

代谢型谷氨酸受体 4 亚型(mGluR4)高通量药物筛选模型的建立

张娅玲^{1,2}, 白艳秋^{1,2}

1 中国科学院北京基因组研究所, 北京 101300

2 中国科学院研究生院, 北京 100039

摘要: 为发现代谢型谷氨酸受体 4 亚型(mGluR4)的调节剂, 通过荧光检测胞内钙浓度的方法, 建立一个基于细胞功能性检测的高通量筛选(HTS)系统。将人 mGluR4 基因转染稳定表达 $G_{\alpha 15}$ 蛋白的人胚肾细胞(HEK-293), 用 Zeocin 筛选获得稳定表达 mGluR4 的细胞株, 并通过钙流检测试验验证该细胞系的生物学功能。优化了实验系统中荧光染料的孵育时间, 溶剂二甲基亚砜(DMSO)耐受性, 以及溶剂氢氧化钠(NaOH)耐受性, 建立了可靠稳定的筛选系统。钙流检测试验数据表明, mGluR4 细胞系对其激动剂的活性程度排序是: L-(+)-2-Amino-4-phosphonobutyric acid (L-AP4)>L-Serine-O-phosphate (L-SOP)>L-Glutamic acid (L-Glu); 拮抗剂是: (RS)- α -Methylserine-O-phosphate (MSOP)>(RS)- α -Methyl-4-phosphonophenylglycine (MPPG)。在 96 和 384 细胞微孔培养板中, 得到该筛选系统 Z' 因子分别是 0.80 和 0.65。结果表明, 该稳定细胞系拥有一个稳定的检测系统, 适合于 mGluR4 激动剂/拮抗剂的筛选。

关键词: 代谢型谷氨酸受体 4 亚型(mGluR4), 高通量筛选(HTS), $G_{\alpha 15}$, 激动剂/拮抗剂

Development of a functional cell-based HTS assay for the identification mGluR4 modulators

Yaling Zhang^{1,2}, and Yanqiu Bai^{1,2}

1 Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 101300, China

2 Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Abstract: To identify metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4) modulators by Ca^{2+} influx assay, we developed the functional cell-based high throughput-screening (HTS) assay. The human mGluR4 cDNA was transfected into HEK-293 stably expressing promiscuous G-protein ($G_{\alpha 15}$) cells. Recombinant stable mGluR4 cell line was selected under Zeocin and validated by Ca^{2+} influx assay. The assay was optimized on loading time of Fluo Calcium Indicator, Dimethyl sulfoxide (DMSO) tolerance and sodium hydroxide (NaOH) tolerance using agonist (L-Glutamic acid (L-Glu)) of mGluR4. The rank order of the agonist potency for the stable human mGluR4 cell line was L-(+)-2-Amino-4-phosphonobutyric acid (L-AP4)>L-Serine-O-phosphate (L-SOP)>L-Glu, and of the antagonist potency was (RS)- α -Methylserine-O-phosphate (MSOP)>(RS)- α -Methyl-4-phosphonophenylglycine (MPPG). Z' factor value of the cell line in 96- and 384-well plate format was 0.80 and 0.65. Our data indicate a successful development of functional human mGluR4 recombinant stable cell line that was suitable for high throughput screening to identify mGluR4 agonist/antagonist.

Received: October 24, 2008; **Accepted:** December 30, 2008

Corresponding author: Yaling Zhang. Tel: +86-10-80481755; E-mail: zhangyl@big.ac.cn

Keywords: metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4), high throughput screening (HTS), $G_{\alpha 15}$, agonist/antagonist

谷氨酸是公认的最重要的兴奋性神经递质之一, 其在众多的中枢神经功能方面发挥着重要的作用, 例如: 记忆的获取与学习, 癫痫、中风等功能紊乱, 神经退行性疾病等^[1]。L-谷氨酸通过与谷氨酸受体相结合发挥其生理作用^[2,3]。谷氨酸受体分为 2 类: 离子型谷氨酸受体(Ionotropic receptors)和代谢型谷氨酸受体(Metabotropic receptors)。离子型谷氨酸受体(iGluRs)包括 3 个亚型: IV_甲基-D-门冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)、红藻氨酸(Kainic acid)和使君子氨酸受体(-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate, AMPA), 该类受体被激活后能促使离子通道开放, 从而阳离子如 Na^+ 、 Ca^{2+} 等进入细胞内; 代谢型谷氨酸受体(mGluRs)包括 mGluR 1-8 共 8 个受体亚型, 为 G 蛋白偶联受体家族成员^[4], 有 7 个跨膜结构, 通过介导第二信使来调节受体生理功能^[5]。根据代谢型谷氨酸受体氨基酸系列同源性、信号转导机制和药理学特性, 将其分为 3 组: 第 1 组包括 mGluR1 和 mGluR5, 能被 3,5-DHPG 选择性的激活, 它们被激活后, 使 PLC 活化, 促使 PI 水解产生 IP3 和 DAG, 增强 iGluRs 异常介导的神经兴奋毒性; 第 2 组包括 mGluR2 和 mGluR3, 其在重组系统中负调控腺苷酸环化酶(AC), LY379268 是其选择性的激动剂; 第 3 组由 mGluR4、mGluR6、mGluR7 和 mGluR8 组成, 其同样是负调控 AC, 可以被 L-AP4 激活^[4,5]。这些受体被激活后, 可以调节谷氨酸神经递质的传递。神经递质传递的异常将会引起众多的疾病。因此, 这些受体已经成为药物研发的重要靶点, 开发与此类受体特异性作用的药物刻不容缓, 而建立快速、方便、经济的筛选平台可以大大加快此类新药的筛选与开发。

