

· 医药生物技术 ·

靶向 β -catenin/TCF4 相互作用小分子抑制剂酶联免疫吸附法高通量筛选模型的优化与应用

付正豪¹, 闫干干¹, 朱小红², 刘晓平¹, 陈云雨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

付正豪, 闫干干, 朱小红, 等. 靶向 β -catenin/TCF4 相互作用小分子抑制剂酶联免疫吸附法高通量筛选模型的优化与应用. 生物工程学报, 2021, 37(8): 2878-2889.

Fu ZH, Yan GG, Zhu XH, et al. Optimizations of an ELISA-like high-throughput screening assay for the discovery of β -catenin/TCF4 interaction antagonists. Chin J Biotech, 2021, 37(8): 2878-2889.

摘要: 在经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路中, β -catenin/TCF4 (T-cell factor 4) 相互作用在非小细胞肺癌 (Non-small cell lung cancer, NSCLC) 的生长分化、化疗耐药、转移复发等过程中发挥着重要的促进作用, 已成为新型靶向性抗 NSCLC 转移药物开发的理想靶标之一。为了高效地发现抑制 β -catenin/TCF4 相互作用的苗头化合物, 本研究在应用酶联免疫吸附实验 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 原理的基础上, 通过优化 GST-TCF4 β BD 包被浓度和 β -catenin 反应浓度, 建立 ELISA 高通量筛选模型并成功应用于苗头化合物的筛选。ELISA 筛选模型优化实验结果表明, 选用 2 μ g/mL GST-TCF4 β BD 和 0.5 μ g/mL β -catenin 建立 ELISA 高通量筛选模型, 其 Z' 因子值为 0.83, 并成功筛选到具有良好抑制活性的白花丹素 (Plumbagin)。肿瘤细胞增殖实验结果表明, 白花丹素对 A549、H1299、MCF7 和 SW480 细胞具有明显的细胞毒性。TOPFlash 实验结果证实, 白花丹素对转染的 HEK293 细胞内 β -catenin 介导的转录活性具有显著的抑制作用, β -catenin/TCF4 相互作用可能是白花丹素抗癌活性的潜在分子靶标之一。文中以 β -catenin/TCF4 相互作用为靶标, 通过系统的实验优化方案, 成功地建立了适用于药物高通量筛选的 ELISA 筛选模型, 为高效筛选靶向 β -catenin/TCF4 相互作用的小分子抑制剂奠定了实验基础。

关键词: Wnt 抑制剂, β -catenin/TCF4 相互作用, 酶联免疫吸附实验, 高通量筛选, 血根碱, 白花丹素

Received: August 23, 2020; **Accepted:** October 28, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81703546), Natural Science Foundation of Anhui Province, China (No. 1808085QH265), College Student Innovation Fund of Wannan Medical College, China (No. WK2021XS54), Jilin Scientific and Technological Development Program, China (No. 20160520045JH), University Natural Science Research Project of Anhui Province, China (No. KJ2019ZD30), Key Technologies Research and Development Program of Anhui Province, China (No. 202004a07020041).

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

Yunyu Chen. Tel: +86-553-3932414; E-mail: chenyunyu1984@163.com

国家自然科学基金 (No. 81703546), 安徽省自然科学基金 (No. 1808085QH265), 皖南医学院大学生科研资助金 (No. WK2021XS54), 吉林省科技发展计划项目 (No. 20160520045JH), 安徽省高校自然科学研究重大项目 (No. KJ2019ZD30), 安徽省重点研究与开发计划项目 (No. 202004a07020041) 资助。

网络出版时间: 2020-11-19

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20201119.1109.003.html>

Optimizations of an ELISA-like high-throughput screening assay for the discovery of β -catenin/TCF4 interaction antagonists

Zhenghao Fu¹, Gangan Yan¹, Xiaohong Zhu², Xiaoping Liu¹, and Yunyu Chen¹

¹ Institute for Drug Screening and Evaluation, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China

² Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: In canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway, β -catenin/TCF4 (T-cell factor 4) interaction plays an important role in the pathogenesis and development of non-small cell lung cancer (NSCLC), and it is tightly associated with the proliferation, chemoresistance, recurrence and metastasis of NSCLC. Therefore, suppressing β -catenin/TCF4 interaction in Wnt/ β -catenin signaling pathway would be a new therapeutic avenue against NSCLC metastasis. In this study, considering the principle of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), an optimized high-throughput screening (HTS) assay was developed for the discovery of β -catenin/TCF4 interaction antagonists. Subsequently, this ELISA-like screening assay was performed using 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GST-TCF4 βBD and 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ β -catenin, then a high Z' factor of 0.83 was achieved. A pilot screening of a natural product library using this ELISA-like screening assay identified plumbagin as a potential β -catenin/TCF4 interaction antagonist. Plumbagin remarkably inhibited the proliferation of A549, H1299, MCF7 and SW480 cell lines. More importantly, plumbagin significantly suppressed the β -catenin-responsive transcription in TOPFlash assay. In short, this newly developed ELISA-like screening assay will be vital for the rapid screening of novel Wnt inhibitors targeting β -catenin/TCF4 interaction, and this interaction is a potential anticancer target of plumbagin *in vitro*.

Keywords: Wnt inhibitor, β -catenin/TCF4 interaction, enzyme-linked immunosorbent assay, high-throughput screening, sanguinarine, plumbagin

非小细胞肺癌 (Non-small cell lung cancer, NSCLC) 是中国发病率和死亡率较高的癌症之一, 其五年生存率仅为 20%, 严重威胁人民的身体健康^[1-2]。虽然目前已有手术治疗、化疗、放疗、靶向治疗等多种治疗手段, 但由于 NSCLC 具有高转移和易复发等特点, 患者的死亡率依然居高不下^[3]。在 NSCLC 复发和转移的过程中, 高度活化的 Wnt/ β -catenin 信号通路极大地促进了肿瘤干细胞 (Cancer stem cells, CSC) 的分化与自我更新, 形成肿瘤起始细胞 (Tumor initialing cells, TICs), 促进了 NSCLC 的脑 (骨) 转移与复发^[4-6]。

在正常细胞中, β -catenin 通过泛素化途径降解, Wnt/ β -catenin 信号通路呈沉默状态。但在 NSCLC 等恶性肿瘤细胞中, β -catenin 泛素化降解途径受阻, 累积在胞质内的 β -catenin 大量入核, 与 TCF4 (T-cell factor 4) 的 βBD 结构域 (β -catenin binding domain, βBD , 1-53 氨基酸 (aa)) 相互作用形成转录复合体, 活化 Wnt/ β -catenin 信号通路,

启动原癌基因的大量表达, 促进 NSCLC 的增殖、分化、转移、耐药与复发^[7-8]。因此, β -catenin/TCF4 相互作用已成为新型高选择性抗 NSCLC 转移药物开发的理想靶标之一。

