活受体(Peroxisome proliferator activated receptor, PPAR)属配体激活转录因子,在激动剂的作用下与类视黄醇受体(retinoid X receptors, RXRs)形成异源二聚体从而改变DNA结合域构象,继而通过与位于某些基因上游的特异的DNA反应元件(peroxisome proliferator responsive element, PPRE)相互作用而调控某些基因的表达,如脂酰辅酶A氧化酶(ACOX)、过氧化物酶体双功能酶、微粒体CYP4A、细胞色素P450、IL-1、TNF- α 以及黏性分子等;另外,受体激动剂复合物可能还通过影响核因子NF- κ B、AP-1的信号通路,从而影响动脉粥样硬化的发生和发展^[1]。因此,建立PPAR- α 受体激动剂筛选体系对研究抗动脉粥样硬化机理及其相关治疗药物具有重要作用。

基于上述对PPAR- α 与其配体作用机制的深入了解,建立转录激活配体筛选体系,其原理^[2]为将PPAR- α 表达载体和含PPRE^[3]反应元件的报告基因载体共转染至某细胞株,根据加入物质诱导报告基因表达的程度筛选新的配体。本试验拟采用萤火虫萤光素酶和海肾萤光素酶双报告基因法^[4-5]。

1 材料与试剂

293T细胞株由中南大学分子生物技术学院提供;DMEM培养液,胎牛血清,PBS胰酶等细胞培养试剂均由湘雅二医院中心实验室提供;LB培养基,13%PEG8000水溶液,苯酚,氯仿,己丙醇,RNase A,溶菌酶缓冲液,SolutionII, SolutionIII

质粒纯化试剂均为实验室自制;pcDNA3.1-PPAR- α 、PPRE-pGL3-premoter重组质粒(本实验室构建);内参质粒pRL-CMV,双萤光素酶报告基因分析试剂Dual-Glo Luciferase Assay System均购自美国Promega公司;Lipofectamine 2000转染试剂购自美国Invitrogen公司;非诺贝特购自法国利博福尼公司。

2 方法

2.1 供转染质粒的制备

取pcDNA3.1-PPAR- α 、PPRE-pGL3-premoter重组质粒及内参质粒pRL-CMV分别转化于JM109感受态细胞中,ampicillin抗性LB培养平板筛选,挑取单个阳性菌落于250 mL含100 μ g·mL⁻¹ ampicillin LB培养基中振荡培养过夜。4 $^{\circ}$ C, 5 000 r·min⁻¹离心4 min,收集细菌,倒置去上清,沉淀重悬于6 mL预冷的溶菌酶缓冲液中消化20 min,加入12 mL SolutionII(新配制)小心颠倒充分混匀,加入7.5 mL SolutionIII颠倒充分混匀,4 $^{\circ}$ C 12 000 r·min⁻¹离心15 min,小心转移上清于一新离心管中,向上清液中加入50 μ L RNaseA (1 mg·mL⁻¹), 37 $^{\circ}$ C消化20 min;等体积TE饱和酚和氯仿-己丙醇溶液(24:1)抽提,12 000 r·min⁻¹离心15 min,收集上层水相;重复上步,等体积氯仿-己丙醇溶液(24:1)抽提,12 000 r·min⁻¹离心10 min,收集上层水相于一新离心管中,加2倍体积的无水乙醇,12 000 r·min⁻¹离心20 min,倒置去上清,沉淀用2 mL 1 mol·L⁻¹ NaCl水溶液溶解,并加入2 mL 13% PEG8000冰浴60 min, 12 000

$r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清, 沉淀用 70%乙醇洗涤, $12\,000\, r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 真空负压干燥, 沉淀溶于双蒸水, 即得可供转染用的纯化质粒。

对各质粒进行浓度测定, pcDNA3.1-PPAR- α 、pGL3-PPRE-luc、pRL-CMV 的浓度分别为 1.3, 2.6, $1.3\, \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

2.2 细胞培养及活性考察

293T 细胞株用含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基于 $37\,^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。按每孔 5×10^3 的浓度接种于 96 孔平底培养板, 贴壁后加浓度为 0.1, 1, 10, 50, $500\, \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 非诺贝特后继续培养 48 min, 观察细胞形态的改变确定给药浓度范围, 见图 1。由图可见非诺贝特在 $0.1 \sim 50\, \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内对细胞活性无明显影响, 确定给药范围为 $0.1 \sim 50\, \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

