

## 采用磁微粒分离酶联免疫法构建基于 KGN 细胞的雌激素生物合成筛选模型

鲁丹枫<sup>1,2</sup>, Azimova Bahtigul Jovliqizi<sup>3</sup>, 张国林<sup>1</sup>, 王飞<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院成都生物研究所, 成都 610041; <sup>2</sup>中国科学院研究生院, 北京 100049;

<sup>3</sup>乌兹别克斯坦科学院生物化学研究所, 塔什干 10012, 乌兹别克斯坦

**摘要:** 雌激素在机体生长发育中发挥着重要作用, 其合成代谢紊乱会导致乳腺癌和骨质疏松等疾病发生。目前, 基于细胞的雌激素合成筛选模型需用到放射性底物, 对环境污染大, 成本较高, 限制了具有组织特异性调控雌激素合成的药物筛选。我们以高表达芳香化酶的 KGN 细胞为检测对象, 比较基于聚苯乙烯酶联免疫法和磁微粒分离酶联免疫法的雌二醇 ELISA 试剂盒的交叉反应和灵敏度, 发现相对于聚苯乙烯酶联免疫法, 磁微粒分离酶联免疫法能够稳定高效的检测雌激素合成。进一步比较培养基中酚红和底物睾酮对雌二醇检测的影响, 成功建立通过磁微粒酶联免疫法检测 KGN 细胞雌二醇合成的筛选模型。

**关键词:** KGN 细胞; 雌激素; ELISA; 筛选

中图分类号: R915

文献标识码: A

## Establishment of a Cell-based Screen Platform for Estrogen Biosynthesis Using Magnetic Particle-based Enzyme-linked immunosorbent Assay

LU Dan-feng<sup>1,2</sup>, Azimova Bahtigul Jovliqizi<sup>3</sup>, ZHANG Guo-lin<sup>1</sup>, WANG Fei<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China; <sup>2</sup>Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; <sup>3</sup>Institute of Biochemistry, Uzbekistan Academy of Sciences, Tashkent 10012, Uzbekistan

**Abstract:** Estrogens play important roles in the growth and development of human, and the disorders of estrogen biosynthesis and metabolism can lead to occurrence of many diseases such as breast cancer and osteoporosis. Currently, the cell-based screen models for estrogen biosynthesis need the use of radioactive substances, which cause environmental pollution and the cost for screening too high to be affordable, thus severely restrict the finding of new drugs to modulate estrogen biosynthesis in a tissue-specific manner. By using human granulosa-like KGN cells which express high amount of aromatase, we found that the 17 $\beta$ -estradiol magnetic particle-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was more stable and sensitive than conventional polystyrene-based ELISA in quantification of 17 $\beta$ -estradiol by comparing the cross-reactivity and sensitivity of the two different 17 $\beta$ -estradiol ELISA methods. After further examining the effects of phenol red in cell culture medium and testosterone substance concentration on the quantitative detection of 17 $\beta$ -estradiol, we successfully established a human granulosa-like KGN cell-based screen platform for estrogen biosynthesis by using magnetic particle-based ELISA.

**Key words:** KGN cells; estrogen; ELISA; screen

雌激素是人体内一种重要的内源性物质, 介导了许多重要的生理功能。雌激素主要有三类, 活性最高的是雌二醇 (17 $\beta$ -estradiol, E<sub>2</sub>), 其次是雌酮 (estrone, E<sub>1</sub>), 活性最低的为雌三醇 (estriol, E<sub>3</sub>), 其生物学效应主要通过雌二醇受体 (estrogen recep-

tor  $\alpha/\beta$ ) 相结合, 激活其转录或非转录活性, 在生殖、免疫、骨骼、心血管和中枢神经系统中发挥重要作用。雌激素缺乏常导致骨质疏松、冠心病、阿尔茨海默症、肥胖等常见疾病, 而雌激素相对过量则是诸多肿瘤 (如乳腺癌) 发生、发展、转移等的直接原因<sup>[1]</sup>。生物体内, 胆固醇通过一系列酶促反应合成雌激素, 其限速步骤是由芳香化酶催化雄激素底物转化为雌激素。芳香化酶在卵巢、脂肪组织及骨骼中均有表达, 但在不同组织中使用不同启动子, 其调控机制也

