DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01349

· 论 著 ·

表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂高通量筛选模型的建立

李 林[1△],李 国[2△],陈莉莉[3],罗海斌[3],陈 静[3],沈 旭[3],梅长林[1*]
1. 第二军医大学长征医院肾内科,上海 200003
2. 海军411医院骨科,上海 200081
3. 中国科学院上海药物研究所,上海 201203

[摘要] **目的**:建立表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase,RTK)抑制剂的高通量筛选模型。**方法**:通过基因工程技术表达EGFR-RTK,ELISA法验证其生物学活性;应用表面等离子共振原理筛选与激酶具有结合活性的化合物,ELISA法检测其生物学活性。**结果**:在原核表达系统中成功表达具有生物学活性的EGFR-RTK蛋白。将蛋白偶联至生物芯片,阳性化合物EI 188与EGFR酪氨酸激酶结合的Kd值为5.00×10^{-7} mol·L^{-1},IC_{50}为12.37 μmol·L^{-1},与预期结果一致。应用该模型筛选31个待测化合物,发现了6个具有结合活性和酶抑制活性的EGFR-RTK抑制剂。**结论**:成功建立了基于表面等离子共振原理和ELISA法的高通量EGFR-RTK抑制剂的筛选模型,为发现新型酪氨酸激酶抑制剂奠定了基础。

[关键词] 表皮生长因子受体;酪氨酸激酶抑制剂;模型;高通量筛选;表面等离子共振
[中图分类号] R 97 [文献标志码] A [文章编号] 0258-879X(2009)12-1349-04

Establishment of high throughput screening model for epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor

LI Lin[1△], LI Guo[2△], CHEN Li-li[3], LUO Hai-bin[3], CHEN Jing[3], SHEN Xu[3], MEI Chang-lin[1*]
1. Department of Nephrology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
2. Department of Orthopaedics, No. 411 Hospital of PLA, Shanghai 200081
3. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203

[**ABSTRACT**] **Objective**: To establish a high throughput screening (HTS) model for epidermal growth factor (EGF) receptor tyrosine kinase (RTK) inhibitor. **Methods**: The bioactive EGFR-RTK was expressed by genetic engineering technology. The binding activity and bioactivity of the compounds were examined by surface plasmon resonance and ELISA. **Results**: The bioactive EGFR-RTK protein was successfully expressed in the prokaryotic expression system and was immobilized on the sensor chip. The equilibrium constants (Kd) between TKI (EI 188) and RTK was 5.00×10^{-7} mol·L^{-1}, and the IC_{50} was 12.37 μmol·L^{-1}, which was consistent with expected. With this model we screened 31 compounds and found that 6 compounds had binding activity and inhibitory activity. **Conclusion**: A novel HTS model of EGFR-TKI has been successfully established using surface plasmon resonance biosensor and ELISA, which lays a foundation for discovery of new TKIs.

[**KEY WORDS**] epidermal growth factor receptor; tyrosine kinase inhibitor; model; high throughout screening; surface plasmon resonance

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(12): 1349-1352]

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)是一种广泛分布于多种细胞表面的跨膜糖蛋白,主要调节细胞的分裂、增生和分化,其胞内区酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase,RTK)异常持续激活可引起细胞的无限增殖和分化不良,导致许多增生性疾病,如多囊肾病、肿瘤等,且预示

[收稿日期] 2009-09-04 [接受日期] 2009-11-24
[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(30330640),国家自然科学基金(30170901),国家科技部重大科技专项(2002AA2Z3130). Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China(30330640), National Natural Science Foundation of China(30170901) and Grant of National Science and Technology R&D Program (2002AA2Z3130).
[作者简介] 李 林,博士,讲师、主治医师. E-mail: lilin16@yahoo.com.cn; 李 国,博士,主治医师. E-mail: liguo_1234567@163.com
* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81885391, E-mail: chlmei1954@126.com

疾病预后不良[1-2]。因此，EGFR-RTK 已成为相关疾病治疗新的作用靶点[3]，其抑制剂（TKI）——Iressa 已被 FDA 批准应用于临床，并取得初步成效[4]。但相关药物仍不能满足目前临床需要，急需开发更多的 TKI 类新药以应用于临床。因此，建立特异、敏感和高效的新型药物筛选模型是目前 TKI 类新药开发研究的热点[5]。

表面等离子共振（surface plasmon resonance，SPR）技术是近年来用于进行生物分子相互作用分析的有力工具[6-7]。本研究采用 SPR 技术测定 TKI 与 EGFR-RTK 的相互作用，结合酶活性 ELISA 测定方法，尝试建立高通量的 EGFR-RTK 抑制剂筛选模型，为 TKI 的筛选奠定基础。

1　材料和方法

1.1　*主要材料及试剂*　包含 EGFR cDNA 的质粒 pRK5 由中国科学院上海药物研究所沈旭教授惠赠，表达载体 pQE30、表达宿主菌 M15 为德国 Qiagen 公司产品。各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品，胶回收试剂盒为华舜公司产品，纯化树脂 Chelating Sepharose Fast Flow 为 Pharmacia Biotech 公司产品，酪氨酸激酶活性检测试剂盒购自加拿大 Chemicon 公司，TKI 阳性化合物 EI 188 购自 Calbiochem 公司。CM5 芯片和 BIAcore 3000 为瑞典 BIAcore AB 公司产品。