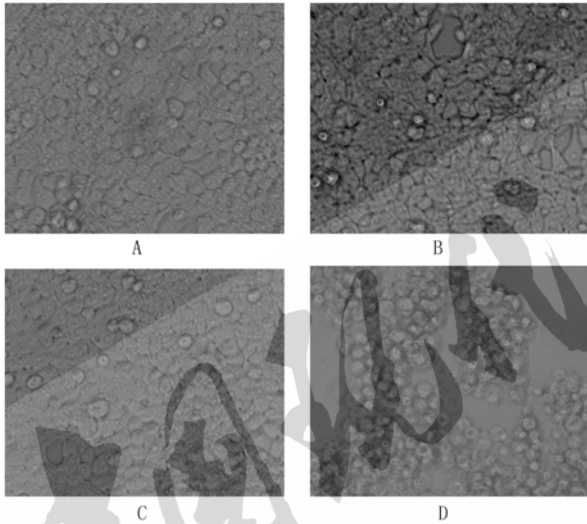


图 1 非诺贝特不同浓度对细胞活性的影响($\times 100$)
A-空白; B- $10\, \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; C- $50\, \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; D- $500\, \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig 1 Effect of different concentration of fenofibrate on 293T cell morphology($\times 100$)

A-blank; B- $10\, \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; C- $50\, \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; D- $500\, \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.3 瞬时转染及萤光素酶报告基因分析

2.3.1 转染效率的优化 选用 293T 细胞株, 接种 96 孔细胞培养板上, 采用 Lipofectamine 2000 转染试剂对海肾萤光素酶报告质粒 pRL-CMV-Rluc 进行瞬时转染, 在转染试剂(μL)与质粒量(μg)比值为 2.5:1 条件下, 每孔转染质粒 0.4, 0.3, 0.2, $0.1\, \mu\text{g}$, 平行 6 个孔, 30 h 后经萤光素酶报告基因试剂处理后, 测定萤光强度, 比较萤光强度确定最佳转染质粒总量, 优化转染效率。

2.3.2 转染及干预试验方案 转染设 pcDNA3.1-PPAR- α 、pGL3-PPRE-luc 及 pRL-CMV 共转染组,

pGL3-PPRE-luc、pRL-CMV 共转染组, pGL3-premoter、pRL-CMV 共转染组, 每组内设 0, 0.1, 1, 10, $50\, \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 非诺贝特不同浓度干预点, 每浓度点重复 5 个样本。设计方案见表 1。

表 1 共转染试验方案

Tab 1 Scheme on co-transfection test

组别	转染质粒		
	pcDNA3.1-PPAR- α	pGL3-PPRE-luc	pRL-CMV
1	+	+	+
2	-	+	+
3	+	-	+

注: “+”表示转染该列标明的质粒; “-”则表示不转染

Note: “+” means vector was transfected in this group; “-” means vector was not transfected

2.3.3 转染步骤 按每孔 5×10^3 的浓度接种 293T 细胞于 96 孔平底培养板中, 细胞贴壁并约 75%融合后加入用不含血清的 DMEM 培养基配制的转染试液, 其中含 pcDNA3.1-PPAR- α 、PPRE-pGL3-premoter 重组质粒及内参质粒 pRL-CMV 各为 $0.67\, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 6 h 后更换培养基, 加入不同浓度的非诺贝特溶液进行干预, 24 h 后进行报告基因分析。

2.3.4 萤光素酶强度分析 经非诺贝特干预 24 h 后的细胞按 Dual-Glo Luciferase Assay System 试剂盒说明书分步处理, 于 GloMax 96 Luminometer 化学发光分光光度计进行萤火虫萤光和海肾萤光强度检测。萤火虫萤光素酶表达强度用萤火虫萤光和海肾萤光强度的比值表示, 即: 萤火虫萤光素酶表达强度=萤火虫萤光强度/海肾萤光强度。相对诱导表达率=(加药组萤火虫萤光强度/加药组海肾萤光)/(空白组萤火虫萤光强度/空白组海肾萤光)。

2.4 统计学分析

所有数据皆采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。对转染优化试验数据, 比较均值大小选取最佳结果; 对不同转染组之间的差异性比较, 采用 t 检验和方差分析, $P < 0.05$ 认为有统计学差异。