本室利用所建立的荧光偏振 (Fluorescence polarization, FP) 高通量筛选模型成功筛选到血根碱, 对 β -catenin/TCF4 相互作用具有良好的抑制活性, 初步证实了血根碱在 Wnt/ β -catenin 信号通路中的潜在抗癌活性分子靶标可能是 β -catenin/TCF4 相互作用^[8-9]。虽然荧光偏振高通量筛选模型具有操作简单、筛选时间短、筛选成本低等优点, 但在荧光偏振筛选模型中, 使用的荧光探针为异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的 TCF4 短肽 (FITC-TCF4)。因为 FITC-TCF4 还不能充分模拟核转录因子 TCF4 的真实空间结构, 所以筛选到的苗头化合物还需要再以基于蛋白质-蛋白质相互作用的实验方法 (如 GST pull-down 实验) 进一步确证其体外抑制活性。

为了快速筛选抑制 β -catenin/TCF4 相互作用的苗头化合物和定量评价其体外抑制活性,本研究基于酶联免疫吸附实验 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 原理,根据 β -catenin/TCF4 相互作用的结构生物学信息^[10-11],建立并应用 ELISA 高通量筛选模型筛选苗头化合物,为靶向 β -catenin/TCF4 相互作用小分子抑制剂的高效筛选奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 *Escherichia coli* Rosetta(DE3) 感受态细胞、蛋白质标准分子量购自 TransGen 公司;酵母粉、胰蛋白酶、琼脂粉购自 Oxoid 公司;Lipofectamin 2 000、BCA (Bicinchoninic acid) 试剂盒、超灵敏化学发光液购自 ThermoFisher 公司;硫酸卡那霉素、异丙基硫代半乳糖苷 (Isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG)、噻唑蓝 (Thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT) 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) 标签单克隆抗体、辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗小鼠 IgG 购自 Biosharp 公司;96 孔酶标板购自 Corning 公司;可溶性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;荧光素酶质粒 TOPFlash 购自 Merck 公司;醋酸纤维素膜、HisTrapTM 层析柱购自 GE 公司;荧光探针 FITC-TCF4 (FITC-GGDDLGANDELISFKDEGEQ EEK-OH) 由 GL Biochem 公司合成;天然产物化合物库购自 ChemDiv 公司;PKF118-310、血根碱、白花丹素购自 TargetMol 公司;A549、H1299、MCF7、SW480、HEK293 细胞由本室保存;重组谷胱甘肽转移酶 (Glutathione S-transferase, GST)、重组人 GST-TCF4 β BD (1-53 aa) 由本室制备和保存;其他生化试剂为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 β -catenin 分离纯化与活性鉴定

按照参考文献[12]所述的方法,将构建的重组质粒 pET-30a- β -catenin 转化到 *E. coli* Rosetta(DE3) 感受态细胞中,设定诱导温度 25 °C、诱导时间 10 h、0.2 mmol/L IPTG 为诱导条件,进行 β -catenin 表达。离心收集诱导培养的菌体,再以超声波细胞粉碎机 (SCIENTZ) 破碎菌体,离心收集上清液,再以 HisTrapTM 层析柱分离纯化 β -catenin。

分别将 1、4、10 μ g β -catenin 进行 SDS-PAGE,再以半干法转膜,设定 4 μ g BSA 为阴性对照组。封闭的免疫印迹膜经漂洗后,再依次加入小鼠抗 His 标签单抗 (1:2 000) 和 HRP-羊抗小鼠 IgG (1:4 000),以超灵敏化学发光液显影成像,以 Western blotting 法鉴定 β -catenin 的正确表达。

按照参考文献[9]所述的荧光偏振方法,将 40 nmol/L FITC-TCF4 以 30 μ L/孔加入到 384 孔板中,再以 30 μ L/孔依次加入 0、10、50、100、200、300、400、500、600、700、800、1 000 nmol/L β -catenin,设置 3 个复孔,在避光条件下,室温孵育 15 min,以多功能酶标仪检测毫偏值 (Millipolarization unit, mP),再以 GraphPad Prism 5.0 软件拟合 β -catenin/FITC-TCF4 结合反应曲线,计算解离平衡常数 (Dissociation constant, K_d) 值。

1.2.2 基于 ELISA 原理的高通量筛选模型的优化与建立

1) 最佳包被浓度与反应方案的确定

将 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 μ g/mL GST-TCF4 β BD 以 100 μ L/孔包被于 96 孔酶标板中,设置 3 个复孔,4 °C 包被过夜。将酶标板以含 0.1% Tween-20 的磷酸盐缓冲液 (Phosphate-buffered solution, PBST) 洗涤 3 次后,再以 5% BSA 溶液室温封闭 2 h。封闭的酶标板经 PBST 洗 3 次后,再依次加入小鼠抗 GST 标签单抗 (1:2 000, 100 μ L/孔) 和 HRP-羊抗小鼠 IgG (1:4 000, 100 μ L/孔),室温孵育 1 h。以 PBST 充分洗涤未结合的抗体后,加入 TMB 溶液 (100 μ L/孔),

室温孵育 5 min 显色。再加入 2 mol/L H_2SO_4 终止反应后, 多功能酶标仪检测 OD_{450} 值。设定包被 BSA 孔为对照组。

将 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GST-TCF4 βBD 以上述方法包被 96 孔酶标板后, 再以 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ β -catenin, 室温孵育 1 h。再加入小鼠抗 His 标签单抗 (1 : 2 000) 和 HRP-羊抗小鼠 IgG (1 : 4 000), TMB 溶液显色, 以多功能酶标仪检测 OD_{450} 值。同法包被 GST 孔设定为对照组。

按照 GST-TCF4 βBD 的包被浓度设置和操作方法, 同法包被 β -catenin, 以小鼠抗 His 标签单抗 (1 : 2 000) 和 HRP-羊抗小鼠 IgG (1 : 4 000) 检测 β -catenin 包被量。

将 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ β -catenin 包被 96 孔酶标板后, 再以 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GST-TCF4 βBD 和 GST, 室温孵育 1 h。再加入小鼠抗 GST 标签单抗 (1 : 2 000) 和 HRP-羊抗小鼠 IgG (1 : 4 000), TMB 溶液显色, 以多功能酶标仪检测 OD_{450} 值。

2) 最佳孵育温度的确定

将 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GST 和 GST-TCF4 βBD 以 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 包被于 96 孔酶标板中, 设置 3 个复孔。酶标板经 PBST 洗涤和 5% BSA 封闭后, 以 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入 0、0.5、1、2、3、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ β -catenin, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。再加入小鼠抗 His 标签单抗 (1 : 2 000) 和 HRP-羊抗小鼠 IgG (1 : 4 000), TMB 溶液显色, 以多功能酶标仪检测 OD_{450} 值。再将孵育温度设定为室温 (25 $^{\circ}\text{C}$) 和 37 $^{\circ}\text{C}$, 同法操作。

