

基于 β -catenin/Lef1 相互作用为靶标的新型抗肿瘤药物高通量筛选模型的建立

陈云雨^{1,2}, 牛夏忆¹, 李妍³, 刘晓平¹

1 皖南医学院 药学院 新药筛选与评价中心, 安徽 芜湖 241002

2 中国科学院 长春应用化学研究所 化学生物学实验室, 吉林 长春 130022

3 中国医学科学院-北京协和医学院 医药生物技术研究所 国家新药(微生物)筛选中心, 北京 100050

陈云雨, 牛夏忆, 李妍, 等. 基于 β -catenin/Lef1 相互作用为靶标的新型抗肿瘤药物高通量筛选模型的建立. 生物工程学报, 2019, 35(4): 707-717.

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. Chin J Biotech, 2019, 35(4): 707-717.

摘要: 旨在以 β -catenin/Lef1 相互作用为靶标, 建立基于 ELISA 原理的适用于靶向 β -catenin/Lef1 相互作用小分子抑制剂筛选的高通量筛选模型。利用 DNA 重组技术, 将构建的 β -catenin-pET-30a(+) 重组质粒转化大肠杆菌 *Escherichia coli* Rosetta (DE3), 经诱导培养后进行 β -catenin 原核表达。采用亲和层析方法分离纯化 β -catenin 后, 以 GST Pulldown 实验进行生物学活性鉴定。利用 ELISA 原理建立 β -catenin/GST-Lef1 结合的分子模型, 通过优选 GST-Lef1 最佳包被浓度和 β -catenin 最佳反应浓度, 建立适用于靶向 β -catenin/Lef1 相互作用小分子抑制剂筛选的高通量筛选模型。SDS-PAGE 和 Western blotting 实验证实 β -catenin 的原核表达。GST Pulldown 实验证实纯化的 β -catenin 具有良好的生物学活性。通过对基于 ELISA 原理建立的 β -catenin/GST-Lef1 结合的分子模型优化, 选用 10 μ g/mL GST-Lef1 和 6 μ g/mL β -catenin 建立 ELISA 高通量筛选模型, 其 Z' 因子为 0.76。本研究成功建立了基于 ELISA 原理的 β -catenin/GST-Lef1 结合的分子模型, 为靶向 β -catenin/Lef1 相互作用小分子抑制剂的高通量筛选奠定了基础。

关键词: Wnt 抑制剂, β -catenin, β -catenin/Lef1 相互作用, 酶联免疫吸附实验, 高通量筛选

Received: August 26, 2018; **Accepted:** November 7, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81703546), Anhui Provincial Natural Science Foundation (No. 1808085QH265), Jilin Scientific and Technological Development Program (No. 20160520045JH), The Doctoral Starting-up Fund of Wannan Medical College (No. RCQD201617), College Student Innovation Fund of Wannan Medical College (No. WK2018S54).

Corresponding authors: Xiaoping Liu. Tel: +86-553-3932601; Fax: +86-553-3932622; E-mail: liuxiaoping@wnmc.edu.cn

Yan Li. Tel: +86-10-63180623; Fax: +86-10-63180604; E-mail: 13391513480@163.com

国家自然科学基金 (No. 81703546), 安徽省自然科学基金 (No. 1808085QH265), 吉林省科技发展计划 (No. 20160520045JH), 皖南医学院博士科研启动基金 (No. RCQD201617), 皖南医学院大学生科研资助金 (No. WK2018S54) 资助。

网络出版时间: 2018-11-26

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20181122.1104.004.html>

Development of an ELISA-based high throughput screening method for novel anticancer agents targeting β -catenin/Lef1 interaction

Yunyu Chen^{1,2}, Xiayi Niu¹, Yan Li³, and Xiaoping Liu¹

1 Center for New Drug Screening & Evaluation, School of Pharmacy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China

2 Laboratory of Chemical Biology, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, Jilin, China

3 National Center for Microbial Drug Screening, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: To develop an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based high throughput screening (HTS) method for β -catenin/Lef1 interaction antagonists screening, *Escherichia coli* Rosetta (DE3) competent cells were transformed with β -catenin-pET-30a(+) plasmid. β -catenin protein was expressed after induction and purified using affinity chromatography. The biological activity of purified β -catenin was further analyzed by GST Pulldown assay. The β -catenin/GST-Lef1 binding model was established using ELISA principle, and the ELISA-based HTS method was further optimized through determination of an optimal coated concentration of GST-Lef1 and working concentration of β -catenin. The results showed that β -catenin protein was successfully expressed and purified. The GST Pulldown assay demonstrated a perfect biological activity for purified β -catenin. Subsequently, the ELISA-based HTS method was performed using 10 $\mu\text{g/mL}$ GST-Lef1 and 6 $\mu\text{g/mL}$ β -catenin, with the Z' factor of 0.76. Taken together, we have successfully developed a simple, robust and reliable ELISA-based HTS method for screening of novel Wnt inhibitors targeting β -catenin/Lef1 interaction.

Keywords: Wnt inhibitors, β -catenin, β -catenin/Lef1 interaction, ELISA, high throughput screening

Wnt/ β -catenin 信号通路的异常活化在结肠癌、肝癌、肺癌、乳腺癌、慢性淋巴细胞白血病等多种癌症的发生与发展中发挥重要作用, 已经成为肿瘤分子靶向治疗的一个重要靶标^[1]。 β -catenin 是介导 Wnt 信号转导的关键调控因子, 同时通过与 E-cadherin 相互作用, 参与细胞黏连和细胞骨架的构成。 β -catenin 核心功能区是 12 个连续重复的犰狳蛋白重复片段 (Armadillo repeats, 138–686 aa), 两侧是 N 端结构域和 C 端转录激活结构域 (Carboxy-terminal transactivation domain, CTA)。其中犰狳蛋白重复片段对 β -catenin 的生物学功能尤为重要, 几乎介导了 β -catenin 与所有已知互作蛋白的结合^[2]。在经典 Wnt 信号通路中, β -catenin 作为重要的核转录调控因子, 通过与 Tcf4 (T-cell factor 4) 和 Lef1 (Lymphoid enhancer factor 1) 相互作用而启动大量原癌基因的表达^[3-4]。研究表明, β -catenin/Lef1 相互作用在非小细胞肺

