

GFP 荧光标记 GLP-1 受体细胞系的建立

李明瑞¹, 季秀玲¹, 张敏¹, 张宽仁¹, 刘东波², 魏云林^{1*}

(1. 昆明理工大学 生命科学与技术学院, 中国云南 昆明 650504;

2. 湖南农业大学, 国家中医药管理局亚健康干预技术实验室, 中国湖南 长沙 410128)

摘要: 为建立胰高血糖素样肽 1 受体(glucagon-like peptide 1 receptor, GLP-1R)药物筛选模型, 真核表达载体 pCMV6/GFP/GLP-1R 构建好后, 转染至 U2OS 细胞, 转染后的细胞经 G418 筛选获得单克隆细胞株。该细胞株经 Western-blot 和 GLP-1 类似物检测, 结果表明 GLP-1R 在该细胞株高表达并对 GLP-1 类似物有着高灵敏度与特异性的反应, 可以用于 GLP-1 受体激动剂的筛选。

关键词: 胰高血糖素样肽-1 受体(GLP-1R); GLP-1-GFP/U2OS 细胞株; II 型糖尿病

中图分类号: Q819

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2015)06-0501-04

Establishment of a GFP Fluorescence Labeled GLP-1 Receptor Cell Line

LI Ming-rui¹, JI Xiu-ling¹, ZHANG Min¹, ZHANG Kuan-ren¹, LIU Dong-bo², WEI Yun-lin^{1*}

(1. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650504, Yunnan, China,

2. Hunan Agricultural University, State Key Laboratory of Subhealth Intervention Technology, Changsha 410128, Hunan, China)

Abstract: To establish glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) cellular model for screening GLP-1R ligands. A eukaryotic expression vector pCMV6-GLP-1R-GFP was constructed and transfected into U2OS cells. A stable expressing GLP-1R-GFP U2OS cell line was established and the expression of GLP-1 receptor was confirmed by Western-blot with a GLP-1 specific antibody. The activities of expressed GLP-1R-GFP were investigated with the cellular redistribution of green fluorescence after stimulation with GLP-1 analogs. The sensitivity and specificity of this cell line was qualified and the results showed that the cell line was suitable for GLP-1 receptor ligand screening.

Key words: glucagon-like peptide 1 receptor (GLP-1R); GLP-1-GFP/U2OS cell line; type II diabetics

(Life Science Research, 2015, 19(6): 501~504)

GLP-1 受体(glucagon-like peptide 1 receptor, GLP-1R)属于 G 蛋白偶联受体 B 家族中的胰高血糖素受体亚家族, 被认为是一个治疗 II 型糖尿病的关键靶受体^[1]。GLP-1R 主要表达于胰岛 β 细胞, 当受体被激活后, 通过 G 蛋白激活腺苷酸环化酶, 使胞内环腺苷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)水平升高, 进而激活蛋白激酶 A, 使相关蛋白磷酸化, 从而刺激胰岛素的合成。GLP-1 是肠 L

细胞分泌的一种肠促胰岛素, 通过作用于 GLP-1R 起到降低血糖的作用^[2]。GLP-1 释放后, 会增强血糖依赖的胰岛素的分泌^[3], 阻止胰高血糖素的分泌^[4], 并通过胰岛 β 细胞的增殖及抑制其凋亡增加胰岛 β 细胞的数量^[5]。与传统的治疗 II 型糖尿病的方法相比, GLP-1 只促进高血糖状态下胰岛素的分泌, 不会引起低血糖副作用^[6]。但是由于 GLP-1 的半衰期不足 5 min, 在体内易被 DPP-IV 降解成

收稿日期: 2014-11-10; 修回日期: 2015-06-15

作者简介: 李明瑞(1989-), 男, 江苏连云港人, 硕士研究生, 主要从事分子药理研究; * 通讯作者: 魏云林(1969-), 男, 云南昆明人, 昆明理工大学教授, 博士, 主要从事嗜极微生物研究, E-mail: homework18@126.com。