代谢型谷氨酸受体 4 亚型(mGluR4)集中分布于小脑颗粒细胞中, 在嗅觉组织中也发现 mGluR4 特异性的表达^[5]。发现并开发 mGluR4 特异性的调节剂, 可以促进众多的与其相关的疾病治疗。大规模的药物开发必不可少的要应用高通量筛选(High throughput screening, HTS)平台, 这样不仅可以节省人力、物力, 又可以大大缩短药物研发前期所消耗的时间。先前的研究报道已有基于细胞水平的功能性检测方法用于筛选 mGluR4 调节剂^[6-10], 例如:

Gomez J 等用鼠 mGluR4 基因和 G-蛋白($G_{\alpha 15}$ 、 $G_{\alpha 16}$ 、 $G_{\alpha q/1}$)瞬时共转染人胚肾细胞(HEK-293)后用于 mGluR4 的研究^[10]; Kowal D 等用人 mGluR4 基因和 G_{qi} 稳定共转染仓鼠卵巢巢细胞(CHO-K1)并用于 mGluR4 的相关研究^[7]。

在本研究中, 用人 mGluR4 重组质粒(Human mGluR4-pcDNA4/TO)转染稳定表达 $G_{\alpha 15}$ 的 HEK-293 细胞株, 通过抗生素的筛选得到重组细胞株, 并应用钙流检测试验进行进一步的确定及试验条件的优化。结果表明, 一个基于重组细胞水平的功能性检测、适用于鉴定 mGluR4 激动剂/拮抗剂的 HTS 平台被成功建立。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

稳定表达 $G_{\alpha 15}$ 的人胚肾细胞(HEK-293/ $G_{\alpha 15}$)由本实验室保存; DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium powder, high glucose, Gibco BRL); Glutamine-free DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose, 1X, -L-Glutamine, Gibco); FBS (Fetal Bovine Serum, Hyclone); dFBS (Dialyzed Fetal Bovine Serum, Hyclone); 选择性抗生素 Zeocin (Invitrogen); Trypsin (Invitrogen); MatriGel[®] Matrix (BD Bioscience); 转染试剂 Lipofectamine[™]2000 (Invitrogen); 荧光染料 Fluo-3/AM (Molecular Probes); Probenecid (Sigma); L-Glutamic acid (L-Glu, Sigma); L-AP4 (L-(+)-2-Amino-4-phosphonobutyric acid), L-SOP (L-Serine-O-phosphate), MPPG ((RS)- α -Methyl-4-phosphonophenylglycine)和 MSOP ((RS)- α -Methylserine-O-phosphate)从 Tocris 购买。

1.2 质粒构建

通过基因合成获得人源 mGluR4 的 cDNA, 并且通过 *Not I* + *Xba I* 亚克隆到真核生物表达载体 pcDNA4/To 上。所得到的表达质粒命名为 mGluR4-pcDNA4/To。

1.3 稳定表达 mGluR4 细胞系构建

稳定表达 $G_{\alpha 15}$ 蛋白的人胚肾细胞(HEK-293/ $G_{\alpha 15}$)培养在含有 10% FBS 的 DMEM 培养基中, 置于 37°C, 5% CO_2 温箱中培养。将 HEK-293/ $G_{\alpha 15}$ 接种于 6 孔细胞培养板中, 待细胞生长到 50%~70% 汇合率时用于转染。使用 Lipofectamine[™]2000 将人源 mGluR4-pcDNA4/TO 质粒转染 HEK-293/ $G_{\alpha 15}$ 细胞

