

1. 一种与脂肪细胞形成相关的药物的筛选方法,包括以下步骤:
 - A. 提供骨髓间质干细胞的细胞株和相关的培养基与培养条件;
 - B. 提供带有脂肪组织特异启动子及绿色荧光蛋白作为报告基因的慢病毒载体,对所述骨髓间质干细胞进行转染,引导向脂肪细胞分化,检测分化过程中荧光蛋白的表达,以及对细胞进行鉴定;
 - C. 加入待筛选的药物,检测荧光蛋白的表达情况,如果出现荧光蛋白表达下调或者上调的情形,该化合物成为与脂肪细胞形成相关的潜在候选药物。
2. 根据权利要求 1 所述的与脂肪细胞形成相关的药物的筛选方法,其特征在于:所述步骤 A 中,所述培养基是通用的哺乳类动物细胞培养液,培养条件是 5% CO₂、37℃。
3. 根据权利要求 1 所述的与脂肪细胞形成相关的药物的筛选方法,其特征在于:所述步骤 B 中,所述分化是用免疫细胞化学、油红 O 染色观察,所述鉴定是用实时定量 PCR 进行鉴定。
4. 根据权利要求 1 所述的与脂肪细胞形成相关的药物的筛选方法,其特征在于:所述步骤 C 中,所述待筛选的药物是小分子化合物或者药物。
5. 根据权利要求 1 所述的与脂肪细胞形成相关的药物的筛选方法,其特征在于:所述步骤 D 中,所述检测荧光蛋白的表达的方法是用酶标仪进行读数。

与脂肪细胞形成相关的药物的筛选方法

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学和细胞生物学领域,涉及一种与脂肪细胞形成相关的药物的筛选方法,尤其是涉及一种通过荧光报告基因的表达检测来筛选促进或者抑制脂肪细胞形成的药物的方法。

背景技术

[0002] 脂肪形成 (Adipogenesis) 是指脂肪细胞形成和成熟的过程,在近几年受到越来越多的关注。脂肪组织的功能包括以脂肪的形式存储能量,更重要的是作为身体最大的内分泌器官维持机体的稳态。脂肪细胞可以分泌多种激素和细胞因子来调节机体的重要机能活动,包括糖代谢、脂肪代谢、血管生成、免疫调节和生殖等。脂肪细胞的功能失调可以导致一系列的代谢相关疾病,包括肥胖症和糖尿病等。具有正性或者负性调节脂肪形成的小分子化合物有望成为这类疾病的新的治疗药物。

[0003] 目前,有多种与干细胞分化相关的筛选小分子化合物的方法。其中,利用荧光素酶 (luciferase) 作为报告基因的方法已经得到广泛的应用。已有报道应用该报告基因进行与干细胞神经分化、心肌分化和成骨分化相关的小分子化合物的筛选。例如, xu 等 (Xu Wu, Sheng Ding, Qiang Ding, Nathanael S. Gray and Peter G. Schultz. (2004) Small molecules that induce cardiomyogenesis in embryonic stem cells. JACS.) 应用大鼠心肌特异启动子 - 心房利钠肽 (ANF) 携带荧光素酶的载体从 10 万个小分子化合物库筛选心肌分化的诱导因子。另外还有使用荧光蛋白作为报告基因或者抗体标记的方法进行小分子的筛选。例如, Hoio 等 (Hironori Hojo, Kazuyo Igawa, Shinsuke Ohba (2008) Development of high-throughput screening system for osteogenic drugs using a cell-based sensor. Biochemical and Biophysical Research Communications.) 应用 I 型胶原启动子携带绿色荧光蛋白转染小鼠 3T3 细胞,直接通过荧光显微镜的观察从 2500 个化合物中筛选与成骨分化相关的小分子化合物。

[0004] 在干细胞的脂肪分化中, PPAR γ 是主要调节因子,而脂肪酸结合蛋白 aP2 (FABP4) 主要表达于脂肪细胞和巨噬细胞上,其主要作用是作为脂质转运蛋白结合长链脂肪酸和维甲酸,并受 PPAR γ 激动剂、胰岛素和脂肪酸所调节。因此,我们认为使用 aP2 携带报告基因的方法是筛选脂肪分化调节因子的快速和敏感的方法。已有研究使用 aP2 启动子携带荧光素酶的载体转染 3T3-L1 细胞的方法筛选 PPAR γ 的激动剂。然而,如果要寻找治疗人类代谢疾病的药物,小鼠来源的 3T3-L1 细胞不是一个理想的模型。而且,荧光素酶的方法虽然比较成熟,但是费用较高而且步骤繁琐。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种新的用于筛选与脂肪形成相关的药物的方法,具体是通过以骨髓间质干细胞作为细胞模型,应用脂肪组织特异启动子 aP2 携带绿色荧光蛋白作为报告基因的载体进行细胞的转染和分化,最终通过酶标仪的检测读数进行与脂肪形成相关

