

## LTB4R1 抑制剂筛选方法的建立及评价

马春晓<sup>1</sup>, 万彦军<sup>1</sup>, 侯少聪<sup>1</sup>, 何淑旺<sup>2</sup>, 颜世强<sup>2</sup>, 李平平<sup>1\*</sup>

- (1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050;  
2. 山东达因海洋生物制药有限公司, 山东 威海 264333)

**摘要:**  $\omega$ 6 脂肪酸代谢产物白三烯 B4 (LTB4) 的受体白三烯 B4 受体 1 (LTB4R1) 属于 G 蛋白耦联受体 (GPCR) 家族, 是胰岛素抵抗、慢性炎症和 2 型糖尿病的潜在药物作用靶点。本文根据 GPCR 家族蛋白激活后可以引起细胞质内钙离子升高的原理, 建立了 96 孔板体系 LTB4R1 抑制剂筛选模型。胞质内钙离子探针 Fluo-8 可以表征细胞质内的钙离子变化, 当共转染 LTB4R1 和 G 蛋白  $\alpha$  亚基 16 (G $\alpha$ 16) 的仓鼠卵巢癌细胞 (CHO) 受到 LTB4 刺激后, 胞浆钙离子浓度升高, Fluo-8 的荧光信号随之增强。LTB4R1 抑制剂处理细胞后, Fluo-8 的荧光信号减弱。本文以 0.2% DMSO 为阴性对照, LTB4R1 抑制剂 cp-105696 为阳性对照建立筛选模型。经 LTB4 刺激后, 0.2% DMSO 处理的细胞 Fluo-8 信号上升约 2 倍后缓慢回落, 而 cp-105696 处理组则抑制 LTB4 的作用。LTB4 和抑制剂 cp-105696 浓度梯度实验表明, Fluo-8 的荧光信号升高幅度和抑制剂的浓度成反比, 可以作为评价待测化合物的抑制效果的指标。多次重复实验计算所得阳性与阴性对照 Z' 因子为 0.777, 证明该筛选模型稳定可靠。本文采用蛋白过表达方式在 CHO 细胞中构建了 LTB4R1-内质网钙的信号通路, 并在此基础上建立了通过检测钙信号强度来筛选化合物对 LTB4R1 抑制活性的体系。本方法可用于 LTB4R1 抑制剂先导化合物的体外初步筛选, 为后续体内研究奠定基础。

**关键词:** 白三烯 B4 受体 1; 筛选; 慢性炎症; 钙信号; Fluo-8

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)11-3316-06

## Establishment and evaluation of *in vitro* screen model for LTB4 receptor 1

MA Chun-xiao<sup>1</sup>, WAN Yan-jun<sup>1</sup>, HOU Shao-cong<sup>1</sup>, HE Shu-wang<sup>2</sup>, YAN Shi-qiang<sup>2</sup>, LI Ping-ping<sup>1\*</sup>

- (1. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Shandong DYNE Marine Biopharmaceutical Co., Ltd., Weihai 264333, China)

**Abstract:** The GPCR family component leukotriene B4 receptor 1 (LTB4R1) is the receptor of leukotriene B4 (LTB4), the metabolic product of  $\omega$ 6 fatty acid. LTB4R1 is a potential therapeutic target for the treatment of insulin resistance, chronic inflammation and type 2 diabetes. Here we established a LTB4R1 inhibitor screen model based on the GPCR family protein property that its activation causes the cytosolic escalation of calcium. The cytosolic calcium probe Fluo-8 represents the change of calcium ion. After adding LTB4, the fluorescent signal of Fluo-8 in the CHO cells which are co-transfected with LTB4R1 and G $\alpha$ 16 will change with the increase of cytosolic calcium, and LTB4R1 inhibitor blocked the effect of LTB4 on fluorescent signal of Fluo-8 in the CHO cells. Here, we used 0.2% DMSO as a negative control, and cp-105696 as a positive control in the screen model. After stimulation with LTB4, the Fluo-8 signal in 0.2% DMSO treated CHO cells increased 2 fold and fell back slowly, while the signal in

收稿日期: 2022-01-27; 修回日期: 2022-05-10.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81770800); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2021-I2M-1-016); 中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费 (2018RC350004); 北京高校卓越青年科学家计划项目 (BJJWZYJH01201910023028).

