

靶向 β -catenin/TCF4相互作用小分子抑制剂荧光偏振高通量筛选模型的建立与应用

陈云雨¹, 胡克¹, 付正豪¹, 牛夏忆¹, 张晶^{2*}, 刘晓平^{1*}

(1. 皖南医学院药物筛选与评价研究所, 安徽 芜湖 241002;

2. 中国医学科学院北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 基于荧光偏振 (fluorescence polarization, FP) 原理, 建立并应用以 β -catenin/TCF4 (T-cell factor 4) 相互作用为靶标的小分子抑制剂荧光偏振高通量筛选模型获得苗头化合物。利用大肠杆菌原核表达系统, 原核表达和分离纯化重组人 β -catenin, 以酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 进行生物学活性鉴定。以异硫氰酸荧光素 (fluorescence isothiocyanate, FITC) 标记的 TCF4 多肽为荧光探针, 通过优化 FITC-TCF4 与 β -catenin 反应浓度, 建立并应用靶向 β -catenin/TCF4 相互作用小分子抑制剂荧光偏振高通量筛选模型进行苗头化合物筛选。利用大肠杆菌原核表达系统成功进行了重组人 β -catenin 原核表达与分离纯化。ELISA 实验证实了纯化的重组人 β -catenin 具有良好的生物学活性。选用 $20 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FITC-TCF4 和 $100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -catenin, 成功建立了 Z' 因子为 0.88 的荧光偏振高通量筛选模型。应用本筛选模型进行高通量筛选, 成功筛选到了血根碱 (sanguinarine)、白屈菜红碱 (chelerythrine) 和化合物 S720 具有良好的抑制活性。本研究成功建立了适用于靶向 β -catenin/TCF4 相互作用小分子抑制剂筛选的荧光偏振高通量筛选模型, 为新型 Wnt 抑制剂的高效化和理性化发现奠定了基础。

关键词: Wnt 抑制剂; β -catenin/TCF4 相互作用; 荧光偏振; 高通量筛选; 血根碱; 白屈菜红碱

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2020)05-0884-08

Development of a fluorescence polarization-based high-throughput screening assay to identify antagonists targeting β -catenin/TCF4 interaction

CHEN Yun-yu¹, HU Ke¹, FU Zheng-hao¹, NIU Xia-yi¹, ZHANG Jing^{2*}, LIU Xiao-ping^{1*}

(1. Institute for Drug Screening and Evaluation, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China; 2. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: To develop a fluorescence polarization (FP)-based high-throughput screening (HTS) assay to identify novel small-molecule antagonists targeting β -catenin/TCF4 (T-cell factor 4) interaction, recombinant human β -catenin was expressed in *Escherichia coli* Rosetta (DE3) cells and purified by HisTrapTM column. The bioactivity of purified β -catenin was further analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). According to FP principle, the β -catenin/TCF4 binding model was performed, and fluorescence isothiocyanate (FITC) labeled TCF4 peptide (FITC-TCF4) served as the molecular probe of adaptor for binding to β -catenin. The FITC-TCF4 and β -

收稿日期: 2019-12-06; 修回日期: 2020-01-16.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81703546); 安徽省自然科学基金资助项目 (1808085QH265); 安徽省高校自然科学研究重大项目 (KJ2019ZD30); 吉林省科技发展计划项目 (20160520045JH); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2017-I2M-1-012); 安徽省大学生创新创业训练计划项目 (S201910368083).

*通讯作者 Tel: 86-10-63180623, E-mail: jingjing-506@hotmail.com;

Tel: 86-553-3932601, E-mail: liuxiaoping@wnmc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0998

catenin working concentration were optimized, and the binding conditions (complex stability and dimethylsulfoxide (DMSO) tolerance) have been investigated yet for further hits screening. The results showed that recombinant human β -catenin was successfully expressed and purified β -catenin exhibited favorable bioactivity in ELISA binding assay. Subsequently, the FP-based HTS assay was performed using 20 nmol·L⁻¹ FITC-TCF4 and 100 nmol·L⁻¹ β -catenin. Under these optimized conditions, a high Z' factor of 0.88 was achieved in a 384-well format and this FP-based HTS assay was very stable with regard to DMSO. Through screening of a natural-based product library (NBPL) using the established FP-based HTS assay, three hits (sanguinarine, chelerythrine, and compound S720) were identified as potential β -catenin/TCF4 interaction antagonists. Taken together, we have successfully developed a simple, robust and reliable FP-based HTS assay for screening of novel antagonists targeting β -catenin/TCF4 interaction.