癌 (Non-small cell lung cancer, NSCLC) 脑 (骨) 转移过程中发挥重要作用, 促进肺癌细胞浸润和脑 (骨) 转移的形成^[5-6]。另一方面, β -catenin/Lef1 相互作用对于维持肿瘤干细胞 (Cancer stem cells, CSC) 分化和自我更新具有极其重要的促进作用, 参与维持肿瘤干细胞休眠体的形成, 促进肿瘤耐药与复发^[7-8]。此外, β -catenin/Lef1 相互作用在急 (慢) 性淋巴细胞白血病的发生与发展中也发挥重要的促进作用, 已经成为白血病治疗的新靶标^[9-13]。因此, 靶向 β -catenin/Lef1 相互作用小分子抑制剂的发现对于抑制 NSCLC 转移和急 (慢) 性淋巴细胞白血病的治疗具有重要意义。

本研究通过原核表达和分离纯化高活性的 β -catenin 与 GST-Lef1 功能蛋白, 以 β -catenin/Lef1 相互作用为靶标, 建立基于酶联免疫吸附实验 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 原理的高通量筛选模型, 为靶向 β -catenin/Lef1 相互

作用小分子抑制剂的理性化发现奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

pET-30a(+)与 pGEX-4T-1 载体由本室保存; GST- β -catenin-pGEX-4T-1 重组质粒由中国科学院大学存济医学院袁莉教授惠赠; 大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞、*E. coli* Rosetta (DE3)感受态细胞、*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞、TransTaq[®]-T DNA 聚合酶、Trans2K[®] DNA Marker、ProteinRuler[®] II、pEASY[®]-T1 试剂盒、EasyPure[®] 试剂盒、琼脂糖、FlyCui[®] BamH I 和 FlyCui[®] Xho I 购自 TransGen 公司; 酵母粉、胰蛋白胨和琼脂粉购自 Oxoid 公司; BCA (Bicinchoninic acid) 试剂盒购自 Thermo 公司; 硫酸卡那霉素、氨苄西林和异丙基硫代半乳糖苷 (Isopropyl β -D-Thiogalactoside, IPTG) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 牛血清白蛋白 (Bull serum albumin, BSA)、小鼠抗组氨酸 (Histidine, His) 标签单抗、小鼠抗谷胱甘肽转移酶 (Glutathione S-transferase, GST) 标签单抗和辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗小鼠 IgG 购自 Biosharp 公司; MaxiLumin[™] 化学发光液购自 Biokits 公司; 96 孔酶标板购自 Corning 公司; 可溶型单组分四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB) 溶液购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 醋酸纤维素膜购自 Millipore 公司; HisTrap 和 GSTrap 层析柱购自 GE 公司; 谷胱甘肽亲和介质购自中科森辉微球技术 (苏州) 有限公司; 其他生化试剂为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 β -catenin (138–781 aa) 基因片段扩增

β -catenin 功能区主要包括犹徐蛋白重复片段 (138–686 aa) 和 C 端转录激活结构域 (687–781 aa), 主要介导与 Wnt 信号通路中相关蛋白的相互作用和染色质重塑复合体的募集^[2]。根据 β -catenin

(138–781 aa) 基因序列设计引物, 以 GST- β -catenin-pGEX-4T-1 重组质粒为模板扩增 β -catenin 基因片段 (1 932 bp)。按照常规 PCR 方法进行 β -catenin 基因片段的扩增^[14], 以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测目的基因扩增结果。

1.2.2 β -catenin 原核表达质粒构建

按照文献所述方法进行 β -catenin 原核表达质粒的构建^[14]。首先, 将回收的 β -catenin 基因片段与 T 载体连接, 构建克隆质粒。将克隆质粒转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选后, 以单菌落 PCR 反应和质粒双酶切法鉴定阳性克隆, 质粒测序由 General Biosystems 公司完成。

双酶切克隆质粒中的 β -catenin 基因片段后回收, 再与 pET-30a(+)载体连接, 构建 β -catenin-pET-30a(+)重组质粒。将重组质粒转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 经卡那霉素抗性筛选后, 同法鉴定阳性克隆。

1.2.3 β -catenin 原核表达

按照文献所述方法进行 β -catenin 原核表达^[14]。首先, 将 β -catenin-pET-30a(+)重组质粒转化 *E. coli* Rosetta (DE3) 感受态细胞, 经卡那霉素抗性筛选后, 随机挑取 6 个单菌落, 以 1 mmol/L IPTG 于 25 °C 诱导培养 10 h, 进行 β -catenin 原核表达。离心收集菌体, 以 8% SDS-PAGE 和 Clinx Image Analysis 软件进行 β -catenin 原核表达量分析。

工程菌大量诱导培养后, 将离心收集的菌体以适量 TBS (50 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl, pH 8.0) 溶液重悬, 离心收集超声波裂解后的上清液和沉淀。8% SDS-PAGE 进行 β -catenin 的可溶性表达分析。

1.2.4 β -catenin 分离纯化

大量收集菌体裂解后的上清液, 以 25% 饱和硫酸铵沉淀后制备粗提液, 再按照文献所述方法以 HisTrap 层析柱进行 β -catenin 的分离纯化^[14]。纯化的 β -catenin 以 8% SDS-PAGE 进行分析, 经 TBS 溶液透析后, 以 BCA 法定量。