3) 最佳孵育时间的确定

按照上述实验方法, 设定 GST-TCF4 βBD 和 β -catenin 的室温孵育时间为 15 min。再加入小鼠抗 His 标签单抗 (1 : 2 000) 和 HRP-羊抗小鼠 IgG (1 : 4 000), TMB 溶液显色, 以多功能酶标仪检测 OD_{450} 值。将孵育时间设定为 30、45、60 min, 同法操作。以 GST 反应孔为对照组。

4) DMSO 耐受性实验

在包被 GST-TCF4 βBD (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 96 孔酶标板中, 以 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ β -catenin, 各反应体系中含 DMSO 终浓度为 0%、1%、2%、3%、4%、5%, 室温孵育 30 min。再加入上述一抗和二抗, 室温孵育 1 h, 多功能酶标仪检测 OD_{450} 值。

5) ELISA 筛选模型的特异性评价

以 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ β -catenin 为稀释液, 利用 2 倍比稀释法, 将 10 mmol/L 血根碱稀释至 12 个浓度 (起始浓度 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$), 再加入到包被 GST-TCF4 βBD (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 96 孔酶标板中, 室温反应 30 min。加入上述一抗和二抗, 室温孵育 1 h 后, 以多功能酶标仪检测 OD_{450} 值。以 GraphPad Prism 5.0 软件拟合血根碱的抑制曲线, 计算其半数抑制浓度 (Half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 值。本实验中设定含 1% DMSO 的为阴性对照组, 不含 β -catenin 的反应孔为阳性对照组。

6) Z'因子及 HTS 主要技术参数的确定

在包被 GST-TCF4 βBD (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 96 孔酶标板中, 以 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ β -catenin, 室温孵育 30 min。设定含 30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 血根碱的孔为阳性对照组 (A 板 1#-60#), 含 1% DMSO 的孔为阴性对照组 (B 板 1#-60#)。加入上述一抗和二抗, 室温孵育 1 h, 以多功能酶标仪检测 OD_{450} 值, 按照 BioTek 操作系统的相关程序进行 Z'因子计算。

根据上述相关检测数据, 对信号本底比值 (Signal to background, S/B)、信号窗值 (Signal window, SW)、信噪比值 (Signal to noise, S/N)、信号/本底变异系数值 (Coefficient of variation of signal/background, CV) 进行计算分析。

1.2.3 苗头化合物的高通量筛选

将 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ β -catenin 以 99 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入到包被 GST-TCF4 βBD (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 96 孔酶标板中, 再以 1 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入小分子化合物 (10 mg/mL), 室温孵育 30 min。加入上述一抗和二抗, 室温孵育

1 h, 以多功能酶标仪检测 OD_{450} 值。设定含 1% DMSO 的孔为阴性对照组, 含 30 $\mu\text{mol/L}$ 血根碱的孔为阳性对照组。在初次筛选中, 判定抑制率大于 50% 的小分子化合物为候选苗头化合物。

1.2.4 苗头化合物的复筛与 IC_{50} 值的测定

按照血根碱抑制活性检测所述的 ELISA 法, 对候选苗头化合物进行复筛, 以 GraphPad Prism 5.0 软件拟合苗头化合物的抑制曲线, 计算 IC_{50} 值。

1.2.5 MTT 实验

取对数生长期的 A549、H1299、MCF7、SW480 和 HEK293 细胞, 以 5 000 个/孔接种到 96 孔细胞板中, 培养过夜。将 10 mmol/L 白花丹素和血根碱分别以细胞培养基进行 2 倍倍比稀释 (起始浓度 100 $\mu\text{mol/L}$, 共稀释 10 个浓度, 100 μL /孔), 每组设定 3 个复孔, 继续孵育 48 h。吸弃上述培养基后, 再以 200 μL /孔加入新鲜培养基, 孵育 24 h 后, 每孔中再加入 22 μL MTT 溶液 (5 mg/mL), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h。以 150 μL /孔加入 DMSO, 室温振荡 15 min, 多功能酶标仪检测 OD_{560} 值。设定含 DMSO 的孔为阴性对照组, 含 25 $\mu\text{mol/L}$ PKF118-310 的孔为阳性对照组, 以 GraphPad Prism 5.0 软件拟合白花丹素和血根碱对上述细胞增殖的抑制曲线, 计算 IC_{50} 值。

同法稀释 PKF118-310 后, 设定含 DMSO 的孔为阴性对照组, 含 25 $\mu\text{mol/L}$ 血根碱的孔为阳性对照组, 以 GraphPad Prism 5.0 软件拟合 PKF118-310 对上述细胞增殖的抑制曲线, 计算其 IC_{50} 值。

1.2.6 TOPFlash 实验

按照 Raghunath 等^[13]所述的方法, 取对数生长期的 HEK293 细胞, 以 3 000 个/孔接种到 96 孔细胞板中, 培养过夜。待细胞稳定贴壁生长后, 使用 Lipofectamin 2000 将荧光素酶质粒 TOPFlash 转染到 HEK293 细胞中。在 HEK293 细胞转染 8 h 后, 分别加入 0.75、1.5、3 $\mu\text{mol/L}$ 白花丹素, 设置 3 个复孔, 再继续培养 24 h。根据荧光素酶操作系统说明书裂解 HEK293 细胞, 再以多功能酶标仪检测相对发光值 (Relative luminescence unit,

RLU)。采用 RLU 值表征 β -catenin 转录活性, DMSO 组的 RLU 值计为 100%, 白花丹素的不同剂量组与 DMSO 组的 RLU 比值计为相对转录活性。

1.2.7 数据分析

采用 GraphPad Prism 5.0 软件拟合血根碱和白花丹素的抑制曲线, 其 IC_{50} 值计算公式如下所述。

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

2 结果与分析

2.1 β -catenin 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 层析柱进行分离纯化。SDS-PAGE 结果表明, 纯化的 β -catenin 在预期分子量 77 kDa 位置有明显且单一的蛋白质条带, 说明其具有较高的纯度 (图 1A)。Western blotting 实验结果表明, 在上述预期分子量的位置, 抗 His 标签抗体能与 β -catenin 反应且具有良好的量效关系, 但其不能与 BSA 反应, 证实了 β -catenin 的正确表达 (图 1B)。荧光偏振实验结果表明, 纯化的 β -catenin 与 FITC-TCF4 具有良好的结合反应, 其 K_d 值为 65 nmol/L, 这说明纯化的 β -catenin 具有良好的生物学活性 (图 1C)。

