

建立大麻素 1 型受体激动剂的细胞筛选模型

王晓彤, 张程璐, 薄茹雪, 周诗绮, 陈乃宏, 苑玉和*

(中国医学科学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: 大麻素受体是中枢神经系统表达丰富的 G 蛋白偶联受体, 也是治疗炎症、疼痛及药物滥用潜在的药物靶点。大麻素受体主要包括大麻素 1 型受体 (cannabinoid type 1 receptor, CB1R)、大麻素 2 型受体 (cannabinoid type 2 receptor, CB2R) 及其他受体。CB1R 在调节中枢记忆、认知和运动等方面发挥关键作用, 因此筛选具有激动 CB1R 活性的化合物具有治疗神经系统疾病的潜在价值。本研究使用的载体质粒将 CB1R 胞内第三环 (intracellular loop 3, ICL3) 基因序列置换为环状绿色荧光蛋白 (circular-permutated enhanced green fluorescent protein, cpEGFP)。慢病毒包装后感染 HEK 293T 细胞, 经嘌呤霉素筛选获得高表达 CB1R-cpEGFP 的稳定细胞株。当激动剂与 CB1R 结合后, 膜受体构象发生改变, 膜受体 cpEGFP 的发色团去质子化产生绿色荧光, 通过检测荧光强度评价激动 CB1R 的活性物质。本研究利用 CB1R 激动剂花生四烯酸-2'-氯乙酰胺 (arachidonyl-2'-chloroethylamide, ACEA) 作为阳性对照评价模型的可靠性。研究发现, ACEA 可激活细胞模型受体, 表现为荧光强度增加, 这种效应能够被 CB1R 特异性拮抗剂利莫那班 (rimonabant) 阻断, 导致荧光消失。本研究利用荧光探针成功构建 CB1R 激动剂细胞筛选模型。

关键词: 大麻素 1 型受体; 细胞模型; 大麻素 1 型受体激动剂; 药物筛选; 环状绿色荧光蛋白

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)06-1603-08

Establishment of a screening cell model for cannabinoid type 1 receptor agonists

WANG Xiao-tong, ZHANG Cheng-lu, BO Ru-xue, ZHOU Shi-qi, CHEN Nai-hong, YUAN Yu-he*

(State Key Laboratory of Bioactive Substances and Functions of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Cannabinoid receptors are one of the most expressed G protein-coupled receptors in the central nervous system, which are potential drug targets for inflammation, pain and drug abuse. Cannabinoid receptors are composed of type 1 receptor (CB1R), type 2 receptor (CB2R) and other receptors, of which CB1R plays a vital role in regulating central memory, cognition, and motor function. Therefore, screening CB1R agonists has potential value in treating nervous system diseases. In this study, the intracellular loop 3 (ICL3) domain of CB1R was replaced with a circular-permutated enhanced green fluorescent protein (cpEGFP). After infecting HEK 293T cells with lentivirus particles, we obtained a stable cell line that was overexpressed human CB1R-cpEGFP after puromycin selection. The interaction between receptor agonists and CB1R led to the change of receptor conformation, resulting in de-protonation of the EGFP, and enhancing the fluorescence intensity. Therefore, active CB1R compounds could be verified by measuring the fluorescence intensity. Using CB1R agonist arachidonyl-2'-chloroethylamide (ACEA) as a positive control to evaluate the reliability of this model, studies have shown that ACEA could induce receptor activation and increase fluorescence intensity, while antagonist rimonabant inhibited

收稿日期: 2022-08-22; 修回日期: 2023-03-24.

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (7212156); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2021-I2M-1-026); 国家卫生健康委员会毒品依赖和戒治重点实验室开放课题 (2020DAMOP-008).

*通讯作者 Tel: 86-10-50927212, E-mail: yuanyuhe@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1006

receptor activation with unchanged fluorescence intensity. In conclusion, this study successfully constructed a fluorescent probe screening model for CB1R agonists.

Key words: cannabinoid type 1 receptor; cell model; cannabinoid 1 receptor agonist; drug screening; circular-permuted enhanced green fluorescent protein

大麻素受体 (cannabinoid receptors, CBRs) 属于 7 次跨膜的 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs)。哺乳动物 CBRs 主要由 CB1R 和 CB2R 组成。CB1R 主要分布于中枢神经系统, 嗅球、海马、基底神经节和小脑等脑区 CB1R 蛋白表达水平较高^[1]。研究显示, CB1R 通过多种途径调节神经系统功能^[2]: 该受体主要位于神经元突触前^[3]和突触后部位^[4], 传导内源性大麻素的逆行信号和介导特定神经元的自我抑制; 它也以较低的水平表达于胶质细胞, 间接调控突触的可塑性^[5]; 此外, CB1R 还在周围神经系统神经元表达, 与病理性疼痛密切相关^[6,7]。鉴于 CB1R 在机体内发挥广泛的神经精神类效应, 因此获取能激动 CB1R 功能的活性物质对改善生理机能或缓解病理发展有重要意义。