活性较低的 GLP-1 (9-36), 因此极大地限制了 GLP-1 在临床上的应用。近年来, 通过合成 GLP-1 类似物已经可以有效地延长 GLP1 的作用时间^[7,8]。目前, GLP1 类似物如 exendin-4 已上市, 但是存在价格高昂, 只能皮下注射, 长期用药易产生药物抵抗的问题。此外, exendin-4 存在一定的副作用, 如导致胰腺炎^[9], 其中具体机制尚不清楚。因此寻找小分子口服、副作用较小的 GLP-1 类似物成为当前的发展方向之一。

本实验构建了 GFP (green fluorescent protein) 标记的 GLP-1R 稳定转染细胞株, 并对该细胞模型进行了验证, 利用云南丰富的天然药物资源, 以期从大量的天然药物资源中筛选出与 GLP-1R 有作用的小分子化合物。

1 材料和方法

1.1 材料

分子克隆所需的胰蛋白胨(tryptone)、酵母提取物(yeast extract)及琼脂糖均购自英国 Oxoid 公司; Ex Tag DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶等工具酶购自日本 Takara 公司; 限制性内切酶 (*Sgf* I、*Mlu* I) 购自加拿大 Fermentas 公司; 凝胶回收试剂盒和质粒小提试剂盒均购自北京索来宝公司; 去内毒素质粒大提试剂盒购自美国 OMEGA 公司; 菌株 *E. coli* DH5 α 和 U2OS 细胞株由本教研室保存; 细胞培养所用的 DMEM 培养基和胎牛血清购自美国 HyClone 公司, 细胞培养瓶和培养板购自美国 Costar 公司, 转染试剂 lipofectamine 2 000 购自 Invitrogen 中国公司, G418 购自美国 Amresco 公司; 工具药 Exendin 4 购自美国礼来公司, Exendin 9-39 购自阿拉丁上海公司; 人 GLP-1R 抗体购自英国 Abcam 公司; 真核表达载体 pCMV6-AC-GFP 购自美国 Origene 公司; 其他试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

引物设计采用 Primer premier 5.0 软件完成。其上游引物: 5'-gaggcgatcgcc ATGGCCGCGCC-CCCGGC-3'; 下游引物: 5'-gcgacgcgtGCTG-CAGGAGCCTGG CAAG-3'。分别在上游引物和下游引物 5'端加上了 *Sgf* I、*Mlu* I 酶切位点和 3 个保护碱基 (gag, gcg), 并在起始密码前另加了 C, 引物由硕阳科技有限公司合成。

1.2.2 人 GLP-1R cDNA 扩增

以人 GLP-1R cDNA 为模板, 采用 PCR 的方式扩增全长人 GLP-1R cDNA 编码区, 全长 1 392 bp。PCR 50 μ L 反应体系中加入 cDNA 模板 1 μ L, 10 \times Ex Taq Buffer 5 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 3 μ L, 上下游引物(10 pmol/L)各 1 μ L, Ex Taq 酶 1 μ L, H₂O 补足至 50 μ L; 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 65 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共进行 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 10 min。琼脂糖电泳鉴定 PCR 产物。

1.2.3 人 GLP-1R 真核表达载体构建

将上述 PCR 产物和 pCMV6-AC-GFP 质粒分别用限制性内切酶 *Sgf* I 和 *Mlu* I 双酶切后, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离、胶回收纯化, 经 T4 DNA 连接酶过夜连接后转化 *E.coli* DH5 α 感受态, 氨苄青霉素筛选培养, 挑取阳性克隆扩增后, 提取质粒进行酶切和 DNA 测序鉴定。

1.2.4 稳定转染人 GLP-1R 的 U2OS 细胞系建立

U2OS 细胞在含 10% (体积分数)胎牛血清的 DMEM 培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C、5% (体积分数) CO₂ 的饱和湿度下培养。待细胞融合至 90%~95%时按 Lipofectamine 2000 操作说明书进行 pCMV6-AC-GFP 和重组表达载体 GLP-1R/pCMV6 的转染。转染 48 h 后, 用胰蛋白酶消化细胞, 在含有 G418 (400 μ g/mL)的选择培养基中筛选两周, 获得具有抗生素抗性的阳性细胞克隆, 扩增培养即为稳定表达人 GLP-1R 的 U2OS 细胞系, 命名为 GLP-1R/U2OS 细胞。