\*通讯作者 Tel: 86-10-50927273, E-mail: lipp@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0129

inhibitor (cp-105696) treated cells was not induced by LTB4. The results showed that LTB4 increased the cytosolic calcium detected by Fluo-8 in a dose dependent manner. Similarly, cp-105696 inhibited the Fluo-8 signal dose dependently, indicating that this method can quantify the inhibitory activity of the compounds. The  $Z'$ -factor, reflecting the robustness of the screen model, was 0.777 with a series of experiments. In sum, we over-expressed LTB4R1 $\alpha$  and G $\alpha$ 16 in CHO cell, used Fluo-8 to detect the calcium signal activated by LTB4, and established the *in vitro* screen model for LTB4 receptor 1.

**Key words:** leukotriene B4 receptor 1; screen; chronic inflammation; calcium signal; Fluo-8

肥胖导致的慢性炎症是引发胰岛素抵抗的重要因素。在肥胖小鼠脂肪组织的免疫细胞中,巨噬细胞占比可达 60%, 远高于正常小鼠脂肪组织中的 10%<sup>[1]</sup>。巨噬细胞在单核细胞化学趋化因子 1 的募集作用下进入脂肪组织, 被活化后表达多种促炎因子, 加剧组织内炎症反应<sup>[2]</sup>。除此之外, 这些炎症因子还可以通过两种形式影响胰岛素敏感性, 一是以旁分泌的形式直接作用于胰岛素的靶细胞, 抑制胰岛素信号转导; 二是经由介导胰岛素受体底物 1 表达来抑制胰岛素受体和胰岛素的结合, 从而引起胰岛素抵抗<sup>[3]</sup>。因此, 抑制或缓解体内的慢性炎症, 可以改善胰岛素抵抗。Li 等<sup>[4]</sup>研究发现, 白三烯 B4 受体 1 (LTB4R1) 能够导致慢性炎症和胰岛素抵抗。LTB4R1 是白三烯 B4 (LTB4) 的受体, 属于 GPCR 超家族, 拥有经典的 7 跨膜螺旋结构, 主要存在于巨噬细胞、嗜酸性粒细胞等免疫细胞中<sup>[5]</sup>。被 LTB4 激活后, LTB4R1 通过结合 G 蛋白引起免疫细胞的炎症反应, 导致免疫细胞表达分泌更多的炎症因子, 如肿瘤坏死因子- $\alpha$  和白介素 1 $\beta$  等。这些炎症因子会募集更多的免疫细胞, 进一步放大炎症反应, 形成慢性炎症。敲除小鼠的 LTB4R1 可以有效降低免疫细胞中炎症因子的表达, 缓解慢性炎症, 改善小鼠的葡萄糖耐受性和胰岛素抵抗, 说明 LTB4R1 为胰岛素抵抗和 2 型糖尿病的有效药物作用靶点<sup>[4]</sup>。因此, LTB4R1 抑制剂具有新型胰岛素抵抗治疗药物的开发前景。

内质网是细胞中的钙库, 内质网膜上的三磷酸肌醇受体到三磷酸肌醇激活会导致内质网中的钙离子外流到细胞质内<sup>[6]</sup>。这一过程可受到 GPCR 信号通路调控, GPCR 家族成员受到配体激活后, G $\alpha$ q 蛋白活化, 进而激活磷脂酶释放三磷酸肌醇, 促进内质网中的钙离子释放<sup>[7]</sup>。很多 GPCR 抑制剂筛选的经典模型即基于此原理<sup>[8]</sup>。但是细胞质中的钙离子是一个动态平衡过程, 受到激活时, 细胞质中的钙离子会急速上升至顶点, 后又慢慢回落至静息水平。因此, 筛选中需要监测钙离子由升高到降低的全过程, 以便区分钙信号的瞬时波动和受到配体激活后产生的钙信号上升。为达到此目的, GPCR 的高通量筛选一般会选择使用实时荧光检测分析系统<sup>[9]</sup>。但是由于相关仪器较为稀缺, 日

常使用不便, 而且在通量不高的情况下, 会造成试剂浪费, 因此并不适合实验室小量化合物活性验证。

作为 GPCR 家族成员, LTB4R1 也适用于这一筛选模型。LTB4R1 被 LTB4 激活后, 可以结合 Gq 蛋白 G $\alpha$ 16, 引起内质网的钙外流, 使得细胞质中的钙离子浓度上升<sup>[10,11]</sup>。本研究由此设计了 LTB4R1 的筛选方法, 即在 CHO 细胞中瞬时表达 LTB4R1 和 G 蛋白, 通过钙结合探针指示细胞质中的钙离子水平。加入化合物后, 如果细胞质中钙信号水平不随 LTB4 的加入而升高, 则初步表明该化合物为 LTB4R1 的抑制剂。