研究表明, CB1R 激动剂通过激活 CB1R 与 G 蛋白偶联, 招募下游 β -arrestin^[8,9], 进而影响认知、情绪、睡眠和疼痛等多种生理过程^[10-12]。目前 CB1R 经典的选择性激动剂主要包括 AM-1235、ACEA、CP 50556-1、CP-55940、HU-210、JWH-007、JWH-018、JWH-200 (WIN55225)、O-1812、UR-144 和 WIN 55212-2。由于 GPCRs 家族在体内广泛表达, 以 GPCRs 为靶点的新药研发是制药公司开发的重点。目前, 药物发现的主要方式是利用化合物或多肽进行临床相关 GPCRs 计算和高通量筛选 (high-throughput screening, HTS)^[13]。哺乳动物细胞 GPCRs 的内源性表达通常很低, 为了提高筛选实验中功能性 GPCRs 的蛋白含量, 通常在工具细胞中过表达异源 GPCRs。在细胞水平检测第二信使浓度的变化能够反映配体与 GPCRs 的相互作用, 发现可以调节 GPCRs 活性的化合物, 但这一方法存在诸多局限性。首先, 人源 GPCRs 在其内源性组织以外的表达有时需要添加表达标签来报告其定位和蛋白含量, 这种占位性标签可能会影响配体受体的结合。第二, 考虑到所有的 GPCRs 均通过相同的 4 个 $G\alpha$ 蛋白家族偶联, 仅少数几种二级信使的浓度发生变化, 因此极大可能发生信号通路之间的串扰。第三, 与其他细胞水平的分析方法类似, 在 GPCRs 的细胞筛选方法中, 化合物可能本身就会导致报告基因输出变化, 导致假阴性和假阳性。如化合物在报告基因检测条件的相同波长处发射荧光, 产生假阳性结果^[14]。

本研究通过感染和筛选, 成功构建稳定表达人源 CB1R 的 HEK 293T 细胞系^[15]。研究表明, ICL3 连接受体跨膜螺旋 5 和 6, 当激动剂与受体结合时, ICL3 包括置换后的 cpEGFP 均会发生较大的构象变化^[16]。检测原理如图 1 所示: 受体激动剂与细胞膜上的 CB1R 发生相互作用后, 受体被激活, CB1R 构象发生改变, 驱使 cpEGFP 发色团去质子化, 绿色荧光强度随之增加 (图 1)。在本研究中, 荧光强度的不同可反映受体活性的改变, 使用 CB1R 特异性拮抗剂利莫那班 (rimonabant) 预孵育可以阻断 CB1R 激动剂激活 CB1R-cpEGFP, 以进一步验证模型的可靠性。结果显示, 荧光强度即受体活性, 随着细胞密度、激动剂浓度、激动剂种类的不同而发生变化; CB1R 拮抗剂 rimonabant 预孵育可阻断 CB1R 激动剂激活 CB1R-cpEGFP, 荧光消失。本研究已成功建立 CB1R 激动剂的药物筛选细胞模型, 可用于评价具有 CB1R 激动作用的活性物质。

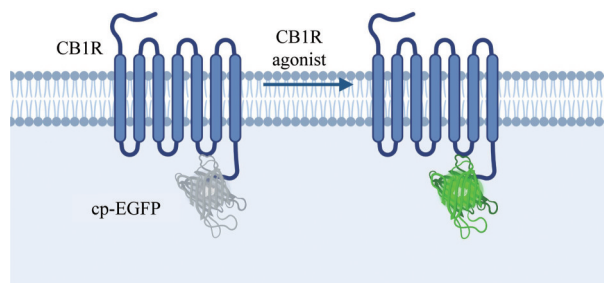


Figure 1 The principle of cell screening model for CB1R agonists. This screening method utilized the CB1R-cpEGFP sensor to reflect changes of ligand-induced receptor conformation by detecting fluorescence intensity (from biorender). CB1R: Cannabinoid type 1 receptor; cpEGFP: Circular-permuted enhanced green fluorescent protein

材料与方法

细胞株 人胚肾细胞系 HEK 293T 细胞为本实验室保存。常规培养于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱。

试剂 花生四烯酸-2'-氯乙酰胺 (arachidonyl-2'-chloroethylamide, ACEA)、多聚赖氨酸 (poly-L-lysine, PLL)、葡萄糖购自美国 Sigma 公司; WIN 55212-2、Bay 59-3074 购自上海陶素公司; rimonabant、嘌呤霉素购自

美国 Selleck 公司; 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 购自美国 Roche 公司; HEPES 购自美国 Amresco 公司; 高糖 DMEM、胎牛血清购自 Gibco 公司; 氯化钠、氯化镁购自天津福晨化学试剂公司; 氯化钾购自北京通广精细化工公司; 氯化钙购自国药化学试剂有限公司; pdisplay-eCB2.0-IRES-mCherry-CAAX 载体由北京大学李毓龙实验室惠赠^[15]; 慢病毒载体 (66334-1, CON254) 由吉凯基因公司包装。

仪器 EnSpire 多功能读板仪购自 PerkinElmer 公司; 二氧化碳培养箱购自 Thermo 公司。

载体的构建与包装 本研究以载体 pdisplay-eCB2.0-IRES-mCherry-CAAX 为模板, 通过 PCR 扩增 CB1R-cpEGFP 基因片段, 克隆于载体 GV208, 测序正确后, 由吉凯基因公司包装为过表达 CB1R-cpEGFP 的慢病毒载体 (GV348), 用于稳定株的构建。