2.2 最佳包被浓度与反应方案的确定

将不同浓度的 GST-TCF4 β BD 包被于 96 孔酶标板中, 以 ELISA 法检测其包被量。实验结果显示, 当包被浓度达到 2 $\mu\text{g/mL}$ 时, 其包被反应曲线趋于饱和 (图 2A)。设定 2 $\mu\text{g/mL}$ 作为 GST-TCF4 β BD 最佳包被浓度, ELISA 实验结果显示, 包被的 GST-TCF4 β BD 与 β -catenin 的结合反应具有明显的量效关系, 但 GST 不能与 β -catenin 发生结合反应。当 β -catenin 反应浓度达到 2 $\mu\text{g/mL}$ 时, 其结合反应曲线趋于平台期, OD_{450} 值达 0.66 (图 2B)。当包被不同浓度的 β -catenin 时, 其包被反应曲线在 4 $\mu\text{g/mL}$ 时趋于饱和 (图 2C)。设定 4 $\mu\text{g/mL}$ 作为 β -catenin 最佳包被浓度, ELISA 实验结果显示, 包

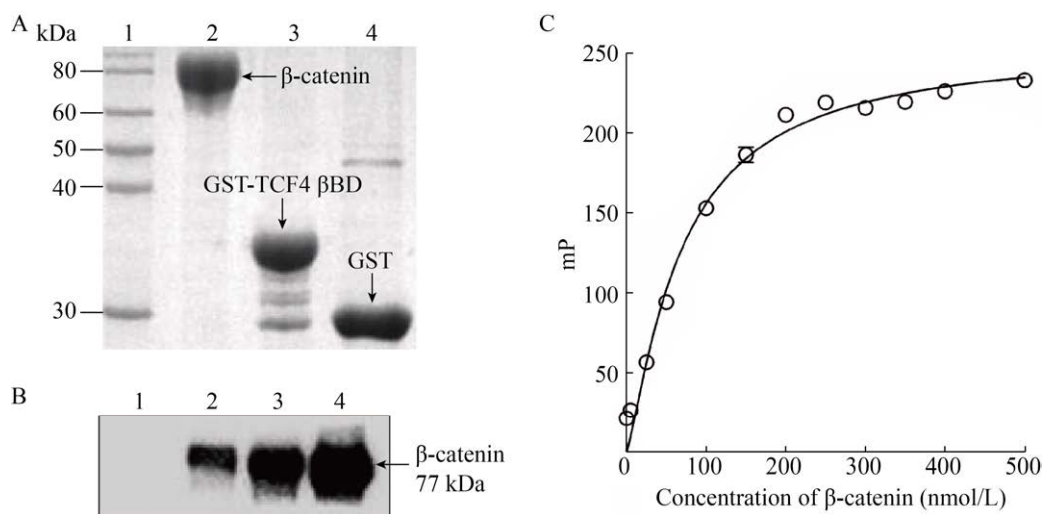


图 1 重组人 β -catenin 的分离纯化与活性鉴定

Fig. 1 Purification and bioactivity analysis of recombinant human β -catenin. (A) Expression and purification analysis of β -catenin using the coomassie brilliant blue-stained SDS-PAGE. 1: protein marker; 2: purified β -catenin band (77 kDa); 3: purified GST-TCF4 β BD band (32 kDa); 4: purified GST band (26 kDa). (B) Validation of purified β -catenin using Western blotting assay. 1: 4 μ g BSA control; 2: 1 μ g β -catenin band; 3: 4 μ g β -catenin band; 4: 10 μ g β -catenin band. (C) Bioactivity analysis using fluorescence polarization (FP) assay. 40 nmol/L FITC-TCF4 was added into β -catenin solution at the indicated concentrations, and then the mixtures were incubated at room temperature (RT, 25 $^{\circ}$ C) for 15 min. The mP values were recorded by a microplate reader (BioTek), and the K_d value that indicates the binding affinity of β -catenin/FITC-TCF4 interaction was subsequently analyzed using GraphPad Prism 5.0. The experiment was performed in triplicate.

被的 β -catenin 与 GST-TCF4 β BD 的结合反应较弱,在结合反应曲线的平台期,其 OD_{450} 值达 0.13,约为背景值的 2 倍 (图 2D)。综上所述,将包被 GST-TCF4 β BD 与 β -catenin 反应作为最佳反应方案,此时 GST-TCF4 β BD 最佳包被浓度为 2 μ g/mL。

2.3 最佳孵育温度、孵育时间的确定与 DMSO 浓度的影响

将不同浓度的 β -catenin 加入到 2 μ g/mL GST-TCF4 β BD 包被的 96 孔酶标板中,其结合反应分别在 4 $^{\circ}$ C、室温 (25 $^{\circ}$ C)、37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 1 h。ELISA 实验结果显示,孵育温度对 GST-TCF4 β BD/ β -catenin 结合反应未产生显著影响。当 β -catenin 反应浓度达 2 μ g/mL 时,其结合反应曲线趋于平台期 (图 3A)。为了使高通量筛选模型具有更好的操作简便性,选择室温作为 GST-TCF4 β BD/ β -catenin 结合反应的最佳孵育温度。

将 GST-TCF4 β BD/ β -catenin 结合反应分别在室温条件下孵育 15、30、45、60 min。ELISA 实验结果显示,孵育 30 min 时的结合反应曲线与 45、60 min 的结合反应曲线高度重合,说明在孵育时间为 30 min 的时间点, GST-TCF4 β BD 与 β -catenin 已充分结合 (图 3B)。因此,选择 30 min 作为 GST-TCF4 β BD/ β -catenin 结合反应的最佳孵育时间。为了使高通量筛选模型具有更高的灵敏度和信号窗,选择 0.5 μ g/mL 作为 β -catenin 最佳反应浓度,其结合反应最佳条件为室温孵育 30 min。

利用上述实验确定的 GST-TCF4 β BD/ β -catenin 最佳反应条件建立 ELISA 筛选模型,检测不同 DMSO 浓度对其结合反应的影响。ELISA 实验结果显示,DMSO 浓度在 5% 以内时,其对 GST-TCF4 β BD/ β -catenin 结合反应未产生显著影响,其 OD_{450} 值为 (0.45 \pm 0.01) (图 3C)。