Key words: Wnt inhibitor; β -catenin/TCF4 interaction; fluorescence polarization; high-throughput screening; sanguinarine; chelerythrine

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 的发病率和死亡率历来高居我国消化系统恶性肿瘤之首, 严重危害居民健康, 其五年生存率仅为 65%^[1,2]。目前, 尽管有手术治疗、放疗、化疗和分子靶向药物等多种治疗手段, 但 CRC 的复发和转移仍是导致其高死亡率的重要原因。在 CRC 复发和转移的过程中, 结直肠癌干细胞 (colorectal cancer stem cell, CCSC) 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路的活化进行自我更新与分化, 形成肿瘤起始细胞 (tumor initiating cells, TICs), 极大促进了 CRC 的转移与恶化^[3-5]。

在经典 Wnt 信号通路中, β -catenin 作为核心转录调控因子, 通过玃狨蛋白重复片段 (armadillo repeats) 结构域与核转录调控因子 TCF4 (T-cell factor 4) 或 LEF1 (lymphoid enhancer factor 1) 的 β BD 结构域 (β -catenin binding domain, β BD) 相互作用形成核转录调控因子复合物, 调控原癌基因表达与 CCSC 恶性转化, 促进 CRC 的复发与转移。因此, β -catenin/TCF4 相互作用已成为 CRC 分子靶向治疗的重要靶标之一^[6,7]。

目前, 已报道的靶向 β -catenin/TCF4 相互作用小分子抑制剂筛选方法主要包括酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 筛选法、4T1 细胞荧光素酶报告基因筛选法、果蝇细胞化学遗传学筛选法和虚拟筛选法。其中, ELISA 筛选法虽然较大程度模拟了 β -catenin 与核转录调控因子 TCF4 的生理相互作用, 但操作步骤繁琐, 筛选过程中需要孵育抗体且多次洗涤, 筛选成本较高, 耗时较长; 4T1 细胞荧光素酶报告基因筛选法和果蝇细胞化学遗传学筛选法主要基于化学发光和 RNA 干扰原理设计, 操作难度较大, 筛选成本较高, 假阳性率也较高; 虚拟筛选法基于靶标分子对接原理设计, 虽然较大程度降低了筛选的实验成本, 但假阳性化合物的有效排除仍是虚拟筛选的核心问题, 必须与实验筛选技术有机结合。基于上述

筛选方法已成功筛选到了 PKF115-584、PKF222-815、PKF118-744、CGP049090、ZTM000990、iCRT-3/5/14、CWP232228、LF3、PNU-74654 等靶向 β -catenin/TCF4 相互作用的小分子抑制剂, 在结直肠癌、乳腺癌、肝癌等肿瘤的实验治疗中展现出良好的应用前景^[8-14]。但上述报道的筛选方法存在的固有缺点和较高的筛选成本, 极大地限制了其在大规模高通量筛选中的推广和应用。

本研究旨在利用荧光偏振 (fluorescence polarization, FP) 原理, 根据 β -catenin/TCF4 相互作用的结构生物学信息, 将异硫氰酸荧光素 (fluorescence isothiocyanate, FITC) 标记的 TCF4 多肽 (FITC-TCF4) 作为核转录调控因子 TCF4 的模拟物^[15,16], 建立并应用荧光偏振高通量筛选模型筛选苗头化合物。荧光偏振高通量筛选模型的建立对靶向 β -catenin/TCF4 相互作用的新型 Wnt 抑制剂高效化与理性化发现具有重要意义。

材料与方法

材料与试剂 重组人 β -catenin (138~781 aa) 表达工程菌由皖南医学院药物筛选与评价研究所刘晓平教授课题组构建; 蛋白质标准分子量 (Transgen 公司); 蛋白胨、酵母粉和琼脂粉 (Oxide 公司); 卡那霉素和异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG) (Sigma 公司); HisTrap™ 层析柱 (GE 公司); 二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白质浓度测定试剂盒 (Thermo 公司); 牛血清白蛋白 (bull serum albumin, BSA) 和辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗大鼠 IgG (Biosharp 公司); MaxiLumin™ 化学发光液 (Tanon 公司); 四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB) 溶液 (TianGen 公司); 384 孔板和酶标板 (Corning 公司); 异硫氰酸荧光素 (fluorescence isothiocyanate, FITC) 标记的 TCF4 多肽荧光探针

(FITC-TCF4: FITC-GGDDLGANDELISFKDEGEQEEK-OH) 和 TCF4 多肽 (TCF4: GGDDLGANDELISFKDEGEQEEK-OH) 由 China Peptides 公司合成; 天然产物化合物库 (ChemDiv 公司); 血根碱、白屈菜红碱和化合物 S720 (TargetMol 公司); 大鼠抗人 β -catenin 多克隆抗体、谷胱甘肽转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 和 GST-LEF1 β BD (1~76 aa) 由皖南医学院药物筛选与评价研究所刘晓平教授课题组制备和保存; 其他生化试剂为国产分析纯试剂。

仪器 细菌震荡培养箱 (上海知楚仪器有限公司); 超声波细胞粉碎机 (SCIENTZ 公司); 高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司); AKTA Pure 层析系统 (GE 公司); 蛋白质电泳仪与转膜仪 (Bio-Rad 公司); 凝胶成像系统 (Clinux 公司); 多功能酶标仪 (BioTek 公司)。

重组人 β -catenin 原核表达与分离纯化 按照参考文献^[17]所述的方法进行重组人 β -catenin 原核表达与分离纯化。首先, 将工程菌以固体平板划线法进行复壮。随机挑取单菌落接种于 LB 液体培养基 (含 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素), 以 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG, 25 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 10 h, 离心收集菌体。菌体以超声波法破碎后, 上清液再以 HisTrapTM 亲和柱分离纯化。纯化的重组人 β -catenin 以 Western blot 实验进行鉴定, 经浓缩和透析后, 再以 BCA 法定量。