(转染操作参照试剂盒说明书进行), HEK-293/G_{α15} 细胞作为阴性对照。转染 24 h 之后, 将细胞以 1:5 和 1:10 的比例传代于 100 mm 培养皿中。细胞贴壁生长 24 h 之后, 加入 120 μg/mL Zeocin 进行抗生素筛选。每 3 d 换一次加有 120 μg/mL Zeocin 的新鲜培养基, 连续筛选 2 周。当阴性对照细胞(没有转染的 HEK-293/G_{α15})在抗生素作用下完全死亡之后, 挑选单细胞克隆团于 96 孔细胞培养板中(Corning costar)进行扩大培养。根据激动剂作用于细胞后引起胞内钙流变化的原理进行阳性细胞克隆的选择。选择具有明显钙流信号变化的细胞克隆(设定为 P0 代)传代培养, 并进行进一步的功能验证。当细胞生长到 90% 汇合率的时候即进行传代培养, 以 1:8 到 1:10 的比例传代培养于含有 5 mL 新鲜培养基(加有 60 μg/mL Zeocin)的 60 mm 细胞培养皿中。

1.4 钙流检测试验方法

钙流检测方法是通过使用仪器 FlexStation (Molecular devices)检测荧光染料 Fluo-3/AM 标记的钙流变化, 在 FlexStation 荧光成像分析系统中, 激发波长为 485 nm, 发射波长为 525 nm。细胞以 2×10^4 /well 的密度接种于 MatriGel[®] Matrix 预先包被的 96 孔黑壁透明底板中(Cloning costar), 过夜培养于 37°C、5% CO₂ 温箱。第 2 天, 小心吸弃孔中全部培养基, 每孔细胞加入 100 μL 含有 5% dFBS 的 glutamine-free DMEM, 在 37°C、5% CO₂ 温箱培养 12~24 h。进行钙流检测试验时, 小心吸弃细胞培养基, 每孔细胞中加入 100 μL 含有 1 mmol/L Probenecid, 1 × Quencher 和 4 μmol/L Fluo-3/AM 的 1 × HBSS buffer (1.26 mmol/L CaCl₂, 0.49 mmol/L MgCl₂, 0.41 mmol/L MgSO₄, 5.33 mmol/L KCl, 0.44 mmol/L KH₂PO₄, 137.93 mmol/L NaCl, 0.34 mmol/L Na₂HPO₄, 5.56 mmol/L D-Glucose, 20 mmol/L HEPES, 4.17 mmol/L NaHCO₃, pH 7.4), 将细胞置于 37°C 避光孵育 90 min。

激动剂(L-Glu, L-AP4 或 L-SOP)配制成 5 × 测试浓度, 以 25 μL/s 的速度将 25 μL 的化合物加入到细胞中, 在加入化合物 16 s 之后采集钙流数据直至 120 s 以上。检测拮抗剂活性时, 将激动剂 L-Glu 和拮抗剂分别配制成 10 × 测试浓度, 并将其等体积混合成 5 × 测试浓度, 以 25 μL/s 的速度将 25 μL 的化合物加入到细胞中, 在加入化合物 16 s 之后采集钙

流数据直至 120 s 以上。

1.5 数据分析

化合物剂量依赖关系使用软件 GraphPad Prism 5 进行非线性曲线拟合分析。本实验中的数据都是经过 2 次重复实验所获得的平均值, 并且检测平均标准偏差(± SEM)。

Z' 因子用下面公式计算:

$$Z' = 1 - 3 \times (|SD \text{ signal}| + |SD \text{ background}|) / (|Mean \text{ signal}| - |Mean \text{ background}|)$$

2 结果

2.1 阳性克隆筛选

将人 mGluR4 重组质粒(mGluR4-pcDNA4/TO)转染稳定表达 G_{α15} 的 HEK-293 细胞株, 通过抗生素的筛选共得到 68 个重组细胞株。用 500 μmol/L L-Glu 激活 mGluR4, 从而引发内钙动员, 进而检测钙信号。其中, 检测到 32 个克隆有明显的钙信号, 但母细胞系 HEK-293/G_{α15} 胞内钙离子水平没有变化。最终挑选了 1 个信号较强的克隆作为待定细胞株, 命名为 mGluR4/HEK-293/G_{α15}, 进行扩大及传代培养, 进一步考察其特异性及稳定性, 同时优化其用于 HTS 时的筛选条件。

2.2 筛选条件的优化

某检测方法是否适用于 HTS, 具有严格的评判标准, 例如: 好的信噪比值, 高灵敏度以及一致性^[11]。为了评估在检测系统中产生的信号的动力学效应, 诸如荧光染料的孵育时间, 溶剂 DMSO 和 NaOH 的耐受性等钙流检测参数都被做了优化。

钙荧光染料(Fluo-3/AM)的孵育时间是影响钙流检测系统信噪比值的因素之一。为了在 mGluR4/HEK-293/G_{α15} 细胞株得到高的信噪比, 本研究首先优化了钙荧光染料的孵育时间。钙荧光染料孵育时间越长, 就能得到越高的钙流信号(数据没有显示)。在以下的试验当中, 钙荧光染料的时间被选定为 90 min。