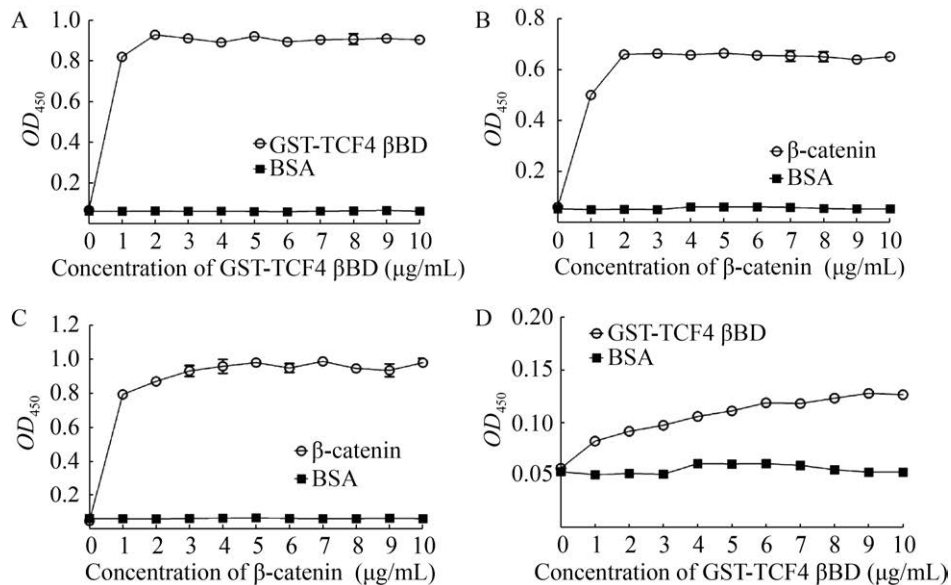


图 2 最佳包被浓度与反应方案的确定

Fig. 2 Determinations of an optimal working concentration of coated protein and GST-TCF4 β BD/ β -catenin *in vitro* interaction mode in an ELISA-like screening assay. (A) Determination of an optimal working concentration of coated GST-TCF4 β BD. GST-TCF4 β BD at the indicated concentrations was coated into a 96-well microplate and then probed with the mentioned antibody. The OD_{450} values were measured. BSA was used as a control. (B) Analysis of GST-TCF4 β BD/ β -catenin binding curve. Different concentrations of β -catenin were incubated in a GST-TCF4 β BD-coated 96-well microplate. After addition of antibody and TMB, GST-TCF4 β BD/ β -catenin binding curve was determined by measuring the OD_{450} values. GST was used as a control. (C) Determination of an optimal working concentration of coated β -catenin. β -catenin at the given concentrations was coated into a 96-well microplate. After addition of antibody and TMB, the OD_{450} value was recorded. (D) Analysis of β -catenin/GST-TCF4 β BD binding curve. GST-TCF4 β BD at indicated concentrations was added into a β -catenin-coated 96-well microplate. After the measurement of OD_{450} values, the binding curve was plotted using GraphPad Prism 5.0.

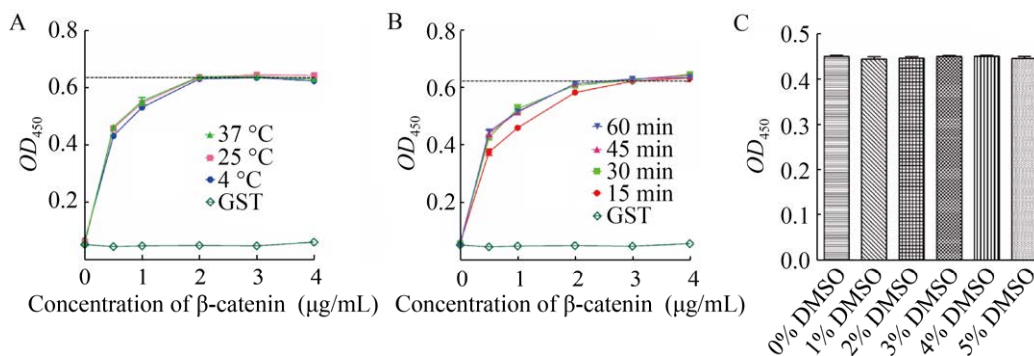


图 3 GST-TCF4 β BD/ β -catenin 结合反应条件的优化

Fig. 3 Incubation condition optimizations of GST-TCF4 β BD/ β -catenin binding in an ELISA-like screening assay. (A) Analysis of GST-TCF4 β BD/ β -catenin binding curve in the different incubation temperatures. β -catenin at the indicated concentrations was added into a GST-TCF4 β BD-coated 96-well microplate, and then the mixtures were incubated at 4 °C, 25 °C, 37 °C for 1 h, respectively. The binding curve was plotted according to the OD_{450} values. GST was used as a control. (B) Analysis of GST-TCF4 β BD/ β -catenin binding curve in the different incubation durations. As previously mentioned, GST-TCF4 β BD/ β -catenin binding mixtures were incubated at RT for 15, 30, 45, 60 min, respectively, and then the binding curve was recorded. GST served as a control. (C) Analysis of DMSO tolerance in an ELISA-like screening assay. β -catenin (0.5 μ g/mL) was incubated in a GST-TCF4 β BD-coated 96-well microplate at RT for 30 min in the presence of the indicated DMSO concentrations. The OD_{450} values were recorded for comparison analysis.

2.4 筛选模型的特异性评价

本实验室利用荧光偏振高通量筛选模型,初步证实了血根碱在 Wnt/ β -catenin 信号通路中的潜在抗癌活性分子靶标可能是 β -catenin/TCF4 相互作用。应用上述已优化的 ELISA 筛选模型检测血根碱对 GST-TCF4 β BD/ β -catenin 相互作用的抑制作用。实验结果显示,在 ELISA 筛选模型中,血根碱对上述相互作用具有良好的抑制活性,其 IC_{50} 值为 $(1.82 \pm 0.16) \mu\text{mol/L}$ (图 4),与其在荧光偏振筛选模型中的 IC_{50} 值 $(1.22 \pm 0.08) \mu\text{mol/L}$ 基本相近^[8-9],说明所建立的 ELISA 筛选模型具有良好的特异性。

2.5 Z'因子及 HTS 主要技术参数的确定

经过上述优化实验,以多功能酶标仪计算所建立的 ELISA 高通量筛选模型的 Z'因子值为 0.83,满足了其大于 0.5 的基本要求 (图 5)。另外,本筛选模型的 S/B 值、S/N 值、SW 值、CV 值等 HTS 主要技术参数均满足了高通量筛选的基本要求 (表 1),这说明通过上述优化方案,已成功建

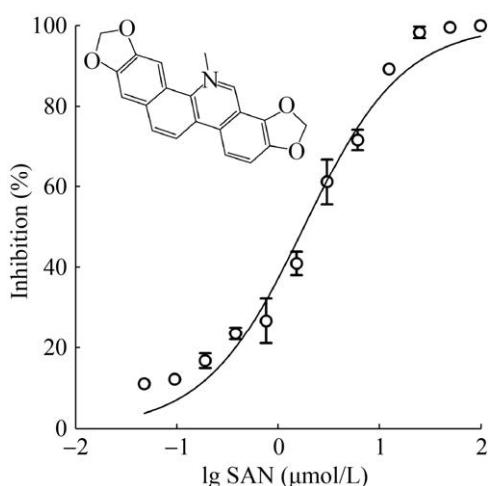


图 4 血根碱在 ELISA 筛选模型中的抑制活性

Fig. 4 The inhibitory activity of sanguinarine (SAN) in an ELISA-like screening assay. The mixtures containing β -catenin ($0.5 \mu\text{g/mL}$) and sanguinarine at indicated concentrations were added into a GST-TCF4 β BD-coated 96-well microplate at RT for 30 min. After addition of antibody and TMB, the OD_{450} values were recorded, and then IC_{50} value of sanguinarine was analyzed using GraphPad Prism 5.0.