重组人 β -catenin 生物学活性鉴定 按照参考文献所述的 ELISA 方法进行重组人 β -catenin 生物学活性鉴定^[17]。首先, 将 GST 与 GST-LEF1 β BD (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 包被 96 孔酶标板, 每孔 100 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日, 酶标板经 10% BSA 封闭 2 h 后, 各孔依次加入 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ β -catenin, 每孔 100 μL , 每组设置 3 组复孔, 室温孵育 1 h。依次加入大鼠抗人 β -catenin 多克隆抗体 (1:10 000) 和 HRP-羊抗大鼠 IgG (1:4 000) 后, TMB 溶液显色, 多功能酶标仪检测 A_{450} 值。

荧光探针 FITC-TCF4 最佳反应浓度的确定 将 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FITC-TCF4 以荧光偏振反应液 (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris、10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA pH 8.0) 稀释至终浓度分别为 5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 依次加入到 384 孔板中, 每孔 60 μL , 每组设置 3 组复孔, 室温孵育 15 min, 以多功能酶标仪检测 mP 值 (millipolarization units, mP)。

β -Catenin/FITC-TCF4 结合稳定性实验 将 40 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FITC-TCF4 加入到 384 孔板中, 每孔 30 μL , 再依次加入 0、10、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1 000 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -catenin, 每孔 30 μL , 每组设置 3 组复孔, 室温孵育 15、30 min 和 1、2、3、4、5 和

6 h, 以多功能酶标仪检测 mP 值。

同法, 将上述结合反应分别在 4、25、37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 再以多功能酶标仪检测 mP 值。以 GraphPad Prism5.0 软件拟合结合曲线, 计算 β -catenin/FITC-TCF4 结合反应的解离平衡常数 (dissociation constant) K_d 值和 ΔmP 值。

β -Catenin 最佳反应浓度的确定 将 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TCF4 多肽以 200 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -catenin 进行 2 倍倍比稀释 (起始浓度 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 共稀释 10 个浓度梯度) 后, 加入到 384 孔板中, 每孔 30 μL , 每组设置 3 组复孔, 室温孵育 45 min。再将 40 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FITC-TCF4 依次加入, 每孔 30 μL , 室温孵育 15 min, 多功能酶标仪检测 mP 值。以 GraphPad Prism5.0 软件拟合 TCF4 多肽抑制曲线, 计算半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 值和 ΔmP 值。再分别以 400 和 800 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -catenin 同法稀释 TCF4 多肽, 计算 IC_{50} 值和 ΔmP 值。本实验中设定含 2% DMSO 孔为阴性对照孔, 只含 20 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FITC-TCF4 孔为阳性对照孔。

DMSO 耐受性实验 在药物高通量筛选中, DMSO 是经常使用的有机溶剂, 因此需要评价实验体系对 DMSO 的耐受程度。将 40 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FITC-TCF4 加入到 384 孔板中, 每孔 30 μL , 再将 0、10、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1 000 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -catenin 依次加入到 384 孔板中, 每孔 30 μL 。反应体系中含 DMSO 终浓度分别为 0、2%、4%、6%、8%、10%、20%, 每组设置 3 组复孔, 室温孵育 15 min, 以多功能酶标仪检测 mP 值。用 GraphPad Prism5.0 软件拟合结合曲线, 计算 β -catenin/FITC-TCF4 结合反应在各 DMSO 浓度中的 K_d 值和 ΔmP 值。

Z' 因子及其他主要技术参数的测定 将 40 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FITC-TCF4 和 200 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -catenin 加入到 384 孔板中, 每孔各加入 30 μL , 其中 A 板 1[#]~50[#] 孔反应体系中含 2% DMSO, B 板 1[#]~50[#] 孔反应体系中含 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TCF4 多肽, 室温孵育 15 min, 以多功能酶标仪检测 mP 值。设定 A 板 1[#]~50[#] 孔为阴性对照孔, B 板 1[#]~50[#] 孔为阳性对照孔, 按照 BioTek 操作系统的相关程序进行 Z' 因子计算。

另外, 对本筛选模型的信号本底比值 (signal to background, S/B)、信号窗 (signal window, SW)、信噪比 (signal to noise, S/N) 和信号本底变异系数 (coefficient of variation of signal/background, CV) 进行计算分析。

苗头化合物的高通量筛选 天然产物化合物库 (约 5 000 库容) 以 DMSO 稀释至浓度为 1.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 即为次级库。首先, 将 200 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -catenin 加入到 384 孔板中, 每孔 29 μL , 再依次加入小分子化合物, 每孔 1 μL ,

室温孵育 45 min。再将 $40 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FITC-TCF4 加入到 384 孔板中, 每孔 $30 \mu\text{L}$, 室温继续孵育 15 min, 多功能酶标仪检测 mP 值, 计算小分子化合物的抑制率。阴性对照孔和阳性对照孔的设定如上所述。苗头化合物 (hit) 初判标准: 抑制率 $>50\%$ 的小分子化合物。