## 材料与方法

**仪器和耗材** 96 孔黑色底透细胞培养板 (Corning 公司, #3603); 荧光显微镜 (Zeiss 公司, Vert A1); 细胞培养箱 (Panasonic 公司, MCO-170AICUVL-PC); 多功能酶标仪 (Biotek 公司, Synergy H1)。

**细胞** CHO 细胞由中国医学科学院药物研究所胡卓伟实验室赠与。细胞培养在 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 的培养箱中, 并进行传代。培养基为含有 10% 血清的 DMEM 培养基, 每 2~3 天传代 1 次。

**质粒** LTB4R1 (EX-0680-M02-5) 和 G $\alpha$ 16 (EX-A0128-M13-5) 购自 Genecopoeia 公司。

**试剂** DMEM 细胞培养基 (128000-17)、胎牛血清 (16000-044) (Gibco 公司); Lipofectamine 3000 转染试剂盒 (Thermo Fisher 公司, L3000-015); Fluo-8 钙探针试剂盒 (AAT Bioquest 公司, 36315); LTB4 (Cayman 公司, 20110)。

**CHO 细胞的转染** 将连有 LTB4R1 和 G $\alpha$ 16 的哺乳动物细胞表达载体的质粒按照 2.5:1 的比例转染到 CHO 细胞中, 24~48 h 后, 收取细胞铺到 96 孔板中, 密度为 20 000 个细胞/孔。

**Fluo-8 处理细胞** 在筛选前一晚加入化合物进行孵育, 初筛筛选浓度为 10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>, 采用 DMSO 作为阴性对照。检测前, 用 Fluo-8 钙探针 37 °C 细胞培养箱孵育 25 min。Fluo-8 钙探针可以穿透细胞膜进入细胞, 在细胞质中被酯酶剪切形成羧酸集团, 无法继续穿透细胞膜, 因此存在于细胞质中。当 Fluo-8 钙探针特异

性结合钙离子后,会在 490 nm 激发光下,发出 525 nm 波长的发射光。因此可以用 490/525 nm 波长检测细胞质中的钙离子含量。

**Fluo-8 信号检测** 将 96 孔板置于多功能酶标仪中,设置程序,每孔读取静息状态下 490/525 nm 读数,记为  $R_0$ 。由酶标仪配置的滴加器加入 LTB4 至终浓度为  $100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。继续在 490/525 nm 读取 45 s。将其中最大值记为  $R_{\text{max}}$ 。将化合物的  $(R_{\text{max}}-R_0)$  和 DMSO 的  $(R_{\text{max}}-R_0)$  进行比较,计算得到  $1-(R_{\text{max}}-R_0)_{\text{化合物}}/(R_{\text{max}}-R_0)_{\text{DMSO}}$ ,则得到化合物的抑制效果。

**统计学方法** 采用  $t$ -检验进行显著性检验。统计学的显著性表示为  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$  和  $P < 0.001$ 。

## 结果

### 1 LTB4 引起共转染 LTB4R1 和 $G\alpha 16$ 的 CHO 细胞胞浆钙浓度增加

CHO 细胞中基本不表达 LTB4R1 和  $G\alpha 16$  (图 1A),当将 LTB4R1 和  $G\alpha 16$  一同转染进 CHO 细胞后,Western blot 可成功检测到 LTB4R1 和  $G\alpha 16$ ,说明共转染体系构建成功。用 LTB4 ( $400 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 处理共转染细胞,可观察到细胞质中钙离子信号显著上升,并在达到峰值后随着钙离子内流回内质网而下降 (图 1B)。荧光显微镜下观察发现,加入 LTB4 后,共转染细胞在 488 nm

