

技术方法

DOI: 10.11699/cyxb20130620

PPAR γ 激动剂体外筛选模型的建立刘治国¹, 李继斌², 李靖娜¹, 陈笑宜¹, 明 月¹, 崔欢欢¹, 彭 川², 肖晓秋¹

(1. 重庆医科大学生命科学研究院, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学公共卫生与管理学院营养与卫生学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:构建一种过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) γ 激动剂体外筛选模型, 为筛选具有潜在治疗效果的 PPAR γ 激动剂提供研究手段。**方法:**用脂质体 2000(Lipofectamine™ 2000)将含有 PPAR γ 基因质粒(pIRES2-PPAR γ)、萤火虫荧光素酶报告基因质粒(pPPRE $\times$ 3-TK-Luciferase)以及内参照质粒(pRL-TK)按不同比例共转染入人胚胎肾细胞 HEK293 细胞, 并对 3 种质粒比例进行优化; 以不同配体处理转染 3 种质粒的 HEK293 细胞, 通过检测荧光素酶相对活性来确定加入配体对 PPAR γ 的激动效应; 采用经典的 PPAR γ 激动剂和 PPAR γ 特异性拮抗剂, 其他核受体激动剂以及 PPAR α 激动剂考察不同化合物对 PPAR γ 的激动作用程度, 确定模型的特异性; 以 Z' 值考察模型重复性; 并观察了 PPAR γ 激动剂的作用时间特点。**结果:**PPAR γ 质粒、报告基因质粒以及内参照质粒比例为 2:6:1 时相对荧光素酶活性最高; PPAR γ 激动剂罗格列酮可显著增加相对荧光素酶的活性而 PPAR γ 特异性拮抗剂 GW9662 可抑制这种作用, 且相对荧光素酶的活性随着处理时间的增加而升高; 地塞米松, 全反式维甲酸, 雌二醇和非诺贝特无上述活性; 重复 9 次实验后计算得 Z'=0.70。**结论:**本研究成功建立了一种 PPAR γ 激动剂筛选模型, 且模型特异性和重复性较好, 为进一步筛选具有 PPAR γ 激动剂提供了理想的研究手段。

【关键词】过氧化物酶体增殖物激活受体; 罗格列酮; 报告基因**【中国图书分类号】**R965.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-12-25Development of an in vitro model for PPAR γ agonists screeningLIU Zhiguo¹, LI Jibin², LI Jingna¹, CHEN Xiaoyi¹, MING Yue¹, CUI Huanhuan¹, PENG Chuan², XIAO Xiaoli¹

(1. Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University; 2. Teaching and Research Section of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health and Management, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To develop an in vitro peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ ligand screening system for identifying novel compounds with PPAR γ agonist activity. **Methods:** Human PPAR γ plasmid (pIRES2-PPAR γ), firefly luciferase reporter plasmid (pPPRE $\times$ 3-TK-Luciferase) and an internal reference plasmid (pRL-TK) were cotransfected into HEK293 cells by using Lipofectamine™ 2000, and the optimal ratio of three plasmids was determined. Luciferase expression intensity was determined to assess the PPAR γ agonist activity after the potential ligand being added to cotransfected HEK293 cells. Specificity of the model was examined by treatment of PPAR γ agonist and PPAR γ specific antagonist and several nuclear receptor agonists and PPAR α agonist; repeatability was also determined by Z' value and time characteristics of PPAR agonist action was observed. **Results:** PPAR γ plasmid, reporter gene vector and internal control plasmid ratio of 2:6:1 was proved to be suitable for highest relative luciferase activity. PPAR γ agonist rosiglitazone can significantly increase the relative luciferase activity and co-treatment with PPAR γ specific antagonist GW9662 resulted in significantly reduced expressions of luciferase and increased relative luciferase activity in the HEK293 cells in a time dependent manner. Dexamethasone, all-trans retinoic acid, 17 β -estradiol and fenofibrate did not alter the relative luciferase activity. Value of Z' was 0.70 after repeating experiments for 9 times. **Conclusions:** An in vitro PPAR γ agonist screening system is developed with acceptable specificity and repeatability. The model can be used for PPAR γ partial agonist screening from synthetic or natural compounds.