嘌呤霉素浓度的确定 按照每毫升 1×10^5 个细胞数将 HEK 293T 细胞接种于 24 孔板, 随后在 37°C 、5% CO_2 条件下培养 24 h。待细胞生长至 95% 左右, 使用无血清培养基将嘌呤霉素稀释到不同浓度, 分别为 4、6、8、10、12、14 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在 37°C 、5% CO_2 条件下继续培养细胞, 并根据细胞状态进行适时换液, 连续观察 7 天, 选择能在 7 天内完全杀死细胞的最低浓度作为嘌呤霉素的工作浓度。

稳定转染细胞株的建立 构建和筛选稳定表达 CB1R-cpEGFP 的 HEK 293T 细胞, 在细胞处于对数生长期时开展实验。将 HEK 293T 细胞接种于 12 孔板中 (细胞密度为每毫升 1×10^5 个), 37°C 、5% CO_2 培养箱培养 24 h。制备病毒稀释液, 以感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 值为 30 感染细胞。根据细胞生长状况进行换液, 加入 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 嘌呤霉素进行筛选, 共筛选 4 天。随后, 以嘌呤霉素 ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 作为维持浓度继续扩大培养。

荧光检测方法 提前使用 PLL 包被不透光黑底 96 孔板, 按照不同的细胞密度种板, 37°C 、5% CO_2 培养箱培养 24 h, 待细胞完全贴壁后, 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ Hank's 平衡盐溶液 (Hank's balanced salt solution, HBSS) 清洗细胞, 随后加入 $90 \mu\text{L}$ 含 0.1% BSA 的 HBSS 孵育 20 min。基线荧光值至少连续监测 5 min, 正式检测前, 每孔加入 $10 \mu\text{L}$ 10 倍对应浓度的化合物或同等浓度的溶剂对照稀释液, 连续检测 30 min, 每分钟一次。为了探究 CB1R 特异性拮抗剂 rimonabant 对特定化合物激活的 CB1R-cpEGFP 是否有阻断作用, 使用 $10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ rimonabant 或溶剂对照提前孵育 30 min, 随后加入激动剂进行检测。所有的实验使用不透光黑色 96 孔板 (购自 Corning 公司), 使用 $488 \pm 10 \text{nm}$ 范围

内的激发光和 $561 \pm 10 \text{nm}$ 处的发射光检测荧光强度。

细胞延时成像拍摄 提前使用 PLL 包被 35mm 玻璃底共聚焦培养皿, 按照一定细胞密度种板, 37°C 、5% CO_2 培养箱培养 24 h, 待细胞完全贴壁后, 首先每孔加入 1mL HBSS 清洗细胞, 随后每孔加入 $900 \mu\text{L}$ 含 0.1% BSA 的 HBSS 孵育 20 min。平衡后将培养皿放置到载物台, 转动细准焦螺旋进行调焦, 直至视野清晰, 开始拍摄。在第 5 min 加入 $100 \mu\text{L}$ 10 倍对应浓度的 ACEA 或者 DMSO 稀释液。拍摄条件: $\times 40$ 水镜/以 30 s 间隔拍摄 15 min。激发光波长: $488 \pm 10 \text{nm}$, 发射光波长: $561 \pm 10 \text{nm}$ 。图像采集采用荧光激光扫描共聚焦显微镜 (徕卡 TCS SP2, 德国), 并通过徕卡共聚焦软件输出。

统计学分析 在配体添加之前和之后至少同时检测 3 个单独的荧光读数 (分别为 $\text{signal}_{\text{basal}}$ 和 $\text{signal}_{\text{stim}}$)。为了量化这一变化, 计算激动剂作用后第 5 min 每个孔的 $\Delta\text{Fluorescence}$ 作为基础百分比 ($[(\text{signal}_{\text{stim}} - \text{signal}_{\text{basal}})/\text{signal}_{\text{basal}}] \times 100\%$)。随后减去空白对照的平均 $\Delta\text{Fluorescence}$ 得 ΔF 。使用 GraphPad Prism 7.0 软件进行分析。数据分析采用 one-way ANOVA 单因素方差分析。本研究中实验均至少重复 3 次, 数据以平均值 \pm 标准误差表示, $P < 0.05$ 被认为有统计学差异。

为了量化 CB1R 特异性拮抗剂 rimonabant 对特定化合物激活的 CB1R-cpEGFP 的阻断作用, 记录激动剂加入前 5 min 基线荧光值并取均值作为 $\text{signal}_{\text{basal}}$, 记录激动剂加 5 min 后荧光值 $\text{signal}_{\text{stim-5min}}$, 根据计算公式: $\Delta\text{Fluorescence} = [(\text{signal}_{\text{stim}} - \text{signal}_{\text{basal}})/\text{signal}_{\text{basal}}] \times 100\%$, 得到第 10 min $\Delta\text{Fluorescence}$ 。随后减去空白对照的平均 $\Delta\text{Fluorescence}$ 得到 ΔF 。