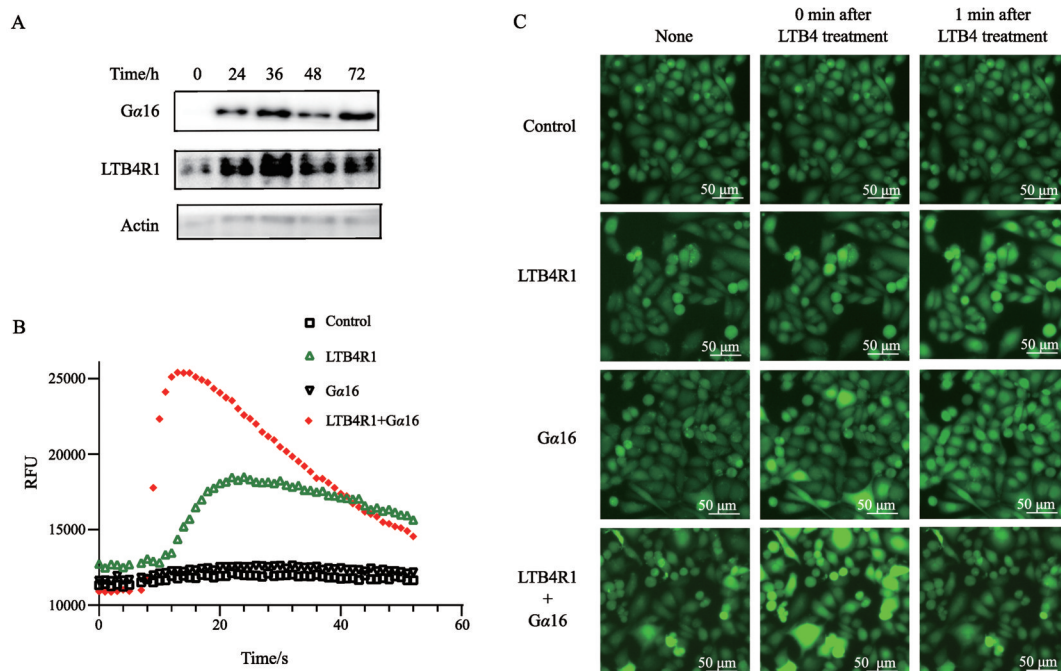
激发光下发出绿色荧光,没有转染或仅转染单个基因的细胞钙信号的上升幅度显著低于共转染组 (图 1C)。以上结果提示,LTB4 增加钙信号的过程需要 LTB4R1 和  $G\alpha 16$  共同参与。

### 2 LTB4 剂量依赖性增加转染 LTB4R1 和 $G\alpha 16$ 的 CHO 细胞胞浆中钙离子浓度

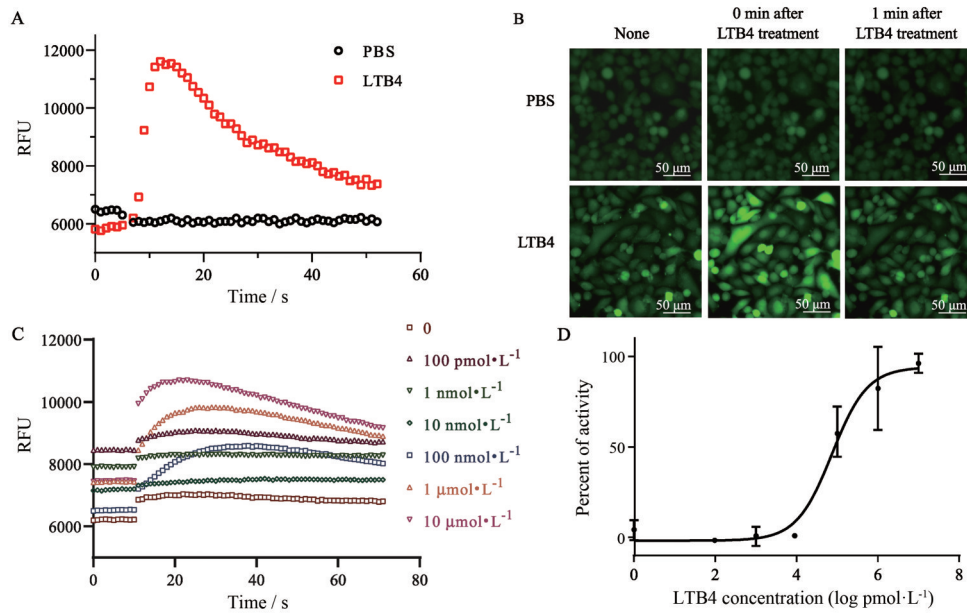
为验证 LTB4 是否剂量依赖性增加转染 LTB4R1 和  $G\alpha 16$  的 CHO 细胞胞浆中钙离子浓度,本研究首先比较 LTB4 ( $400 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 处理组和阴性对照组 (PBS) 对胞质钙离子水平的影响,发现 PBS 处理组细胞内钙离子水平在处理前后没有变化 (图 2A、B),而 LTB4 处理组则显著升高胞浆钙浓度。最后,为确定最佳 LTB4 浓度,本研究采用不同浓度的 LTB4 ( $100 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1} \sim 10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对共转染 LTB4R1 和  $G\alpha 16$  的 CHO 细胞进行刺激,发现胞质内钙信号的升高幅度和 LTB4 的浓度成正比。根据上述钙信号的激活程度拟合激活曲线,经计算确定采用  $400 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  作为筛选使用浓度 (图 2C、D)。