【Key words】peroxisome proliferator-activated receptor; rosiglitazone; reporter gene

作者介绍: 刘治国, Email: liuzhiguo2700@163.com,

研究方向: 新药研发。

通信作者: 肖晓秋, Email: xiaoxq@cqmu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(编号: 81030008); 国家自然科学基金面上资助项目(编号: 81270947); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(编号: 20115503110008)。

根据国际糖尿病联盟发布的第 5 版糖尿病地图,2012 年全球糖尿病患者达到 3.71 亿,中国糖尿病患者已超过 9 200 万,是全球第 1 大糖尿病发病国,其中 90% 以上为 2 型糖尿病^[1],糖尿病已成为威胁我国国民健康的重要疾病,其治疗药物的研发也成为目前糖尿病研究领域的一个持续热点。

过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) γ 是一种配体激活的核受体转录因子,在脂肪细胞分化过程中发挥关键作用^[2],PPAR γ 活化后可以促进脂肪细胞的分化,增加胰岛素敏感的小脂肪细胞数量^[3],促进脂联素的分泌,增加机体对胰岛素的敏感性^[4-5],从而改善 2 型糖尿病的发生发展。因此,PPAR γ 激动剂成为治疗 2 型糖尿病药物的关注对象。

罗格列酮(rosiglitazone, Rog)是一种人工合成 PPAR γ 激动剂,属噻唑烷二酮类药物(thiazolidinediones, TZDs),能有效增加外周组织对胰岛素的敏感性,促进机体对葡萄糖的利用,从而达到降低血糖的效果,被广泛用于治疗 2 型糖尿病^[6-7]。基于细胞水平转录实验,PPAR γ 激动剂可分为完全激动剂和部分激动剂^[8]。Rog 通常被认为是一种 PPAR γ 完全激动剂。但同时因过强的受体激动效应而引起患者体重增加、水肿、心衰等副作用^[9-10],使其临床应用受到限制。Yamauchi 等^[11]研究已经证实 TZDs 发挥胰岛素增敏作用并不需要完全激活 PPAR γ ; 另有研究表明 PPAR γ 部分激动剂也可有效改善胰岛素抵抗,且导致的副作用更少,因而具有更好的安全性^[12-13]。因此,筛选更多具有 PPAR γ 部分激动剂活性的化学物质成为开发新的糖尿病治疗药物的关键环节。本研究目的即构建 PPAR γ 激动剂筛选系统,为寻找新的更安全有效的 PPAR γ 部分激动剂提供研究手段。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

DMEM 培养基,胎牛血清和青霉素链霉素混合液购自美国 Hyclone 公司;小牛血清购自美国 Gibco 公司;质粒提取试剂盒购自 Omega 公司;地塞米松(dexamethasone, Dex),胰岛素,全反式维甲酸(all-transretinoic acid, ATRA),雌二醇(17 β -estradiol, E2),GW9662 购自美国 Sigma 公司;脂质体 2000 (LipofectamineTM 2000)购自美国 Invitrogen 公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国 Promega 公司;非诺贝特(Fenofibrate, Feno)为市售产品;Rog 由重庆太极集团提供。

1.2 细胞和质粒

人胚胎肾细胞株 HEK293 为本实验室保存。人全长 PPAR γ 表达质粒(pIRES-PPAR γ)和报告基因质粒(pPPRE $\times$ 3-TK-Luciferase, TK 为 thymidine kinase 的启动子)由重庆医科大学周岐新教授惠赠,内参质粒(pRL-TK)购自 Promega 公司。

1.3 细胞培养

HEK293 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 全湿条件下培养。培养基中添加青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml。

1.4 瞬时转染及荧光报告基因检测

HEK293 细胞用含 5% 血清的 DMEM 培养基接种于 24 孔板(5 $\times$ 10⁴ 个/孔),待细胞铺满孔板约 90% 时,用 LipofectamineTM 2000 将 PPAR γ 表达质粒、报告基因质粒以及内参质粒(标化不同组间转染效率)共转染入 HEK293, 5 h 后用含有 10% 血清的 DMEM 培养基换液,同时加入不同浓度的受试药物,然后用双荧光素酶报告基因检测试剂盒测定相对荧光素酶活性。按以下计算式确定各组相对荧光素酶活性:相对荧光素酶活性=实验组荧光素酶活性/溶媒组荧光素酶活性,各组荧光素酶活性=萤火虫荧光素酶活性/海参荧光素酶活性,溶媒组是指 0.1% DMSO 的处理组。

1.5 转染优化方案

按照 LipofectamineTM 2000 转染 24 孔板时脂质体(μ l)与总质粒(μ g)2:0.8 的推荐比例,对 pIRES-PPAR γ 、pPPRE $\times$ 3-TK-Luciferase 及 pRL-TK 质粒的转染比例进行优化,分别观察 2:2:1、2:4:1、4:4:1、2:6:1、2:8:1 共 5 种设定比例下转染后相对荧光素酶的活性。