结果

1 细胞密度对 CB1R 活性的影响

为了探究细胞密度对 CB1R 活性的影响, 以确定最佳细胞密度进行后续筛选, 实验设置 5 个密度梯度, 每毫升细胞数分别为: 8×10^4 、 1×10^5 、 3×10^5 、 5×10^5 和 7×10^5 个。ACEA 是一种强效特异性 CB1R 激动剂。使用相同浓度的 ACEA 刺激不同密度的细胞, 即可检测受体活性的不同变化。在本研究中, 荧光强度的变化直接反映受体的激活情况, 而荧光值的大小则代表荧光强度的高低, 因此应用荧光值代表受体活性的高低。结果显示, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ACEA 刺激稳定表达 CB1R-cpEGFP 的 HEK 293T 细胞后, CB1R 被激活, 荧光值随着细胞密度的增加而增加。在设定的 5 个细胞密度梯度下, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ACEA 均明显诱导荧光强度的增加 ($P < 0.001$)。当细胞密度为每毫升 7×10^5 个时, 荧光值

达到最大 (图 2A), 第 10 min ΔF 值为 $172.76\% \pm 23.05\%$ (图 2B)。因此, 本方法采用每毫升 7×10^5 个的细胞数进行后续检测。

为进一步验证筛选模型的特异性, 在加入 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACEA 刺激细胞前, 应用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CB1R 特异性拮抗剂 rimonabant 孵育细胞 30 min, 根据材料中计算方法得到 ΔF 。结果显示, 在 5 个细胞密度梯度下, 经 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rimonabant 预处理, ACEA 均无法激动细胞膜受体, ACEA 作用的第 5 min ΔF 值与对照组相比, 无显著性差异; 与未经拮抗剂处理组 (每毫升细胞数为 8×10^4 、 1×10^5 、 3×10^5 、 5×10^5 和 7×10^5 个) 相比, 拮抗剂处理组第 5 min ΔF 值均显著性降低 (图 2B)。因此, 在不同细胞密度条件下, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACEA 引起的 CB1R-cpEGFP 的激活均能被 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rimonabant 所阻断, 进一步验证本筛选模型的可行性。

2 激动剂 ACEA 的浓度对 CB1R 活性的影响

为了探究激动剂的浓度对 CB1R 活性的影响, 本研究给予不同浓度的 ACEA (0.01 、 0.05 、 0.1 、 1 、 5 和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 刺激细胞来检测受体的激活情况, 同时设立溶剂对照组 (不加 ACEA)。结果显示, 在每毫升 7×10^5 个细胞密度条件下, 不同浓度 ACEA 激动 CB1R 后, 产生的荧光强度不同, 其中 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACEA 可以诱导产生最高的荧光值 (图 3A)。ACEA (0.1 、 1 、 5 和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 刺激 CB1R 过表达细胞后, 第 5 min ΔF 值与溶剂对照组相比, 均显著增加 ($P < 0.001$)。ACEA ($0.05 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 也能够产生明显的荧光变化 ($P < 0.05$)。在本实验条件下, 最适 ACEA 浓度为 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其第 5 min ΔF 值为 $181.34\% \pm 56.85\%$ (图 3B)。为了更加形象地展示细胞荧光的动态变化, 本研究应用 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACEA 刺激细胞进行荧光时间序列成像拍摄, 与溶剂对照组 (图 3C) 相比, $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACEA 加入培养皿后, 细胞膜能够观察到明亮的绿色荧光, 且在 15 min 内基本保持不变 (图 3D)。

为进一步验证筛选模型的特异性, 在加入不同浓

度 ACEA 刺激细胞前, 应用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CB1R 特异性拮抗剂 rimonabant 孵育细胞 30 min, 根据材料中计算方法得到 ΔF 。结果显示, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rimonabant 预处理后, 不同浓度的 ACEA 均无法激动细胞膜受体, 第 10 min ΔF 值与对照组相比, 无显著性差异; 与未经拮抗剂处理组 (ACEA: 0.05 、 0.1 、 1 、 5 和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 相比, 拮抗剂处理后细胞第 5 min ΔF 值均显著性降低 (图 3B)。为了更加形象地展示细胞荧光的动态变化, 应用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rimonabant 或溶剂对照预孵育细胞 30 min 后, 加入 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACEA 刺激细胞进行荧光时间序列成像拍摄。与溶剂对照组 (图 3E) 相比, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rimonabant 预孵育后, 细胞膜没有明显的绿色荧光 (图 3F)。上述结果均表明, CB1R 特异性拮抗剂 rimonabant 能够阻断不同浓度 ACEA 引起的 CB1R-cpEGFP 的激活, 表现为膜受体不能产生强烈的荧光。

