

## · 实验方法 ·

基于膜电位检测原理的  $\gamma$ -氨基丁酸 A 型受体药物高通量筛选模型

张毅, 石童, 张瑞华, 陈学军, 靳倩, 石晶晶, 王陈, 李丽琴

(国民核生化灾害防护国家重点实验室, 北京 102205)

**摘要:** 目的 利用膜电位检测原理, 构建一种靶向  $\gamma$ -氨基丁酸 A 型受体 ( $GABA_A R$ ) 的药物高通量筛选模型。方法 采用  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ - $GABA_A R$ -CHO 细胞株构建  $GABA_A R$  药物高通量筛选方法; 分别以工具化合物的 50% 激动效应浓度 ( $EC_{50}$ ) 和  $EC_{80}$  浓度下的激活值 (ASV) 和 Z' 因子作为判定指标, 对缓冲液反应体系、激动剂 GABA 激活浓度、染料种类和染料孵育时间进行优化选择; 在优化条件下分别利用激动剂 GABA (0.05, 0.25 和  $1.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、阳性变构剂地西洋 (Dia, 1, 5 和  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和拮抗剂加巴嗪 (gabazine, Gab, 0.1, 1.0 和  $10.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 进行方法稳定性考察; 通过工具化合物 GABA, Dia 和 Gab 的剂量-效应关系检测, 考察方法灵敏度。结果 构建的方法分别实现了对不同药理性质化合物 GABA, Dia 和 Gab 的特异性检测; 通过方法优化获得的优化条件为: 在 GABA  $EC_{20}\sim EC_{50}$  激活浓度下, 采用  $5 \mu\text{L}$  含氯体系加样, 对使用红色染料孵育 30~50 min 的  $GABA_A R$ -CHO 细胞进行工具化合物检测; 对不同浓度 GABA, Dia 和 Gab 检测的 CV% 分别介于 4.09%~15.30%, 5.59%~8.30% 和 5.65%~15.64%; 通过对 3 种工具化合物的剂量-效应关系检测, 获得 GABA 和 Dia 的  $EC_{50}$  值分别为  $(137.4\pm 26.3) \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $(3.5\pm 0.7) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , Gab 的 50% 抑制效应浓度为  $(164.9\pm 36.6) \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结论 本研究建立并优化了高通量检测方法, 该方法特异性好、精密度高、稳定可靠、灵敏度高, 为靶向  $GABA_A R$  的先导化合物发现提供了良好的技术基础。

**关键词:** 高通量筛选;  $\gamma$ -氨基丁酸 A 型受体; 地西洋; 膜电位; 细胞模型

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1000-3002-(2022)02-0120-09

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2022.02.006

$\gamma$ -氨基丁酸 A 型受体 ( $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor,  $GABA_A R$ ) 是由 5 种亚基组成的配体门控氯离子通道受体, 其中  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  亚型组成在人体内分布最广<sup>[1]</sup>。 $GABA_A R$  因为其多样的药理学功能被广泛关注, 激动剂 GABA 通过抑制兴奋发生和传递, 介导镇静睡眠、抗惊厥和抗焦虑等相关生理过程<sup>[2-3]</sup>, 阳性变构剂地西洋 (diazepam, Dia) 通过对  $GABA_A R$  的变构作用增强 GABA 对  $GABA_A R$  的激动作用<sup>[4-5]</sup>。因此,  $GABA_A R$  作为抗焦虑和镇静睡眠药物作用的主要靶点, 在睡眠发生和维持等睡眠相关过程中发挥重要功能。

体外基于  $GABA_A R$  的促睡眠药物筛选方法主要有标记法和非标记法, 其中非标记法主要有膜片钳电生理检测法、Cl<sup>-</sup>敏感荧光染料检测法和膜电位检测法。膜片钳电生理检测法存在对细胞有损伤

作用、检测通量小、成本高昂的问题; Cl<sup>-</sup>敏感荧光染料检测法存在易漂白、检测时限短的问题<sup>[6]</sup>。近年来发展的基于膜电位检测原理的实时荧光信号检测技术, 其检测原理为: 当激动剂 GABA 作用于  $GABA_A R$  时, 引起 Cl<sup>-</sup> 内流进入细胞膜, 膜内侧呈负电性, 细胞表现为超极化状态, 这种超极化状态很快被细胞外的阳离子进入膜内侧而削弱。本研究使用的膜电位敏感荧光染料具有阳离子亲和性, 在阳离子进入膜内侧的同时, 荧光染料也随阳离子一起进入细胞膜内, 表现为荧光信号增强, 荧光信号的大小与激动剂 GABA 剂量相关。因此, 激动剂 GABA 引起的 Cl<sup>-</sup> 内流表现为较高的荧光信号, 反之, 表现为较低的荧光信号。该技术已经在 Na<sup>+</sup> 和 K<sup>+</sup> 通道药物筛选中获得应用<sup>[7-9]</sup>, 但是在 Cl<sup>-</sup> 通道药物筛选中尚未得到广泛应用。随着荧光信号检测仪器灵敏度和检测通量的提高, 基于膜电位检测原理的高通量药物筛选方法显示出良好的应用前景。

本研究拟应用表达人源  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$  亚型的  $GABA_A R$ -CHO 细胞株建立基于膜电位检测原理的

作者简介: 张毅, 硕士研究生, 主要从事药物筛选与分子药理学研究, E-mail: zhangyi2017yaoxue@163.com

通讯作者: 李丽琴, E-mail: llq969696@163.com; 王陈, E-mail: wangchenpla@163.com

药物高通量筛选方法,并通过方法优化、工具化合物精密度检测、工具化合物剂量-效应关系检测等进行方法考察,为靶向 GABA<sub>A</sub>R 的活性化合物的早期发现提供了良好的技术基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、试剂和主要仪器

表达人源  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$  亚型的 GABA<sub>A</sub>R-CHO 细胞株 ( $\alpha_1$  亚基诱导表达,由本课题组构建并保存);红色染料、蓝色染料和 Tetra 型实时荧光定量分析系统(美国 Molecular Devices 公司);GABA(批号:APN15178-1-1,英国 Abcam 公司);Dia(批号:171225-200903,中国药品生物制品检定研究所);加巴嗪(gabazine, Gab,批号:G215SM0150,美国 Alomone 公司);DMEM/F12 培养基和胎牛血清(美国 Gibco 公司);Hank's 液(上海吉至生化有限公司);384 孔细胞检测板和 384 孔化合物板(德国 Greiner 公司);其他试剂均为上海阿拉丁生化科技股份有限公司产品。Countstar BioTech 型细胞计数仪(上海睿钰生物科技有限公司);B3111 型 CO<sub>2</sub> 培养箱和 1384 型超净工作台(美国 Thermo 公司);IX51 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);Five Easy 型 pH 检测仪(瑞士 Mettler Toledo 公司);万分之一电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司)。