1.2.5 Western blotting 实验鉴定 β -catenin

按照文献所述方法^[14], 纯化的 β -catenin 经 8% SDS-PAGE 后转膜, 一抗为 1:2 000 稀释的小鼠抗 His 标签单抗, 二抗为 1:4 000 稀释的 HRP-羊抗小鼠 IgG, 用 MaxiLuminTM 化学发光液显影成像。

1.2.6 GST-Lef1 (1-76 aa) 原核表达与分离纯化

Lef1 是经典 Wnt 信号通路中重要的核转录调控因子, β -catenin 通过狄猴蛋白重复片段结构域与 Lef1 的 β BD 结构域 (β -catenin binding domain, β BD, 1-76 aa) 相互作用, 进而调控大量原癌基因的转录与表达^[15-16]。检索 Lef1 (1-76 aa) 的基因序列, 以 BamHI 和 XhoI 作为酶切位点, 由 General Biosystems 公司进行全基因合成后连接 pGEX-4T-1 载体, 构建 GST-Lef1-pGEX-4T-1 重组质粒。

Lef1 (1-76 aa) 基因合成序列如下 (下划线为双酶切位点): 5'-GGATCCATGCCCAACTTTC CGGAGGAGGCGGGGGGGACCCGGA ACTCTGCGCCACCGATGAGATGATCCCCTCAAG GACGAAGGCGATCCCCAGAAGGAGAAGATC TTCGCCGAGATCAGTCATCCCGAAGAGGAGG GCGACTTAGCCGACATCAAGTCATCTTTGGTT AACGAGTCCGAAATCATCCAGCCAGCAACG GGCATGAGGTGGTCAGACAAGCCCCGTCCC TCGAG-3'。

大量收集菌体裂解后的上清液, 再按照文献所述方法以 GSTrap 层析柱分别进行 GST-Lef1 和 GST 的分离纯化^[14]。纯化的 GST-Lef1 和 GST 以 10% SDS-PAGE 进行分析, 经 TBS 溶液透析后, 以 BCA 法定量。

1.2.7 GST Pulldown 实验

将 10 μ g GST-Lef1 和 10 μ g GST 分别加入到 20 μ L GST 琼脂糖凝胶亲和介质中, 4 $^{\circ}$ C 反应过夜。收集反应后的 GST 琼脂糖凝胶, 以 TBS 溶液重悬。离心洗涤 3 次后, 分别加入 2 μ g 和 10 μ g β -catenin, 室温反应 1 h, 收集 GST 凝胶。以 1.2.5

方法检测 β -catenin 的结合量。

1.2.8 基于 ELISA 原理的高通量筛选模型的优化与建立

1) GST-Lef1 最佳包被浓度的确定

将 5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 μ g/mL 的 GST-Lef1 包被 96 孔酶标板 (100 μ L/孔), 每组 3 个复孔, 以包被 1 μ g BSA 孔作为阴性对照。酶标板经含 0.1% Tween-20 的磷酸盐 (Phosphate-buffered solution, PBS) 缓冲液 (PBST) 洗板 3 次后, 以含 10% BSA 的 PBST 溶液于 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h。PBST 洗板后, 依次加入 1:2 000 稀释的小鼠抗 GST 标签单抗和 1:4 000 稀释的 HRP-羊抗小鼠 IgG, 室温反应 1 h。以 PBST 洗板 3 次后, 每孔加入 TMB 溶液 (100 μ L/孔), 室温避光显色 5 min, 再加入 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 多功能酶标仪检测 OD₄₅₀ 值 (CytationTM 5, BioTek)。

2) β -catenin 最佳反应浓度的确定

GST 与 GST-Lef1 (10 μ g/mL; 100 μ L/孔) 包被 96 孔酶标板, 以包被 GST 孔作为阴性对照组。酶标板经 PBST 洗涤和 10% BSA 封闭后, 将 0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 μ g/mL 的 β -catenin (100 μ L/孔) 依次加入到 96 孔酶标板中, 每组 3 个复孔, 室温孵育 1 h。PBST 洗板后, 按照上述方法依次加入 1:2 000 稀释的小鼠抗 His 标签单抗和 1:4 000 稀释的 HRP-羊抗小鼠 IgG, 室温反应 1 h。以 TMB 溶液 (100 μ L/孔) 显色, 多功能酶标仪检测 OD₄₅₀ 值。

3) DMSO 浓度对 β -catenin/GST-Lef1 结合的影响

GST-Lef1 (10 μ g/mL; 100 μ L/孔) 包被的 96 孔酶标板以 PBST 洗涤和 10% BSA 封闭后, 依次加入含 0%、1%、2%、3%、4%、5% DMSO 浓度的 β -catenin (6 μ g/mL; 100 μ L/孔) 到 96 孔酶标板中, 每组 3 个复孔, 室温反应 1 h。按照上述方法检测 OD₄₅₀ 值。

4) Z'因子及其他主要技术参数的测定

GST 和 GST-Lef1 (10 $\mu\text{g/mL}$; 100 $\mu\text{L/孔}$) 包被的 96 孔酶标板以 PBST 洗涤和 10% BSA 封闭后, 将 β -catenin (6 $\mu\text{g/mL}$; 100 $\mu\text{L/孔}$) 加入到 96 孔酶标板中, 室温孵育 1 h。将 GST-Lef1 与 β -catenin 反应孔设置为阴性孔, GST 与 β -catenin 反应孔设置为阳性孔, 其中 1#–30#孔为阴性孔, 31#–60#孔为阳性孔。以多功能酶标仪检测 OD_{450} 值并按照 BioTek 操作系统的相关程序进行 Z'因子的自动计算。

另外, 根据相关文献^[17-18], 我们也对本筛选模型的信号本底比 (Signal to background, S/B)、信号窗 (Signal window, SW)、信噪比 (Signal to noise, S/N)、信号/本底变异系数 (Coefficient of variation of signal/background, CV) 进行了定量分析。