3 激动剂的种类对 CB1R 活性的影响

不同种类的激动剂与 CB1R 结合口袋的结合位点并不完全一致, 致使受体被激活情况存在差异。本研究应用 3 种 CB1R 激动剂 ACEA、WIN 55212-2 和 Bay 59-3074 (0.1 、 1 和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 刺激细胞以检测受体的激活情况, 同时设立溶剂对照组。结果显示, 在每毫升 7×10^5 个的细胞密度条件下, 不同种类的 CB1R 激动剂刺激细胞后, 产生的荧光值不同 (图 4A~C)。在相同浓度下, 3 种激动剂诱导产生的荧光度值比较如下: ACEA > WIN 55212-2 > Bay 59-3074, 提示 3 种激动剂与受体的亲和力并不相同, 与文献^[17,18]报道的研究结果一致, 由此表明相同浓度的激动剂, 受体荧光强度的改变可反映受体的亲和性。其中, ACEA (0.1 、 1 和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 WIN 55212-2 (0.1 、 1 和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在第 5 min ΔF 值与对照组相比, 荧光强度显著增加 ($P < 0.001$), 表明受体已被激活 (图 4D~F)。

为进一步验证筛选模型的特异性, 在加入不同 CB1R 激动剂刺激细胞前, 应用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CB1R 特

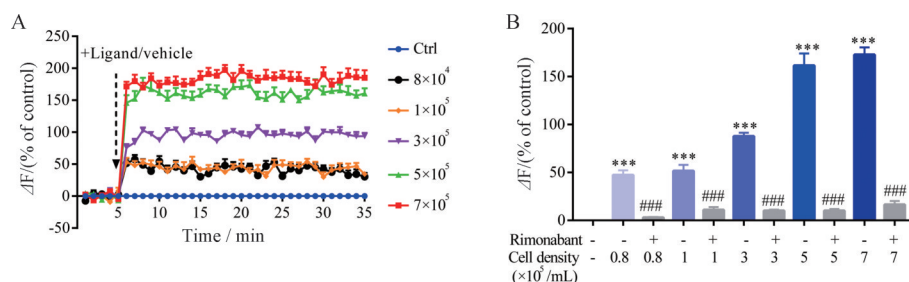


Figure 2 The effect of cell density on CB1R activity. A: ΔF value time-course response at different cell densities upon stimulation with $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ arachidonyl-2'-chloroethylamide (ACEA); B: ΔF value at the 5th min induced by $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACEA with or without pretreatment with $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rimonabant. All experiments were performed using HEK 293T cells stably expressing CB1R-cpEGFP sensors. $n = 3$, $x \pm \text{SEM}$. *** $P < 0.001$ vs Ctrl group; #### $P < 0.001$ vs ACEA activated groups without rimonabant

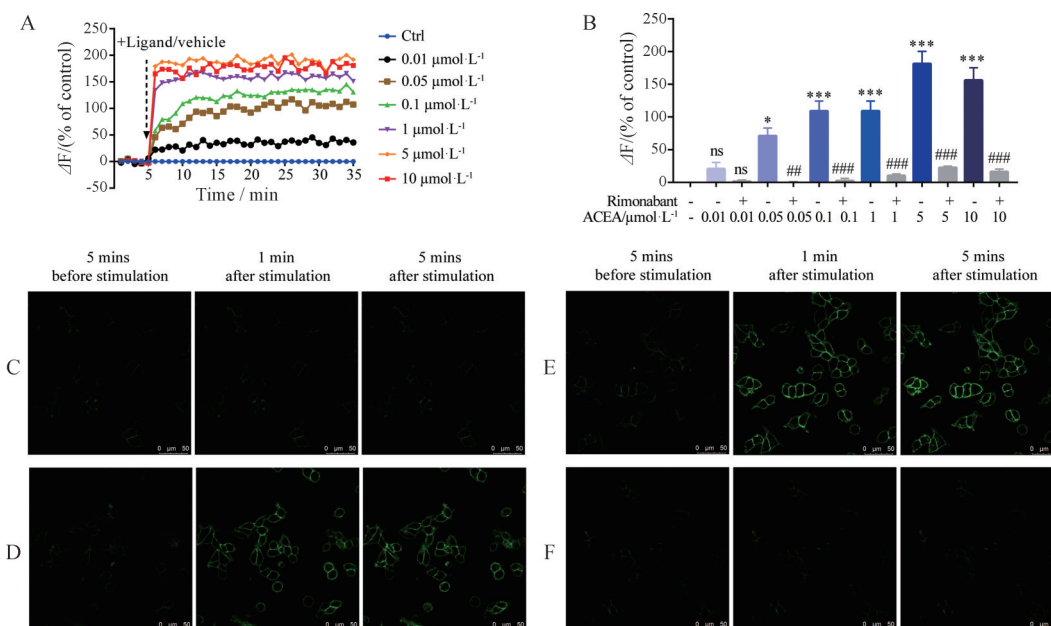


Figure 3 Effect of agonist ACEA concentration on CB1R activity. A: Under the same cell density, ΔF value time-course response upon stimulation with different concentrations of ACEA; B: ΔF value at the 5th min induced by different concentrations of ACEA with or without pretreatment with 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rimonabant; C, D: Fluorescence time-lapse imaging of cells upon stimulation with 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ solvent control (C) and ACEA (D); E, F: Pre-incubated with 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of solvent control (E) or rimonabant (F) for 30 min, fluorescence time-lapse imaging of cells upon stimulation with 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACEA. All experiments were performed using HEK 293T cells stably expressing CB1R-cpEGFP sensors. $n = 3$, $x \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs Ctrl group; ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$ vs ACEA activated groups without rimonabant