1.2.5 Western-blot 检测 GLP-1R 翻译水平的表达

收集转染细胞, 裂解后取 40 μ g 处理后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳并电转移至 PVDF 膜上, 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭振荡 2 h, 与 1:200 稀释后的一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 然后与 1:5 000 稀释后的 HRP 标记的二抗室温孵育 2 h, PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, DAB 显色检测目的蛋白。

1.2.6 GLP-1R/U2OS 细胞株 GLP-1R 活性分析

GLP-1R/U2OS 细胞按每孔 100 μ L (1 000 细胞/孔)培养于 96 孔培养板, 用含 10% (体积分数)胎牛血清的 DMEM 培养基, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 24 h。第 2 d 撤去完全培养基, 用 PBS 缓冲液清洗, 加入待测样本 Exendin-4, 室温放置 20 min, 倒置荧光显微镜观察荧光变化。用高内涵系统分析荧光斑点的数量与荧光的平均强度。

2 结果

2.1 重组表达载体 pCMV6-AC-GFP/GLP-1R 的鉴定

对重组质粒(图 1)进行酶切鉴定和 PCR 鉴定,证实外源基因已插入载体之中。为了进一步验证插入大小,方向正确与否,又对重组质粒进行了双向测序,通过序列比对发现大小和方向正确。

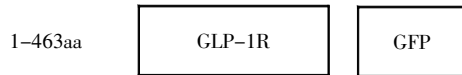


图 1 GFP 标记 GLP-1R 位置示意图

Fig.1 The schematic view of GFP labeled GLP-1R

2.2 GLP-1R/U2OS 细胞株的筛选

转染 24 h 后,用胰蛋白酶消化细胞,在含有 G418 (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的选择培养基中筛选两周,获得具有抗性的高表达 GFP (图 2) 的阳性细胞克隆,扩增培养即为稳定表达 GLP-1R 的 U2OS 细胞株,命名为 GLP-1R/U2OS 细胞株。Western-blot 实验证明 GLP-1R-GFP 在此细胞株中高表达 (图 3)。

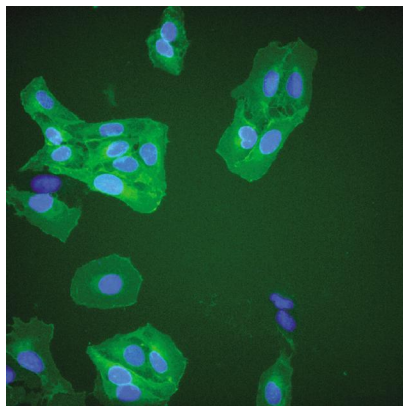


图 2 经 G418 筛选后获得的单克隆细胞株

Fig.2 The obtained monoclonal cell lines after G418 selection

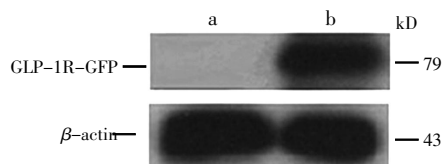


图 3 Western-blot 检测 GLP-1R 翻译水平的表达

a: 未转染 pCMV6-GLP-1R-GFP 质粒细胞; b: 转染 pCMV6-GLP-1R-GFP 质粒细胞。

Fig.3 The expression of GLP-1R-GFP detected by Western-blot with the GLP-1 specific antibody in the cloned GLP-1R-GFP/U2OS cells

a: Cells without plasmids transfection; b: Cells transfected with pCMV6-GLP-1R-GFP plasmids.