药物的筛选,尤其适用于筛选促进或者抑制脂肪细胞形成的潜在候选药物。

[0006] 本发明所述的与脂肪形成相关的药物的筛选方法,包括以下步骤:A. 提供骨髓间质干细胞的细胞株和相关的培养基与培养条件;B. 提供带有脂肪组织特异启动子及绿色荧光蛋白作为报告基因的慢病毒载体,对所述骨髓间质干细胞进行转染,引导向脂肪细胞分化,检测分化过程中荧光蛋白的表达,以及对细胞进行鉴定;C. 加入待筛选的药物,检测荧光蛋白的表达情况,如果出现荧光蛋白表达下调或者上调的情形,该化合物成为与脂肪细胞形成相关的潜在候选药物。

[0007] 所述步骤A中,培养基是通用的哺乳类动物细胞培养液,培养条件是5% CO₂、37°C。

[0008] 所述步骤B中,所述分化是用免疫细胞化学、油红O染色观察,所述鉴定是用实时定量PCR进行鉴定。

[0009] 所述步骤C中,所述待筛选的药物是小分子化合物或者药物。

[0010] 所述步骤D中,所述检测荧光蛋白的表达的方法是用酶标仪进行读数。

[0011] 本发明首先构建慢病毒质粒 pLVfinal/pgk-puromycin-aP2-hrGFP(意为慢病毒表达载体,由广泛表达启动子 pgk 调控 puromycin 抗性基因的表达, aP2 基因调控 hrGFP 的表达),在 293ft 细胞(来源于 SV40 大 T 抗原转化的人胚肾细胞,一种通用的病毒包装细胞)进行慢病毒包装,浓缩,随后进行不同种属来源的胚胎干细胞和间质干细胞的转染和筛选,并在脂肪诱导分化的过程中观察到绿色荧光蛋白的表达,通过免疫荧光化学和 RT-PCR 的方法证实表达绿色荧光的细胞为脂肪细胞。目前均未见报道。

[0012] 本发明以骨髓间质干细胞为例,通过实验研究骨髓间质干细胞脂肪分化过程中绿色荧光蛋白的表达变化及其与 aP2 基因 RNA 水平的表达和脂滴生成之间的关系。结论是随着脂肪分化时间的延长,绿色荧光蛋白的表达量逐渐升高(通过酶标仪进行读数检测), aP2 基因 RNA 水平的表达(通过实时 PCR 检测)和脂滴形成(通过油红 O 染色检测)也逐渐增高,三者之间存在正相关关系。由此,本发明将绿色荧光蛋白的表达量作为间质干细胞脂肪分化的观察和检测指标。

[0013] 因此,建立通过应用脂肪组织特异启动子 aP2 携带绿色荧光蛋白作为报告基因的载体进行骨髓间质干细胞的转染和分化,最终通过酶标仪的检测读数来筛选与脂肪形成相关药物的方法是可行的,也是非常有应用前景的。本发明首次提出了这种通过荧光报告基因的表达检测来筛选促进或者抑制脂肪细胞形成的药物或化合物的方法。

[0014] 本发明以小分子化合物作为药物筛选的示例,验证了上述方法的可行性,通过建立骨髓间质干细胞脂肪分化的模型,在分化过程中加入小分子化合物 Ly294002、chir99021 和 Thiazolidinedione,通过绿色荧光蛋白的检测获得小分子化合物与骨髓间质干细胞脂肪分化的直接关系,并通过定量 PCR 检测脂肪特异基因、油红 O 染色进行脂滴染色等方法与荧光检测结果相互印证。首次发现绿色荧光蛋白的表达量可以很好地提示脂肪分化的程度,进一步证明了绿色荧光蛋白可以作为干细胞脂肪分化的观察和检测指标。

[0015] 由此,本发明建立了一种与脂肪细胞形成相关的药物的筛选方法,通过绿色荧光蛋白的表达检测可以用来筛选与脂肪细胞形成相关的药物,尤其是用于筛选促进或者抑制脂肪形成的药物,也可以用于筛选可以促进或抑制其他类型干细胞脂肪分化的相关化合物。

附图说明

[0016] 在这里,仅通过与实施例的方式来描述本发明的内容,与以下的附图有关:

[0017] 图 1 是 pLVfinal/pgk-puromycin-aP2-hrGFP 慢病毒表达质粒的构建示意图;图中,携带启动子的入门克隆 pUP-aP2、携带绿色荧光报告基因的入门克隆 pDown-hrGFP 和携带嘌呤霉素抗性基因的目的载体,在 LR 克隆酶的作用下发生位点特异的重组反应,得到表达载体 pLVfinal/pgk-puro-aP2-hrGFP,其中 hrGFP 的表达受 aP2 启动子的调控。

[0018] 图 2 是转染前(左图)、转染后(右图)细胞的光镜照片,可见转染后细胞保持细长梭形,成旋涡状生长,与转染前无明显差异。

[0019] 图 3A 是转染后骨髓间质干细胞正常成脂过程中定量 PCR 检测 aP2 基因表达的柱形图。

[0020] 图 3B 是转染后的骨髓间质干细胞正常成脂过程中用酶标仪检测绿色荧光蛋白表达的柱形图。

[0021] 图 4A 是转染后的骨髓间质干细胞正常成脂过程中加入 Ly294002 后,在分化第 15 天定量 PCR 检测 PPAR α 、LPL、aP2 基因的表达的柱形图。

[0022] 图 4B 是转染后的骨髓间质干细胞正常成脂过程中加入 Ly294002 后,在分化第 15 天用酶标仪检测绿色荧光蛋白表达的柱形图。

[0023] 图 5 是转染后的骨髓间质干细胞正常成脂过程中加入 TZD 后,在分化第 15 天用酶标仪检测绿色荧光蛋白表达的柱形图。

[0024] 图 6 是转染后的骨髓间质干细胞正常成脂过程中加入 chir99021 后,在分化第 15 天用酶标仪检测绿色荧光蛋白表达的柱形图。

具体实施方式

[0025] 实施例一:pLVfinal/pgk-puromycin-aP2-hrGFP 慢病毒表达质粒的构建。

[0026] 本实施例的目的是构建一种应用脂肪组织特异启动子 aP2 携带绿色荧光蛋白作为报告基因的载体,构建方法如图 1 所示,具体如下:

[0027] (1) 携带启动子的入门克隆:首先通过 PCR 反应扩增带有 attB4 和 attB1R 位点的序列 attB4-promoter-attB1R(如 aP2, 又称为 FABP4, 即脂肪酸结合蛋白 4, 来自美国奥克兰儿童医院研究所),然后在 BP ClonaseTM II Enzyme Mix(BP 克隆酶,从美国 Invitrogen 公司购买)作用下与入门载体 pDONRTMP4-P1R(从美国 Invitrogen 公司购买)发生 BP 位点间的重组反应,生成带启动子的入门克隆 pDONRTML4-aP2-R1。

[0028] (2) 携带报告基因的入门克隆:首先通过 PCR 反应扩增带有 attB1 和 attB2 位点的序列 attB1-reporter gene-attB2(如 hrGFP, 绿色荧光蛋白,从美国 Stratagene 公司购买),然后在 BP ClonaseTM II Enzyme Mix(BP 克隆酶)作用下与入门载体 pDONRTM221(从美国 Invitrogen 公司购买)的 attP1 和 attP2 位点发生 BP 位点间的重组反应,生成入门克隆 pDONRTM221-hrGFP。

[0029] (3) 目的载体的构建:通过酶切和连接反应将 pLenti6/BLOCK-iT-DEST 载体(从美国 Invitrogen 公司购买)中灭菌素抗性基因(blasticidin)换成嘌呤霉素(puromycin)抗性基因,构建出目的载体 pDESTpuro。

[0030] (4) 表达克隆的构建:将入门克隆 pDONRTML4-aP2-R1、pDONRTM221-hrGFP 和目的载体 pDESTpuro 以一定的比例混合,在 LR ClonaseTM II Enzyme Mix(LR 克隆酶,从美国 Stratagene 公司购买)作用下发生位点特异的重组,得到表达克隆 pLVfinal/pgk-puromycin-aP2-hrGFP(意为慢病毒表达载体,由广泛表达启动子 pgk 调控 puromycin 抗性基因的表达,aP2 基因调控 hrGFP 的表达)。