### 3 LTB4R1 抑制剂 cp-105696 抑制 LTB4 对胞浆钙浓度的作用

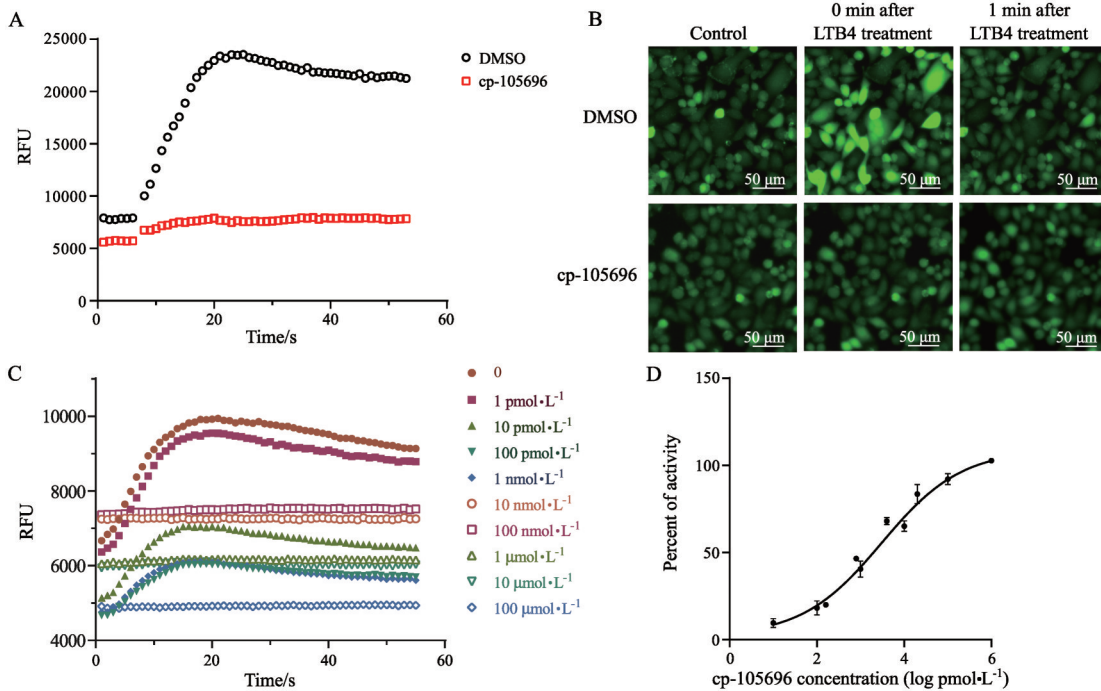
化合物 cp-105696 是已报道的 LTB4R1 抑制剂<sup>[6]</sup>。采用 cp-105696 ( $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 作为阳性对照,可以发现当 LTB4R1 信号通路受到抑制时,LTB4 刺激的胞质内



**Figure 1** LTB4 stimulated calcium transient in CHO cells transfected with LTB4R1 and  $G\alpha 16$ . A: Leukotriene B4 receptor 1 (LTB4R1) and  $G\alpha 16$  expression pattern by Western blot after transfection with LTB4R1 and  $G\alpha 16$  for 0, 24, 36, 48, and 72 h in CHO cells; B: The increase of calcium transient with leukotriene B4 (LTB4,  $400 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) stimulation by Fluo-8 calcium probe in CHO cells transfected with LTB4R1,  $G\alpha 16$ , or both; C: Immunofluorescence of the Fluo-8 calcium probe in CHO cells with LTB4 stimulation. Fluo-8 calcium probe detects cytosolic calcium and expresses green fluorescence. RFU: Relative fluorescence units