2 结果与分析

2.1 β -catenin 原核表达质粒构建

以 GST- β -catenin-pGEX-4T-1 重组质粒为模板, 利用 PCR 反应成功扩增了与 β -catenin 基因片段 (1 932 bp) 大小一致的特异 DNA 片段 (图 1A)。将构建的 β -catenin-pET-30a(+) 重组质粒转化 *E.*

coli DH5 α , 以单菌落 PCR 反应和质粒双酶切法鉴定经卡那霉素抗性筛选的阳性克隆。鉴定结果表明, 所挑取的单菌落均可特异性扩增出约 1 932 bp 的 DNA 片段 (图 1B)。构建的重组质粒经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后, 再次得到了与 PCR 扩增结果大小一致的 DNA 片段 (图 1C)。上述结果表明, 成功构建了 β -catenin 原核表达质粒。

2.2 β -catenin 原核表达与分离纯化

6 株工程菌经诱导培养后, 离心收集菌体, 以 8% SDS-PAGE 和 Clinx Image Analysis 软件进行 β -catenin 原核表达分析。与阴性对照组相比, 在 β -catenin 理论分子量 (77 kDa) 位置可见明显的蛋白表达条带, β -catenin 表达量约为 15% (图 2A)。取菌体裂解后的上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 分析表明, β -catenin 以可溶形式表达, 大部分存在于上清液中 (图 2B)。综上所述, 成功进行了 β -catenin 原核表达。

25% 饱和硫酸铵沉淀的菌体裂解上清液经 HisTrap 层析柱分离纯化后, 收集的样品进行 SDS-PAGE 分析。结果表明, 在 β -catenin 理论分子量 (77 kDa) 位置呈单一蛋白条带, 表明纯化的 β -catenin 具有较高的纯度 (图 2B)。以 Western blotting 实验对纯化的 β -catenin 进行鉴定, 在

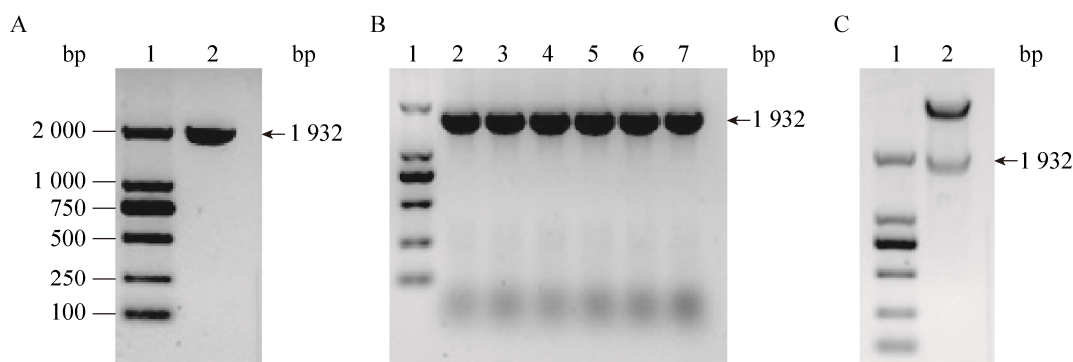


图 1 β -catenin 原核表达质粒构建

Fig. 1 The construction of bacterial expression plasmid of β -catenin. (A) PCR product of β -catenin gene. 1: DNA marker; 2: β -catenin gene product. (B) PCR products of six random positive clones. 1: DNA marker; 2–7: β -catenin gene product. (C) Dual-restriction enzyme digestion map for β -catenin-pET-30a(+) plasmid. 1: DNA marker; 2: plasmid double digestion product.

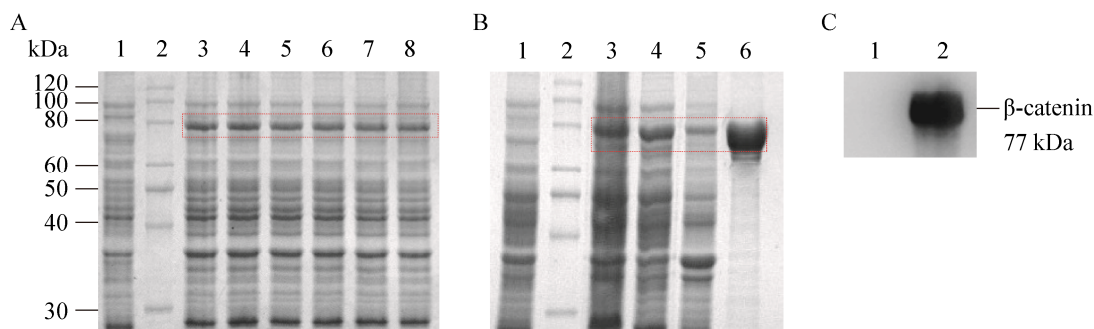


图2 β -catenin 原核表达与分离纯化

Fig. 2 Bacterial expression and purification of β -catenin. (A) Bacterial expression of β -catenin. 1: negative control; 2: protein marker; 3–8: positive clones. (B) Purification of β -catenin. 1: negative control; 2: protein marker; 3: total cell proteins; 4: supernatant; 5: pellet; 6: purified β -catenin (77 kDa). (C) Western blotting analysis of β -catenin. 1: protein marker; 2: β -catenin band (77 kDa).