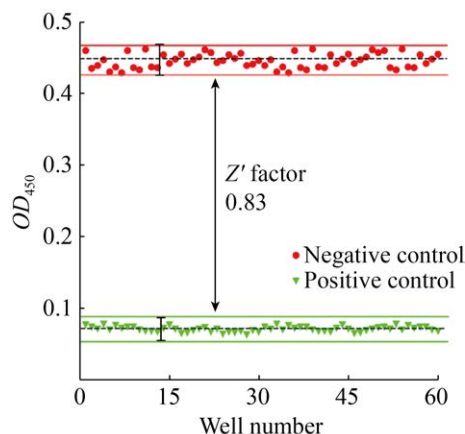


图 5 ELISA 筛选模型 Z'因子的确定

Fig. 5 Determination of Z' factor in an ELISA-like screening assay. The OD_{450} values of the negative and positive wells were shown.

表 1 ELISA 高通量筛选模型的综合评价

Table 1 The general indicators in an ELISA-like screening assay

Indicators	Requirements of HTS	Results of HTS
S/B	>3	6.34
S/N	>10	31.16
SW	Not determined	0.38
CV (%)	<10	2.56
Z' factor	>0.5	0.83

立了适用于 β -catenin/TCF4 相互作用小分子抑制剂高通量筛选的 ELISA 筛选模型。

2.6 苗头化合物的筛选与白花丹素抗癌活性的分子靶标确证

根据上述 ELISA 筛选模型的优化实验结果,选择 $2 \mu\text{g/mL}$ 作为 GST-TCF4 β BD 最佳包被浓度, $0.5 \mu\text{g/mL}$ 作为 β -catenin 最佳反应浓度,最佳反应条件为室温孵育 30 min,成功建立了 ELISA 高通量筛选模型 (图 6A)。应用上述 ELISA 筛选模型对本室天然产物化合物库 (含 500 个天然产物) 进行高通量筛选,以初筛抑制率大于 50% 为标准,共获得 10 个候选苗头化合物 (图 6B)。在第二轮复筛中,成功筛选到的白花丹素 (Plumbagin) 具有良好的抑制活性,其 IC_{50} 值为 $(4.55 \pm 0.27) \mu\text{mol/L}$

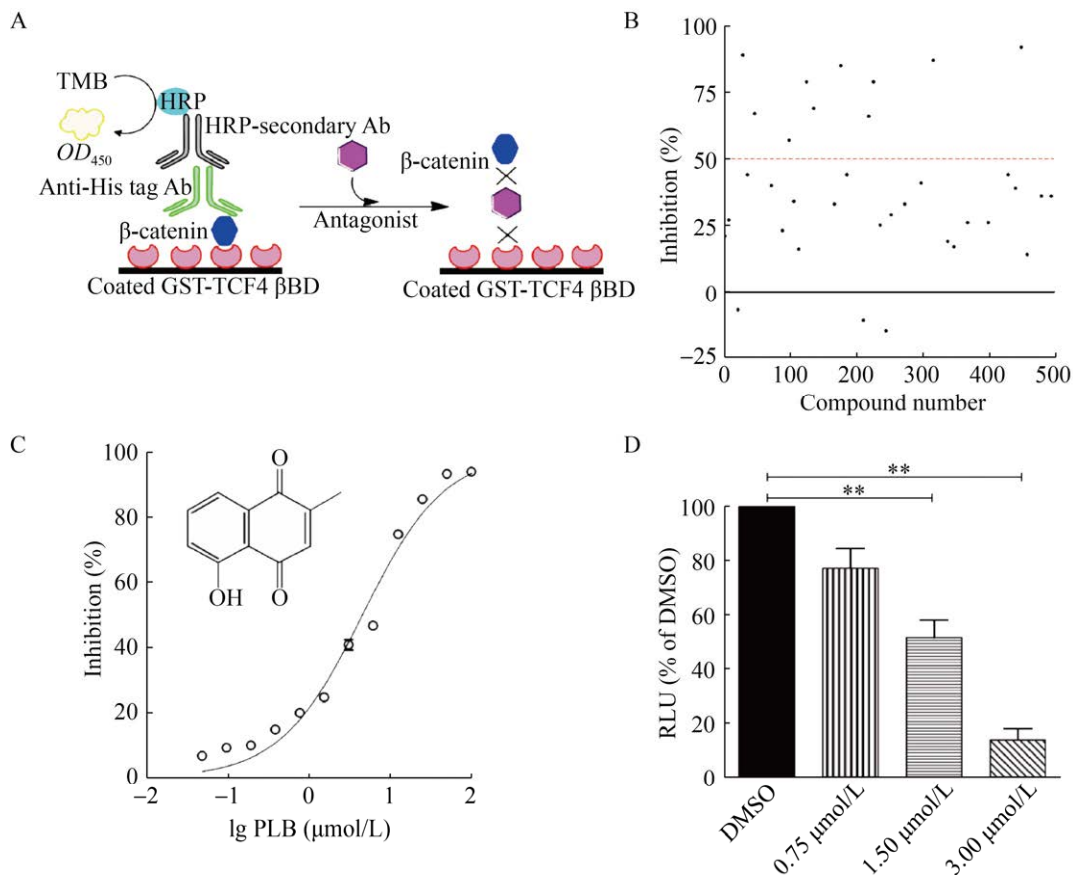


图 6 苗头化合物的筛选与白花丹素抗癌活性的分子靶标确证

Fig. 6 A pilot screening and the anticancer target validation of plumbagin *in vitro*. (A) The schematic illustration for an ELISA-like HTS assay. Briefly, 2 μg/mL GST-TCF4 βBD (100 μL/well, light red) was coated into a 96-well microplate overnight. After PBST washing, the mixtures containing of β-catenin (0.5 μg/mL, blue) and small molecule were incubated for 30 min at RT in a GST-TCF4 βBD-coated 96-well microplate. Remaining β-catenin was detected using anti-His tag antibody (green) and HRP-conjugated secondary antibody (gray). After addition of TMB, the OD₄₅₀ values were measured. The candidate hits (purple) were identified as potential antagonists because of the lower OD₄₅₀ values in the primary screening. (B) Overview of a pilot screening of a natural product library. The red dashed line in the figure indicated 50% inhibition. The candidate hits (>50% inhibition) were further validated in second ELISA-like screening assay. (C) The inhibitory curve of plumbagin (PLB) in second ELISA-like screening assay. The chemical structure of plumbagin (PLB) was shown. (D) The effect of plumbagin on the β-catenin-responsive transcription in TOPFlash assay. HEK293 transfection cells were treated with DMSO (control) or plumbagin (0.75–3.00 μmol/L) for 24 h, and TOPFlash luciferase activity was carried out as previously described in reference^[13]. All data are expressed as the $\bar{x} \pm s$ from three independent experiments and considered significant if *P* values were found to be less than 0.05.