[0031] 实施例二:慢病毒的包装、浓缩和骨髓间质干细胞的转染。

[0032] 将质粒 pLVfinal/pgk-puromycin-aP2-hrGFP 与 ViraPowerTM Lentiviral Packaging Mix(包装质粒,从美国 Stratagene 公司购买)共转染 293FT 细胞(说明来源,从美国 Stratagene 公司购买)72 小时后,在荧光显微镜下观察,可见少量细胞表达强绿色荧光,细胞部分融合,细胞内可见多量病毒颗粒。收集病毒上清液高速离心后,将无色透明沉淀物用 100 μ l 1 \times PBS 溶解后。所得病毒浓缩液置于超低温冰箱保存。

[0033] 取传代后 1 天状态较好的骨髓间质干细胞,加入病毒悬液 20 μ l,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中培养。8 小时后去除含病毒的培养液,换为新鲜的培养液。第二天同样时间,再在 1ml 培养液中加入 20 μ l 病毒悬液,8 小时后换液。连续感染两次后,用低糖培养液继续培养。转染后四天,开始加入嘌呤霉素进行筛选,浓度为 1-5ug/ml,时间为 5-7 天,筛选完后即可得到稳定转染的细胞。

[0034] 转染前、后的细胞形态如图 2 所示,可见转染后细胞保持细长梭形,成旋涡状生长,与转染前无明显差异。

[0035] 实施例三:转染后骨髓间质干细胞的鉴定

[0036] (1) 细胞表面标记的检测:取生长接近融合状态的骨髓间质干细胞,用胰酶消化吹打成单细胞悬液,加入抗 CD34,CD45,CD29,CD44,CD73 和 CD166 的一抗室温孵育 30 分钟。设立同型对照和以未转染的骨髓间质干细胞作为阴性对照。

[0037] 采用流式细胞技术分析转染前后细胞的表面分子表达情况,结果显示:两组细胞均不表达 CD34 和 CD45,高表达 CD29、CD44、CD73 和 CD166;这说明,转染前后细胞的表面分子表达情况没有发生明显变化,保持了间质干细胞的特性。

[0038] (2) 成骨分化:将骨髓间质干细胞以 5 \times 10³/cm² 密度接种于 6 孔板,当细胞接近融合时开始加入含有地塞米松、 β 甘油磷酸钠和维生素 C 的成骨诱导液,诱导时间为 14 天,最后用茜素红(可以特异结合钙结节)染色的方法进行鉴定。结果可见六孔板中有大量的深红色的染色,说明细胞在分化过程中产生了大量的钙结节,证明转染后的间质干细胞保持了成骨分化的能力。

[0039] (3) 软骨分化:将 5 \times 10⁴ 细胞离心沉淀于 15ml 的离心管底,加入含有血清、TGF- β 3、胰岛素和转铁蛋白的软骨诱导液诱导 21 天,最后进行石蜡切片和用二型胶原抗体染色(二型胶原是软骨细胞特异性的标记物之一)的方法进行鉴定。染色结果显示切片上大部分细胞为染色阳性,说明转染后的间质干细胞保持了软骨分化的能力。

[0040] 间质干细胞能够向脂肪、骨和软骨三种细胞分化,本实施例对转染后骨髓间质干细胞进行成骨分化和软骨分化实验,证明转染后不会影响细胞的分化能力,可用于后面的实验。

[0041] 实施例四:转染后骨髓间质干细胞的脂肪分化

[0042] 当细胞生长至融合状态的时候,加入含有吡啶美辛、地塞米松、胰岛素和 3-异丁

基-1-甲基黄嘌呤脂肪诱导液,诱导时间为15天。在分化的第0、3、6、9、12、15天进行荧光观察和酶标仪读数,并提取RNA进行定量PCR检测成脂相关基因的表达和油红O染色,分析在不同诱导天数荧光表达量与成脂相关基因和脂滴形成的相关性。

[0043] 转染后的骨髓间质干细胞正常成脂过程中定量PCR检测aP2基因的表达情况如图3A所示,随着时间的延长,基因的表达量逐渐升高,到十五天的时候达到最大值。

[0044] 转染后的骨髓间质干细胞正常成脂过程中用酶标仪检测绿色荧光蛋白表达情况如图3B所示,随着时间的延长,绿色荧光蛋白的表达量逐渐升高,到十五天的时候达到最大值。与定量PCR的结果一致。

[0045] 实施例五:与脂肪细胞形成相关的药物的筛选示例

[0046] 本实验选用了一些已知的与脂肪细胞形成相关的药物(小分子抑制剂),利用本发明所述的方法来进行筛选,验证了本发明所述方法用于筛选与脂肪细胞形成相关的药物的可行性和有效性。

[0047] (1)Ly294002:一种常见的磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)信号通路的抑制剂,可以通过抑制脂肪形成关键转录因子PPAR α 的表达而明显抑制脂肪细胞的分化和增殖。