为了评估由通用溶剂 DMSO 和 NaOH 引起的非特异性本底, DMSO 和 NaOH 耐受性通过钙流检测试验被测定。试验结果表明, 当 DMSO 和 NaOH 终浓度分别达到 0.5% (图 1A)和 0.2% (图 1B)时, 对于在 mGluR4/HEK-293/G_{α15} 细胞株上进行钙流检测试验没有显著的影响。因此, 在后续试验中, DMSO 和 NaOH 的终浓度分别被选定为 0.5%和 0.2%。

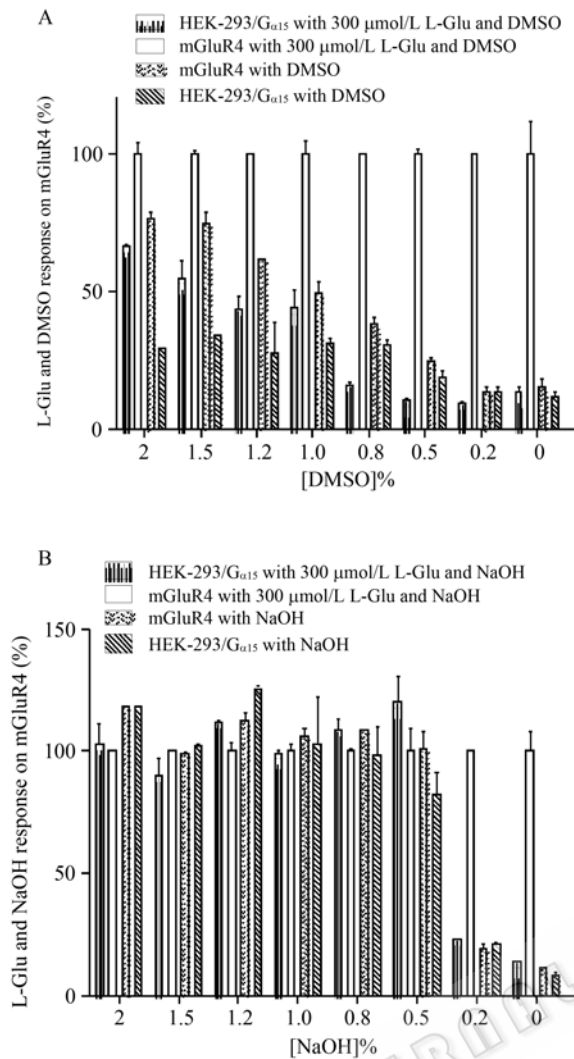


图 1 DMSO (A)和 NaOH (B)耐受性检测

Fig. 1 DMSO (A) and NaOH (B) tolerance detection. Assays were performed in duplicate and monitored with FlexStation plate reader.

2.3 mGluR4/HEK-293/G α_{15} 细胞株功能性检测

在以上优化后的实验条件下, 分别用不同浓度的 mGluR4 激动剂 (L-Glu、L-AP4 和 L-SOP) 和拮抗剂 (MSOP 和 MPPG) 作用于 mGluR4/HEK-293/G α_{15} 细胞株, 检测细胞内钙离子浓度的变化, 以证实 mGluR4 筛选模型的功能活性。

首先, 通过胞内钙流检测试验, 得到 3 种激动剂 (L-Glu、L-AP4 和 L-SOP) 的剂量依赖效应曲线。结果表明, 这 3 个激动剂的半数有效刺激浓度 (EC₅₀) 均与文献报道相符 (表 1)。L-AP4 是最强的激动剂, 其 EC₅₀ 为 0.27 $\mu\text{mol/L}$ (图 2); L-SOP 和 L-Glu 次之, EC₅₀ 分别为 2.85 $\mu\text{mol/L}$ 和 12.04 $\mu\text{mol/L}$ (图 2)。

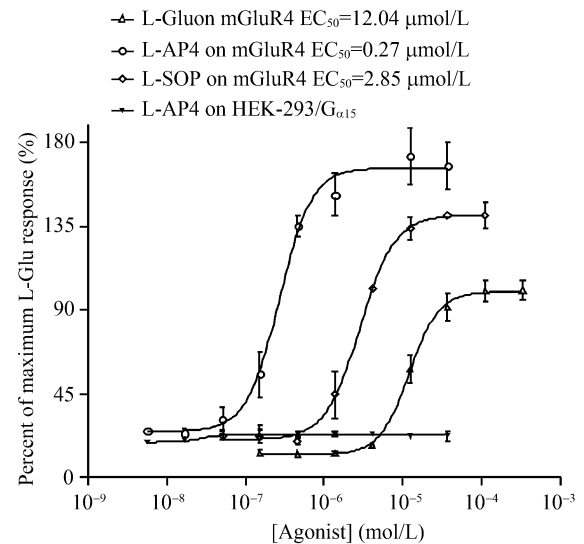


图 2 激动剂对 mGluR4 细胞的剂量效应

Fig. 2 Dose response of agonist on mGluR4 cell line. Assays were performed in duplicate and monitored with FlexStation plate reader. Data points represent means \pm SEM. EC₅₀ value was determined using GraphPad Prism 5 software.