β -catenin 理论分子量 (77 kDa) 位置仍呈现出特异性条带, 证实了 β -catenin 的正确表达 (图 2C)。 β -catenin 经 TBS 溶液透析和 BCA 法定量后, 其浓度为 1.0 mg/mL。

2.3 GST-Lef1 原核表达与分离纯化

工程菌经诱导培养后收集菌体, 以 10% SDS-PAGE 和 Clinx Image Analysis 软件进行 GST-Lef1 原核表达分析。结果表明, 在 GST-Lef1 理论分子量 (34 kDa) 位置可见明显的蛋白表达条带, GST-Lef1 表达量约为 18% (图 3)。取菌体裂解后的上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 分析表

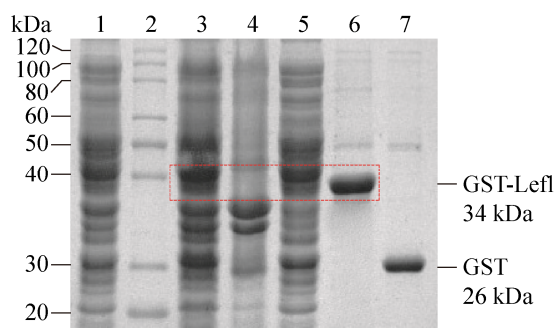


图3 GST-Lef1 原核表达与分离纯化

Fig. 3 Bacterial expression and purification of GST-Lef1. 1: negative control; 2: protein marker; 3: total cell proteins; 4: pellet; 5: supernatant; 6: purified GST-Lef1; 7: purified GST.

明, GST-Lef1 以可溶形式表达, 大部分存在于上清液中 (图 3)。

菌体裂解上清液经 GSTrap 层析柱分离纯化后, 收集的样品进行 SDS-PAGE 分析。结果表明, 得到了与预期分子量 (34 kDa) 大小一致且纯度较高的 GST-Lef1 (图 3)。纯化的 GST-Lef1 和 GST (26 kDa) 经 TBS 溶液透析和 BCA 法定量后, 其浓度分别为 1.3 mg/mL 和 1.7 mg/mL。

2.4 β -catenin 生物学活性鉴定

细胞核内 β -catenin/Lef1 相互作用是 Wnt/ β -catenin 信号通路中最重要的转录调控方式^[3-4,15-16]。GST Pulldown 实验表明, 纯化的 β -catenin 能与 GST-Lef1 在体外发生明显的特异性结合反应, 且结合反应具有典型的量效关系, 但 β -catenin 不能与 GST 发生结合反应 (图 4)。上述结果表明, 纯化的 β -catenin 具有良好的生物学活性。

2.5 GST-Lef1 最佳包被浓度的确定

将不同浓度的 GST-Lef1 包被 96 孔酶标板后, 以 ELISA 方法进行包被量检测。结果表明, GST-Lef1 包被浓度大于 10 μ g/mL 时, OD_{450} 值趋于稳定并始终维持在 0.73–0.81 之间, 10 μ g/mL 的包被浓度基本达到包被饱和量 (图 5)。因此选用 10 μ g/mL 作为 GST-Lef1 的最佳包被浓度。

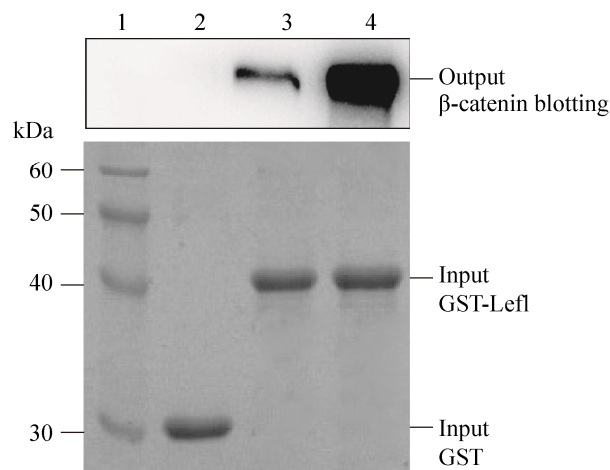


图 4 GST Pulldown 实验

Fig. 4 GST Pulldown assay. 1: protein marker; 2: 10 μ g GST+10 μ g β -catenin; 3: 10 μ g GST-Lef1+2 μ g β -catenin; 4: 10 μ g GST-Lef1+10 μ g β -catenin.

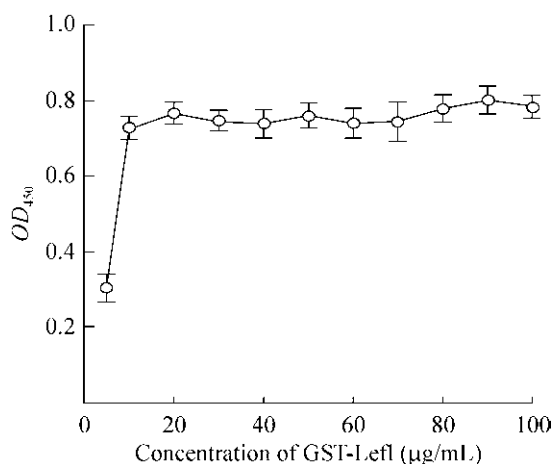


图 5 GST-Lef1 最佳包被浓度的确定

Fig. 5 Determination of an optimal coated concentration of GST-Lef1 in ELISA-based HTS method.

2.6 β -catenin 最佳反应浓度的确定

将系列稀释的 β -catenin 加入到 10 μ g/mL GST-Lef1 包被的 96 孔酶标板中, 以 ELISA 方法进行 β -catenin 结合量检测。结果表明, β -catenin 与 GST-Lef1 的结合反应具有良好的浓度依赖性。当 β -catenin 浓度达到 7 μ g/mL 时, OD_{450} 值达到最大并趋于结合反应的饱和 (图 6)。为了使其结合反应在实验体系中趋于饱和状态并增大实验体

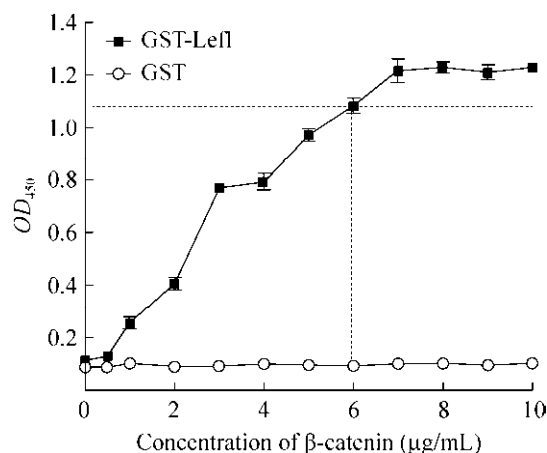


图 6 β -catenin 最佳反应浓度的确定

Fig. 6 Determination of an optimal working concentration of β -catenin in ELISA-based HTS method.