异性拮抗剂 rimonabant 孵育细胞 30 min, 记录并计算得到激动剂作用第 5 min ΔF 。结果显示, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rimonabant 预处理后, ACEA、WIN 55212-2 和 Bay 59-3074 (0.1、1 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 均无法激动细胞膜受体, 第 5 min ΔF 值与对照组相比, 无显著性差异 (图 4D~F); 另外, 与未经拮抗剂处理组 (ACEA: 0.1、1 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; WIN 55212-2: 0.1、1 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 相比, 拮抗剂处理后细胞第 5 min ΔF 值均显著性降低 (图 4D~F)。以上结果证明, CB1R 激动剂引起的 CB1R-cpEGFP 的激活均能被 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rimonabant 所阻断。

4 Rimonabant 抑制 ACEA 对 CB1R 的激动作用

本实验建立的细胞模型依赖于配体受体相互作用, 受体构象发生变化后促使 cpEGFP 发色团去质子化, 随之受体分子产生明显荧光。因此, 配体受体相互作用被抑制剂或拮抗剂阻碍时, 受体不能被激活或者构象不发生改变, 表现为荧光度值不会显著增加。Rimonabant 是 CB1 的特异性抑制剂, 提前加入 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rimonabant 或溶剂对照与细胞孵育 30 min 后, 再加入 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 激动剂 ACEA (A⁺) 或溶剂对照 (A⁻) 刺激细胞, 通过记录荧光度值的变化来反映受体的活性改变。结果显示, rimonabant 预处理后 (R⁺),

ACEA 无法激动细胞膜受体, 无法诱导荧光度值显著增加 (R⁺A⁺), 而应用溶剂对照预先孵育细胞 (R⁻), ACEA 能够成功激动 CB1R, 荧光度值显著增强 (R⁺A⁺) (图 5A), R⁺A⁺ 组第 5 min ΔF 值与 R⁻A⁻ 组相比, 荧光值显著升高 ($P < 0.001$, 图 5B)。为了进一步探究 rimonabant 剂量与受体抑制效应的关系, 应用不同浓度 rimonabant (0.01、0.05、0.1、1、5 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 预处理后, 加入激动剂 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACEA 刺激细胞。结果显示, 随着 rimonabant 浓度的降低, CB1R 抑制作用减弱 (图 5C、D)。

讨论

CB1R 是 7 次跨膜受体, 胞内含有一个与 Gi/Go 蛋白异质三聚体相互作用的结构域。一旦被激动剂激活后, CB1R 结构改变, Gi/Go 被激活, 从而抑制 cAMP 的合成, 促进 Ca²⁺ 通道的开放, 激活有丝分裂活化蛋白激酶^[19]。目前研究认为 CB1R 可以活化多个通路, 不同 CB1R 激动剂具有不同的分子结构, 不同激动剂基于不同分子结构可以偏向激动受体, 引起信号通路差异激活^[20,21]。这也导致不同 CB1R 激动剂与 CB1R 结合的亲和力和效应存在差异。

多项研究表明, CB1R 参与中枢神经系统疾病的

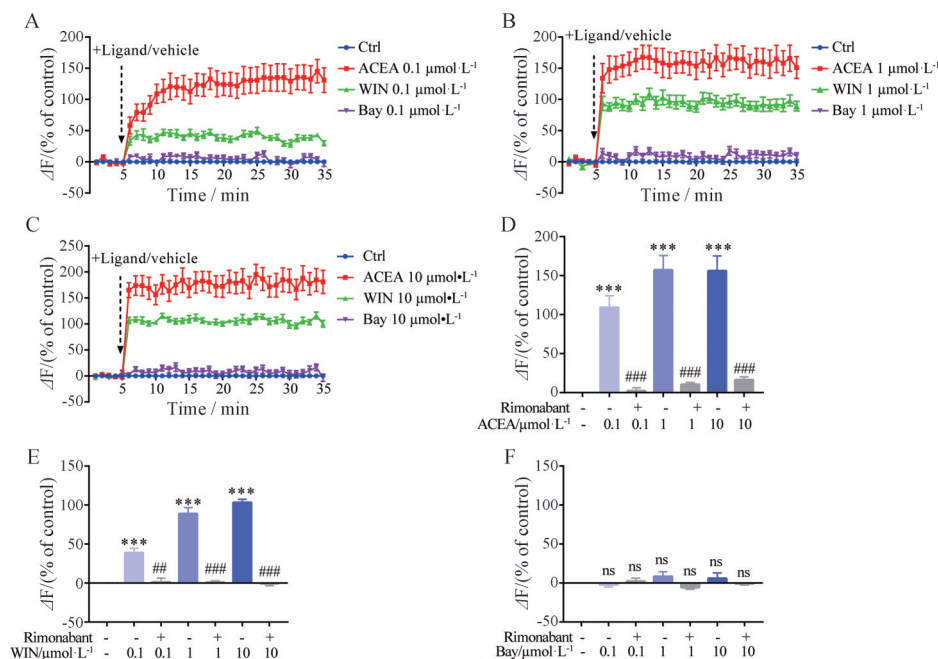


Figure 4 Effects of different agonists on CB1R activity. ΔF value time-course response upon stimulation with 0.1 (A), 1 (B), 10 (C) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ agonists; D–F: ΔF value at the 5th min induced by CB1R agonists with or without pretreatment with 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rimonabant. All experiments were performed using HEK 293T cells stably expressing CB1R-cpEGFP sensors. $n = 3$, $x \pm \text{SEM}$. *** $P < 0.001$ vs Ctrl group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs CB1R agonists activated groups without rimonabant. WIN: WIN 55212-2; Bay: Bay 59-3074