另外, 通过钙流检测方法, 本研究测试了 2 个拮抗剂 MSOP 和 MPPG。用 10 $\mu\text{mol/L}$ 的刺激剂 L-Glu 刺激细胞内钙的释放, 同时用不同浓度的拮抗剂抑制此胞内钙的释放, 从而得到拮抗剂的剂量依赖曲线 (图 3), 并与文献报道相符 (表 1)。MSOP 和 MPPG 的半数有效抑制浓度 (IC₅₀) 分别是 32.83 $\mu\text{mol/L}$ 和 59.90 $\mu\text{mol/L}$ (图 3)。

2.4 mGluR4/HEK-293/G α_{15} 细胞株稳定性考察

众所周知, 有效性、特异性、可溶解性、稳定性、毒性以及化合物和靶体之间的作用机制对于基于细胞水平的检测方法至关重要。一旦靶体选定, 稳定表达该靶体的细胞系就要被构建并且在传代培养时不被丢失。为了考察该 mGluR4/HEK-293/G α_{15} 细胞株的稳定性, mGluR4/HEK-293/G α_{15} 细胞在 60 $\mu\text{g/mL}$ Zeocin 的条件下培养至 20 代以上, 冻存 1 代、5 代、10 代和 20 代细胞。之后同时检测 L-Glu 或 MSOP 在这几代的 mGluR4 细胞上的作用。如图 4 所示, 激动剂 L-Glu 的 EC₅₀ (图 4A, 3.51 $\mu\text{mol/L}$ ~8.82 $\mu\text{mol/L}$) 和拮抗剂 MSOP 的 IC₅₀ (图 4B, 19.30 $\mu\text{mol/L}$ ~37.19 $\mu\text{mol/L}$) 在不同代数细胞之间基本保持一致 (表 2)。由此可见, 该 mGluR4/HEK-293/G α_{15} 细胞株是稳定的。

表 1 mGluR4 激动剂和拮抗剂作用活性总结(单位: $\mu\text{mol/L}$)Table 1 Potency of agonist and antagonist of mGluR4 ($\mu\text{mol/L}$)

Category	Compound name	Reported		Our data		Reference
		EC ₅₀	IC ₅₀	EC ₅₀	IC ₅₀	
Agonist	L-Glu	5~38	/	12.04	/	12, 13, 14, 15
	L-AP4	0.3	/	0.27	/	16
	L-SOP	2.7	/	2.85	/	8, 12, 13, 16, 17
Antagonist	MSOP	/	11.44	/	32.83	18
	MPPG	/	110	/	59.90	13

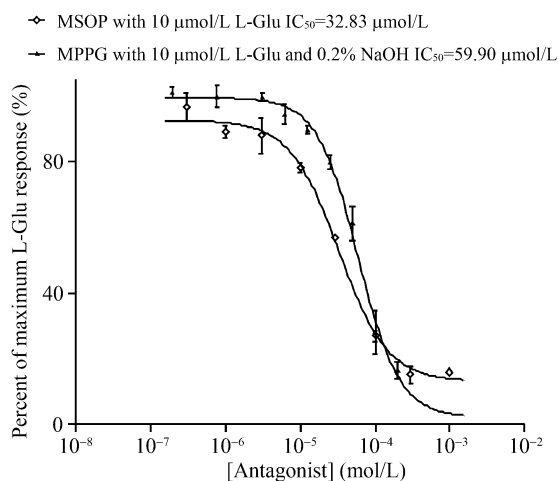


图 3 拮抗剂对 mGluR4 细胞的剂量效应

Fig. 3 Dose response of antagonist on mGluR4 cell line. Agonist L-Glu ($10 \mu\text{mol/L}$) was used to induce a calcium influx. For MPPG, final concentration of NaOH is 0.2%. Assays were performed in duplicate and monitored with FlexStation plate reader. Data points represent means \pm SEM. IC₅₀ value was determined using GraphPad Prism 5 software.