1.6 模型特异性和重复性考察

为观察模型的特异性,分别选取 Dex、E2 和 ATRA 等经典核受体激动剂和 PPAR α 激动剂 Feno 以及 PPAR γ 特异性拮抗剂 GW9662 加入该模型,并与 PPAR γ 激动剂 Rog 组对比;采用国际公认的统计学参数 Z' 值以考察该模型重复性。Z' 取值范围在 0~1 之间,Z'>0.5 说明模型可用于高通量筛选。Z' 值按以下公式计算:

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

其中 μ_{ct} : Rog 组的平均值, μ_{cn} : 溶媒组的平均值; σ_{ct} : Rog 组的标准偏差, σ_{cn} : 溶媒组的标准偏差。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 13.0 进行统计学分析,数据用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析其中两两比较采用 LSD-t 法,以 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒转染比例优化

报告基因质粒结构上含有 3 个 PPAR 结合部位,下游含编码萤火虫荧光素酶基因。PPAR γ 与配体结合后再结合至过氧化物酶体增殖物反应元件(peroxisome proliferator respo-

nse element,PPRE)从而启动下游萤火虫荧光素酶表达,其表达强度与 PPAR γ 激活程度成正比。按照 5 种设定的不同质粒比例进行转染,加入 10 $\mu\text{mol/L}$ Rog 处理 24 h 后,检测各组相对荧光素酶的活性。结果见表 1,各组合之间相对荧光素酶活性差异均无统计学意义;且质粒比例在 2:6:1 时,相对荧光素酶活性最高,达到对照组 3.16 倍水平。因此,本研究选取 2:6:1 比例组合进行下一步实验。

表 1 不同比例质粒组合的相对荧光素酶活性数值 ($n=3,\bar{x}\pm s$)
Tab.1 Relative luciferase activity among different ratios of plasmids ($n=3,\bar{x}\pm s$)

质粒比例	相对荧光素酶活性
2:2:1	2.69 $\pm$ 0.11
2:4:1	2.96 $\pm$ 0.16
4:4:1	3.03 $\pm$ 0.11
2:6:1	3.16 $\pm$ 0.21
2:8:1	2.92 $\pm$ 0.10

注:Rog 用量为 10 $\mu\text{mol/L}$,处理时间为 24 h

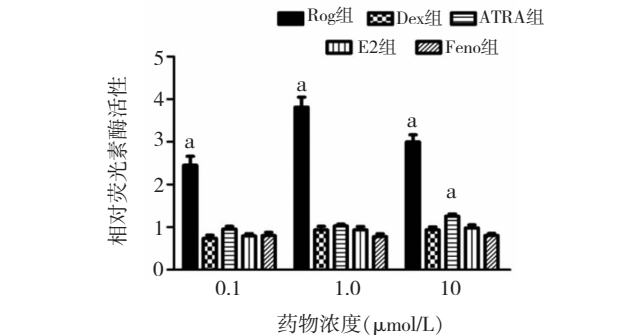
2.2 模型特异性和重复性

采用不同浓度的受试药物处理转染后的 HEK293 细胞,24 h 后测定相对荧光素酶的活性。结果如表 2、图 2 所示,Rog 组在不同浓度均可显著增加相对荧光素酶的活性,但是不同浓度之间没有显著性差异,并且在 1 $\mu\text{mol/L}$ 时相对荧光素酶活性最高(3.81 倍);而 Dex、ATRA、E2、Feno 等处理组相对荧光素酶活性明显低于 Rog 组。

表 2 不同配体处理后相对荧光素酶活性数值 ($n=3,\bar{x}\pm s$)
Tab.2 Relative luciferase activity after treatment with different ligands ($n=3,\bar{x}\pm s$)

配体	0.1 $\mu\text{mol/L}$	1.0 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$
Rog组	2.45 $\pm$ 0.36 ^a	3.81 $\pm$ 0.40 ^a	2.99 $\pm$ 0.29 ^a
Dex组	0.74 $\pm$ 0.12	0.93 $\pm$ 0.15	0.94 $\pm$ 0.12
ATRA组	0.96 $\pm$ 0.11	1.03 $\pm$ 0.08	1.26 $\pm$ 0.09 ^a
E2组	0.80 $\pm$ 0.09	0.93 $\pm$ 0.14	0.98 $\pm$ 0.12
Feno组	0.80 $\pm$ 0.12	0.80 $\pm$ 0.13	0.80 $\pm$ 0.07