### 1.2 GABA<sub>A</sub>R 药物高通量筛选反应体系构建

将细胞在 DMEM/F12 混合培养基中常规培养,培养基中加入 10% 胎牛血清、杀稻瘟菌素 10 mg·L<sup>-1</sup>、选择性抗生素博来霉素 100 mg·L<sup>-1</sup>、嘌呤霉素 1 mg·L<sup>-1</sup> 和潮霉素 B 300 mg·L<sup>-1</sup>。将细胞置于 37°C 含 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中常规培养,每 2 d 按照 1:8~1:10 的比例传代。

基于膜电位检测原理构建药物高通量筛选方法的反应体系,该反应体系包含贴壁完全的细胞、膜电位敏感染料、激动剂激活受体浓度和反应缓冲液。首先,当细胞生长密度达到 80% 时,在 GABA<sub>A</sub>R-CHO 细胞中加入四环素 1 mg·L<sup>-1</sup> 诱导  $\alpha_1$  亚基表达 36 h,在诱导表达 12 h 后消化细胞,将诱导表达的 GABA<sub>A</sub>R-CHO 细胞按照每孔 1×10<sup>4</sup> 个细胞接种到 384 孔板,继续诱导表达 24 h 后制备成 384 孔细胞板(检测前去掉培养基),然后加入 20  $\mu$ L 红色染料孵育 30 min;另外,采用含 Cl<sup>-</sup> 的缓冲液制备含有 0.15  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 激动剂 GABA(包含阳性变构剂或拮抗剂的 GABA 溶液)每孔体积为 40  $\mu$ L 的化合物板,设置化合物加样体积为 5  $\mu$ L;最后将染料

孵育过的 384 孔细胞板和 384 孔化合物板放入膜电位实时荧光检测分析系统进行荧光信号检测,设置仪器参数为:检测时间 130 s,每秒 1 次,前 10 s 进行基线检测(获得荧光信号 B<sub>0</sub>),第 11~130 秒进行化合物检测(获得荧光信号 B<sub>1</sub>)。Tetra 型实时荧光定量分析系统检测 GABA<sub>A</sub>R-CHO 细胞膜电位信号的仪器参数设置详见表 1。在以下的方法优化中主要对缓冲液体系、激动剂 GABA 浓度、染料类型和染料孵育时间进行优化选择。

**Tab.1 Instrument parameters of FLIPR<sup>TETRA</sup> for detection of  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor (GABA<sub>A</sub>R)-CHO membrane potential signals**

Parameter	Value
Excitation wavelength/nm	510-545
Emission wavelength/nm	565-625
LED intensity	20%
Gain	2000
Exposure time/ms	0.4
Detection interval/s	1
Sample volume/ $\mu$ L	5
Sampling height/ $\mu$ L	5
Liquid absorption speed/ $\mu$ L·s <sup>-1</sup>	5
Sample adding speed/ $\mu$ L·s <sup>-1</sup>	10

FLIPR: fluorescent real-time imaging plate reader system.

### 1.3 GABA<sub>A</sub>R 药物高通量筛选方法优化

#### 1.3.1 缓冲液体系选择

缓冲液体系采用两因素交叉设计实验方法,因素 1 为缓冲液类型,分别为含 Cl<sup>-</sup> 缓冲液和无 Cl<sup>-</sup> 缓冲液,因素 2 为加入体系中的化合物体积,分别为 5, 10, 20 和 25  $\mu$ L。

含 Cl<sup>-</sup> 缓冲液配方为 (mmol·L<sup>-1</sup>): CaCl<sub>2</sub> 1.26, MgCl<sub>2</sub> 0.82, KCl 5.33, NaCl 137.93, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.44, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.34, 葡萄糖 5.56, HEPES 20, 用 1 mmol·L<sup>-1</sup> 的 NaOH 溶液将 pH 调节至 7.4; 无 Cl<sup>-</sup> 缓冲液配方为 (mmol·L<sup>-1</sup>): 葡萄糖酸钙 1.26, 葡萄糖酸镁 0.82, 葡萄糖酸钾 5.33, 葡萄糖酸钠 137.93, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.44, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.34, 葡萄糖 5.56, HEPES 20, 用 1 mmol·L<sup>-1</sup> 的 NaOH 溶液将 pH 调节至 7.4。

以 GABA 1.00  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 和 GABA 0.15  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> + Dia 30  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 的检测信号曲线获得的激活值 (activation signal value, ASV) (首先将第 60~80 秒的荧光信号 B<sub>1</sub> 对前 10 s 基线检测 B<sub>0</sub> 归一化处理,扣除本底后的数据的平均值) 和 Z' 因子作为判定指标,判定缓冲液类型与化合物加样体积对 GABA<sub>A</sub>R

膜电位高通量筛选方法的影响。 $Z' = 1 - 3 \times (s_{\text{样本信号}} + s_{\text{本底信号}}) / |\bar{x}_{\text{样本信号}} - \bar{x}_{\text{本底信号}}|$ 。

### 1.3.2 检测体系中激动剂 GABA 浓度选择

分别在 10% 激动效应浓度 (excitatory concentration of 10%,  $EC_{10}$ ),  $EC_{20}$  和  $EC_{50}$  GABA 浓度 (即 0.05, 0.10 和 0.25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 条件下, 对 Dia 的 12 个浓度梯度 (0.0005, 0.0015, 0.0046, 0.014, 0.041, 0.12, 0.37, 1.11, 3.33, 10, 30 和 90  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 进行荧光信号检测, 将第 11~130 秒的荧光信号  $B_t$  对前 10 s 基线检测  $B_0$  作归一化处理, 扣除本底后获得检测信号曲线, 计算该曲线下面积 (area under curve, AUC)。以化合物浓度的常用对数值为横坐标, 以相对活性百分率 (relative activity percentage, RAP, 以工具化合物的最大激动或抑制信号曲线的 AUC 值作为 100%, 对各浓度下的 AUC 值进行百分比计算则为该浓度的 RAP) 为纵坐标, 采用 Origin 2019 软件进行 logistic 曲线拟合, 获得不同 GABA 浓度下, 阳性变构剂 Dia 的  $EC_{50}$  值, 以该值作为判定指标, 将测得 Dia  $EC_{50}$  值较低 (灵敏度较高) 的 GABA 的浓度作为 GABA 激活受体的浓度。