苗头化合物 IC_{50} 值测定 将 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 血根碱 (sanguinarine, SAN)、白屈菜红碱 (chelerythrine, CHE) 和化合物 S720 以 $200 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -catenin 进行 2 倍倍比稀释 (起始浓度 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 共稀释 12 个浓度梯度), 加入到 384 孔板中, 每孔 $30 \mu\text{L}$, 每组设置 3 组复孔, 室温孵育 45 min。再将 $40 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FITC-TCF4 依次加入到 384 孔板中, 每孔 $30 \mu\text{L}$, 室温继续孵育 15 min, 多功能酶标仪检测 mP 值。以 GraphPad Prism5.0 软件拟合苗头化合物的抑制曲线, 计算 IC_{50} 值。

数据处理与分析 采用 GraphPad Prism5.0 软件拟合 β -catenin/FITC-TCF4 结合反应曲线和 Hit 抑制曲线, 分别计算 K_d 值和 IC_{50} 值, 其中 Hit 抑制率计算公式如下所述:

$$\text{Hit 抑制率 (\%)} = \frac{\text{mP}_{\text{阴性对照}} - \text{mP}_{\text{Hit}}}{\text{mP}_{\text{阴性对照}} - \text{mP}_{\text{阳性对照}}} \times 100\%$$

结果

1 重组人 β -catenin 原核表达、分离纯化与活性鉴定

工程菌经诱导培养后, 菌体裂解上清液以 HisTrapTM 亲和层析柱分离纯化。考马斯亮蓝染色结果显示, 诱导的工程菌在分子质量 77 kD 位置有明显的蛋白质表达条带, 上清液中含有大量目的蛋白质, 表明重组人 β -catenin 在大肠杆菌中以胞内可溶形式表达。纯化的重组人 β -catenin 仅有单一蛋白质条带, 说明具有较高的纯度 (图 1A)。Western blot 实验结果表明, 在分子质量 77 kD 位置同样有单一蛋白质条带。随着重组人 β -catenin 剂量的增加, 蛋白质条带逐渐增粗, 证实了重组人 β -

catenin 的正确表达 (图 1B)。GST-LEF1 β BD 介导的 ELISA 实验结果表明, 重组人 β -catenin 能与 GST-LEF1 β BD 发生特异性结合反应, 结合反应具有良好的量效关系和浓度依赖性 (图 1C)。上述实验结果表明, 成功进行了重组人 β -catenin 原核表达与分离纯化, 纯化的重组人 β -catenin 具有良好的生物学活性。纯化的重组人 β -catenin 经浓缩、透析和 BCA 定量后, 浓度为 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2 荧光探针 FITC-TCF4 最佳反应浓度的确定

将不同浓度的 FITC-TCF4 置于 384 孔板中, 以多功能酶标仪检测 mP 值。实验结果表明, 从 $100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 开始, 不同浓度的 FITC-TCF4 在实验体系中的 mP 值基本保持一致, 在 $5\sim 50 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度时, mP 值波动最小, 基本保持在 25~30 之间, 具有相对较低且平稳的 mP 值 (图 2)。为了保持实验体系的良好灵敏度和较低的本底值, 选用 FITC-TCF4 最佳反应浓度为 $20 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

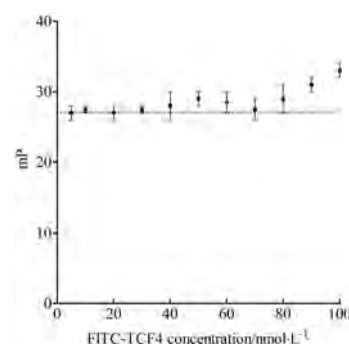


Figure 2 Determination of the optimal working concentration of FITC-TCF4 in FP screening assay. FITC: Fluorescence isothiocyanate; TCF4: T-cell factor 4; FP: Fluorescence polarization

3 β -Catenin/FITC-TCF4 结合反应的稳定性

采用饱和曲线法, 测定不同孵育时间和反应温度条件下 β -catenin/FITC-TCF4 结合反应的 K_d 值和 ΔmP 值。荧光偏振实验结果表明, 室温孵育 15、30 min 和

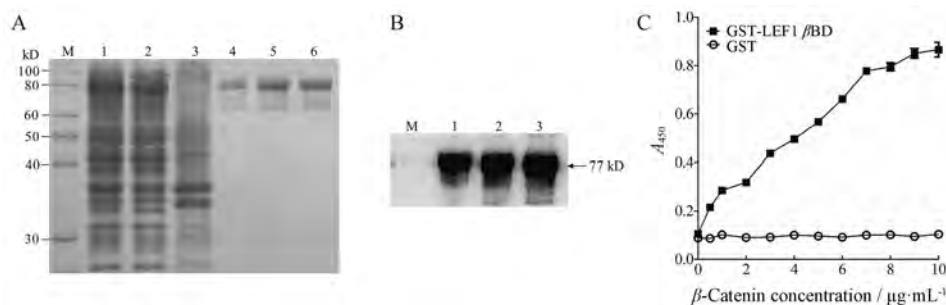


Figure 1 Bacterial expression, purification, and identification of recombinant human β -catenin. A: Bacterial expression and purification of recombinant human β -catenin. M: Marker; 1: Total cell proteins; 2: Supernatant; 3: Pellet; 4-6: Purified β -catenin band. B: Identification of recombinant human β -catenin using Western blot assay. M: Marker; 1: $0.5 \mu\text{g}$ β -catenin band; 2: $1 \mu\text{g}$ β -catenin band; 3: $2 \mu\text{g}$ β -catenin band. C: Bioactivity analysis of purified β -catenin binding to GST-LEF1 β BD using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). GST: Glutathione S-transferase; LEF1 β BD: Lymphoid enhancer factor 1 β -catenin binding domain