表 2 mGluR4 激动剂 L-Glu 和拮抗剂 MSOP 作用于不同代细胞之间的活性总结(单位: $\mu\text{mol/L}$)Table 2 Potency of L-Glu and MSOP at different passages of cells ($\mu\text{mol/L}$)

Potency		P1	P5	P10	P20
L-Glu	EC ₅₀	3.51	5.45	4.57	8.82
MSOP	IC ₅₀	37.19	28.67	19.30	24.18

2.5 Z'因子评估

高质量的检测系统以及强有力的数据分析为鉴定真正有活性的化合物提供了保证。Z'因子是一种被大众所广泛接受的既简便又实用的检测系统评价参数^[19,20]。Z'因子的大小介于 $-\infty$ 和 1 之间。当 $0.5 < Z' < 1$ 时,意味着此检测系统是一个有效的系统;当 $0 < Z' < 0.5$ 时,意味着此检测系统基本可行;当 $Z'=0$ 时,意味着此检测系统模棱两可;当 $Z' < 0$ 时,意味着此检测系统根本不可行^[20]。在本次试验当中,

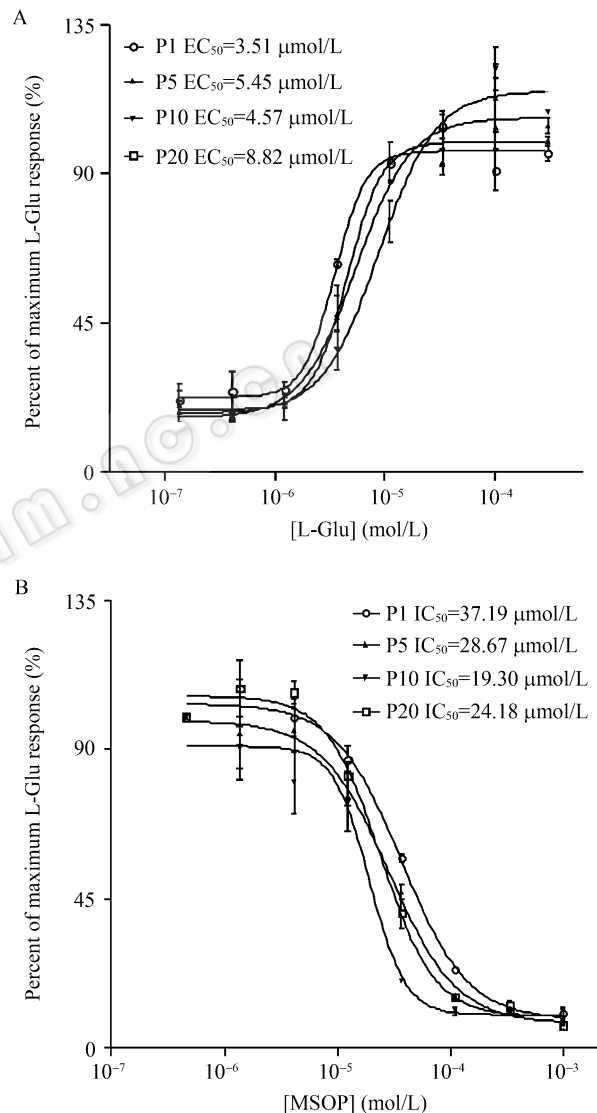


图 4 mGluR4 细胞株稳定性检测

Fig. 4 Stability of mGluR4 cell line. Dose response curves of agonist-L-Glu (A) and antagonist-MSOP (B) for passages 1, 5, 10 and 20 were showed. Agonist L-Glu ($10 \mu\text{mol/L}$) was used to induce a calcium influx. The cell was tested up to passage 20. Assays were performed in duplicate and monitored with FlexStation plate reader. Data points represent means \pm SEM. EC₅₀ and IC₅₀ value were determined using GraphPad Prism 5 software.

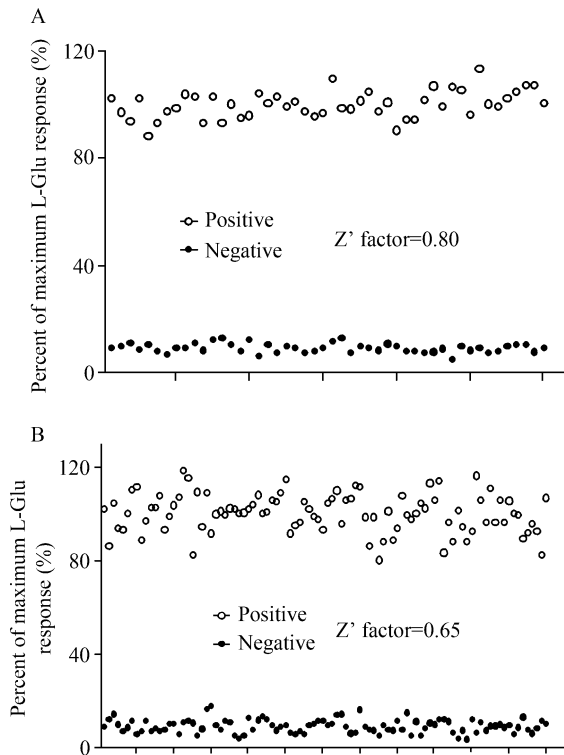


图5 Z'因子检测

Fig. 5 Z' factor determination. mGluR4/HEK-293/G α_{15} cell line was stimulated with 100 $\mu\text{mol/L}$ L-Glu (positive) and assay buffer (negative). Assays were monitored with FlexStation plate reader. (A) 96-well plate format. (B) 384-well plate format.