### 1.3.3 染料选择

分别采用红色和蓝色染料孵育细胞, 对激动剂 GABA 的 11 个浓度梯度 (0.0005, 0.0015, 0.0046, 0.014, 0.041, 0.12, 0.37, 1.11, 3.33, 10 和 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和阳性变构剂 Dia 的 12 个浓度梯度 (0.0005, 0.0015, 0.0046, 0.014, 0.041, 0.12, 0.37, 1.11, 3.33, 10, 30 和 90  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 进行荧光信号检测, 并按 1.3.2 方法对荧光信号的 AUC 和 RAP 进行计算, 以化合物浓度的对数值为横坐标, 以各浓度的 RAP 为纵坐标, 对 GABA 和 Dia 的  $EC_{50}$  进行检测。以 GABA 和 Dia 的活性  $EC_{50}$  值以及在 2 个化合物  $EC_{80}$  浓度下获得的 ASV 和  $Z'$  因子作为判定指标, 判定染料的适用性。

### 1.3.4 染料孵育时间

分别在细胞与染料孵育 10, 30, 50 和 120 min 条件下, 其余步骤同 1.3.3, 判定染料孵育的最佳时间。

### 1.4 GABA<sub>A</sub>R 药物高通量筛选方法稳定性

采用优化方法分别对不同浓度的激动剂 GABA (0.05, 0.25 和 1.00  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、阳性变构剂 Dia (1, 5 和 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和拮抗剂 Gab (0.1, 1.0 和 10.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 进行批间精密考察, 各浓度设 6 个复孔, 连续检测 3 d。通过对 3 个化合物在不同浓度下荧光信号的 AUC 进行统计分析, 计算获得批间变异系数 (coefficient of variation, CV%), 以评价方法的精密性;

计算工具化合物各浓度下的  $Z'$  因子, 判定方法测定数据的质量, 以评估方法的稳定性。

### 1.5 GABA<sub>A</sub>R 药物高通量筛选方法灵敏度

采用优化的检测条件对工具化合物激动剂 GABA 的 11 个浓度梯度 (0.0005, 0.0015, 0.0046, 0.014, 0.041, 0.12, 0.37, 1.11, 3.33, 10 和 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 阳性变构剂 Dia 的 11 个浓度梯度 (0.0015, 0.0046, 0.014, 0.041, 0.12, 0.37, 1.11, 3.33, 10, 30 和 90  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和拮抗剂 Gab 的 12 个浓度梯度 (0.0005, 0.0015, 0.0046, 0.014, 0.041, 0.12, 0.37, 1.11, 3.33, 10, 30 和 90  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 进行荧光信号检测, 并对荧光信号的 AUC 进行计算分析。各浓度均设 4 个复孔。以化合物浓度的常用对数值为横坐标, 以各浓度的 RAP 为纵坐标, 采用 Origin 2019 软件进行 logistic 曲线拟合, 获得化合物的  $EC_{50}$  或 50% 抑制效应浓度 (inhibitory concentration,  $IC_{50}$ ), 以评价方法的检测灵敏度。

### 1.6 统计学分析

实验结果数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 Student *t* 检验, 以  $P < 0.05$  表示为差异有统计学意义。

## 2 结果

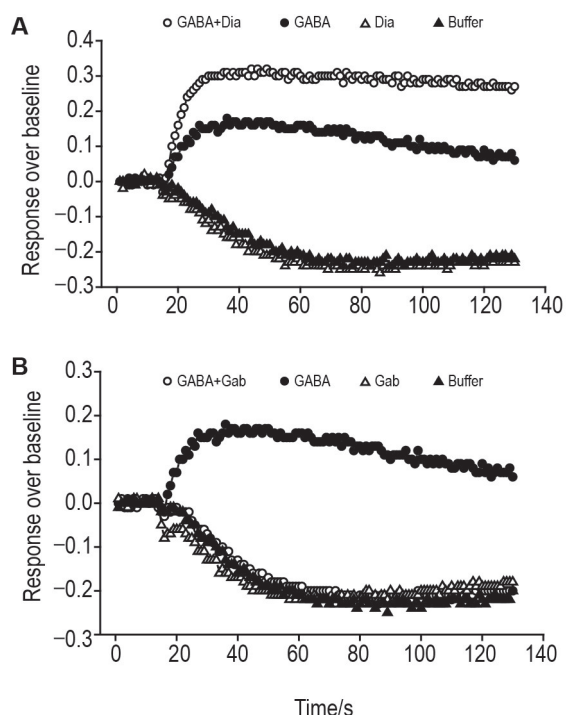
### 2.1 GABA<sub>A</sub>R 药物高通量筛选反应体系构建

荧光信号检测结果 (图 1) 显示, GABA<sub>A</sub>R-CHO 细胞上, GABA 0.15  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  对在诱导表达  $\alpha_1$  亚基的 GABA<sub>A</sub>R-CHO 细胞有明显的激动作用; 在 Dia 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  存在下, GABA 0.15  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  对细胞的激活作用进一步增强 (图 1A); 在 Gab 10.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  存在下, GABA 0.15  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  对细胞的激活作用被削弱 (图 1B); 单独应用阳性变构剂 Dia 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  或含 Cl<sup>-</sup> 缓冲液均对细胞无明显激活作用。

### 2.2 GABA<sub>A</sub>R 药物高通量筛选方法优化

#### 2.2.1 不同缓冲液体系对筛选检测指标的影响

实验通过含 Cl<sup>-</sup> 缓冲液和无 Cl<sup>-</sup> 缓冲液与 5, 10, 20 和 25  $\mu\text{L}$  加样体积交叉设计, 对 GABA 1.00  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和 GABA 0.15  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  + Dia 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 ASV 和  $Z'$  因子计算结果见图 2。在检测 GABA 信号时, 在不同的加样体积下, 各含 Cl<sup>-</sup> 组和无 Cl<sup>-</sup> 组的 ASV 值和  $Z'$  因子之间均无显著差异 (图 2A 和 2C)。在检测阳性变构剂 Dia 信号时, 在不同的加样体积下, 各含 Cl<sup>-</sup> 组 ASV 值均明显高于无 Cl<sup>-</sup> 组 ( $P < 0.05$ ) (图 2B), 含 Cl<sup>-</sup> 组  $Z'$  因子均大于无 Cl<sup>-</sup> 组 (图 2D), 随着