收稿日期: 2012-03-26

接受日期: 2012-05-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20932007, 30900769); 中国科学院“西部之光”项目; 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2011ZX09307-002-02)

\* 通讯作者 Tel: 86-28-85256758; E-mail: wangfei@cib.ac.cn

不一样<sup>[2]</sup>。

在我国,随着社会、经济的发展,近十年来,许多老年性疾病(如心脑血管疾病、骨质疏松症及乳腺癌)的发病率、死亡率和危险因素呈直线上升趋势。例如,由骨质疏松症导致的脊柱或胯骨骨折是老年人发病和死亡的一个主要原因<sup>[3]</sup>。乳腺癌已经是患病率最高的妇女恶性肿瘤,严重影响绝经后妇女的生活质量<sup>[4]</sup>。这些疾病的发生都与雌激素在体内的合成代谢紊乱和/或其介导的信号途径失调有关,因此发现新的雌激素合成调节剂对于这些重大疾病的治疗具有重要意义。但目前受限于小分子化合物的检测方法,针对雌激素合成的化合物筛选进展缓慢,严重限制了具有组织特异性的雌激素合成调节剂的发现。对于雌二醇的检测分析,国内外学者进行了大量研究工作,建立了诸如 TLC、GC/MS、HPLC 等理化分析方法<sup>[5]</sup>。但这些方法操作比较繁琐,不适用于大量样本的筛选工作<sup>[6]</sup>。目前常用方法是以同位素标记的睾酮或雄烯二酮为底物,使用人胎盘微粒体或人重组芳香化酶蛋白<sup>[7]</sup>,或使用哺乳动物细胞系(如表达芳香化酶的人 JEG-3 或 JAr 细胞系),通过测量<sup>3</sup>H-水释放量,从而确定芳香化酶活性<sup>[8]</sup>。同位素方法的优点是所测结果可靠,检测灵敏度高;缺点是操作复杂,需要专门的实验设备和条件,成本高,难以做到高通量筛选。人卵巢颗粒细胞 KGN 细胞被发现表达较高水平的芳香化酶,由于缺乏 17 $\alpha$ -羟化酶,其本身并不产生睾酮或雌激素,且促卵泡激素(FSH)和福斯克林(Forskolin)可显著促进细胞内芳香化酶表达,是进行雌激素合成研究的良好细胞<sup>[9,10]</sup>。采用非放射性雌激素 ELISA 方法,能有效地检测出 KGN 细胞芳香化酶活性变化<sup>[9,10]</sup>,具有快速、简便、灵敏、经济的特点,适合大批量样品检测<sup>[11]</sup>。但这种基于聚苯乙烯基质的酶联免疫法的抗体与聚苯乙烯材料是疏水性非特异性结合的,导致检测灵敏度低,重复性不好。而磁微粒分离酶联免疫法具有很多优点,例如磁微粒尺寸小、表面积大,共价交联结合抗体,增加了抗原-抗体反应的效率,降低非特异性结合,检测更快速,更精确<sup>[12,13]</sup>。

虽然磁微粒分离免疫法已用于检测环境污染物中的雌激素<sup>[14,15]</sup>,但该方法在基于细胞的雌激素活性评价和筛选方面的应用尚有待进一步研究。本研究通过比较传统的聚苯乙烯酶联免疫法和磁微粒分离酶联免疫法的检测灵敏度和特异性差异,确定

KGN 细胞系的培养条件、底物睾酮处理浓度等因素,构建雌激素活性检测的筛选模型。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

睾酮(T)、福美司坦(FOR)及福斯克林(FSK)买自 sigma 化学公司(St. Louis, MO)。睾酮、福美司坦及福斯克林用 DMSO 溶解稀释,配成终浓度为 100 mmol/L 的原始溶液,存放在-20℃。化合物溶液用 DMSO 依次梯度稀释 10 倍。DMSO 在培养基中的最终浓度为 0.1% (v/v)。新生小牛血清、胎牛血清及活性炭/葡聚糖处理去除内源性激素的新生小牛血清买自 GIBCO 公司。有、无酚红的 DMEM/F-12 培养基买自 Invitrogen 公司。青霉素、PBS 及含 EDTA 的胰酶买自成都哈里生物公司。BCA 蛋白检测试剂盒买自上海 Bestbio 公司。