不仅检测了用 96-孔板进行钙流检测试验时的 Z' 因子(图 5A), 同时也用 384-孔板进行了检测(图 5B)。用 300 $\mu\text{mol/L}$ 的 L-Glu 刺激 mGluR4 并引发钙动员, 用缓冲液作用于该细胞系以得到试验背景, 之后所得到的 Z' 因子分别为 0.80 和 0.65, 由此说明该 mGluR4 检测系统适用于 HTS。

2.6 模拟筛选

进行 HTS 时, 成千上万的化合物都会用数块 96 或 384-孔板进行 HTS 筛选。本研究模拟了在 96-孔板上的筛选过程。用上述建立好的 mGluR4 钙流检测方法筛选 74 种已知化合物(包括小分子化合物及具有活性的多肽)。化合物用 DMSO 进行配制, 其终浓度是 10 $\mu\text{mol/L}$, DMSO 终浓度是 0.5%, 以满足 HTS 的要求。模拟筛选结果显示, 在该 96-孔板不同位置所设置的阳性对照(300、100、30 和 10 $\mu\text{mol/L}$ L-Glu)及阴性对照(缓冲液)都检测到了相应的钙信号(图 6)。从中也得到了一些对于该 mGluR4 有活性的化合物。总之, 该模拟筛选结果显示, mGluR4 检测方法适用于 HTS 以鉴定 mGluR4 的活性化合物。

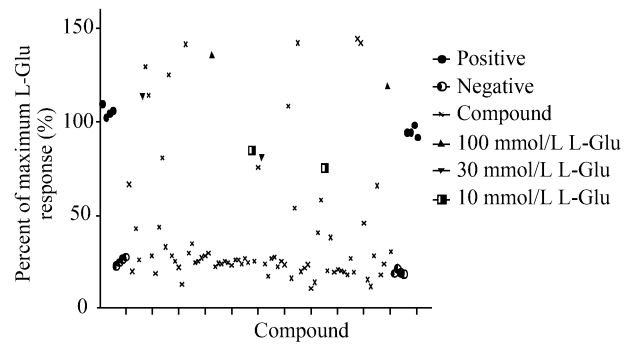


图6 模拟筛选

Fig. 6 Spiking test. The test was performed and monitored with FlexStation II plate reader. Scatter plot of spiking data test of the positive control and compound were showed. Positive: 300 $\mu\text{mol/L}$ L-Glu; Negative: assay buffer with 0.5% DMSO.

3 讨论

mGluR4 是结合于 G $_i$ 类的 G 蛋白, 目前对 G $_i$ 偶联的 G 蛋白偶联受体可以通过同位素结合试验, cAMP 定量试验、报告基因系统、荧光检测钙流等方法进行检测。与其他检测方法相比, 通过荧光检测胞内钙水平变化的方法来筛选 GPCR 的激动剂/拮抗剂灵敏度高、耗时短、使用范围更广泛、操作更简便。

在本研究中, 选择 HEK-293/G α_{15} 作为表达人源 mGluR4 的母细胞。这是因为 HEK-293 细胞已经被证明非常适合于异源表达 GPCRs, HEK-293 细胞容易生长形成单层细胞, 具有很强的生长活性和较强的贴壁能力。更重要的是, G $_i$ 类的 G 蛋白不能引起细胞内的钙流变化; 而 HEK-293/G α_{15} 细胞中的 G α_{15} 可以将 mGluR4 偶联到 PLC 通路上, 继而可以通过检测钙流的变化来间接反应 mGluR4 的作用。由图 2 可以看出, 在激动剂 L-AP4 的作用下, mGluR4/HEK-293/G α_{15} 细胞产生了内部钙流变化, 并且呈剂量依赖关系, EC $_{50}$ 大约为 0.27 $\mu\text{mol/L}$, 而母细胞 HEK-293/G α_{15} 却没有类似明显的胞内钙流的变化。

通过人源 mGluR4 质粒转染 HEK-293/G α_{15} 细胞, 建立了人源 mGluR4 稳定表达的细胞系。首先, 使用激动剂 L-Glu 对 mGluR4/HEK-293/G α_{15} 钙流检测试验时的一些系统检测因子, 包括钙荧光染料的孵育时间, DMSO 耐受性和 NaOH 耐受性进行了优化。其次, 使用 mGluR4 特异性的激动剂/拮抗剂对 mGluR4/HEK-293/G α_{15} 进行了验证。结果显示, 这个