(图 6C)。MTT 实验结果显示, 白花丹素对 A549、H1299、MCF7、SW480 和 HEK293 细胞具有明显的细胞毒性 (表 2)。TOPFlash 实验结果显示, 与 DMSO 对照组相比, 白花丹素对 HEK293 转染细胞内 β-catenin 介导的转录活性 (β-catenin-responsive transcription, CRT) 具有显著的抑制作用 (图 6D)。

3 讨论

在大部分恶性肿瘤细胞中 (如 NSCLC), Wnt/β-catenin 信号通路异常活化, β-catenin 泛素化降解途径受阻, 导致胞质内累积的 β-catenin 大量入核与核转录因子 TCF4 相互作用形成转录调

表 2 白花丹素、血根碱和 PKF118-310 的细胞毒性
Table 2 The inhibitory effect of plumbagin (PLB), sanguinarine (SAN) and PKF118-310 on the proliferation of various cell lines

Cell lines	IC ₅₀ (μ mol/L)		
	PLB	SAN	PKF118-310
A549	7.83 \pm 0.51	8.74 \pm 0.85	0.75 \pm 0.15
H1299	10.23 \pm 0.77	3.69 \pm 0.56	1.14 \pm 0.66
MCF7	14.21 \pm 1.25	7.56 \pm 0.94	1.56 \pm 0.35
SW480	7.36 \pm 1.21	5.37 \pm 0.86	0.24 \pm 0.19
HEK293	8.12 \pm 1.38	10.31 \pm 1.05	3.56 \pm 0.89

控元件,启动原癌基因的大量表达,促进肿瘤细胞的增殖、分化、侵袭、转移、复发和耐药^[4-8]。鉴于正常细胞内不存在 Wnt/ β -catenin 信号通路,因此 β -catenin/TCF4 相互作用被认为是广谱高选择性新型抗肿瘤药物开发的理想靶标之一。

制备高活性的 β -catenin 是建立靶向 β -catenin/TCF4 相互作用小分子抑制剂筛选模型的重要基础。本研究采用大肠杆菌原核表达技术,成功制备了高活性的 β -catenin。目前,荧光偏振技术已发展成为基于蛋白质-蛋白质相互作用 (Protein-protein interactions, PPIs) 为靶标的小分子抑制剂高通量筛选的重要方法之一,并且广泛应用于重组蛋白质的生物学活性分析^[9,14-15]。考虑到在 Wnt/ β -catenin 信号通路中, β -catenin/TCF4 相互作用是重要的转录调控“分子开关”,因此制备的 β -catenin 与 TCF4 是否具有高亲和力是其活性评价的核心指标之一。在荧光偏振实验中,将 FITC-TCF4 作为核转录因子 TCF4 的模拟物,证实了纯化的 β -catenin 能与 FITC-TCF4 特异性结合,其结合反应 K_d 值为 65 nmol/L,与文献报道基本一致^[9],说明纯化的 β -catenin 具有良好的生物学活性。

目前已报道了多种筛选方法成功应用于 β -catenin/TCF4 相互作用小分子抑制剂的筛选,其中 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,但其操作复杂,筛选成本较高^[16-17];基于 β -catenin 结构生物学信息的虚拟筛选法,虽

然可使药物高通量筛选的成本大幅度地降低,但假阳性化合物的发生率也相对较高,所以必须结合其他实验筛选法进一步进行假阳性化合物的有效排除^[18];本实验室建立的荧光偏振筛选法虽然耗时短、用量少、成本低,但筛选到的化合物还需再以 GST-pull down 实验模拟 β -catenin/TCF4 相互作用以进一步验证其体外抑制活性^[9,15]。ELISA 实验能够较大程度地真实模拟蛋白质分子间的相互作用,具有操作简单、特异性强、灵敏度高优点,已被广泛应用于药物筛选和疾病诊断^[12,19-20]。为了更好地弥补上述筛选方法的不足并促进 β -catenin/TCF4 相互作用小分子抑制剂的高效筛选,本研究基于 ELISA 原理,通过判断化合物对 β -catenin 与已包被的 GST-TCF4 β BD 的高亲和力相互作用是否具有阻断作用,进而高效地筛选苗头化合物。本研究建立的 ELISA 筛选模型基本真实地模拟了 β -catenin/TCF4 相互作用,不仅可以用于小分子抑制剂的高通量筛选,还可以用于化合物体外抑制活性的定量评价,因此本模型具有良好的实用性和推广性。

在 Wnt 信号通路中, β -catenin 通过犰狳样蛋白质重复片段结构域 (Armadillo repeats) 可与大部分功能蛋白质分子结合,发挥信号转导作用^[21]。但 TCF4 和 E-cadherin 与 β -catenin 的结合域有部分重叠且大部分天然产物具有多靶点药理活性,利用本筛选模型筛选到的苗头化合物还需要再以荧光偏振实验、免疫共沉淀 (Co-immunoprecipitation, Co-IP) 实验、Western blotting 实验等系统地评价其抗癌靶标与药理活性的相关性^[22]。由于本筛选模型的操作时间较长,后续可以进一步改进实验方法,采用 HRP-抗人 β -catenin 抗体一步显色法进行检测;另外, β -catenin 在较长时间冻存或反复冻融后会导致其活性降低,所以,定期采用荧光偏振法对 β -catenin 进行生物学活性评价至关重要。

与已报道的基于 β -catenin 包被方案的 ELISA 筛选模型相比^[23],本筛选模型选择 2 μ g/mL 作为

GST-TCF4 β BD 最佳包被浓度, 此时酶标板的结合量基本饱和; 选择 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为 β -catenin 最佳工作浓度, 一方面保持了本筛选模型的高信号窗, 另一方面最适中的 β -catenin 工作浓度也使本筛选模型具有更高的灵敏度。不同的包被方案导致差异的原因可能在于 β -catenin 的包被使其空间构象发生某些改变, 从而与 GST-TCF4 β BD (1-53 aa) 的亲和力减弱, 使表征结合反应强弱的核心指标 OD_{450} 值降低。