系的信号窗, 因此选用 6 μ g/mL 作为 β -catenin 的最佳反应浓度。

2.7 DMSO 浓度对 β -catenin/GST-Lef1 相互作用的影响

利用确定最佳 GST-Lef1 包被浓度和 β -catenin 反应浓度的 ELISA 分子结合模型进行 DMSO 浓度影响实验。结果表明, DMSO 浓度在 0%–5% 时, OD_{450} 值趋于稳定并始终维持在 0.97–1.05 之间, 其对 β -catenin/GST-Lef1 相互作用未产生显著影响 (图 7)。

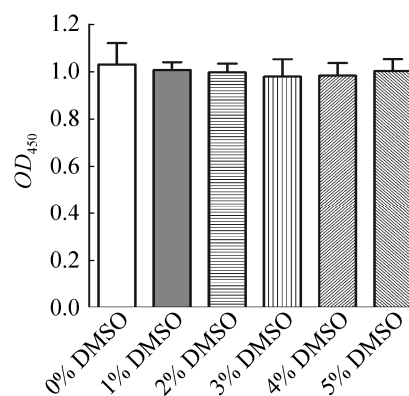


图 7 DMSO 浓度对 β -catenin/GST-Lef1 相互作用的影响

Fig. 7 Effect of DMSO concentrations on β -catenin/GST-Lef1 interaction in ELISA-based HTS method.

2.8 Z'因子及其他主要技术参数的测定

通过综合分析计算,本筛选模型的Z'因子值为0.76,满足高通量筛选中Z'因子大于0.5的基本要求(图8)。

除Z'因子外,本筛选模型的其他4个通用技术指标,如信号本底比(S/B)、信噪比(S/N)、信号窗(SW)和信号/本底变异系数(CV)也完全满足高通量筛选的基本要求(表1)。

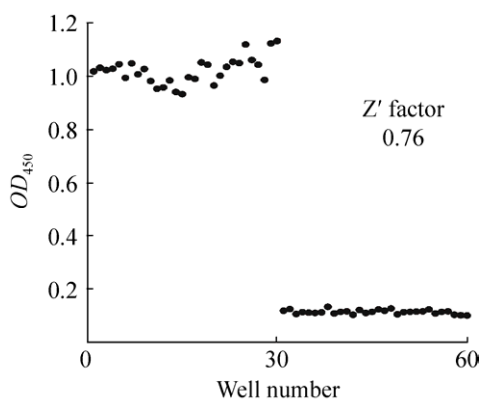


图8 ELISA 筛选模型 Z'因子的确定

Fig. 8 Determination of Z' factor in ELISA-based HTS method.

表1 ELISA 高通量筛选模型的综合评价

Table 1 General indicators in ELISA-based HTS method

Indicators	Requirements of HTS	Results of HTS
S/B	>3	10.39
S/N	>10	43.18
SW	Not determined	0.95
CV (%)	<10	1.94
Z' factor	>0.5	0.76

3 讨论

Wnt/ β -catenin 信号通路是调控肿瘤细胞生长增殖的关键信号通路,在肿瘤发生与发展中发挥着极其重要的作用,与肿瘤细胞的生长分化、上皮-间质转化、免疫耐受及化疗耐药密切相关。鉴于正常细胞中不存在Wnt/ β -catenin 信号通路,而肿瘤细胞中Wnt/ β -catenin 信号通路异常活化并

启动大量原癌基因的表达,所以Wnt/ β -catenin 信号通路已成为新型高选择性抗肿瘤药物开发的一个理想靶标^[3]。

Lef1 与 Tcf4 同属于高迁移组分 (High mobility group, HMG) 转录因子,是经典 Wnt 信号通路中重要的核转录调控因子。在肿瘤细胞内 β -catenin 通过与 Lef1 的 β BD 结构域相互作用,启动大量原癌基因的转录与表达,促进肿瘤细胞的增殖与分化^[3-4,15-16]。目前靶向 β -catenin/Tcf4 相互作用的小分子抑制剂 (如 ZTM-000990、PKF115-584、PKF222-815、PKF118-744、CGP049090、iCRT-3/5/14、LF-3 等) 已经成为抗肿瘤药物研究的热点,在结肠癌^[19-21]、乳腺癌^[22]、肝癌^[23-24]、多发性骨肉瘤^[25]等肿瘤实验治疗中展现出良好的应用前景。但关于靶向 β -catenin/Lef1 相互作用的小分子抑制剂筛选方法及相关抑制剂的肿瘤分子治疗研究却鲜有报道^[13,26]。

由于蛋白质-蛋白质相互作用 (Protein-protein interactions, PPIs) 位点缺少较深的“口袋”式结构,且具有较大的非连续性的相互作用面积,这使得以 PPIs 为靶点的小分子药物开发依然面临较大的挑战;另外,由于缺少具有多样化学结构的靶向 PPIs 的小分子配体,较难进行基于结构的定向药物设计^[27]。因此,靶向 β -catenin/Lef1 相互作用小分子抑制剂的发现对未来以其为靶标的新型抗肿瘤药物定向设计具有重要的理论意义。