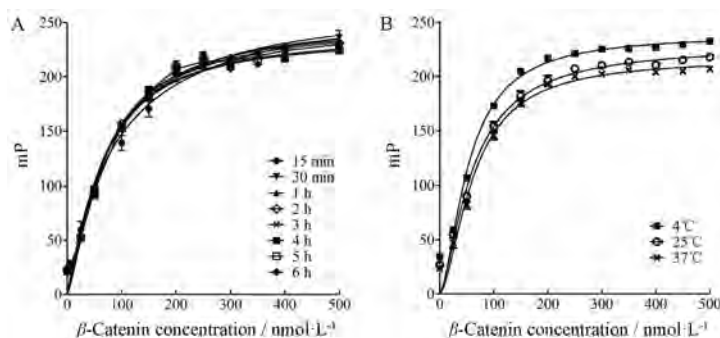


Figure 3 The stability analysis of β -catenin/FITC-TCF4 complex. A: Saturation binding curves at 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, and 6 h; B: Saturation binding curves at 4, 25, and 37 °C

1、2、3、4、5和6 h时, 结合反应的 K_d 值和 ΔmP 值基本保持稳定(图3A、表1)。室温孵育15 min时, 结合反应基本达到平衡, K_d 值约为 $(68.11 \pm 4.08) \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, ΔmP 值约为 (185.87 ± 3.44) (表1)。另外, 结合反应在4、25、37 °C孵育15 min时, 结合反应的 K_d 值和 ΔmP 值也基本保持稳定, K_d 值约为 $(62.76 \pm 3.27) \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, ΔmP 值约为 (184.66 ± 4.92) (图3B、表2)。上述实验结果表明, β -catenin/FITC-TCF4结合反应具有良好的稳定性。

Table 1 K_d and ΔmP values at different incubation durations. K_d : Dissociation constant; ΔmP : Dynamic range of millipolarization units

Stability indices	Time duration							
	15 min	30 min	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
$K_d/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	70.24	71.01	68.05	67.73	68.81	65.51	63.76	63.57
ΔmP	181	186	183	182	191	190	188	186

Table 2 K_d and ΔmP values at different incubation temperatures

Stability indices	Temperature/°C		
	4	25	37
$K_d/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	58.74	66.74	62.81
ΔmP	184	179	191

4 β -Catenin最佳反应浓度的确定

在荧光偏振实验中, 通常认为参与反应的配体蛋白浓度至少为 K_d 值的1.5倍才能满足高通量筛选需求^[18,19]。为了确定 β -catenin最佳反应浓度, 分别采用1.5、3、6倍 K_d 值, 即100、200、400 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -catenin与20 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FITC-TCF4反应建立荧光偏振反应体系, 并利用该反应体系检测TCF4多肽的竞争性抑制作用, 计算 IC_{50} 值和 ΔmP 值。实验结果表明, 随着 β -catenin浓度的增加, TCF4多肽的 IC_{50} 值逐渐升高。1.5倍 K_d 值, 即100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -catenin反应体系中, TCF4多肽具有较低的 IC_{50} 值, ΔmP 值稳定在165左右, 具有较大的信号窗(图4、表3)。另外, 本实验也证实了所建立的荧光偏振实验体系具有良好的特异性。为了保证实验

体系的高灵敏度和较大的信号窗, 选用 β -catenin最佳反应浓度为100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

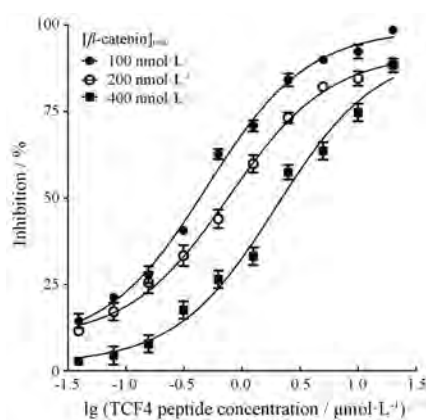


Figure 4 The inhibitory curves of TCF4 peptide in the competitive FP assay

Table 3 IC_{50} and ΔmP values of TCF4 peptide in the competitive FP assay. IC_{50} : Half maximal inhibitory concentration

Inhibitory indices	β -Catenin concentration/ $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$		
	100	200	400
$IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.36	0.75	2.47
ΔmP	165	185	190