### 1.2 试剂盒

基于磁微粒分离酶联免疫法的 *Ekozyme* 人雌二醇 ELISA 诊断试剂盒,北京,倍爱康生物技术有限公司。基于聚苯乙烯基质酶联免疫法的 *Cussabio* 人雌二醇 ELISA 试剂盒,武汉,华美生物技术有限公司。

### 1.3 细胞培养

KGN 细胞系(解放军总医院,母义明教授提供,中国北京)在补充有 5% (v/v) 胎牛血清(GIBCO, Invitrogen),青霉素(100 单位/mL)及链霉素(0.1 g/L)的 DMEM/F-12 培养基(Invitrogen, Carlsbad, CA),37℃,5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 芳香化酶活性检测

根据文献<sup>[10]</sup>并作适当修改,3 × 10<sup>4</sup> KGN 细胞/ml 接种在 24 孔组织培养板中培养 24 h。培养基更换成不含血清的、DMEM/F-12 培养基,加入不同浓度测试化合物,培养 24 h。加入底物睾酮,继续培养 24 h。吸取培养基及去除培养基后裂解细胞所得溶液存于-20℃。培养基 13000 rpm,离心 1 min,使培养基中细胞碎片等沉淀,获得培养基上清液。用雌二醇检测试剂盒定量培养基上清液中雌二醇量。所得结果经蛋白校正,表示为对照 DMSO 的百分数。用 BCA 蛋白检测试剂盒定量裂解细胞所得溶液的蛋白含量。

#### 1.4.2 检测方法

按各种试剂盒的使用说明书进行操作。用 Thermo Scientific Verioskan Flash 多功能读数仪检测

吸光度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 聚苯乙烯酶联免疫法与磁微粒分离酶联免疫法的底物特异性研究

以 KGN 细胞系为研究对象检测雌二醇合成变化需要以睾酮为底物,而睾酮的化学结构与雌二醇的化学结构具有较高的相似性。因此,为了研究聚

苯乙烯酶联免疫法与磁微粒分离酶联免疫法在雌二醇检测中的特异性,我们检测了这两种试剂盒与底物睾酮的交叉反应。表 1 表明,这两种酶联免疫法的交叉反应都较低,睾酮几乎不影响雌二醇检测。即,基于聚苯乙烯酶联免疫法的 ELISA 试剂盒与基于磁微粒分离酶联免疫法的 ELISA 试剂盒的特异性都较高。

表 1 雌二醇检测法的交叉反应率

Table 1 The cross-reactivity of polystyrene-and magnetic particle-based 17 $\beta$ -estradiol assay methods(%)

睾酮原始浓度 Concentration of testosterone ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.001	0.01	0.1	1	10
聚苯乙烯酶联免疫法	0.007	0.05	0.17	0.38	6.25
磁微粒分离酶联免疫法	0.07	0.13	0.64	1.22	8.35

### 2.2 聚苯乙烯酶联免疫法与磁微粒分离酶联免疫法的灵敏度研究

为了确定聚苯乙烯酶联免疫法与磁微粒分离酶联免疫法雌二醇检测灵敏度,使用这两种 ELISA 检测方法检测 DMSO、10  $\mu\text{mol/L}$  福斯克林及 50  $\mu\text{mol/L}$  福美司坦处理 KGN 细胞系后芳香化酶活性变化情况<sup>[16-18]</sup>。图 1 表明,同种处理条件,磁微粒分离酶联免疫法检测到更高的雌二醇量,芳香化酶活性变化更显著。上述结果表明,与传统的聚苯乙烯酶联免疫法相比,磁微粒分离酶联免疫法灵敏度更高,更适合于雌二醇检测。