注:质粒比例组合为 2:6:1,处理时间为 24 h;a,与溶媒组相比, $P<0.05$



质粒比例为 2:6:1,用不同浓度的配体处理转染的 HEK293 细胞 24 h 后,检测相对荧光素酶的活性; $\bar{x}\pm s,n=3$;a:与溶媒组相比, $P<0.05$

图 2 模型特异性
Fig.2 Specificity of the model

为了进一步验证模型特异性,接着观察了 PPAR γ 特异性拮抗剂 GW9662 处理后荧光素酶的表达情况。结果见表 3, GW9662 组相对荧光素酶活性与溶媒组差异无统计学意义;而 PPAR γ 激动剂 Rog 可促进荧光素酶的表达,当 GW9662 与 Rog 共同处理时,这种促进作用显著降低。实验重复 9 次后计算得 $Z'=0.70$,说明模型重复性良好,可用于高通量筛选。

表 3 Rog 和 GW9662 处理后相对荧光素酶活性数值 ($n=3,\bar{x}\pm s$)
Tab.3 Relative luciferase activity after treatment with Rog and GW9662 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

配体	相对荧光素酶活性
溶媒组	1
Rog组	3.07 $\pm$ 0.11
GW9662组	0.74 $\pm$ 0.07
GW9662 + Rog 组	1.48 $\pm$ 0.12 ^a

注:质粒比例组合为 2:6:1,Rog 和 GW9662 用量均为 10 $\mu\text{mol/L}$,处理时间为 24 h;a,与 Rog 组相比, $P<0.05$

2.3 Rog 与荧光素酶报告基因表达强度的时效关系

用 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 Rog 分别处理转染后的 HEK293 细胞 12、24、48 h,然后测定相对荧光素酶的活性。结果显示相对荧光素酶的活性随着 Rog 处理时间的延长而增加(表 4),各组之间都具有显著性差异,并且在 48 h 相对荧光素酶的活性最高(4.82 倍)。

表 4 不同 Rog 处理时间时相对荧光素酶活性数值 ($n=3,\bar{x}\pm s$)
Tab.4 Relative luciferase activity after treatment with Rog for different working time periods ($n=3,\bar{x}\pm s$)

处理时间 (h)	相对荧光素酶活性
12	1.55 $\pm$ 0.17
24	3.08 $\pm$ 0.16 ^a
48	4.82 $\pm$ 0.13 ^{ab}

注:质粒比例组合为 2:6:1;Rog 用量为 10 $\mu\text{mol/L}$;a,与 12 h 相比, $P<0.05$;b,与 24 h 相比, $P<0.05$

3 讨论

PPARs 是一类配体激活的转录因子,属核受体超家族成员,包括 PPAR α 、 β 、 γ 3 种亚型^[14]。在无 PPAR 配体存在时,PPAR 与维甲酸 X 受体(retinoid X receptor,RXR)结合形成 PPARs/RXR 异二聚体,并募集辅抑制因子形成无活性的复合体抑制其靶基因的表达。当配体出现时,在辅激活子的参与下,配体与 PPARs 以及 RXR 形成具有转录活性的复合物并转移至细胞核,与靶基因启动子区域 PPRE 结合,从而启动靶基因的表达,发挥配体的生物学效应^[15]。基于对上述 PPAR 信号传导通路的特点,本研究利用荧光素酶报告基因方法构建了 PPAR γ 激动剂的筛选体系,以期筛选安全有效的糖尿病潜在