**Figure 2** LTB4 induced calcium change dose dependently in CHO cells transfected with LTB4R1 and  $G\alpha 16$ . A, B: Effect of  $400 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  LTB4 on intracellular calcium concentration using Fluo-8 calcium probe in LTB4R1 and  $G\alpha 16$  co-transfected CHO cells; C: The calcium signal by Fluo-8 calcium probe in LTB4R1 and  $G\alpha 16$  co-transfected CHO cells with stimulation of LTB4 from  $100 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$  to  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; D: The LTB4 activation curve in CHO cells.  $n = 3, \bar{x} \pm \text{SEM}$  in D



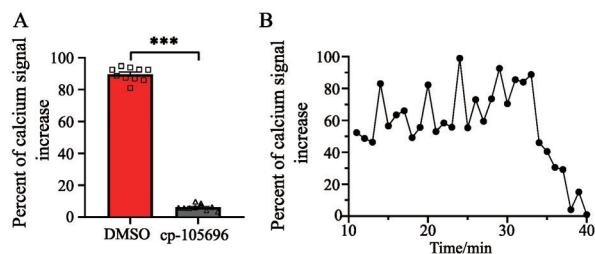
**Figure 3** LTB4R1 inhibitor cp-105696 blocked the calcium transient in CHO cells. A, B: Overnight treatment of  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  cp-105696 inhibited the calcium transient by Fluo-8 calcium probe in LTB4R1 and  $G\alpha 16$  co-transfected CHO cells; C: The calcium fluctuation in LTB4R1 and  $G\alpha 16$  transfected CHO cells with cp-105696 ( $1 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$  to  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , overnight); D: The inhibition curve of cp-105696 in CHO cells.  $n = 4, \bar{x} \pm \text{SEM}$  in D

钙信号上升受到显著抑制(图3A),细胞内由Fluo-8结合钙离子后发出的绿色荧光信号也大幅下降(图3B)。使用不同浓度的cp-105696处理细胞,发现LTB4刺激的胞质内钙信号上升幅度与抑制剂浓度呈负相关,根

据抑制程度计算cp-105696的 $IC_{50}$ 为 $3.051 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,与之前报道cp-105696的 $IC_{50}$ ( $8.42 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )相近<sup>[12]</sup>,说明胞质内钙离子信号的水平可以反映抑制剂的活性,该模型可以用于LTB4R1的抑制剂筛选。

#### 4 LTB4R1 抑制剂筛选模型评测

采用  $Z'$  因子对本 LTB4R1 筛选模型进行评测, 计算阳性对照 cp-105696 和阴性对照 DMSO 的抑制率, 组内平均值和标准差, 得到  $Z'$  因子为 0.777 (图 4A), 说明本筛选方法稳定可靠。本方法需要记录细胞从受到 LTB4 激活到细胞质内钙信号平息全过程, 共用时 1 min 左右, 使得采用普通酶标仪进行筛选时, 不能同步检测多孔板上的每一个样本, 同时 Fluo-8 的钙离子结合能力会使得细胞由于缺少钙离子而死亡。因此采用普通酶标仪进行实验时, 需要控制单次检测的样本数量, 避免因 Fluo-8 溶液处理细胞时间过久导致细胞死亡, 无法响应 LTB4 的刺激而产生的假阳性结果。为解决这一问题, 本研究检测了不同 Fluo-8 孵育时间对细胞响应刺激的能力。将细胞与 Fluo-8 孵育 30 min 后, 在不同时间点加入 LTB4 进行检测, 发现在加入 LTB4 30 min 内, 细胞均可以响应 LTB4 的刺激 (图 4B)。因此, 本研究将筛选规模定为每次 30 个样品, 以保证结果可靠。



**Figure 4** The stability and reliability of LTB4R1 screening model. A: The increase of fluorescence induced by  $400 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  LTB4 in CHO cells after vehicle and  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  cp-105696 treatment respectively; B: The increase of fluorescence induced by  $400 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  LTB4 at different time points after 30 mins of Fluo-8 calcium probe incubation in CHO cells. Increase = (peak-basal)/basal  $\times 100\%$ .  $n=10$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  in A. \*\*\* $P < 0.001$ .