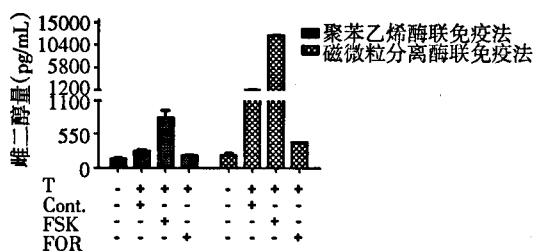


图 1 雌二醇检测方法比较

Fig. 1 The sensitivity comparison of polystyrene-and magnetic particle-based 17 $\beta$ -estradiol assay methods

### 2.3 酚红对雌二醇检测的影响

培养基所含的酚红用于指示培养基中 CO<sub>2</sub> 浓度变化,其颜色是粉红色。为了确定酚红颜色对检测结果的影响,我们用聚苯乙烯酶联免疫法 (OD450) 和磁微粒分离酶联免疫法 (OD550) 测量 PBS 溶液及酚红溶液的吸光度值,图 2 表明,两种雌二醇检测方法中,酚红溶液在检测波长处的吸光度

值都显著大于 PBS 在对应波长处的吸光度值。上述结果表明,由于酚红颜色干扰,导致检测结果比真实结果更大。因此,应用不含酚红的 DMEM/F-12 培养基接种 KGN 细胞系。

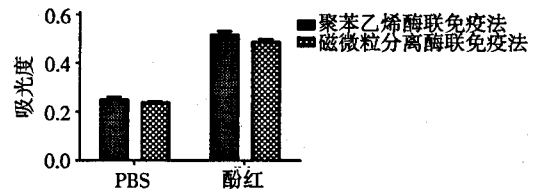


图 2 酚红对雌二醇检测结果的影响

Fig. 2 The effect of phenol red in the culture medium on quantification of 17 $\beta$ -estradiol in polystyrene-and magnetic particle-based 17 $\beta$ -estradiol assay methods

### 2.4 最适睾酮处理终浓度的研究

为了优化检测体系的灵敏度,我们用基于磁微粒分离酶联免疫法的 ELISA 试剂盒检测底物睾酮与产物雌二醇间的浓度关系。图 3 表明,当底物睾酮终浓度为 10 nmol/L 时,与 DMSO 相比,50  $\mu\text{mol/L}$  福美司坦抑制了 22% 的芳香化酶活性,而 10  $\mu\text{mol/L}$  福斯克林增加了 300% 的雌二醇量。而其它睾酮处理浓度条件下,福斯克林或福美司坦激活或抑制芳香化酶活性的能力不显著。这可能因为,基于磁微粒分离酶联免疫法的雌二醇 ELISA 试剂盒测量范围为 0 ~ 11 nmol/L,底物睾酮处理终浓度过大,造成培养基中雌二醇量超过该方法的检测极限。上述结果表明,底物睾酮处理终浓度为 10 nmol/L 时,基于磁微粒分离酶联免疫法的 ELISA 试

剂盒具有最佳检测灵敏度。

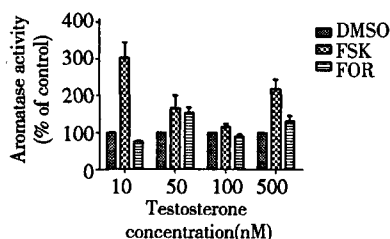


图3 睾酮浓度对雌二醇合成检测结果的影响

Fig. 3 The effect of testosterone concentration on quantification of  $17\beta$ -estradiol in magnetic particle-based  $17\beta$ -estradiol assay methods

## 2.5 筛选模型有效性研究

为了确定基于磁微粒分离酶联免疫法的检测体系有效性,我们检测底物睾酮终浓度为 10 nmol/L 时,不同浓度芳香化酶抑制剂及激动剂对 KGN 细胞系雌激素合成的影响。如图 4 所示,与不加底物睾酮相比,加入睾酮使培养基中雌二醇量增加了 9 倍,表明 KGN 细胞系有内源性芳香化酶蛋白表达。与加入睾酮处理的相比,加入不同浓度(1-10  $\mu$ mol/L)阳性对照福斯克林,培养基中雌二醇生成量以浓度依赖方式增加,其中 10  $\mu$ mol/L 福斯克林诱导培养基中雌二醇量增加了 4.2 倍左右。加入不同浓度(1~50  $\mu$ mol/L)芳香化酶抑制剂福美司坦,雌二醇合成量以浓度依赖方式被抑制,其中 50  $\mu$ mol/L 福美司坦抑制了 30% 左右的雌二醇合成量。以上结果表明我们成功建立雌激素筛选模型,可用于筛选雌激素合成调节剂。