**Fig.1 Fluorescence signal change curves of diazepam (Dia, A) and gabazine (Gab, B) by membrane potential detection method.** The day before the experiment, the GABA<sub>A</sub>R-CHO cells were inoculated into 384-well cell plates at the density of  $1 \times 10^4$  per well. The detection reaction system was 25  $\mu\text{L}$  per well. The culture medium was removed, and 20  $\mu\text{L}$  of red dye (prepared with  $\text{Cl}^-$ -containing buffer) was added into each well. After 30 min of incubation, 5  $\mu\text{L}$  of compound solution was added into the well for fluorescence signal detection. A: The fluorescence signal curves were obtained from GABA  $0.15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , Dia  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  or GABA  $0.15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +Dia  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  solutions prepared by  $\text{Cl}^-$ -containing buffer. B: The fluorescence signal curves were obtained from GABA  $0.15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , Gab  $10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  and GABA  $0.15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +Gab  $10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  solutions prepared by  $\text{Cl}^-$ -containing buffer. Response over baseline: the mean of the fluorescence signals in the reaction system during the 1<sup>st</sup>-10<sup>th</sup> second was taken as the baseline, and fluorescence signals during the 11<sup>th</sup>-130<sup>th</sup> second were normalized according to the baseline.

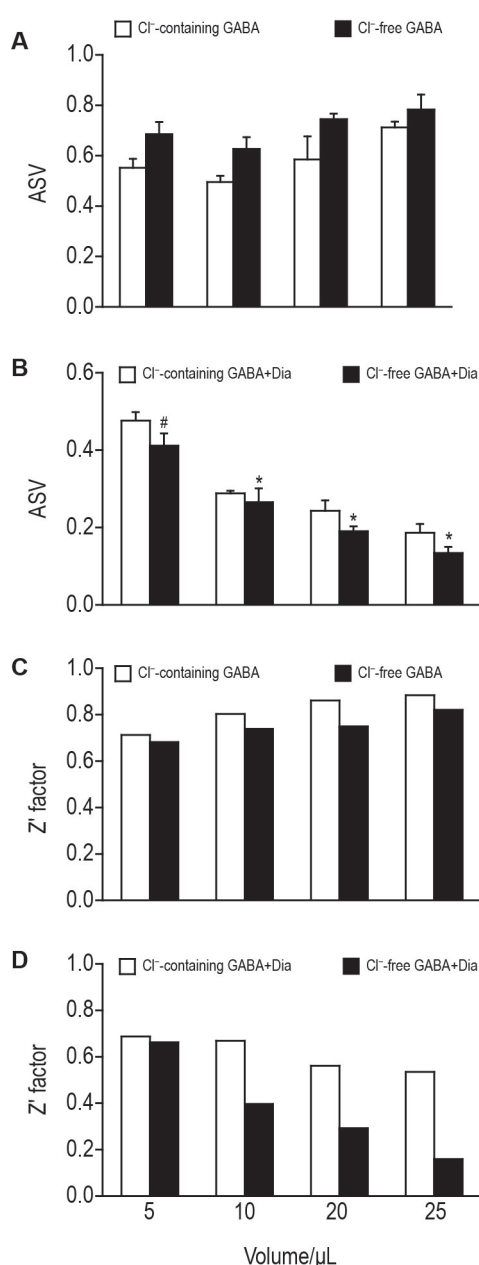
加样体积的增加, 2组 ASV 和 Z' 因子均减小, 其中 ASV 在加样体积 10, 20 和 25  $\mu\text{L}$  时较加样体积 5  $\mu\text{L}$  时显著减少 ( $P < 0.05$ ) (图 2B)。

### 2.2.2 不同激动剂浓度对变构剂检测的影响

分别在 GABA 终浓度 0.05, 0.10 和 0.25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  下, 对不同 Dia 浓度下 AUC 值进行检测, 结果 (表 2) 显示, 在不同 GABA 浓度下, 阳性变构剂 Dia 的  $\text{EC}_{50}$  值随激动剂 GABA 浓度增大而逐渐减小。与 GABA  $\text{EC}_{10}$  浓度下 Dia 检测结果相比, 在 GABA  $\text{EC}_{20}$  和 GABA  $\text{EC}_{50}$  浓度下, Dia 的  $\text{EC}_{50}$  检测值更低 ( $P < 0.05$ ), 检测更灵敏。

### 2.2.3 不同染料对筛选检测指标的影响

采用红色或蓝色染料孵育细胞时, 分别检测激



**Fig.2 Effect of buffer system on GABA and Dia activation signals and Z' factor of signals.** See Fig.1 for the number of cells, dye type and incubation time treatment. The volume of compound solution added into the reaction system was 5, 10, 20 or 25  $\mu\text{L}$ , respectively. The solutions of GABA  $1.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  and GABA  $0.15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +Dia  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (the final concentration during detection) were prepared by  $\text{Cl}^-$ -containing buffer or  $\text{Cl}^-$ -free buffer. The activation signal values (ASV) of the solutions were detected and the Z' factors were calculated based on the ASVs.  $Z' = 1 - 3 \times (s \text{ of sample signal} + s \text{ of background signal}) / |\bar{x} \text{ of sample signal} - \bar{x} \text{ of background signal}|$ .  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ . \* $P < 0.05$ , compared with the GABA+Dia group under the 5  $\mu\text{L}$  reaction system and  $\text{Cl}^-$ -free buffer; # $P < 0.05$ , compared with the GABA+Dia group under the 5  $\mu\text{L}$  reaction system and  $\text{Cl}^-$ -containing buffer.