大肠杆菌原核表达体系已成为制备重组蛋白的首选表达体系^[28],本研究综合利用 DNA 重组技术,成功进行了 β -catenin 和 GST-Lef1 的原核表达与分离纯化。由于 His 标签较小,几乎不影响目的蛋白的理化性质且方便目的蛋白的检测与纯化,His 标签已被广泛应用于多种重组蛋白在各种表达系统的表达与纯化中^[29]。故此在设计 β -catenin 原核表达和分离纯化策略时,笔者首次采用 pET-30a(+) 载体的 His 标签融合表达策略成功进行了 β -catenin 原核表达与分离纯化。与已报

道的 GST- β -catenin 融合表达策略相比^[30], 笔者建立的 β -catenin 原核表达与分离纯化方法具有更好的简便性和实用性。此外, 鉴于 *E. coli* Rosetta (DE3) 可补充大肠杆菌缺乏的 6 种稀有密码子对应的 tRNA, 可提高真核基因在大肠杆菌中的表达水平, 故此选择 *E. coli* Rosetta (DE3) 作为 β -catenin 的表达宿主菌。

GST Pulldown 实验主要在溶液中进行, 可以真实地反映蛋白质分子间的相互作用, 已成为体外研究蛋白质-蛋白质相互作用的经典实验方法^[31]。我们利用 GST Pulldown 实验进行 β -catenin 的生物学活性鉴定, 证实了纯化的 β -catenin 能与 GST-Lef1 发生特异性结合反应, 这表明纯化的 β -catenin 具有良好的生物学活性。

酶联免疫吸附实验具有操作简便、检测灵敏、成本低廉等优点, 使其在疾病诊断和药物筛选研究领域得到了极大的应用与发展^[32-34]。本研究以 β -catenin/Lef1 相互作用为靶标, 应用 ELISA 原理建立的高通量筛选模型还具有所需样品量少、重复性好、检测结果稳定等诸多优点, 可以实现大样本的简便、快速的高通量筛选与分析。虽然本筛选模型还存在一定的局限性 (如操作步骤较多、需多次洗涤、耗时较长等), 但和本实验室曾采用的酵母双杂交筛选模型相比, 应用本筛选方法不但可以有效减少筛选化合物用量, 降低筛选成本, 还具有更好的简便性和灵敏性。另外, 本筛选模型基本真实模拟了 β -catenin/Lef1 的生理相互作用, 不仅可以应用于以 β -catenin/Lef1 相互作用为靶标的抗肿瘤药物高通量筛选, 还可以联合 GST Pulldown 实验用于评价小分子抑制剂的体外抑制活性, 因此本方法也具有较好的实用性。

目前, 我们成功应用本筛选模型对本实验室天然产物化合物库进行了初步筛选, 已获得了若干苗头化合物, 相关化合物的抗肿瘤分子机制研

究正在进行之中。此外, 我们也利用本筛选模型对本实验室设计的一系列靶向多肽进行了系统筛选和体外抑制活性评价, 已获得了若干有深入研究价值的多肽分子, 相关多肽的细胞药理学研究也在同步进行之中。在本筛选模型的后续方法改进中, 可直接使用 HRP-抗 His 标签抗体一步法检测和显色, 通过减少实验操作步骤以提高筛选效率。

Z'因子是评价高通量筛选模型的核心参数, 它结合了信号窗 (SW) 和信号/本底变异系数 (CV) 这 2 个与模型质量密切相关的重要参数, 一般要求 Z'因子 > 0.5 的模型才适用于药物高通量筛选^[35]。通过对建立的 ELISA 高通量筛选模型的通用技术指标, 如 Z'因子、信号本底比 (S/B)、信噪比 (S/N)、信号窗 (SW)、信号/本底变异系数 (CV) 进行定量评价, 表明本筛选模型具有良好的稳定性、灵敏性和特异性。

综上所述, 本研究成功建立了基于 β -catenin/Lef1 相互作用为靶标的 ELISA 高通量筛选模型, 为靶向 β -catenin/Lef1 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和美国华盛顿大学结构生物学系许文清教授在 β -catenin 原核表达方面给予的悉心指导和无私帮助!

REFERENCES

- [1] Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(1): 11-26.
- [2] Su S, Wu W. Regulation of target gene transcription by Wnt/ β -catenin signaling. *Sci Sin Vitae*, 2014, 44(10): 1029-1042 (in Chinese).
苏尚, 吴畏. Wnt/ β -catenin 信号通路对靶基因转录的调控. *中国科学: 生命科学*, 2014, 44(10): 1029-1042.
- [3] Barker N, Clevers H. Mining the Wnt pathway for

- cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(12): 997–1014.
- [4] Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*, 2012, 149(6): 1192–1205.
- [5] Nguyen DX, Chiang AC, Zhang XHF, et al. WNT/TCF signaling through LEF1 and HOXB9 mediates lung adenocarcinoma metastasis. *Cell*, 2009, 138(1): 51–62.
- [6] Chen CY, Jan YH, Juan YH, et al. Fucosyltransferase 8 as a functional regulator of nonsmall cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(2): 630–635.
- [7] Iqbal W, Alkarim S, AlHejin A, et al. Targeting signal transduction pathways of cancer stem cells for therapeutic opportunities of metastasis. *Oncotarget*, 2016, 7(46): 76337–76353.
- [8] Steeg PS. Targeting metastasis. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(4): 201–218.
- [9] Metzeler KH, Heilmeyer B, Edmaier KE, et al. High expression of lymphoid enhancer-binding factor-1 (*LEF1*) is a novel favorable prognostic factor in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*, 2012, 120(10): 2118–2126.
- [10] Yeung J, Esposito MT, Gandillet A, et al. β -Catenin mediates the establishment and drug resistance of MLL leukemic stem cells. *Cancer Cell*, 2010, 18(6): 606–618.
- [11] Petropoulos K, Arseni N, Schessl C, et al. A novel role for Lef-1, a central transcription mediator of Wnt signaling, in leukemogenesis. *J Exp Med*, 2008, 205(3): 515–522.
- [12] Gandhirajan RK, Poll-Wolbeck SJ, Gehrke I, et al. Wnt/ β -catenin/LEF-1 signaling in chronic lymphocytic leukemia (CLL): a target for current and potential therapeutic options. *Curr Cancer Drug Targets*, 2010, 10(7): 716–727.
- [13] Gandhirajan RK, Staib PA, Minke K, et al. Small molecule inhibitors of Wnt/ β -catenin/*Lef-1* signaling induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells *in vitro* and *in vivo*. *Neoplasia*, 2010, 12(4): 326–335.
- [14] Chen YY, Liu G, Zhang J, et al. Bacterial expression, purification and biological activity evaluation of Plk1 PBD protein. *J Chongqing Med Univ*, 2018, 43(11): 1453–1457 (in Chinese).
陈云雨, 刘刚, 张晶, 等. Plk1 PBD 蛋白原核表达、分离纯化与活性鉴定. *重庆医科大学学报*, 2018, 43(11): 1453–1457.
- [15] Behrens J, von Kries JP, Kühl M, et al. Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, 1996, 382(6592): 638–642.
- [16] von Kries JP, Winbeck G, Asbrand C, et al. Hot spots in β -catenin for interactions with LEF-1, conductin and APC. *Nat Struct Biol*, 2000, 7(9): 800–807.
- [17] Gong SQ, Han XW, Li XH, et al. Development of a high-throughput screening strategy for upregulators of the OPG/RANKL ratio with the potential for antiosteoporosis effects. *J Biomol Screen*, 2016, 21(7): 738–748.
- [18] Chen YY, Miao DD, Zhang YM, et al. Development of a novel fluorescence polarization-based high-throughput screening method for PLK1 PBD inhibitors. *Chin Med Biotechnol*, 2017, 12(5): 385–390 (in Chinese).
陈云雨, 缪冬冬, 张叶明, 等. 靶向 PLK1 PBD 小分子抑制剂荧光偏振高通量筛选模型的建立. *中国医药生物技术*, 2017, 12(5): 385–390.
- [19] Lepourcelet M, Chen YNP, France DS, et al. Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/ β -catenin protein complex. *Cancer Cell*, 2004, 5(1): 91–102.
- [20] Fang L, Zhu QH, 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. *Cancer Res*, 2016, 76(4): 891–901.
- [21] 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(15): 5954–5963.
- [22] 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. *Cancer Res*, 2015, 75(8): 1691–1702.
- [23] Wei W, Chua MS, Grepper S, et al. Small molecule antagonists of Tcf4/ β -catenin complex inhibit the growth of HCC cells *in vitro* and *in vivo*. *Int J Cancer*, 2010, 126(10): 2426–2436.

- [24] Kim JY, Lee HY, Park KK, et al. CWP232228 targets liver cancer stem cells through Wnt/ β -catenin signaling: a novel therapeutic approach for liver cancer treatment. *Oncotarget*, 2016, 7(15): 20395–20409.
- [25] Sukhdeo K, Mani M, Zhang YY, et al. Targeting the β -catenin/TCF transcriptional complex in the treatment of multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(18): 7516–7521.
- [26] Hsieh TH, Hsu CY, Tsai CF, et al. A novel cell-penetrating peptide suppresses breast tumorigenesis by inhibiting β -catenin/LEF-1 signaling. *Sci Rep*, 2016, 6: 19156.
- [27] Ivanov AA, Khuri FR, Fu HA. Targeting protein-protein interactions as an anticancer strategy. *Trends Pharmacol Sci*, 2013, 34(7): 393–400.
- [28] Baeshen MN, Al-Hejin AM, Bora RS, et al. Production of biopharmaceuticals in *E. coli*: current scenario and future perspectives. *J Microbiol Biotechnol*, 2015, 25(7): 953–962.
- [29] Li YJ, Chen YY, Bi LJ. Fusion tags technology and their applications. *Chin J Biotech*, 2006, 22(4): 523–527 (in Chinese).
李永进, 陈媛媛, 毕利军. 融合标签技术及其应用. *生物工程学报*, 2006, 22(4): 523–527.
- [30] Yin HL, Yuan L. Prokaryotic expression, purification, and identification of GST- β -catenin-His double labeled fusion protein. *J Grad Univ Chin Acad Sci*, 2012, 29(6): 847–852 (in Chinese).
尹会龙, 袁莉. GST- β -catenin-His 双标签融合蛋白的原核表达、纯化及鉴定. *中国科学院研究生院学报*, 2012, 29(6): 847–852.
- [31] Chai ZB, Zhang GL, Han JX. Application of GST-pull down technique in study on protein-protein interaction. *Chin J Biol*, 2014, 27(10): 1354–1358 (in Chinese).
柴政斌, 张更林, 韩金祥. GST-pull down 技术在蛋白质相互作用中的应用. *中国生物制品学杂志*, 2014, 27(10): 1354–1358.
- [32] Wang L, Bao Y, Yang Y, et al. Discovery of antagonists for human scavenger receptor CD36 via an ELISA-like high-throughput screening assay. *J Biomol Screen*, 2010, 15(3): 239–250.
- [33] Zhang XL, Nie YZ, Lan XG, et al. Preparation of anti-HBsAg epitope monoclonal antibodies and establishment of a sandwich ELISA for HBV serotype detection. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2014, 30(2): 171–175 (in Chinese).
张晓磊, 聂玉哲, 蓝兴国, 等. 抗 HBsAg 表位单克隆抗体的制备及 HBV 血清型夹心 ELISA 的建立. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, 30(2): 171–175.
- [34] Siarot L, Chutiwitoonchai N, Sato H, et al. Identification of human immunodeficiency virus type-1 Gag-TSG101 interaction inhibitors by high-throughput screening. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(4): 2970–2976.
- [35] Zhang JH, Chung TDY, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen*, 1999, 4(2): 67–73.

(本文责编 郝丽芳)