#### 讨论

本文建立了一种 LTB4R1 抑制剂的筛选方法, 即利用 CHO 细胞自带的内质网钙库, 在细胞内过表达 LTB4R1 和其相应的 G 蛋白  $G\alpha 16$ , 从而构建完整的 GPCR-内质网的信号通路, 再根据 LTB4 结合 LTB4R1 会导致细胞质中钙离子浓度上升这一原理, 通过测量钙信号的强弱来检测化合物对 LTB4R1 的抑制活性。为进一步评估本筛选方法的有效性, 本研究通过 LTB4 浓度梯度实验和 LTB4R1 抑制剂 cp-105696 的浓度梯度实验, 证明了钙离子浓度上升幅度与 LTB4R1 的激活程度具有相关性, 可以用来作为检测指标, 方法可靠。

在建立筛选方法的过程中遇到的问题之一是, 细胞内的钙离子浓度是动态变化的, 加入 LTB4 刺激后,

细胞质钙信号会在数秒内升高, 然后缓慢回落, 整个变化过程需要约 1 min。在普通酶标仪上进行小规模药物筛选时, 既无法同时所有孔中加入 LTB4, 也无法监控每个孔 1 min 内的钙离子信号变化。因此, 本研究在图 4 实验中通过检测了加入 Fluo-8 钙离子螯合剂后, 细胞钙信号的稳定时间, 确定了本方法的最大检测样品数, 以免由于细胞状态受损导致钙信号降低, 从而得到假阳性结果。

本筛选方法建立过程中遇到的另一个问题是, 因不同孔细胞状态存在差异, 每次实验中静息状态下 Fluo-8 的荧光读数也会有差异, 甚至在同一实验中, 随着 Fluo-8 孵育时间增加, 细胞荧光信号也会上升。为解决这一问题, 本研究比较了 3 种反映钙信号上升幅度的统计量: 荧光信号最高值、荧光信号增长值及 LTB4 刺激后 Fluo-8 最高值与刺激前读数的比值。经比较, 前两个统计量组间差异比较大,  $Z'$  因子也过大, 而 Fluo-8 最高值和静息值的比值则较为稳定, 在多次实验中均保持在 1.8~2.2 之间, 计算得到  $Z'$  因子为 0.777, 表明采用这一指标可以很好地区分阴性对照和阳性对照, 筛选结果可靠。

MD 公司的实时荧光检测分析系统 FLIPR 常用于高通量筛选, 原理也是基于钙信号变化, 可以同时监测多孔板上的每一个样品, 但是 FLIPR 普及程度较低, 限制了该筛选模型在药物筛选中的应用。而且高通量筛选适用于对规模数以万计的化合物库进行筛选, 在化合物合成阶段或天然产物分离阶段, 化合物的积累规模较小, 采用 FLIPR 进行筛选并不合适。因此, 本筛选模型的建立扩大了钙信号筛选方法的适用范围, 克服了上述假阳性问题, 可为小规模的候选化合物筛选提供帮助。

目前 GPCR 抑制剂或激动剂筛选有多种方法。第一种方法是根据已知的 GPCR 结构, 通过分子动力学模拟小分子化合物和 GPCR 结合的最稳定模式来筛选激动剂和抑制剂<sup>[13]</sup>。该方法优点在于可以通过计算机模拟优选结合紧密的小分子骨架, 节省实验时间。缺点则是需要获得目的 GPCR 的结构, 而且模拟出的化合物需要进一步的实验检验, 因此该方法通常作为第一步筛选, 用来缩小筛选范围。第二种方法是通过检测 GPCR 下游的产物来进行 GPCR 的筛选。与  $G\alpha s$  蛋白结合的 GPCR 激活后可以引起细胞中 cAMP 的含量升高, 通过检测 cAMP 的浓度可以筛选 GPCR 的抑制剂<sup>[14]</sup>。但是这个方法仅限于结合  $G\alpha s$  蛋白的 GPCR, 有一定的局限性。第三种方法则是通过蛋白相互作用来进行 GPCR 抑制剂的筛选, 即 BRET (bioluminescence resonance energy transfer) 方法。在这种方法中, 能量