动剂 GABA、阳性变构剂 Dia 的活性, 其  $\text{EC}_{50}$ 、ASV 和 Z' 因子见图 3 和表 3。不同染料孵育下, 激动剂 GABA 检测的  $\text{EC}_{50}$  值、ASV、Z' 因子的检测结果无

**Tab.2 Effect of GABA activation concentration on excitatory concentration of 50% (EC<sub>50</sub>) of allosteric activity Dia**

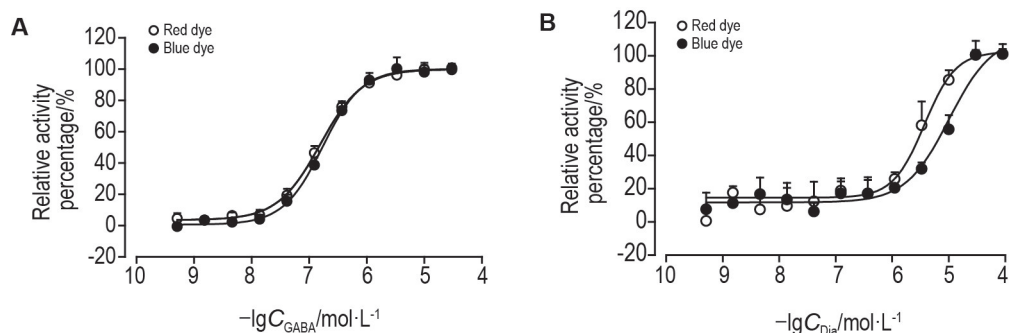
GABA	GABA concentration/ μmol·L <sup>-1</sup>	Dia EC <sub>50</sub> value/ μmol·L <sup>-1</sup>
EC <sub>10</sub>	0.05	7.7±2.0
EC <sub>20</sub>	0.10	4.7±0.3*
EC <sub>50</sub>	0.25	4.2±0.6*

See Fig.1 for the number of cells, the detection reaction system, dye type and incubation time treatment. Concentration-effect relationship of positive allosteric agent Dia was detected at different GABA activation concentrations of EC<sub>10</sub>, EC<sub>20</sub> and EC<sub>50</sub>. There were 384-cell plates with 1×10<sup>4</sup> GABA<sub>A</sub>R-CHO cells per well on each test. The concentration gradient of Dia was 0.0005, 0.0015, 0.0046, 0.014, 0.041, 0.12, 0.37, 1.11, 3.33, 10, 30 and 90 μmol·L<sup>-1</sup>.  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=4$ . \* $P<0.05$ , compared with the EC<sub>50</sub> of Dia obtained at GABA EC<sub>10</sub> concentration.

显著性差异,变构剂 Dia 的 ASV 大小无明显差异;在对变构剂 Dia 的 EC<sub>50</sub> 检测时,蓝色染料比红色染料的 EC<sub>50</sub> 增大约 2.73 倍 ( $P<0.05$ );红色染料 Z' 因子(0.59)显著高于蓝色染料 Z' 因子(0.40)(表 3)。表明使用 GABA<sub>A</sub>R-CHO 细胞对阳性变构剂 Dia 引起的膜电位检测时,红色染料检测灵敏度比蓝色染料更高。

**2.2.4 不同染料孵育时间对筛选检测指标的影响**

分别将细胞与染料孵育 10, 30, 50 和 120 min, 检测激动剂 GABA 和阳性变构剂 Dia 的活性,其 EC<sub>50</sub> 值、ASV、Z' 因子的检测结果(图 4,表 4)显示,在染料孵育 30 和 50 min 条件下,GABA 和 Dia 的 EC<sub>50</sub> 值较染料孵育 10 和 120 min 条件下更低 ( $P<0.05$ ),检测

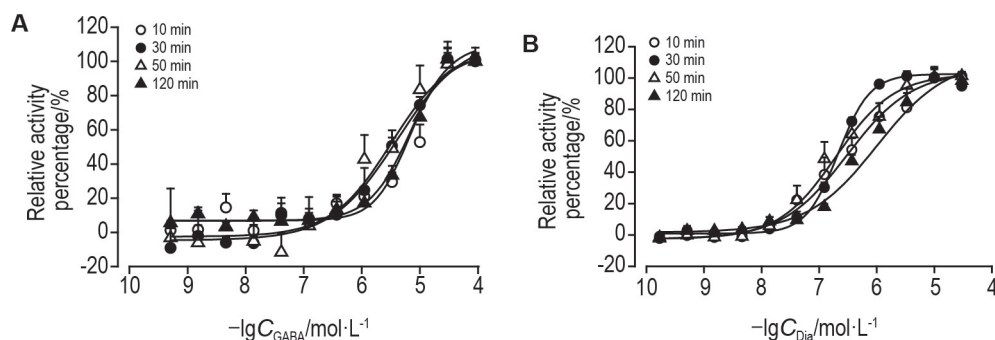


**Fig.3 Effect of dye on concentration-effect relationships of GABA (A) and Dia (B).** See Fig.1 for the number of cells, the detection reaction system and incubation time treatment. The concentration gradient of GABA was 0.0005, 0.0015, 0.0046, 0.014, 0.041, 0.12, 0.37, 1.11, 3.33, 10 and 30 μmol·L<sup>-1</sup>. The concentration gradient of Dia was 0.0005, 0.0015, 0.0046, 0.014, 0.041, 0.12, 0.37, 1.11, 3.33, 10, 30 and 90 μmol·L<sup>-1</sup>. Relative activity percentage (RAP) was the percentage of the AUC value of the excitation or inhibition signal curve under each concentration and the AUC value of the maximum excitation or inhibition signal curve.  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=4$ .

**Tab.3 Effect of dye on concentration-effect relationships of GABA and Dia**

Dye type	GABA			Dia		
	Z' factor	ASV	EC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	Z' factor	ASV	EC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
Red dye	0.88	0.49	154.1±8.6	0.59	0.13	3.7±0.6*
Blue dye	0.81	0.56	170.8±12.5	0.40	0.17	10.1±2.9

Tab.3 was the calculation result of Fig.3.  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=4$ . \* $P<0.05$ , compared with blue dye group.



**Fig.4 Effect of dye incubation time on concentration-effect relationships of GABA (A) and Dia (B).** See Fig.1 for the number of cells, the detection reaction system and dye type treatment. See Fig.3 for the concentration of GABA and Dia treatment.  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=4$ .

**Tab.4 Effect of dye on concentration-effect relationships of GABA and Dia**

Dye incubation time/min	GABA			Dia		
	Z' factor	ASV	EC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	Z' factor	ASV	EC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
10	0.55	0.58	305±52	0.31	0.12	4.3±2.9
30	0.87	0.52	211±15**	0.53	0.13	4.1±1.2 <sup>Δ</sup>
50	0.81	0.72	197±29**	0.42	0.11	3.0±0.7 <sup>Δ</sup>
120	0.75	0.69	996±76	0.35	0.12	6.8±2.5

Tab.4 was the calculation result of Fig.4.  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=4$ . \* $P<0.05$ , compared with the GABA group after 10 min of incubation; \*\* $P<0.05$ , compared with the GABA group after 120 min of incubation; <sup>Δ</sup> $P<0.05$ , compared with the Dia group after 120 min of incubation.