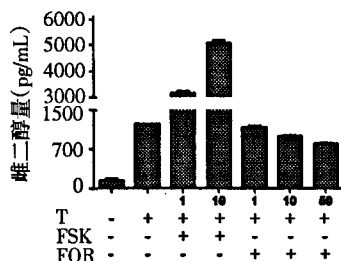


图4 KGN 细胞系筛选模型有效性验证

Fig. 4 The validation of the screen platform in human KGN cells

## 3 结论

通过比较传统基于聚苯乙烯基质的酶联免疫法及磁微粒分离酶联免疫法的检测特异性及灵敏度,我们发现,虽然聚苯乙烯酶联免疫法与磁微粒分离酶联免疫法的检测特异性差别不大,但磁微粒分离

酶联免疫法的灵敏度更高,更适合于雌二醇检测。通过进行酚红对检测结果影响及底物睾酮处理终浓度的研究发现,酚红颜色干扰导致磁微粒分离酶联免疫法的检测结果变大,磁微粒分离酶联免疫法的最适底物睾酮处理终浓度为 10 nmol/L。通过检测筛选模型有效性确定所构建的雌激素筛选模型,即在 24 孔组织培养板中,使用不含酚红、含 5% 活性炭/葡聚糖处理去除内源性激素的新生小牛血清的 DMEM/F-12 培养基接种  $3 \times 10^4$  KGN 细胞/ml,培养 24 h。加测试物处理 KGN 细胞系前,培养基更换成不含酚红、不含血清的 DMEM/F-12 培养基;24 小时后,加入终浓度为 10 nmol/L 底物睾酮,继续培养 24 h,用基于磁微粒分离酶联免疫法的雌二醇 ELISA 试剂盒检测培养基中雌二醇量。所建立的筛选模型避免采用放射性底物,环境友好,成本较低,适用于基于细胞的雌激素生物合成活性评价和高通量筛选,对筛选和发现具有组织特异性的雌激素合成调节剂具有重要意义。

## 参考文献

- 1 Simpson ER, Misso M, Hewitt KN, et al. Estrogen—the good, the bad, and the unexpected. *Endocrine Reviews*, 2005, 26: 322-330.
- 2 Timm GE. Final detailed review paper on aromatase. *EPA*, 2005:1-93.
- 3 Nawata H, Tanaka S, Takayanagi R, et al. Aromatase in bone cell; association with osteoporosis in postmenopausal women. *J Steroid Biochem mol biol*, 2005, 53:165-174.
- 4 Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med*, 2006, 354:270-282.
- 5 Sawaya NW, Lone KP, Husain A, et al. Screening for estrogenic steroids in sheep and chicken by the application of enzyme-linked immunosorbent assay and a comparison with analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 1998, 63:563-569.
- 6 Singh P, Ram BP, Sharkov N. Enzyme-immunoassay for screening of sulfamethazine in swine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1989, 37:109-114.
- 7 Njar VCO, Grun G, Hartmann RW. Evaluation of 6,7-aziridinyl steroids and related compounds as inhibitors of aromatase (P-450arom). *J Enzyme Inhibition*, 1995, 9:195-202.
- 8 Lephart ED, Simpson ER. Assay of aromatase activity. *Methods in Enzymology*, 1991, 206:477-483.