5 实验体系对DMSO的耐受性

通过分析DMSO对 β -catenin/FITC-TCF4结合反应饱和曲线 K_d 值和 ΔmP 值的影响, 判断荧光偏振实验体系对DMSO的耐受性。当DMSO浓度在0~20%时, 饱和曲线的 K_d 值为 $(64.66 \pm 0.68) \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, ΔmP 值为 (183.92 ± 4.12) , 波动极小(图5、表4)。上述实验结果表明, 当DMSO浓度在20%以内时, 其对 β -catenin/FITC-TCF4结合反应没有显著影响, 实验体系对DMSO具有良好的耐受性。

6 Z'因子及其他主要技术参数的测定

Z'因子是评价药物高通量筛选体系稳定性的核心参数。通过综合分析和计算, 本筛选模型Z'因子值为

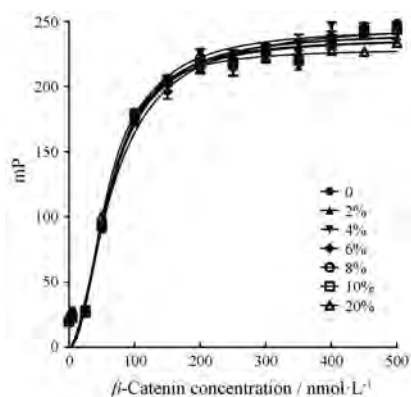


Figure 5 DMSO tolerance analysis in FP-based high-throughput screening (HTS) assay

Table 4 K_d and ΔmP values in DMSO tolerance analysis

Stability indices	DMSO concentration/%						
	0	2	4	6	8	10	20
$K_d/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	65.91	66.23	68.05	65.59	65.90	64.42	59.32
ΔmP	187	183	184	178	186	185	181

0.88, 满足高通量筛选中 Z' 因子大于 0.5 的基本要求 (图 6)。另外, 本筛选模型 S/B、SW、S/N 和 CV 等参数也完全满足高通量筛选的基本要求 (表 5)。

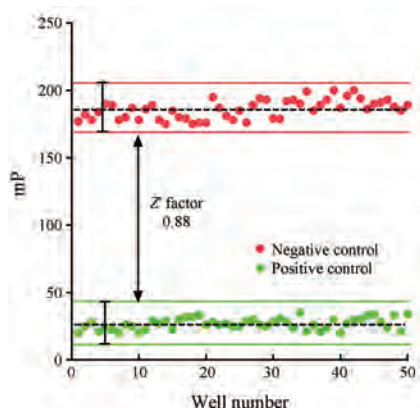


Figure 6 Determination of Z' factor in FP-based HTS assay

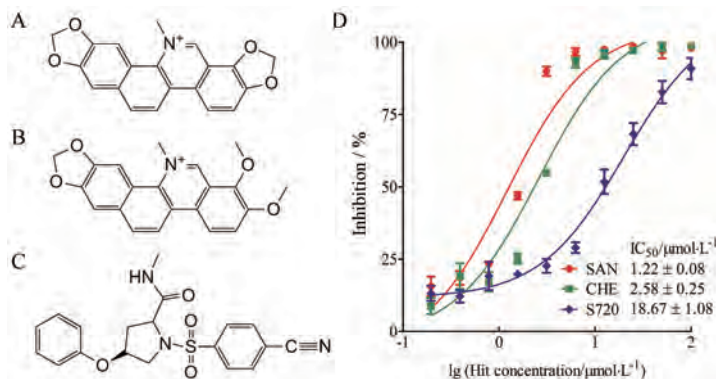


Figure 7 Three hits were validated in FP-based HTS assay. A: The chemical structure of sanguinarine (SAN); B: The chemical structure of chelerythrine (CHE); C: The chemical structure of compound S720; D: The inhibitory curves of three hits in FP screening assay

Table 5 General indicators in FP-based HTS assay. S/B: Signal to background; S/N: Signal to noise; SW: Signal window; CV: Coefficient of variation of signal/background

Indicator	Requirement of HTS	Result of FP
S/B	> 3	7.65
S/N	> 10	15.41
SW	Not determined	160.09
CV/%	< 10	2.18
Z'	> 0.5	0.88

7 苗头化合物的筛选与发现

应用上述已建立的荧光偏振高通量筛选模型, 对本室天然产物化合物库进行了高通量筛选, 成功筛选到血根碱 (SAN)、白屈菜红碱 (CHE) 和化合物 S720 具有良好的抑制活性, 其 IC_{50} 值分别为 (1.22 ± 0.08) 、 (2.58 ± 0.25) 、 $(18.67 \pm 1.08) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 7)。

讨论

Wnt/ β -catenin 信号通路是调控肿瘤干细胞形成与分化的关键信号通路, 与肿瘤生长、复发、转移和耐药密切相关。在正常细胞中, 胞质中 β -catenin 通过泛素化途径降解, 因此不存在 Wnt/ β -catenin 信号通路。但在肿瘤细胞中, 胞质中累积的 β -catenin 大量进入细胞核与核转录调控因子 TCF4 或 LEF1 相互作用, 形成核转录调控因子复合物, 活化 Wnt/ β -catenin 信号通路, 启动原癌基因的大量表达^[6,7]。所以, 靶向 β -catenin 介导的核转录调控 (β -catenin responsive transcription, CRT), 尤其是 β -catenin/TCF4 相互作用, 是新型高选择性 Wnt 抑制剂开发的重要策略之一。