灵敏度更高;在染料孵育 30 和 50 min 条件下, GABA 和 Dia 的 Z' 因子较染料孵育 10 和 120 min 条件下更高,检测稳定性更好。表明染料孵育时间控制在 30~50 min 更适于对 GABA<sub>A</sub>R 活性化合物的检测。

### 2.3 GABA<sub>A</sub>R 药物高通量筛选方法的稳定性

如表 5 所示,使用优化后膜电位检测方法,对 GABA (0.05, 0.25 和 1.00 μmol·L<sup>-1</sup>)、Dia (1, 5 和 30 μmol·L<sup>-1</sup>) 和 Gab (0.1, 1.0 和 10.0 μmol·L<sup>-1</sup>) 的荧光信号 AUC 值进行批间变异系数 CV% 和 Z' 因子的计算,3 个化合物在不同浓度下 CV% 均 ≤ 15.64%, 其中,在 GABA 0.25 和 1.00 μmol·L<sup>-1</sup>、Dia 5 和 30 μmol·L<sup>-1</sup> 及 Gab 10.0 μmol·L<sup>-1</sup> 条件下测得的 CV% 均 ≤ 10%。在 GABA 0.25 和 1.00 μmol·L<sup>-1</sup>、Dia 5 和 30 μmol·L<sup>-1</sup> 和 Gab 1.0 和 10.0 μmol·L<sup>-1</sup> 条件下测得的 Z' 因子均 ≥ 0.4。结果表明,优化后 GABA<sub>A</sub>R 药物高通量筛选方法可用于 GABA<sub>A</sub>R 相关化合物的活性检测,该方法稳定性较高。

**Tab.5 Stability of high throughput screening method for GABA, Dia and Gab**

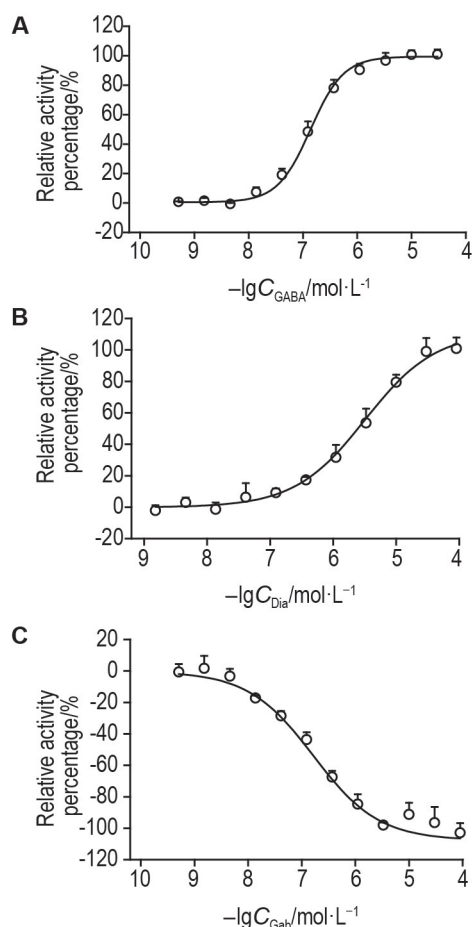
Tool drug/μmol·L <sup>-1</sup>	AUC	CV%	Z' factor
GABA 0.05	9.51±1.46	15.30	0.670
0.25	27.47±1.55	5.64	0.822
1.00	39.91±1.59	4.09	0.861
Dia 1	16.28±1.35	8.30	0.175
5	28.13±1.57	5.59	0.400
30	40.25±2.66	6.62	0.558
Gab 0.1	7.73±1.21	15.64	0.109
1.0	-8.87±1.29	14.59	0.712
10.0	-16.22±0.92	5.65	0.817

See Fig.1 for the number of cells, the detection reaction system, dye type and incubation time treatment. AUC: area under curve; CV: coefficient of variation.  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ .

### 2.4 GABA<sub>A</sub>R 药物高通量筛选方法的灵敏度

采用优化后的 GABA<sub>A</sub>R 药物高通量筛选方法

对激动剂 GABA、阳性变构剂 Dia 和拮抗剂 Gab 的剂量-效应关系进行检测,结果见图 5。获得 GABA 的 EC<sub>50</sub> 值为 (137.4±26.3) nmol·L<sup>-1</sup>, Dia 的 EC<sub>50</sub> 值为 (3.2±0.7) μmol·L<sup>-1</sup>, Gab 的 IC<sub>50</sub> 值为 (164.9±36.6) nmol·L<sup>-1</sup>。

**Fig.5 Concentration-response relationships of GABA**

**(A), Dia (B) and Gab (C).** See Fig.1 for the number of cells, the detection reaction system, dye type and incubation time treatment. The concentration gradient of GABA was 0.0005, 0.0015, 0.0046, 0.014, 0.041, 0.12, 0.37, 1.11, 3.33, 10 and 30 μmol·L<sup>-1</sup>. The concentration gradient of Dia was 0.0015, 0.0046, 0.014, 0.041, 0.12, 0.37, 1.11, 3.33, 10, 30 and 90 μmol·L<sup>-1</sup>. The concentration gradient of Gab was 0.0005, 0.0015, 0.0046, 0.014, 0.041, 0.12, 0.37, 1.11, 3.33, 10, 30 and 90 μmol·L<sup>-1</sup>.  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=4$ . IC<sub>50</sub>: 50% inhibitory concentration.