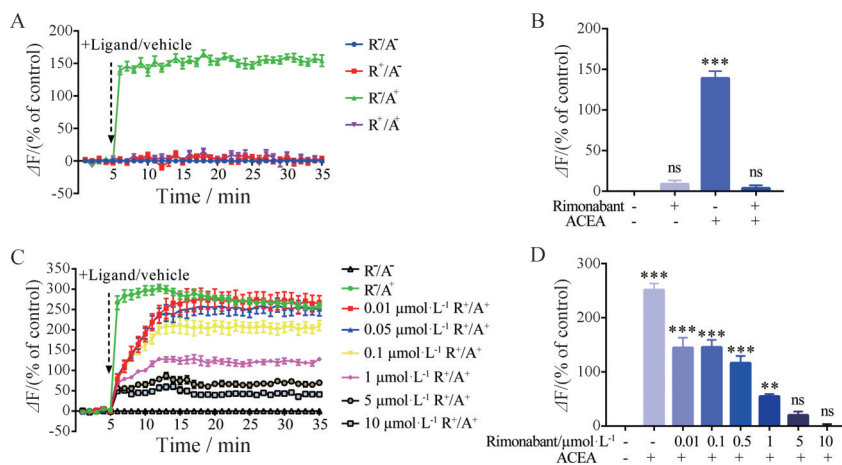


Figure 5 Rimonabant inhibits CB1R activation by ACEA. A: Pre-incubated with 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of rimonabant or solvent control for 30 min, ΔF value time-course response upon stimulation with 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACEA or solvent control; B: Pretreatment with 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rimonabant, ΔF value at the 5th min induced by 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACEA; C: Pre-incubated with different concentrations of rimonabant for 30 min, ΔF value time-course response upon stimulation with 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACEA; D: Pretreatment with different concentrations of rimonabant, ΔF value at the 5th min induced by 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACEA. All experiments were performed using HEK 293T cells stably expressing CB1R-cpEGFP sensors. $n = 3$, $x \pm \text{SEM}$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Ctrl group

多种病理生理过程, 如癫痫、疼痛、多发性硬化、恶心呕吐、食欲不振、帕金森症和精神分裂症等^[22,23]。除了中枢系统疾病, CB1R 也能够调节外周组织器官的生理病理状态, 是疼痛、能量代谢、炎症、青光眼和癌症等多种疾病潜在药理学靶点^[6]。但到目前为止, 许多典型的CB1R配体(特别是CB1激动剂)因导致呼吸系统紊乱、肾功能障碍和心血管功能障碍等诸多不良反应

而被限制使用。因此, 开发能够选择性激活CB1R且无不良反应发生的新型药物迫在眉睫。

GPCRs是体内含量最多的受体超家族, 当它与配体结合后, 受体被激活, 受体的构象发生改变, 进而触发一系列信号通路, 将复杂的细胞外信号转化为关键的生理效应。研究显示, cpEGFP的某些位置可以允许插入蛋白质, 且插入蛋白质构象的变化会改变化学环

境,促使cpEGFP生色基团去质子化而发射荧光^[24]。研究者利用此原理将cpEGFP置换受体胞内第三环部分的结构。经过结构改造,受体未被激活时,cpEGFP基本不产生荧光;当受体被激活后,细胞膜上的受体构象发生改变,导致定位于细胞膜的受体内部cpEGFP去质子化并发射出绿色荧光^[15,25]。基于以上原理,本实验构建能够反映CB1R活性变化的载体,并得到稳定过表达CB1R-cpEGFP的HEK 293T细胞,稳定转染细胞株对经典的CB1R激动剂和抑制剂均能产生响应:激动剂可激活受体,表现为细胞膜荧光强度增加,一定范围内荧光强度随激动剂的增加而增强,并且不同激动剂诱导受体产生的荧光强度与文献^[17,18]报道的受体亲和性是一致的;而拮抗剂则阻止激动剂对受体的激活,表现为细胞膜荧光无明显改变,并与抑制剂的浓度呈剂量依赖的关系。由此表明,本研究成功建立CB1R激动剂的药物筛选细胞模型。与现有常用的筛选方法比较,本研究构建的荧光探针检测方法简便快速、灵敏特异,可实现高通量检测。本筛选模型的报告标签cpEGFP与CB1R ICL3融合,几乎不会影响胞外的配体受体相互作用,极大降低标签对结果产生干扰的可能性。同时,本细胞模型只对配体受体的结合敏感,并不偶联GPCR下游的信号通路^[15],筛选结果真实可信。但由于筛选结果依赖荧光标签EGFP的报告,某些化合物可能在报告基因检测条件的相同波长处产生自发荧光,则可产生假阳性结果,这种情况可通过设定相应的阴性对照排除。