Z'因子是高通量筛选模型评价的核心参数, 本研究建立的 ELISA 高通量筛选模型 Z'因子为 0.83, 完全满足高通量筛选中 Z'因子大于 0.5 的基本要求^[24]。在上述优化的 ELISA 筛选模型中, 血根碱的 IC_{50} 值为 $(1.82 \pm 0.16) \mu\text{mol}/\text{L}$, 与文献报道基本相近^[8-9], 说明了本筛选模型具有良好的特异性、灵敏性和稳定性。

本文运用所建立的 ELISA 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, 成功筛选到的白花丹素对 β -catenin/TCF4 相互作用具有良好的抑制活性, 但其细胞毒性的选择性较差, 这可能与多靶点抗癌活性有关^[25-26]。另外, 白花丹素对不同肿瘤细胞的毒性略有差异, 这可能与不同肿瘤细胞中 Wnt 信号通路的活化程度有关。因此, 白花丹素作为新型 Wnt 抑制剂的苗头化合物, 还需要深入进行化学改造以提高其成药性。

白花丹素又名白花丹醌, 是传统中药白花丹的主要药效成分之一, 具有抗炎、抗肿瘤等多种药理活性^[26]。已有研究表明, 白花丹素对 NSCLC 细胞具有明显的细胞毒性, 并通过抑制结直肠癌和乳腺癌细胞中的 Wnt 信号通路发挥抗癌活性, 但白花丹素在 Wnt 信号通路中的潜在抗癌靶标尚未明确^[13, 27-28]。本研究初步证实了 β -catenin/TCF4 相互作用可能是白花丹素抗癌活性的潜在分子靶标之一。

综上所述, 本研究成功建立了适用于 β -catenin/TCF4 相互作用小分子抑制剂筛选的 ELISA 高通量筛选模型, 为靶向 β -catenin/TCF4

相互作用小分子抑制剂的高效筛选及其药理学活性评价奠定了实验基础。

致谢: 衷心感谢中国医学科学院-北京协和医学院医药生物技术研究国家新药(微生物)筛选中心张晶副研究员和上海药明康德新药开发有限公司林晓燕博士在白花丹素细胞毒性实验和 TOPFlash 实验中给予的悉心指导和无私帮助!

REFERENCES

- [1] Chen WQ, Zheng RS, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] Chen WQ, Zheng RS, Zeng HM, et al. The incidence and mortality of major cancers in China, 2012. *Chin J Cancer*, 2016, 35: 73.
- [3] Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*, 2018, 553(7689): 446-454.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities. *Cell*, 2017, 169(6): 985-999.
- [8] 付正豪, 闫干干, 戚海燕, 等. 靶向 β -catenin/TCF4 相互作用抑制剂在肿瘤分子治疗中的研究进展. *药学学报*, 2021, 56(5): 1238-1245.
Fu ZH, Yan GG, Qi HY, et al. Recent advances in novel anticancer agents targeting β -catenin/TCF4 interaction for molecular cancer therapeutics. *Acta Pharm Sin*, 2021, 56(5): 1238-1245 (in Chinese).
- [9] 陈云雨, 胡克, 付正豪, 等. 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. *药学学报*, 2020, 55(5): 884-891.
Chen YY, Hu K, Fu ZH, et al. Development of a fluorescence polarization-based high-throughput

- screening assay to identify antagonists targeting β -catenin/TCF4 interaction. *Acta Pharm Sin*, 2020, 55(5): 884-891 (in Chinese).
- [10] Omer CA, Miller PJ, Diehl RE, et al. Identification of Tcf4 residues involved in high-affinity β -catenin binding. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 256(3): 584-590.
- [11] Knapp S, Zamai M, Volpi D, et al. Thermodynamics of the high-affinity interaction of TCF4 with beta-catenin. *J Mol Biol*, 2001, 306(5): 1179-1189.
- [12] 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 (in Chinese).
- [13] Raghu D, Karunagaran D. Plumbagin downregulates Wnt signaling independent of p53 in human colorectal cancer cells. *J Nat Prod*, 2014, 77(5): 1130-1134.
- [14] 牛夏忆, 韩茂椿, 李淼, 等. 重组人 β -catenin 原核表达条件的优化及生物学活性鉴定. *微生物学杂志*, 2020, 40(1): 58-66.
Niu XY, Han MC, Li M, et al. Optimization of prokaryotic expression conditions and biological activity identification of recombinant human β -catenin. *J Microbiol*, 2020, 40(1): 58-66 (in Chinese).
- [15] Chen YY, Fu ZH, Li DS, et al. Optimizations of a novel fluorescence polarization-based high-throughput screening assay for β -catenin/LEF1 interaction inhibitors. *Anal Biochem*, 2020, 612: 113966. DOI: 10.1016/j.ab.2020.113966.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Trosset JY, Dalvit C, Knapp S, et al. Inhibition of protein-protein interactions: the discovery of druglike β -catenin inhibitors by combining virtual and biophysical screening. *Proteins*, 2006, 64(1): 60-67.
- [19] 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.
- [20] Kim J, Bong S, Kim DR, et al. Validation and comparison of ELISA kits to measure interferon gamma responses in QuantiFERON cultural supernatants for diagnosis of tuberculosis. *J Microbiol Methods*, 2018, 150: 29-31.
- [21] Bienz M. β -catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr Biol*, 2005, 15(2): R64-R67.
- [22] Zhang M, Catrow JL, Ji HT. High-throughput selectivity assays for small-molecule inhibitors of β -catenin/T-cell factor protein-protein interactions. *ACS Med Chem Lett*, 2013, 4(2): 306-311.
- [23] Lepourcelet M, Chen YN, France DS, et al. Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/ β -catenin protein complex. *Cancer Cell*, 2004, 5(1): 91-102.
- [24] 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.
- [25] Liu YL, Cai Y, He CW, et al. Anticancer properties and pharmaceutical applications of plumbagin: a review. *Am J Chin Med*, 2017, 45(3): 423-441.
- [26] Padhye S, Dandawate P, Yusufi M, et al. Perspectives on medicinal properties of plumbagin and its analogs. *Med Res Rev*, 2012, 32(6): 1131-1158.
- [27] Gomathinayagam R, Sowmyalakshmi S, Mardhatillah F, et al. Anticancer mechanism of plumbagin, a natural compound, on non-small cell lung cancer cells. *Anticancer Res*, 2008, 28(2): 785-792.
- [28] Sakunrangsit N, Ketchart W. Plumbagin inhibits cancer stem-like cells, angiogenesis and suppresses cell proliferation and invasion by targeting Wnt/ β -catenin pathway in endocrine resistant breast cancer. *Pharmacol Res*, 2019, 150: 104517. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104517.

(本文责编 陈宏宇)