### 3 讨论

GABA<sub>A</sub>R 作为 Cl<sup>-</sup>通道受体,与抗焦虑、镇静、睡眠等生理活动密切相关。高通量筛选作为药物发现最有效的技术手段之一,已广泛应用于靶向药物筛选<sup>[9]</sup>。为了开发新型抗焦虑、镇静、促睡眠药物,本研究利用电压敏感染料可以电压依赖方式在细胞内外质膜间转移从而产生荧光信号变化的原理<sup>[10-11]</sup>,在 GABA<sub>A</sub>R-CHO 细胞株上构建了 GABA<sub>A</sub>R 药物高通量筛选方法,该方法实现了对激动剂、阳性变构剂、拮抗剂等靶向 GABA<sub>A</sub>R 的不同性质化合物药理学作用的检测,检测特异性好。

在方法优化中,以 EC<sub>50</sub> 值、ASV 和 Z' 因子为评价指标,对缓冲液体系、激动剂 GABA 激活浓度、染料种类以及染料孵育时间等条件进行了优化选择。其中,在高通量筛选中,需要使用阳性化合物来评估筛选条件和测量方法的质量,从而预测高通量筛选方法的可行性,Z' 因子作为度量标准,是一个无量纲的参数,该参数不仅用于评估测定数据的质量,还用于评价阳性对照与本底信号之间的分离度以及阳性对照信号动态变化范围。在各种浓度下均可计算 Z' 因子。多数文献采用 EC<sub>80</sub> 浓度下计算 Z' 因子,优化后的高通量方法在该浓度下的 Z' 因子 ≥ 0.4,通常认为高通量检测方法是可行的,该方法中阳性和阴性对照的分离度较好,可用于高通量筛选<sup>[10]</sup>。本研究以激动剂 GABA 和阳性变构剂 Dia 为模型化合物,选择 EC<sub>50</sub> 值较低,ASV 较高,Z' 因子较大的条件作为优化后条件,分别获得优化后的条件为,使用含 GABA EC<sub>20</sub>~EC<sub>50</sub> 浓度的 5 μL 含 Cl<sup>-</sup> 加样体积,对使用红色染料孵育 30~50 min 的 GABA<sub>A</sub>R-CHO 细胞进行工具化合物的检测,Z' 因子均 ≥ 0.4,符合高通量检测要求。

方法稳定性考察表明,对不同浓度的激动剂 GABA、阳性变构剂 Dia 和拮抗剂 Gab 进行检测的 CV% 分别介于 4.09%~15.30%、5.59%~8.30% 和 5.65%~15.64%;对 3 个工具化合物在高浓度(GABA 1 μmol·L<sup>-1</sup>, Dia 30 μmol·L<sup>-1</sup> 和 Gab 10 μmol·L<sup>-1</sup>) 下测得的 Z' 因子分别为 0.861, 0.558 和 0.817,在中浓度(GABA 0.25 μmol·L<sup>-1</sup>, Dia 5 μmol·L<sup>-1</sup>, Gab 1 μmol·L<sup>-1</sup>) 下测得的 Z' 因子分别为 0.822, 0.400 和 0.712。表明本方法优化后检测精密度较好,检测数据质量较高,符合高通量筛选方法对数据的可重复性和稳定性的要求。

本研究采用优化后的方法对工具化合物剂量-效应关系进行检测,以评价本方法可靠性。实验结果

显示,采用本方法测得激动剂 GABA 的 EC<sub>50</sub> 值为 (137.4±26.3) nmol·L<sup>-1</sup>。文献报道,采用膜电位检测方法在表达 GABA<sub>A</sub>R 的 HEK293 细胞上对 GABA 检测的 EC<sub>50</sub> 值为 2.2~4.7 μmol·L<sup>-1</sup><sup>[11-12]</sup>,本方法灵敏度较文献方法高 16~34 倍;文献报道,采用电生理方法在表达 GABA<sub>A</sub>R 的爪蟾卵母细胞上对 GABA 检测的 EC<sub>50</sub> 值为 7.3~51.2 μmol·L<sup>-1</sup><sup>[13-15]</sup>,本方法较电生理检测方法灵敏度高 >53 倍。采用本方法检测得阳性变构剂 Dia 的 EC<sub>50</sub> 值为 (3.2±0.7) μmol·L<sup>-1</sup>。文献报道,采用膜电位检测方法在表达 GABA<sub>A</sub>R 的 HEK293 细胞上检测到 Dia 的 EC<sub>50</sub> 值为 10.0 μmol·L<sup>-1</sup>,本方法灵敏度比该文献方法提高约 3 倍<sup>[14-15]</sup>;文献用电生理方法在表达 GABA<sub>A</sub>R 的爪蟾卵母细胞上检测到 Dia 的 EC<sub>50</sub> 值为 44.0~71.9 μmol·L<sup>-1</sup><sup>[14-15]</sup>,本方法灵敏度比该文献方法高 14~22 倍。采用本方法测得拮抗剂 Gab 的 IC<sub>50</sub> 值为 (164.9±36.6) nmol·L<sup>-1</sup>。文献报道,用电生理方法在表达 GABA<sub>A</sub>R 的爪蟾卵母细胞上测得 Gab 的 IC<sub>50</sub> 值为 (0.15±0.01) μmol·L<sup>-1</sup><sup>[16]</sup>,本方法灵敏度与该文献报道方法基本相当。结果证实,本研究中构建并优化的 GABA<sub>A</sub>R 药物高通量检测方法检测灵敏度较高。

本研究建立并优化的 GABA<sub>A</sub>R 药物高通量筛选方法特异性好、精密度高,稳定可靠,灵敏度高,为靶向 GABA<sub>A</sub>R 的镇静睡眠类、抗焦虑等先导化合物的发现提供了良好的技术基础。

#### 参考文献:

- [1] Johnston GA, Hanrahan JR, Chebib M, *et al.* Modulation of ionotropic GABA receptors by natural products of plant origin [J]. *Adv Pharmacol*, 2006, 54: 285-316.
- [2] Rudolph U, Möhler H. GABA<sub>A</sub> receptor subtypes: therapeutic potential in Down syndrome, affective disorders, schizophrenia, and autism [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2014, 54(1): 483-507.
- [3] Belelli D, Harrison NL, Maguire J, *et al.* Extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors: form, pharmacology, and function [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(41): 12757-12763.
- [4] Braat S, Kooy R. The GABA<sub>A</sub> receptor as a therapeutic target for neurodevelopmental disorders [J]. *Neuron*, 2015, 86(5): 1119-1130.
- [5] Brodie MJ, Besag F, Ettinger A, *et al.* Epilepsy, anti-epileptic drugs, and aggression: an evidence-based review [J]. *Pharmacol Rev*, 2016, 68(3): 563-602.