(下转第 67 页)

结构特异且均具有较强的生物活性,但化合物 1~3 通过钙流模型评价其生物活性的测试结果却显示它们均无促进钙离子细胞内流的活性。

虽然白三叶草植物内生真菌烟曲霉的发酵乙酸乙酯提取物显示具有抑制白菜种子发芽的活性,但分离得的四个生物碱的量少,未能进一步评价其是否就是其化感作用的活性物质,以及能否抑制紫茎泽兰的生长,这些工作拟将在以后的工作中继续开展。

致谢:云南大学李文均教授鉴定真菌。

#### 参考文献

- Ross SM, King JR, Cesar Izaurralde R, et al. Weed suppression by seven clover species. *Agron J*, 2001, 93: 820-827.
  - Zhang XF(张晓芳), Wang JX(王金信), Xie N(谢娜), et al. Allelopathic effects of *Trifolium repens* volatile and its chemical components. *Acta Phytophy Sin*(植物保护学报), 2011, 38: 374-378.
  - Wang LH(王莉衡). Research advance on plant endophyte. *Chem Bioeng*(化学与生物工程), 2011, 28(3): 5-7.
  - Wang SL, Chen YH, Wang CL, et al. Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme Microb Technol*, 2005, 36: 660-665.
  - Han XX(韩小贤), Xu XY(许晓妍), Cui CB(崔承彬), et al. Alkaloidal compounds produced by a marine-derived fungus, *Aspergillus fumigatus* H1-04, and their antitumor activities. *Chin J Med Chem*(中国药物化学杂志), 2007, 14: 232-237.
  - Zhou F(周凤), Zhang HC(张弘弛), Liu R(刘瑞), et al. Isolation and biological evaluation of secondary metabolites of endophytic fungus *Aspergillus* sp. from *Astragalus membranaceus*. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2012, 18: 125-128.
  - Jens CF, Christian R, Kristian FN, et al. Metabolomics of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol*, 2009, 47: S53-S71.
  - Tomoda H, Kim YK, Nishida H, et al. Pyripyropenes, novel inhibitors of Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *aspergillus fumigatus* I. production, isolation, and biological properties. *J Antibiot*, 1994, 47: 148-153.
  - Kim YK, Tomoda H, Nishida H, et al. Pyripyropenes, novel inhibitors of Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *aspergillus fumigatus* II. structure elucidation of pyripyropenes A, B, C, D. *J Antibiot*, 1994, 47: 154-162.
  - Cole RJ, Kirksey J, Dorner JW, et al. Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* species isolated from molded silage. *J Agric Food Chem*, 1977, 25: 826-830.
  - Zhang LM(张丽敏), Li ZL(李占林), Bai J(白皎), et al. Metabolites of *Aspergillus* sp. HT-2. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2011, 46: 1154-1158.
- 
- (上接第 30 页)
- Nishi Y, Yanase T, Mu YM, et al. Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses functional follicle-stimulating hormone receptor. *Endocrinology*, 2001, 142: 437-445.
  - Ohno K, Araki N, Yanase T, et al. A novel nonradioactive method for measuring aromatase activity using a human ovarian granulosa-like tumor cell line and an estrone ELISA. *Toxicol Sci*, 2004, 82: 443-450.
  - Sheth HB, Sporns P. Development of a single ELISA for detection of sulfonamides. *J Agric Food Chem*, 1991, 39: 1696-1700.
  - Foti AG, Herschman H, Cooper JF. A solid-phase radioimmunoassay for human prostatic acid phosphatase. *Cancer Res*, 1975, 35: 2446-2452.
  - Kala M, Bajaj K, Sinha S. Magnetic bead enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detects antigen-specific binding by phage-displayed scFv antibodies that are not detected with conventional ELISA. *Anal Biochem*, 1997, 254: 263-266.
  - Tanaka T, Takeda H, Ueki F, et al. Rapid and sensitive detection of 17 $\beta$ -estradiol in environmental water using automated immunoassay system with bacterial magnetic particles. *J Biotech*, 2004, 108: 153-159.
  - Shelver WL, Parrotta CD, Slawewski R, et al. Development of a magnetic particle immunoassay for polybrominated diphenyl ethers and application to environmental and food matrices. *Chemosphere*, 2008, 73: 18-23.
  - Sanderson JT, Hoedijk J, et al. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by natural and synthetic flavonoid compounds in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol Sci*, 2004, 82: 70-79.
  - Canton RF, Sanderson JT, Letcher RJ, et al. Inhibition and induction of aromatase (CYP19) activity by brominated flame retardants in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol Sci*, 2005, 88: 447-455.
  - Brooks JD, Thompson LU. Mammalian lignans and genistein decrease the activities of aromatase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in MCF-7 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005, 94: 461-467.