药物提供研究手段。

高通量药物筛选的特点是低耗、灵敏度高、操作简便、微型化^[16]。人胚胎肾细胞株 HEK293 细胞因其转染效率高,并且低表达内源性配体,常作为研究外源基因的受体细胞。本研究首先对共转染质粒的比例进行了优化,结果 5 种组合的相对荧光素酶活性均没有显著差别,提示本系统中不同质粒的用量不是影响荧光素酶表达的关键因素。在建立高通量药物筛选模型时,特异性和重复性是评价模型的两个重要因素。不同信号通路之间如果存在交叉则会影响模型的特异性。PPRE 与雌激素受体反应元件结构上存在相似性,而糖皮质激素受体和 RXRs 均可与 PPARs 结合,这些受体均有可能影响 PPAR γ 信号通路从而降低对 PPAR γ 激动剂筛选的特异性。因此本研究观察了模型对 E2、Dex 和 ATRA 等核受体激动剂以及 PPAR α 激动剂 Feno 的筛选效果。结果显示,ATRA 可浓度依赖性的增加相对荧光素酶的活性,仅在 10 $\mu\text{mol/L}$ 水平时达到溶媒组的 1.26 倍;但 Rog 组相对荧光素酶活性最高可增加 3.81 倍,是 ATRA 的 3 倍;而其他几种核受体激动剂与溶媒组相比均没有明显差异,该结果证明模型具有一定的特异性;GW9662 是 PPAR γ 的特异性拮抗剂^[17],本研究结果发现 GW9662 可抑制 Rog 对荧光素酶表达的促进作用,进一步验证了该模型的特异性。 Z' 因子是国际上公认的常用来考察模型重复性的统计学参数。本体系中 $Z'=0.70$,达到高通量筛选要求,提示模型重复性良好,可用于体外高通量筛选具有 PPAR γ 激动剂活性的化学物质。此外,本研究还观察了 PPAR γ 激动剂 Rog 与相对荧光素酶活性的时效关系,结果显示 Rog 可时间依赖性的增加相对荧光素酶的活性,提示在使用该模型进行筛选时应注意确定受试物的处理时间。

综上所述,本研究在体外模拟 PPAR 信号传导系统,将 PPAR γ 质粒、PPRE 报告基因质粒及内参照质粒共转染入 HEK293 细胞,构建了一种稳定性和特异性均较好的 PPAR γ 激动剂筛选模型,为进一步筛选具有 PPAR γ 激动剂活性的化学合成物、天然药物或食物成分,寻找安全有效的 PPAR γ 部分激动剂提供了一种便捷的研究工具。

参 考 文 献

[1] Guariguata L. By the numbers; new estimates from the IDF diabetes atlas update for 2012[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2012, 98(3): 524–525.

[2] Rosen E D, Spiegelman B M. PPAR γ : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth[J]. J Biol Chem, 2001, 276(41): 37731–37734.

[3] Rocchi S, Picard F, Vamecq J, et al. A unique PPAR γ ligand with potent insulin-sensitizing yet weak adipogenic activity[J]. Mol Cell, 2001, 8(4): 737–747.

[4] Díez J J, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease[J]. Eur J Endocrinol, 2003, 148(3): 293–300.

[5] Sugii S, Olson P, Sears D D, et al. PPAR γ activation in adipocytes is sufficient for systemic insulin sensitization[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(52): 22504–22509.

[6] Olefsky J M. Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists[J]. J Clin Invest, 2000, 106(4): 467–472.

[7] Staels B, Fruchart J C. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists[J]. Diabetes, 2005, 54(8): 2460–2470.

[8] Berger J P, Petro A E, Macnaul K L, et al. Distinct properties and advantages of a novel peroxisome proliferator-activated protein [gamma] selective modulator[J]. Mol Endocrinol, 2003, 17(4): 662–676.

[9] Nissen S E, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes[J]. N Engl J Med, 2007, 356(24): 2457–2471.

[10] Graham D J, Ouellet-Hellstrom R, MaCurdy T E, et al. Risk of acute myocardial infarction, stroke, heart failure, and death in elderly Medicare patients treated with rosiglitazone or pioglitazone[J]. JAMA, 2010, 304(4): 411–418.

[11] Yamauchi T, Waki H, Kamon J, et al. Inhibition of RXR and PPAR γ ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes[J]. J Clin Invest, 2001, 108(7): 1001–1013.

[12] Agrawal R, Jain P, Dikshit S N. Balaglitazone: a second generation peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma (γ) agonist[J]. Mini Rev Med Chem, 2012, 12(2): 87–97.

[13] Chaudhary S, Dube A, Kothari V. NS-1: a novel partial peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist to improve insulin sensitivity and metabolic profile[J]. Eur J Pharmacol, 2012, 684(1–3): 154–160.

[14] Tzameli I, Fang H, Ollero M, et al. Regulated production of a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand during an early phase of adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes[J]. J Biol Chem, 2004, 279(34): 36093–36102.

[15] Kanzer-Lewis G. Early combination therapy with a thiazolidinedione for the treatment of type 2 diabetes[J]. Diabetes Educ, 2003, 29(6): 954–958, 961.

[16] 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.

[17] Goyal S N, Bharti S, Bhatia J, et al. Telmisartan, a dual ARB/partial PPAR- γ agonist, protects myocardium from ischaemic reperfusion injury in experimental diabetes[J]. Diabetes Obes Metab, 2011, 13(6): 533–541.

(责任编辑: 关蕴良)