- [6] Kaneko H, Putzier I, Frings S, *et al.* Determination of intracellular chloride concentration in dorsal root ganglion neurons by fluorescence lifetime imaging [J]. *Curr Top Membr*, 2002, 53(02): 167-184.
- [7] Liu K, Samuel M, Tillett J, *et al.* High-throughput screening for Kv1.3 channel blockers using an improved FLIPR-based membrane-potential assay [J]. *J Biomol Screen*, 2010, 15(2): 185-195.
- [8] Vasilyev DV, Shan QJ, Lee YT, *et al.* A novel high-throughput screening assay for HCN channel blocker using membrane potential-sensitive dye and FLIPR [J]. *J Biomol Screen*, 2009, 14(9): 1119-1128.
- [9] Nik AM, Pressly B, Singh V, *et al.* Rapid throughput analysis of GABA<sub>A</sub> receptor subtype modulators and blockers using DiSBAC<sub>4</sub>(3) membrane potential red dye [J]. *Mol Pharmacol*, 2017, 92(1): 88-99.
- [10] Zhang JH, Chung T, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays [J]. *J Biomol Screen*, 1999, 4(2): 67-73.
- [11] Joesch C, Guevarra E, Parel SP, *et al.* Use of FLIPR membrane potential dyes for validation of high-throughput screening with the FLIPR and micro-ARCS technologies: identification of ion channel modulators acting on the GABA<sub>A</sub> receptor [J]. *J Biomol Screen*, 2008, 13(3): 218-228.
- [12] Knappenberger KS, Liu J, Chen TS, *et al.* A high-throughput functional assay for characterization of  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> channel modulators using cryopreserved transiently transfected cells [J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2008, 6(6): 781-786.
- [13] Duke RK, Hinton T. Effects of bilobalide, ginkgolide B and picrotoxinin on GABA<sub>A</sub> receptor modulation by structurally diverse positive modulators [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 806(7): 83-90.
- [14] Ma C, Pejo E, Mcgrath M, *et al.* Competitive antagonism of anesthetic action at the  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor by a novel etomidate analog with low intrinsic efficacy [J]. *Anesthesiology*, 2017, 127(5): 824-837.
- [15] Steven M, Mariangela C, Hong-Jin S, *et al.* Diverse voltage-sensitive dyes modulate GABA<sub>A</sub> receptor function [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(8): 2871-2879.
- [16] Hansen SL, Ebert B, Fjalland B, *et al.* Effects of GABA<sub>A</sub> receptor partial agonists in primary cultures of cerebellar granule neurons and cerebral cortical neurons reflect different receptor subunit compositions [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 133(4): 539-549.

## A high throughput screening method for drugs targeting $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor based on principles of membrane potential detection

ZHANG Yi, SHI Tong, ZHANG Rui-hua, CHEN Xue-jun, JIN Qian, SHI Jing-jing, WANG Chen, LI Li-qin  
(State Key Laboratory of Nuclear Biological Chemical Protection for Civilian, Beijing 102205, China)

**Abstract: OBJECTIVE** To establish a high-throughput screening method for drugs targeting  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor (GABA<sub>A</sub>R) based on the principles of membrane potential detection. **METHODS** A high-throughput screening reaction system for drugs targeting GABA<sub>A</sub>R was constructed on  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -GABA<sub>A</sub>R-CHO cell lines. The buffer system, GABA activation concentration, dye type and dye incubation time were optimized by the excitatory concentration of 50% (EC<sub>50</sub>) value of GABA and diazepam (Dia), the activation signal values (ASVs) and Z' factors obtained from the detection curves at the EC<sub>80</sub> concentrations of GABA and Dia were the indexes for assessment of optimization. The stabilities of the method were investigated under optimized conditions by the signals of agonist GABA (0.05, 0.25 and 1.00  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), positive allosteric Dia (1, 5 and 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and antagonist gabazine (Gab, 0.1, 1.0 and 10.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). The dose-effect relationships of agonist GABA, allosteric agent Dia and antagonist Gab were detected by the optimized high-throughput screening method of GABA<sub>A</sub>R drugs. **RESULTS** Specific detections of GABA, Dia and Gab were made possible, respectively. The optimization conditions were as follows: 5  $\mu\text{L}$  chlorine-containing reaction system containing GABA concentration of EC<sub>20</sub>-



EC<sub>50</sub>, incubation with red dye for 30–50 min. The variation coefficients of the method were 4.09%–15.30%, 5.59%–8.30%, 5.65%–15.64% at the concentrations of GABA (0.05, 0.25 and 1 μmol·L<sup>-1</sup>), Dia (1, 5 and 30 μmol·L<sup>-1</sup>) and Gab (0.1, 1.0 and 10.0 μmol·L<sup>-1</sup>), respectively. The EC<sub>50</sub> values of GABA and Dia were (137.4±26.3) nmol·L<sup>-1</sup> and (3.2±0.7) μmol·L<sup>-1</sup>, respectively, and the 50% inhibitory concentration of Gab was (164.9±36.6) nmol·L<sup>-1</sup>. **CONCLUSION** This high-throughput screening method for drugs targeting GABA<sub>A</sub>R based on the principles of membrane potential detection show specificity, high precision and stability and high sensitivity, which can technologically facilitate the discovery of lead compounds targeting GABA<sub>A</sub>R.

**Key words:** high-throughput screening; γ-aminobutyric acid type A receptor; diazepam; membrane potential; cell model

**Corresponding author:** LI Li-qin, E-mail: llq969696@163.com; WANG Chen, E-mail: wangchenpla@163.com

(收稿日期: 2021-07-21 接受日期: 2021-10-14)

(本文编辑: 赵楠)

## 《中国药理学与毒理学杂志》编辑部投稿温馨提示

结合本刊的稿约及平时常见的问题,编辑部温馨提示:

1. 在线([http://202.38.153.236:81/Jweb\\_cjpt](http://202.38.153.236:81/Jweb_cjpt))投稿成功后,请尽快在线上传“版权专有使用授权书”,编辑部收到全部材料后方开始稿件的处理工作。

2. “版权专有使用授权书”可在本刊网站的“投稿指南”下载;签名作者的顺序一定要与稿件署名顺序一致;不方便签字者,可由第一作者或通讯作者代签;加盖单位公章。

3. 本刊中英文稿件兼收,优秀英文稿件优先刊出。

4. 为方便修改,文稿要采用 Word 文档格式;提供中英文的文题、摘要、作者单位、关键词及基金项目名称。摘要的结果部分不能只进行结论性描述,要给出重要的数据。为便于国际交流,中文稿件的英文摘要可以比中文摘要更详细。

5. 为便于文中插图的编辑处理及排版,由数据利用软件绘出的柱图或线图,要以原图的形式插入(双击能够进入作图软件),不要以图片形式插入,同时用表格形式给出作图数据( $\bar{x}\pm s$ )。图表和参考文献一律用英文,但中文文献的中文刊名或书名需放在英文刊名或书名后的括号内。要求图表自明。

6. 为缩短稿件的处理时间,请一定尽快修改稿件,及时发回编辑部。