[0048] 当细胞生长至融合状态的时候,加入含有吡啶美辛、地塞米松、胰岛素和3-异丁基-1-甲基黄嘌呤脂肪诱导液,同时加入不同浓度的Ly294002,诱导时间为15天。在分化第0、3、6、9、12、15天进行荧光观察和酶标仪读数,并进行定量PCR检测成脂相关基因的表达和油红O染色,分析在不同诱导天数荧光表达量与成脂相关基因和脂滴形成的相关性。

[0049] 转染后的骨髓间质干细胞正常成脂过程中加入Ly294002后,在分化第15天定量PCR检测PPAR α 、LPL、aP2基因的表达情况,如图4A所示,随着浓度的升高,基因的表达量逐渐降低。

[0050] 转染后的骨髓间质干细胞正常成脂过程中加入Ly294002后,在分化第15天用酶标仪检测绿色荧光蛋白表达情况,如图4B所示,随浓度升高,绿色荧光蛋白表达量逐渐降低。

[0051] 由此,通过检测绿色荧光蛋白表达的筛选结果与定量PCR的结果一致。

[0052] (2)Chir99021:一种常见的糖原合成酶激酶-3(GSK3)信号通路的抑制剂,可以通过抑制脂肪形成关键转录因子PPAR α 和CEBP α 的表达而明显抑制脂肪细胞的分化和增殖。

[0053] 当细胞生长至融合状态的时候,加入含有吡啶美辛、地塞米松、胰岛素和3-异丁基-1-甲基黄嘌呤脂肪诱导液,同时加入不同浓度的Chir99021,诱导时间为15天。在分化的第0、3、6、9、12、15天进行荧光观察和酶标仪读数。

[0054] 转染后的骨髓间质干细胞正常成脂过程中加入TZD后,在分化第15天用酶标仪检测绿色荧光蛋白表达情况,如图5所示,随着浓度的升高,绿色荧光蛋白的表达量逐渐升高,到10 μ M荧光表达达到最大值。

[0055] (3)Thiazolidinedione(TZD):是一种噻唑烷二酮类化合物,临床上用于治疗糖尿病,主要是通过改善胰岛素抵抗达到治疗的目的。它是脂肪分化关键转录因子PPAR α 的激动剂,可以促进干细胞向脂肪细胞分化。

[0056] 当细胞生长至融合状态的时候,加入含有地塞米松、胰岛素和3-异丁基-1-甲基黄嘌呤脂肪诱导液,同时加入不同浓度的TZD,诱导时间为15天。在分化的第0、3、6、9、12、15天进行荧光观察和酶标仪读数。

[0057] 转染后的骨髓间质干细胞正常成脂过程中加入 chir99021 后,在分化第 15 天用酶标仪检测绿色荧光蛋白表达情况,如图 6 所示,随浓度升高,绿色荧光蛋白的表达量逐渐降低。

[0058] 综上所述,本发明利用转染了 aP2hrGFP 载体的间质干细胞作为与脂肪细胞形成相关的药物的筛选研究。在正常的脂肪分化实验和加入脂肪分化抑制剂 Ly294002 的实验中,通过酶标仪的检测发现绿色荧光蛋白的表达与定量 PCR 和油红 O 的染色结果相符。在进一步的脂肪分化实验中,加入脂肪形成抑制剂 chir99021 和促进剂 TZD,可以检测到绿色荧光蛋白的表达随着 chir99021 和 TZD 浓度的改变而发生相应的改变。因此,这种转染了 aP2hrGFP 载体的间质干细胞提供了一种简单的、灵敏的和精确的脂肪细胞形成相关的药物的筛选方法。