高活性的 β -catenin 制备是荧光偏振高通量筛选模型建立的重要基础。本研究采用大肠杆菌原核表达技术, 成功进行了重组人 β -catenin 原核表达、分离纯化与活性鉴定。由于大肠杆菌表达的重组人 β -catenin 融合有 His 标签, 故此直接采用 HisTrapTM 亲和层析柱进行一步法分离纯化。GST-LEF1 β BD 介导的 ELISA 实验

证实了纯化的重组人 β -catenin能与GST-LEF1 β BD特异结合,结合反应具有良好的量效关系,这表明纯化的重组人 β -catenin具有良好的生物学活性。

荧光偏振技术具有均相反应、操作简便、检测灵敏、成本低廉等优点,被广泛应用于药物筛选、蛋白质活性鉴定、药物分析与疾病诊断^[19-23]。本研究以 β -catenin/TCF4相互作用为靶标,将荧光探针FITC-TCF4作为核转录调控因子TCF4的模拟物,基于偏振荧光强弱与荧光分子大小正相关的原理建立了小分子抑制剂荧光偏振高通量筛选模型^[15,16,24]。如果小分子化合物为非活性化合物,那么分子量较大的 β -catenin将与分子量较小的FITC-TCF4发生特异性结合反应,荧光复合物的分子量将增大,旋转速度较慢,荧光偏振实验中表现较高的mP值;反之,活性化合物能够特异性阻断 β -catenin与FITC-TCF4的相互作用,荧光复合物分子量将明显减小,旋转速度较快,荧光偏振实验中则表现较低的mP值。

相比已报道的靶向 β -catenin/TCF4相互作用小分子抑制剂的ELISA筛选法、4T1细胞荧光素酶报告基因法、果蝇细胞化学遗传学筛选法和虚拟筛选法,本研究建立的荧光偏振筛选模型具有化合物用量少、操作简便、耗时较短、灵敏度高、重复性好、成本低廉等优点,不仅可以快速实现小分子化合物的高通量筛选,还可以用于天然产物体外抑制活性的初步评价,因此本模型具有良好的实用性和推广性。但在本荧光偏振高通量筛选模型中,荧光探针FITC-TCF4仅是一条短肽,还不足以完全模拟作为生物大分子的核转录调控因子TCF4的真实理化性质和空间结构,所以苗头化合物还需要再以基于真实蛋白质相互作用建立的ELISA实验或GST Pull-down实验深入进行体外抑制活性评价,进一步确证苗头化合物的潜在分子靶标。

本研究基于荧光偏振原理建立高通量筛选模型时,选择 $20\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为FITC-TCF4最佳工作浓度,因为此时FITC-TCF4具有较低且平稳mP值。饱和曲线测定实验结果表明,建立的以 β -catenin/FITC-TCF4结合反应为基础的荧光偏振筛选体系具有良好的稳定性。TCF4多肽的竞争性抑制实验结果说明,实验体系中的 β -catenin浓度选择对抑制剂的药理活性评价影响较大。为了保证实验体系的适宜信号窗和高灵敏度,选择 $100\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为 β -catenin最佳工作浓度。DMSO耐受实验结果显示,当DMSO浓度控制在20%以内时,其对 β -catenin/FITC-TCF4结合反应没有显著影响,实验体系对DMSO具有良好的耐受性。 Z' 因子是高通量筛选模型稳定性评价的核心参数,本研究建立的荧光偏振筛选模型 Z' 因子为0.88,满足了高通量筛选模型

Z' 因子大于0.5的基本要求。另外,本筛选模型S/B、S/N、SW和CV值也完全满足了高通量筛选的基本要求,这表明所建立的荧光偏振筛选模型具有良好的稳定性、灵敏性和特异性。本文成功运用所建立的荧光偏振筛选模型对本室天然产物化合物库进行高通量筛选,首次发现了血根碱、白屈菜红碱和化合物S720对 β -catenin/TCF4相互作用具有良好的抑制活性。

血根碱和白屈菜红碱是传统中药博落回和白屈菜的主要药效成分之一,具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗炎等药理活性^[25-27]。研究表明,血根碱可通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路的原癌基因表达,进而抑制肺癌干细胞的生长与分化发挥抗肿瘤活性,但血根碱在Wnt/ β -catenin信号通路中的潜在分子靶标迄今尚未明确^[28]。综合上述筛选结果,本研究初步证实了 β -catenin/TCF4相互作用可能是血根碱抗肿瘤活性的潜在分子靶标之一。

综上所述,本研究成功建立了基于 β -catenin/TCF4相互作用为靶标的荧光偏振高通量筛选模型,为靶向 β -catenin/TCF4相互作用的小分子抑制剂高通量筛选和药理学活性评价奠定了实验基础。

致谢:衷心感谢中国科学院大学存济医学院袁莉教授、军事科学院军事医学研究院军事兽医研究所全军人兽共患病预防与控制重点实验室张国利教授和岳玉环教授在重组人 β -catenin原核表达和活性鉴定方面给予的悉心指导和无私帮助!