3 结果

3.1 转染优化

按优化试验方案经转染后, 测得各孔细胞萤光强度值见表 2。由表可知, 在转染试剂(μL)与质粒量(μg)比值为 2.5:1 条件下, 当转染量为 $0.2\, \mu\text{g}$ 时转染效率最高。因此, 转染质粒总量确定为每孔 $0.2\, \mu\text{g}$ 。

表 2 优化试验所测得的海肾萤光强度($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Results of optimization test ($n=6, \bar{x} \pm s$)

转染量/ μg	萤光强度	
	$\bar{x} \pm s$	相对值
0.1	510 550.7 $\pm$ 80 986.0	281.2
0.2	592 708.8 $\pm$ 105 794.2	326.5
0.3	532 818.0 $\pm$ 89 163.8	293.5
0.4	516 541.2 $\pm$ 70 340.5	284.5
0	1 815.0 $\pm$ 340.1	1

注: 相对值为各实验组与空白组比值

Note: Relative value was the ratio of test group to blank group

3.2 非诺贝特干预试验

经不同浓度的非诺贝特干预后, 测得各组内不同浓度点平均相对萤光强度见表 3。设 0 点诱导活性为 1, 计算其他浓度点的相对平均萤光素酶诱导率见图 2。从图 2 可以看出没转染 pcDNA3.1-

表 3 不同浓度的非诺贝特干预下各转染组的相对萤光强度($n=5, \bar{x} \pm s$)

Tab 3 Relative luciferase intension of different fenofibrate concentration group ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组 别	不同浓度非诺贝特干预下各转染组的相对萤光强度				
	0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
组 1	0.039 4 $\pm$ 0.005 1	0.038 7 $\pm$ 0.008 7 ¹⁾	0.055 0 $\pm$ 0.014 2 ¹⁾	0.106 4 $\pm$ 0.012 7 ¹⁾	0.134 9 $\pm$ 0.027 5 ¹⁾
组 2	\	0.031 6 $\pm$ 0.006 1	0.044 7 $\pm$ 0.012 6	0.048 1 $\pm$ 0.010 3	0.043 0 $\pm$ 0.011 7
组 3	\	0.036 5 $\pm$ 0.007 0	0.045 6 $\pm$ 0.015 9	0.050 2 $\pm$ 0.016 1	0.036 4 $\pm$ 0.012 5

注: 与其它浓度组相比, ¹⁾ $P<0.05$

Note: Compared with other fenofibrate concentration groups, ¹⁾ $P<0.05$

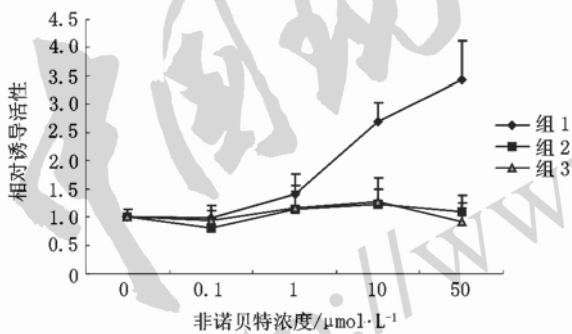


图 2 非诺贝特干预下不同转染组不同浓度点的相对萤光素酶诱导率

Fig 2 Effect of different concentration fenofibrate on relative induce activity

4 讨论

信号通路中所涉及的 RXRs 在本试验中没有设计相应的表达质粒, 原因在于本模型所选用的 293T 细胞为人肾上皮细胞, 能表达不同亚型的视黄醇受体, 且有文献[2]报道, 在没有共转染 RXRs 表达质粒的情况下成功建立 PPARs 激动剂筛药体系。

PPAR- α 或 pGL3-PPRE-luc 的组 2 和组 3 萤光素酶表达活性跟同时转染上述两质粒的组 1 相比存在统计学差异($P<0.05$), 而组 2 和组 3 之间无统计学差异, 这从另一方面对本实验前部分所构建的上述两质粒加以鉴定, 分别具有体外表达 PPAR- α 受体和增强萤光素酶表达效率的功能。而组 1 的统计学差异验证了以 PPAR- α 受体转导通路为基础, 通过共转染 pcDNA3.1-PPAR- α 、pGL3-PPRE-luc 及内对照质粒 pRL-CMV 建立的 PPAR- α 受体激动剂筛药体系, 能通过萤光素酶表达活性反映外加药物是否与 PPAR- α 受体发生功能性结合。随着非诺贝特浓度的增加, 组 2 和组 3 没有显著变化, 而组 1 相应的萤光素酶表达量也随之增加, 说明转染细胞内有足量的 PPAR- α 受体得以表达, 并且被激动的 PPAR- α 受体量也随之增加。