综上所述,本研究成功构建了CB1R激动剂的药物筛选细胞模型,为发现激动CB1R活性化合物提供快速便捷的工具。该荧光探针筛选方法具有广阔的实用性和应用前景:不仅实现了对CB1R激动剂的高通量筛选,同时也为其他GPCRs激动剂的筛选方法提供新思路。利用该模型筛选得到的活性化合物通过何种信号通路影响胞内的信号传导,仍需要后续实验进一步研究。

致谢: 本项目中所用的载体 pdisplay-eCB2.0-IRES-mCherry-CAAX由北京大学李毓龙实验室惠赠。

作者贡献: 王晓彤负责实验操作及论文初稿的撰写;张程璐、薄茹雪负责提供实验材料;周诗绮协助完成实验;陈乃宏和苑玉和负责课题指导及终稿审查。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Mackie K. Cannabinoid receptors: where they are and what they do [J]. *J Neuroendocrinol*, 2008, 20 Suppl 1: 10-14.
- [2] Lutz B. Neurobiology of cannabinoid receptor signaling [J]. *Dialogues Clin Neurosci*, 2020, 22: 207-222.
- [3] Katona I, Sperlagh B, Sik A, et al. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons [J]. *J Neurosci*, 1999, 19: 4544-4558.
- [4] Marinelli S, Pacioni S, Cannich A, et al. Self-modulation of neocortical pyramidal neurons by endocannabinoids [J]. *Nat Neurosci*, 2009, 12: 1488-1490.
- [5] Castillo PE, Younts TJ, Chavez AE, et al. Endocannabinoid signaling and synaptic function [J]. *Neuron*, 2012, 76: 70-81.
- [6] Maccarrone M, Bab I, Bıro T, et al. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2015, 36: 277-296.
- [7] Clapper JR, Moreno-Sanz G, Russo R, et al. Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism [J]. *Nat Neurosci*, 2010, 13: 1265-1270.
- [8] Ibsen MS, Connor M, Glass M. Cannabinoid CB(1) and CB(2) receptor signaling and bias [J]. *Cannabis Cannabinoid Res*, 2017, 2: 48-60.
- [9] Laprairie RB, Bagher AM, Denovan-Wright EM. Cannabinoid receptor ligand bias: implications in the central nervous system [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2017, 32: 32-43.
- [10] Kesner AJ, Lovinger DM. Cannabinoids, endocannabinoids and sleep [J]. *Front Mol Neurosci*, 2020, 13: 125.
- [11] Murillo-Rodrıguez E, Pastrana-Trejo JC, Salas-Crisostomo M, et al. The endocannabinoid system modulating levels of consciousness, emotions and likely dream contents [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2017, 16: 370-379.
- [12] Woodhams SG, Chapman V, Finn DP, et al. The cannabinoid system and pain [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 124: 105-120.
- [13] Macarron R, Banks MN, Bojanic D, et al. Impact of high-throughput screening in biomedical research [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10: 188-195.
- [14] Aldrich C, Bertozzi C, Georg GI, et al. The ecstasy and agony of assay interference compounds [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 2165-2168.
- [15] Dong A, He K, Dudok B, et al. A fluorescent sensor for spatiotemporally resolved imaging of endocannabinoid dynamics *in vivo* [J]. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 787-798.
- [16] Jing M, Zhang P, Wang G, et al. A genetically encoded fluorescent acetylcholine indicator for *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 726-737.
- [17] Coronado-Alvarez A, Romero-Cordero K, Macıas-Triana L, et al. The synthetic CB(1) cannabinoid receptor selective agonists: putative medical uses and their legalization [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2021, 110: 110301.
- [18] Teng H, Thakur GA, Makriyannis A. Conformationally constrained analogs of BAY 59-3074 as novel cannabinoid receptor ligands [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21: 5999-6002.
- [19] Felder CC, Joyce KE, Briley EM, et al. Comparison of the

- pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors [J]. *Mol Pharmacol*, 1995, 48: 443-450.
- [20] Patel M, Finlay DB, Glass M. Biased agonism at the cannabinoid receptors-evidence from synthetic cannabinoid receptor agonists [J]. *Cell Signal*, 2021, 78: 109865.
- [21] Walsh KB, Andersen HK. Molecular pharmacology of synthetic cannabinoids: delineating CB1 receptor-mediated cell signaling [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 6115.
- [22] Stasiłowicz A, Tomala A, Podolak I, et al. *Cannabis sativa* L. as a natural drug meeting the criteria of a multitarget approach to treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 778.
- [23] Dos Reis Rosa Franco G, Smid S, Viegas C. Phytocannabinoids: general aspects and pharmacological potential in neurodegenerative diseases [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2021, 19: 449-464.
- [24] Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96: 11241-11246.
- [25] Feng J, Zhang C, Lischinsky JE, et al. A genetically encoded fluorescent sensor for rapid and specific *in vivo* detection of norepinephrine [J]. *Neuron*, 2019, 102: 745-761.e8.