References

- [1] Du LB, Li HZ, Wang YQ, et al. Report of colorectal cancer incidence and mortality in China, 2013 [J]. Chin J Oncol (中华肿瘤杂志), 2017, 39: 701-706.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68: 7-30.
- [3] Iqbal W, Alkarim S, AlHejin A, et al. Targeting signal transduction pathways of cancer stem cells for therapeutic opportunities of metastasis [J]. Oncotarget, 2016, 7: 76337-76353.
- [4] Sebio A, Kahn M, Lenz HJ. The potential of targeting Wnt/ β -catenin in colon cancer [J]. Exp Opin Ther Targets, 2014, 18: 611-615.
- [5] Ma HY, He M, Wei MJ. Research progress on targeting effect and regulating mechanisms of the stemness of cancer stem cells [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 189-196.
- [6] Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13: 11-26.
- [7] Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer [J]. Oncogene, 2017, 36: 1461-1473.
- [8] Lepourcelet M, Chen YN, France DS, et al. Small-molecule

- antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex [J]. *Cancer Cell*, 2004, 5: 91-102.
- [9] Gonsalves FC, Klein K, Carson BB, et al. An RNAi-based chemical genetic screen identifies three small-molecule inhibitors of the Wnt/*wingless* signaling pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 5954-5963.
- [10] Jang GB, Hong IS, Kim RJ, et al. Wnt/ β -catenin small-molecule inhibitor CWP232228 preferentially inhibits the growth of breast cancer stem-like cells [J]. *Cancer Res*, 2015, 75: 1691-1702.
- [11] Fang L, Zhu Q, Neuenschwander M, et al. A small-molecule antagonist of the β -catenin/TCF4 interaction blocks the self-renewal of cancer stem cells and suppresses tumorigenesis [J]. *Cancer Res*, 2016, 76: 891-901.
- [12] Trosset JY, Dalvit C, Knapp S, et al. Inhibition of protein-protein interactions: the discovery of druglike beta-catenin inhibitors by combining virtual and biophysical screening [J]. *Proteins*, 2006, 64: 60-67.
- [13] Yan M, Li G, An J. Discovery of small molecule inhibitors of the Wnt/ β -catenin signaling pathway by targeting β -catenin/Tcf4 interactions [J]. *Exp Biol Med*, 2017, 242: 1185-1197.
- [14] Cheng X, Xu X, Chen D, et al. Therapeutic potential of targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in colorectal cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 473-481.
- [15] Poy F, Lepourcelet M, Shivdasani RA, et al. Structure of a human Tcf4-beta-catenin complex [J]. *Nat Struct Biol*, 2001, 8: 1053-1057.
- [16] Fasolini M, Wu X, Flocco M, et al. Hot spots in Tcf4 for the interaction with beta-catenin [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 21092-21098.
- [17] Chen YY, Niu XY, Li Y, et al. Development of an ELISA-based high throughput screening method for novel anticancer agents targeting β -catenin/Lef1 interaction [J]. *Chin J Biotech (生物工程学报)*, 2019, 35: 707-717.
- [18] Nikolovska-Coleska Z, Wang R, Fang X, et al. Development and optimization of a binding assay for the XIAP BIR3 domain using fluorescence polarization [J]. *Anal Biochem*, 2004, 332: 261-273.
- [19] Zhu MR, Du DH, Hu JC, et al. Development of a high-throughput fluorescence polarization assay for the discovery of EZH2-EED interaction inhibitors [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39: 302-310.
- [20] Jiang YH, Zhang J, Chen YY, et al. Screening of small molecule inhibitors for PLK1 PBD and evaluation of antitumor activities [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 409-415.
- [21] Chen YY, Liu G, Zhang J, et al. Bacterial expression, purification and biological activity evaluation of Plk1 PBD protein [J]. *J Chongqing Med Univ (重庆医科大学学报)*, 2018, 43: 1453-1457.
- [22] Yang XH, Xu GJ, Zhang XY, et al. A fluorescence polarization immunoassay for the detection of aflatoxins in herbal teas [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 620-624.
- [23] He Q, Cui X, Shen D, et al. Development of a simple, rapid and high-throughput fluorescence polarization immunoassay for glycocholic acid in human urine [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 158: 431-437.
- [24] Zhang H, Wu Q, Berezin MY, et al. Fluorescence anisotropy (polarization): from drug screening to precision medicine [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2015, 10: 1145-1161.
- [25] Achkar IW, Mraiche F, Mohammad RM, et al. Anticancer potential of sanguinarine for various human malignancies [J]. *Future Med Chem*, 2017, 9: 933-950.
- [26] Almeida IV, Fernandes LM, Biazi BI, et al. Evaluation of the anticancer activities of the plant alkaloids sanguinarine and chelerythrine in human breast adenocarcinoma cells [J]. *Anti-cancer Agents Med Chem*, 2017, 17: 1586-1592.
- [27] Fu C, Guan G, Wang H. The anticancer effect of sanguinarine: a review [J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24: 2760-2764.
- [28] Yang J, Fang Z, Wu J, et al. Construction and application of a lung cancer stem cell model: antitumor drug screening and molecular mechanism of the inhibitory effects of sanguinarine [J]. *Tumor Biol*, 2016, 37: 13871-13883.