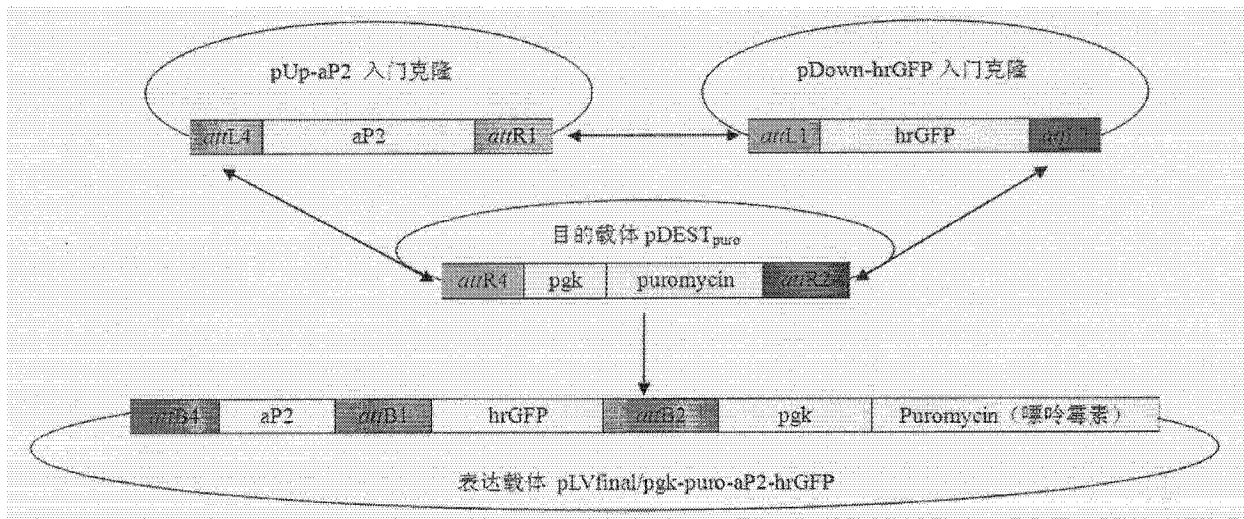


图 1

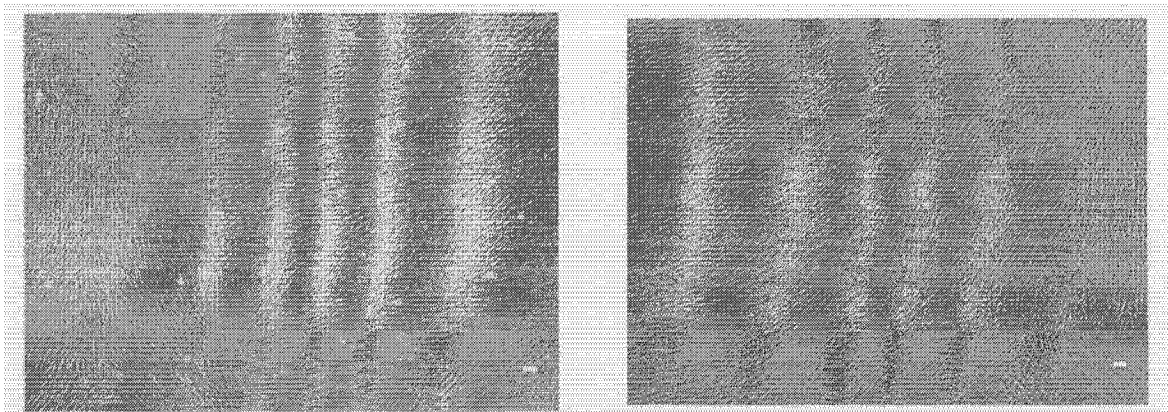


图 2

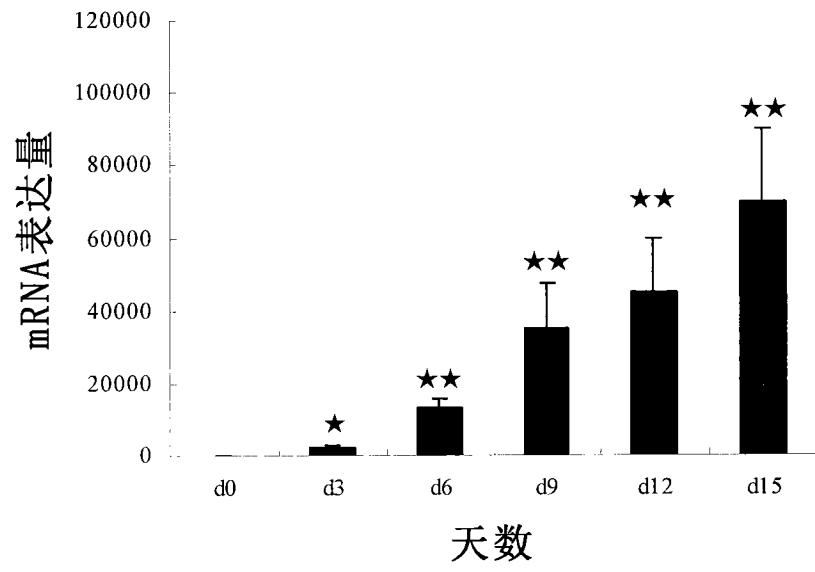


图 3A

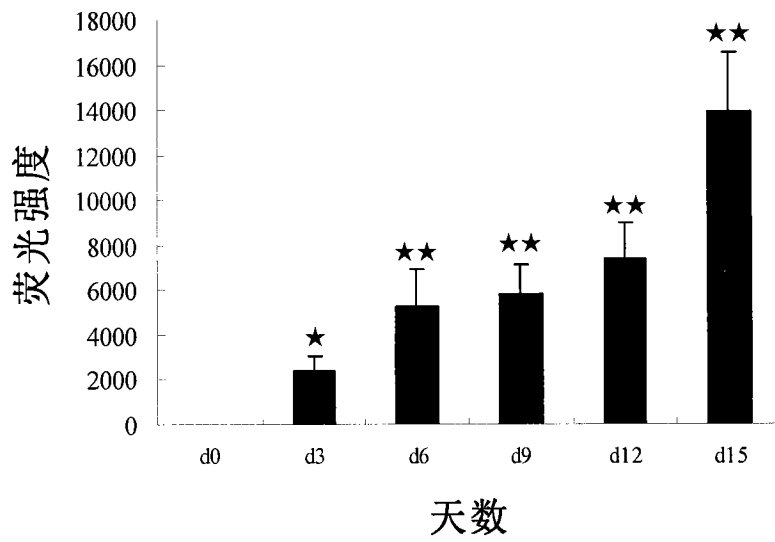


图 3B

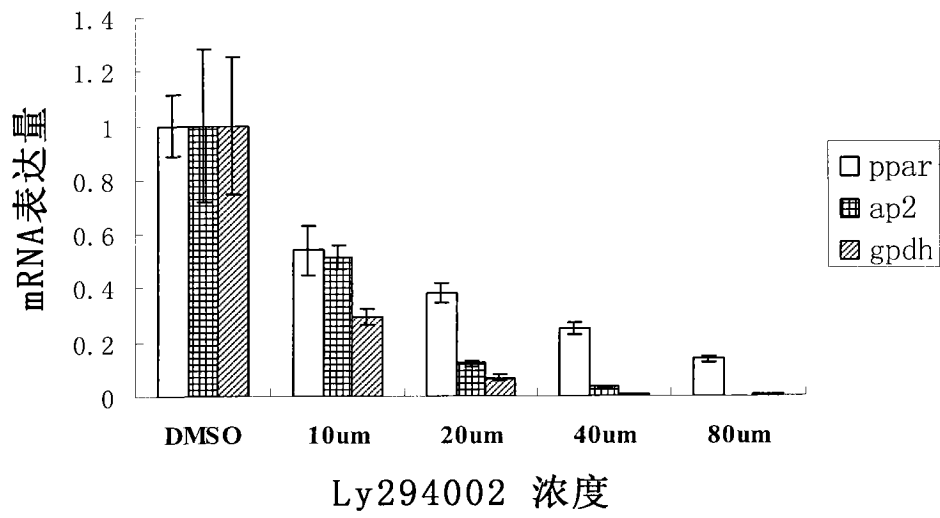


图 4A

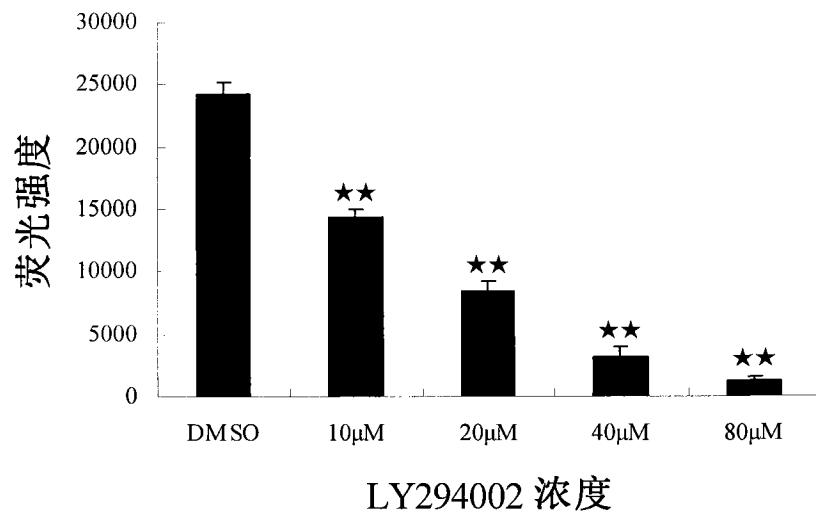


图 4B

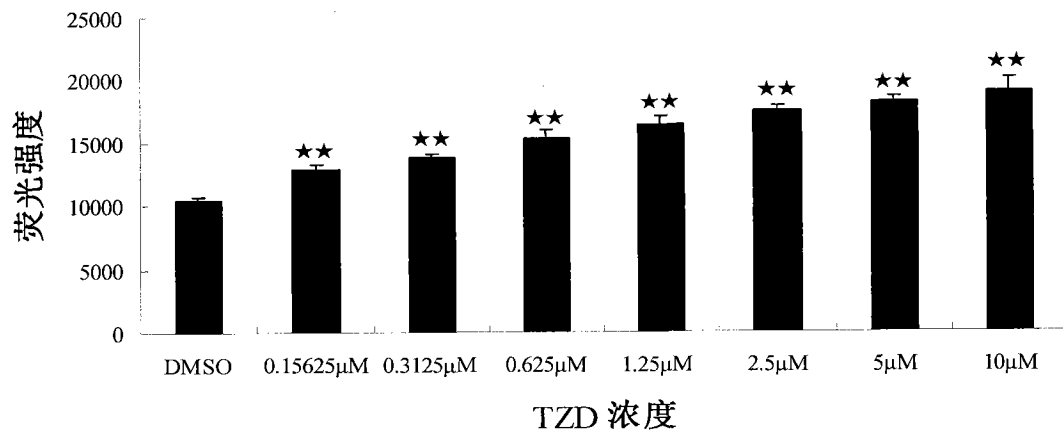