供体连接在  $G\alpha$  蛋白上, 能量受体则连接在  $G\gamma$  蛋白上, 当 GPCR 被激活时,  $G\alpha$  蛋白和  $G\gamma$  蛋白结合在一起, 能量供体和受体靠近, 通过检测 BRET 信号即可以进行筛选。这种方法需要选择适合的能量供体和受体并纯化蛋白进行标记, 建立模型需要更多条件<sup>[15]</sup>。本文利用 LTB4R1 结合  $G\alpha_q$  蛋白引起内质网钙外流的方法建立筛选模型, 与 BRET 方法相比, 不需要前期进行蛋白的纯化和标记, 建立更简单。

本文建立了基于钙信号的 LTB4R1 抑制剂筛选模型, 与其他方法相比, 本方法简单可靠, 可用于小规模药物筛选, 如分离天然产物或者先导化合物的结构优化中不需要进行高通量筛选的情况。除 LTB4R1 外, 本筛选模型也可以扩展到其他 GPCR 的抑制剂筛选, 只需将目的 GPCR 和相应的 G 蛋白过表达在工具细胞中, 加入相应配体激活后, 即可进行抑制剂的筛选。本筛选模型的缺点则是受限于酶标仪加样器无法加入多种化合物, 较难扩展到激动剂的筛选, 需要搭配多通道加样器才可进行。如以 LTB4 为阳性对照, 加入化合物后, 迅速检测细胞质中的钙离子信号是否上升, 即可判断化合物是否为 LTB4R1 的激动剂。

**作者贡献:** 马春晓负责筛选模型的建立和评测、数据整理和论文撰写; 万彦君完成了抑制剂  $IC_{50}$  的测定; 侯少聪负责论文修改; 何淑旺和颜世强提供实验所需化合物; 李平平指导实验设计及论文撰写与修改。

**利益冲突:** 全体作者声明不存在任何利益冲突。

## References

- [1] Weisberg SP, McCann D, Desai M, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112: 1796-1808.
- [2] Wentworth JM, Naselli G, Brown WA, et al. Pro-inflammatory CD11c<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity [J]. *Diabetes*, 2010, 59: 1648-1656.
- [3] Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of insulin action and insulin resistance [J]. *Physiol Rev*, 2018, 98: 2133-2223.
- [4] Li P, Oh DY, Bandyopadhyay G, et al. LTB4 promotes insulin resistance in obese mice by acting on macrophages, hepatocytes and myocytes [J]. *Nat Med*, 2015, 21: 239-247.
- [5] Tager AM, Luster AD. BLT1 and BLT2: the leukotriene B4 receptors [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2003, 69: 123-134.
- [6] Schmitz EA, Takahashi H, Karakas E. Structural basis for activation and gating of IP3 receptors [J]. *Nat Commun*, 2022, 13: 1408.
- [7] Dickson EJ, Falkenburger BH, Hille B. Quantitative properties and receptor reserve of the IP3 and calcium branch of Gq-coupled receptor signaling [J]. *J Gen Physiol*, 2013, 141: 521-535.
- [8] Ma Q, Ye L, Liu H, et al. An overview of  $Ca^{2+}$  mobilization assays in GPCR drug discovery [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2017, 12: 511-523.
- [9] Arkin MR, Connor PR, Emkey R, et al. FLIPR™ Assays for GPCR and ion channel targets [M] // Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, et al. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2012: 1-33.
- [10] Peres CM, Aronoff DM, Serezani CH, et al. Specific leukotriene receptors couple to distinct G proteins to effect stimulation of alveolar macrophage host defense functions [J]. *J Immunol*, 2007, 179: 5454-5461.
- [11] Liu AM, Ho MK, Wong CS, et al.  $G\alpha(16/z)$  chimeras efficiently link a wide range of G protein-coupled receptors to calcium mobilization [J]. *J Biomol Screen*, 2003, 8: 39-49.
- [12] Showell HJ, Pettipher ER, Cheng JB, et al. The *in vitro* and *in vivo* pharmacologic activity of the potent and selective leukotriene B4 receptor antagonist CP-105696 [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995, 273: 176-184.
- [13] Kruse AC, Hu J, Pan AC, et al. Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor [J]. *Nature*, 2012, 482: 552-556.
- [14] Vasudevan NT. cAMP assays in GPCR drug discovery [J]. *Methods Cell Biol*, 2017, 142: 51-57.
- [15] Stoddart LA, Johnstone EKM, Wheal AJ, et al. Application of BRET to monitor ligand binding to GPCRs [J]. *Nat Methods*, 2015, 12: 661-663.