2.3 GLP-1R/U2OS 细胞模型的验证

将上述获得的 GLP-1R/U2OS 细胞按 100 μL /孔 (1 000 细胞/孔) 培养于 96 孔培养板,用含 10% (体积分数) 小牛血清的 DMEM 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h。第 2 d 撤去完全培养基,用 PBS 缓冲液清洗,加入待测样本 Exendin-4 和 GLP-1R 抑制剂 Exendin 9-39, 孵育 20 min 后移去孔中溶液,用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min,用 PBS 缓冲液洗 3 次,加入 DAPI 染料避光染色 15 min,用 PBS 缓冲液洗 5 次,在孔中留 100 μL PBS 缓冲液,用高内涵系统观察分析荧光斑点。图 4 显示绿色荧光重新分布并形成斑点。高内涵系统分析表明荧光斑点的数量和荧光强度在经过 Exendin-4 处理后存在剂量效应(图 5)与时间效应关系(图 6)。

3 讨论

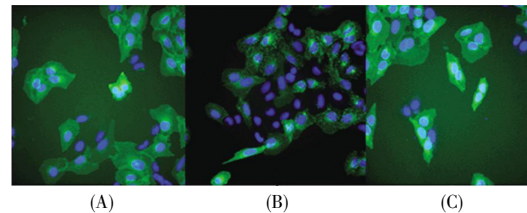


图 4 高内涵系统观察 Exendin-4 和 Exendin 9-39 处理前后细胞的荧光变化

(A) 未经 Exendin-4 处理的细胞; (B) 经 Exendin-4 (10^{-7} mol/L) 处理的细胞; (C) 加入 Exendin9-39 (10^{-5} mol/L) 后经 Exendin-4 (10^{-7} mol/L) 处理的细胞。

Fig.4 Representative fluorescence image changes before and after treatment with Exendin-4 and GLP-1 antagonist Exendin9-39 obtained by High Content System Monitor

(A) Without Exendin-4; (B) Treatment with Exendin-4 (10^{-7} mol/L); (C) Treatment with Exendin-4 (10^{-7} mol/L) and Exendin9-39 (10^{-5} mol/L).

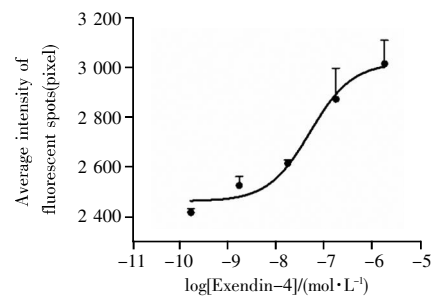


图 5 荧光斑点平均强度与 Exendin-4 的浓度依赖关系 Exendin-4 处理 30 min 后,在高内涵设备中可以观察到荧光斑点的平均强度随着 Exendin-4 浓度的增加而增强。

Fig.5 The dependence relationship of the average intensity of fluorescent spots and Exendin-4

Concentration dependence of the increase in fluorescence intensity of bright spots after Exendin-4 treatment for 30 minutes. The average fluorescence intensity of spot acquired from high content system.

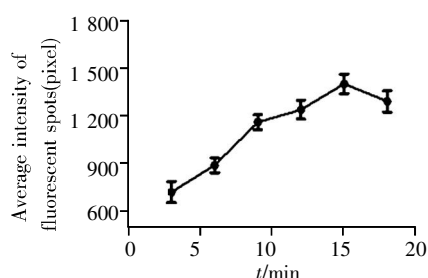


图 6 Exendin-4 处理后荧光改变的时间效应关系

Exendin-4 (10^{-7} mol/L)处理后, 荧光斑点的强度随着时间的增加而增强。

Fig.6 The time course of fluorescence intensity after Exendin-4 treatment

After Exendin-4 (10^{-7} mol/L) treatment, the intensity of fluorescence spots increases with the increase of time.