图 5

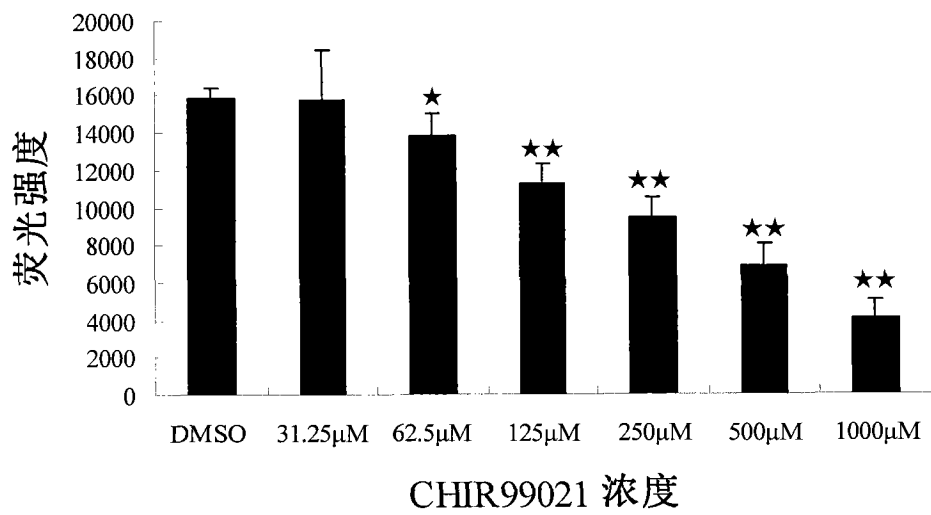


图 6

专利名称(译)	与脂肪细胞形成相关的药物的筛选方法		
公开(公告)号	CN102146435A	公开(公告)日	2011-08-10
申请号	CN201010109029.5	申请日	2010-02-05
[标]申请(专利权)人(译)	中山大学		
申请(专利权)人(译)	中山大学		
当前申请(专利权)人(译)	中山大学		
[标]发明人	项鹏 覃洁 李伟强 余伟华 张丽蓉		
发明人	项鹏 覃洁 李伟强 余伟华 张丽蓉		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/68 C12Q1/02 G01N21/64		
代理人(译)	刘宇峰		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种与脂肪细胞形成相关的药物的筛选方法，包括以下步骤：A.提供骨髓间质干细胞的特定细胞株和相关的培养条件；B.对细胞进行基因转染，引导向脂肪细胞分化，检测分化过程中荧光蛋白的表达，以及对细胞进行鉴定；C.加入待筛选的药物；以及D.检测荧光蛋白的表达情况，如果出现荧光蛋白表达下调或者上调的情形，该化合物成为与脂肪细胞形成相关的潜在候选药物。本发明建立了一种与脂肪细胞形成相关的药物的筛选方法，通过绿色荧光蛋白的表达检测可以用来筛选与脂肪细胞形成相关的药物，尤其是用于筛选促进或者抑制脂肪形成的药物。