重组细胞系适用于发现 mGluR4 的激动剂/拮抗剂。更重要的是, 本研究对该检测系统进行了统计学意义上的评估。在 96 及 384-孔板上所得到的 Z' 因子均大于 0.5, 这强有力地证明 mGluR4 细胞系适用于 HTS。最后, 74 个化合物在 96-孔板上通过模拟筛选, 所有的阳性及阴性对照都得到了肯定的结果, 这些说明该 mGluR4 检测系统可以非常灵敏的用于 HTS, 从而鉴定 mGluR4 活性化合物。

综上所述, 本研究第一次用 HEK-293/G α_{15} 母细胞建立了一个稳定高表达人源 mGluR4 的重组细胞系: mGluR4/HEK-293/G α_{15} 。这个细胞系不仅适用于细胞功能性研究, 而且适用于结合试验中的膜蛋白的提取, 增强了配体特异性的结合。本研究所建立的 mGluR4 的重组细胞系是一个灵活的、稳定的、有效的、适用于 HTS 体系, 可以用于药理学分析、功能性研究以及筛选 mGluR4 的激动剂/拮抗剂。

REFERENCES

- [1] Tanabe Y, Masu M, Ishii T, *et al.* A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron*, 1992, **8**: 169–179.
- [2] Yang ZQ. Agonists and antagonists for group III metabotropic glutamate receptor 6, 7 and 8. *Curr Top Med Chem*, 2005, **5**: 913–918.
- [3] Kew JN, Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)*, 2005, **179**(1): 4–29.
- [4] Mathiesen JM, Svendsen N, Bräuner-Osborne H, *et al.* Positive allosteric modulation of the human metabotropic glutamate receptor 4 (hmGluR4) by SIB-1893 and MPEP. *Br J Pharmacol*, 2003, **138**: 1026–1030.
- [5] Ferraguti F, Shigemoto R. Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res*, 2006, **326**(2): 483–504.
- [6] Rosemond E, Wang M, Yao Y, *et al.* Molecular basis for the differential agonist affinities of group III metabotropic glutamate receptors. *Mol Pharmacol*, 2004, **66**: 834–842.
- [7] Kowal D, Nawoschik S, Ochalski R, *et al.* Functional calcium coupling with the human metabotropic glutamate receptor subtypes 2 and 4 by stable co-expression with a calcium pathway facilitating G-protein chimera in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Pharmacol*, 2003, **66**(5): 785–790.
- [8] Tanabe Y, Nomura A, Masu M, *et al.* Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4. *J Neurosci*, 1993, **13**(4): 1372–1378.
- [9] Brabet I, Parmentier ML, de Colle C, *et al.* Comparative effect of L-CCG-I, DCG-IV and gamma-carboxy-L-glutamate on all cloned metabotropic glutamate receptor subtypes. *Neuropharmacology*, 1998, **37**: 1043–1051.
- [10] Gomeza J, Mary S, Brabet I, *et al.* Coupling of mGluR2 and mGluR4 to G α_{15} , G α_{16} and chimeric G $\alpha_{q/i}$ proteins: characterization of new antagonists. *Mol Pharmacol*, 1996, **50**: 923–930.
- [11] Kunapuli P, Ransom R, Murphy KL, *et al.* Development of an intact cell reporter gene beta-lactamase assay for G protein-coupled receptors for high-throughput screening. *Anal Biochem*, 2003, **314**(1): 16–29.
- [12] Thomsen C, Pekhletski, R, Haldeman, B, *et al.* Cloning and characterization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR4b. *Neuropharmacology*, 1997, **36**: 21–30.
- [13] Han, G, Hampson DR. Ligand binding to the amino-terminal domain of the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 10008–10013.
- [14] Thomsen C, Kristensen P, Mulvihill E, *et al.* L-2-amino-4-phosphonobutyrate (L-AP4) is an agonist at the type IV metabotropic glutamate receptor which is negatively coupled to adenylate cyclase. *Eur J Pharmacol*, 1992, **227**: 361–362.
- [15] Ahmadian H, Nielsen B, Brauner-Osborne H, *et al.* (S)-homo-AMPA, a specific agonist at the mGlu6 subtype of metabotropic glutamic acid receptors. *J Med Chem*, 1997, **40**: 3700–3705.
- [16] Eriksen L, Thomsen C. [3H]-L-2-amino-4-phosphonobutyrate labels a metabotropic glutamate receptor, mGluR4a. *Br J Pharmacol*, 1995, **116**: 3279–3287.
- [17] Thomsen C, Suzdak, PD. Serine-O-phosphate has affinity for type IV, but not type I, metabotropic glutamate receptor. *Neuroreport*, 1993, **4**: 1099–1101.
- [18] Pin, JP, Acher F. The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 2002, **1**: 297–317.
- [19] Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen*, 1999, **4**(2): 67–73.
- [20] Sui YX, Wu ZJ. Alternative statistical parameter for high-throughput screening assay quality assessment. *J Biomol Screen*, 2007, **12**(2): 229–234.