报告基因表达活性的分析试验过程中, 由于转染效率、细胞活性等非特异性生物因素的差异使得最终的分析结果包含有这些非特异性生物因素所带来的信号反馈, 为排除它们的影响, 本试验设立内对照报告基因, 与实验报告基因共转染, 最后以实验报告基因与内对照报告基因表达强度的比值来确定由特异性外加干预所带来的反馈信号。而与传统的双报告基因体系比较, 双萤光素酶报告基因体系具有速度快、响应灵敏、方便等优点, 能在几秒钟内完成两种萤光素酶的检测, 样品不需孵育等预处理, 同时内源背景低, 适合高通量的药物筛选。

实验设立了不同的共转染质粒组, 通过比较 pGL3-PPRE-luc、pRL-CMV 共转染组与 pGL3-premoter、pRL-CMV 共转染组的表达结果, 确定 pGL3-PPRE-luc 载体中所插入的 PPRE 片断是否起到表达增强的作用, 而通过比较 pcDNA3.1-PPAR- α 、pGL3-PPRE-luc 及 pRL-CMV 共转染组 (下转第 693 页)

(上接第 680 页)

与 pGL3-PPRE-luc、pRL-CMV 共转染组的表达结果, 可从功能上加以确定 PPAR- α 受体得以表达, 并具有相应的活性, 从而免除了对用 RT-PCR 法和间接免疫荧光法对 PPAR- α 表达的检测。

近年来, 许多研究表明 PPAR- α 受体的激动作用会影响到动脉粥样硬化的发生和发展^[1,6]。建立 PPAR- α 受体激动剂筛选模型, 不仅能为新药的发现提供平台, 同时也能为更深入地研究动脉粥样硬化机理提供基础。但由于动脉粥样硬化发病机理复杂, 以单一靶点和某一信号转导通路为基础建立筛药体系, 尽管从某种程度上能解释所获活性物的作用机理, 但并不能肯定其抗动脉粥样硬化的确切机理。因此, 需要在更深地了解动脉粥样硬化机理的前提下, 去探索并建立更多更深入的筛药体系。

5 结论

基于 PPAR- α 信号转导通路, 以非诺贝特为阳性药物建立的 PPAR- α 受体激动剂筛选体系, 灵敏性好、便捷, 适合 PPAR- α 受体功能性结合药物的高通量筛选。

REFERENCES

- [1] ISRAELIAN-KONARAKI Z, REAVEN P D. Peroxisome proliferator activated receptor-alpha and atherosclerosis from basic mechanisms to clinical implications [J]. *Cardiol Rev*, 2005, 13 (5): 240-246.
- [2] INOUE I, SHINODA Y, IKEDA M, et al. CLOCK/BMAL1 is involved in lipid metabolism via transactivation of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) response element [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2005, 12 (3): 169-174.
- [3] SCHACHTRUP C, EMMER T, BLECK B, et al. Functional analysis of peroxisome-proliferator-responsive element motifs in genes of fatty acid-binding proteins [J]. *Biochem J*, 2004, 382 (1): 239-245.
- [4] YAN J, FAN C L, WO X D, et al. A peroxisome proliferator response elements regulatory system in xenopus oocytes and its application [J]. *Chin Med J (Engl Ed)* (中华医学杂志 英文版), 2005, 118 (16): 1362-1367.
- [5] XU C, WANG L L, LIU H Y, et al. C333H, a novel PPAR α/γ dual agonist, has beneficial effects on insulin resistance and lipid metabolism [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 2006, 27 (2): 223-228.
- [6] ZIOUZENKOVA O, PERREY S, ASATRYAN L, et al. Lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins generates PPAR ligands: Evidence for an antiinflammatory role for lipoprotein lipase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 (5): 2731-2745.

收稿日期: 2009-09-16