高通量药物筛选是目前世界上最流行的药物研发手段, 可以从浩瀚的小分子化合物库中高效、快速地寻找药物前体, 拥有高通量药物筛选平台是评价药物研发水平的一个重要指标, 而高通量药物筛选平台的建立依靠高通量筛选模型实现^[10]。GFP 作为报告基因的检测方法简便, 可以定性、定量分析, 价格低廉, 是高通量药物筛选的良好工具^[11]。本研究通过构建 GFP 标记 GLP-1R 的质粒, 转染 U2OS 细胞, 经过 G418 抗性筛选, 首次获得了稳定表达人 GLP-1R 的细胞筛选模型, 该细胞模型经过阳性药 Exendin-4 的验证, 显示出良好的剂量效应关系与时间效应关系, 可用于 GLP-1R 激动剂的筛选。目前, 国内基于 GLP-1R 受体药物筛选的模型有很多, 主要是通过标记与第二信使 cAMP 相偶联的下游响应元件 CRE^[12], 检测标记基因的表达来反应受体与配体的作用。由于 cAMP 是公共途径, 许多内源性受体激活也会产生 cAMP, 所以此种检测方法存在很高的假阳性, 耗时较长。

本研究通过直接检测受体激活后内吞功能, 利用高内涵成像设备捕捉受体激活后的内化反应, 可以定性、定量研究配体与受体的作用, 相比检测 cAMP 偶联基因的方法具有快速、灵敏、专一

性高等优点, 而且会大幅度降低假阳性的发生, 同时也会降低检测成本。

参考文献(References):

- [1] CASSANDRA K, DENISE W, JOHN S, *et al.* Allosteric ligands of the glucagon-like peptide 1 receptor (GLP-1R) differentially modulate endogenous and exogenous peptide responses in a pathway-selective manner: implications for drug screening[J]. *Molecular Pharmacology*, 2010, 78(3): 456-465.
- [2] VILSBOLL T, HOLST J J. Incretins, insulin secretion and Type 2 diabetes mellitus[J]. *Diabetologia*, 2004, 47(3): 357-366.
- [3] KREYMANN B, WILLIAMS G, GHATEI M A, *et al.* Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man[J]. *Lancet*, 1987, 2(8571): 1300-1304.
- [4] DUNNING B E, FOLEY J E, AHREN B. Alpha cell function in health and disease: influence of glucagon-like peptide-1[J]. *Diabetologia*, 2005, 48(9): 1700-1713.
- [5] PERFETTI R, HUI H. The role of GLP-1 in the life and death of pancreatic beta cells[J]. *Hormone and Metabolic Research*, 2004, 36(11/12): 804-810.
- [6] NAUCK M A, HEIMESAAT M M, BEHLE K, *et al.* Effects of glucagon-like peptide 1 on counter regulatory hormone responses, cognitive functions, and insulin secretion during hyperinsulinemic, stepped hypoglycemic clamp experiments in healthy volunteers[J]. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2002, 87(3): 1239-1246.
- [7] NELSON P, POON T, GUAN X, *et al.* The incretin mimetic exenatide as a monotherapy in patients with type 2 diabetes[J]. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 2007, 9(4): 317-326.
- [8] CHOY M, LAM S. Sitagliptin: a novel drug for the treatment of type 2 diabetes[J]. *Cardiology in Review*, 2007, 15(5): 264-271.
- [9] OLANSKY L. Do incretin-based therapies cause acute pancreatitis?[J]. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 2010, 4(1): 228-229.
- [10] GUO F, LIU Y X, ZHENG D X, *et al.* Establishment of high through-put drug screening model targeting retinoic acid receptor in cells[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2005, 40(10): 908-911.
- [11] CHEPUMY O G, HOLZ G G. A novel cyclic adenosine monophosphate responsive luciferase reporter incorporating a nonpalindromic cyclic adenosine monophosphate response element provides optimal performance for use in G protein coupled receptor drug discovery efforts[J]. *Journal of Biomolecular Screening*, 2007, 12(5): 740-746.
- [12] SKOGUND G, HUSSAIN M A, HULZ G G. Glucagon-like peptide 1 stimulates insulin gene promoter activity by protein kinase A-independent activation of the rat insulin I gene cAMP response element[J]. *Diabetes*, 2000, 49(7): 1156-1164.