1.2　EGFR-RTK 蛋白的合成与偶联

1.2.1　*融合蛋白的表达、纯化*　采用原核表达系统表达 EGFR-RTK[8]，方法简述如下：设计引物，扩增 EGFR-RTK，PCR 产物与表达载体 pQE30 经酶切、纯化后连接，转化感受态宿主菌 M15，筛选并培养含有重组质粒的阳性克隆，诱导表达后破碎菌体，离心、洗涤、复性、树脂纯化。洗脱下的融合蛋白 SDS-PAGE 分析融合蛋白及其纯度，Bradford 方法测定蛋白含量。

1.2.2　*RTK 活性测定*　RTK 底物、ATP/$MgCl_2$ 及纯化的 EGFR-RTK 蛋白 37℃孵育 45 min。反应混合液加入酶标板 37℃孵育 30 min，洗涤后封闭 30 min。HRP 偶联的抗磷酸化酪氨酸抗体室温振荡孵育 1 h。加入 TMB 底物室温孵育 5～15 min，加入终止液后，立即用酶标仪读出 450 nm 处光密度值。

1.2.3　*EGFR-RTK 蛋白的偶联*　用 BiaCore 3000 控制软件中的 Application Wizard 程序将纯的 EGFR-RTK 蛋白偶联到 CM5 芯片上。EGFR 蛋白用 10 $\mu mol \cdot L^{-1}$，pH 4.02 NaAc 缓冲液稀释至终浓度为 0.35 mg/ml。活化试剂 EDC、NHS 1∶1 混合，以 5 μl/min 的流速进样 35 μl，然后以同样流速将蛋白偶联在 F_{C4} 通道上，目标蛋白的偶联量为 12 000 RU（共振单位，response unit）。封闭液 Ethanolamine-HCl 同样以 5 μl/min 的流速进样 35 μl，封闭蛋白表面。偶联结束后，系统用 running buffer 平衡 3～4 h，至基线平稳。

1.3　EGFR-RTKI 筛选模型的建立和验证

1.3.1　*表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂筛选模型的验证*　用梯度浓度的 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 EI 188 作为阳性化合物验证偶联的 EGFR 蛋白的结合活性，操作按照仪器说明进行。EI 188 的动力学分析采用 Biacore 软件中的 1∶1（Langmuir）结合拟合模型进行。

1.3.2　*表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂的筛选*　将待筛选的 31 个酪氨酸激酶抑制剂配制成梯度浓度，采用 BiaCore 3000 筛选，操作按照仪器说明进行。

1.3.3　*化合物生物学活性的测定*　选取有结合活性的化合物，应用酪氨酸激酶活性检测试剂盒检测其对酪氨酸激酶的作用，方法同上。计算抑制率和 IC_{50}。抑制率（%）＝（对照光密度－样品光密度）/（对照光密度－空白光密度）×100%。

2　结　果

2.1　*融合蛋白的鉴定*　融合蛋白经 SDS-PAGE 分析，得到相对分子质量约 37 000 的单一条带，与 RTK 的理论计算值相符，纯度为 94.7%（图 1）。

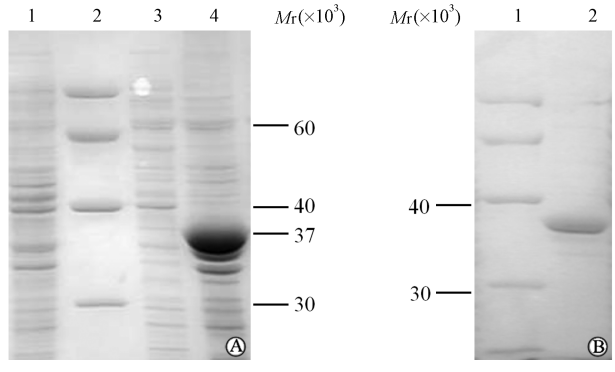

图 1　SDS-PAGE 分析 EGFR-RTK 的表达（A）、纯化（B）

Fig 1　Expression (A) and purification (B) of EGFR-RTK by SDS-PAGE analysis

A：Expression of EGFR-RTK by SDS-PAGE. 1：Bacterium extracts of RTK-M15 non-induced；2：Protein molecular mass marker；3：Supernatant of bacterium extracts of RTK-M15 induced；4：Sediment of bacterium extracts of RTK-M15 induced. B：Purification of EGFR-RTK by SDS-PAGE. 1：Protein molecular mass marker；2：Purified protein of EGFR-RTK (M_r 37 000)

2.2　EGFR-RTK 活性检测　根据蛋白量和 D_{450} 值绘制曲线(图 2),可见随着加入 EGFR-RTK 量的增加,酶促反应产物磷酸化酪氨酸的量也逐渐增加,两者具有线性关系,即表达的重组 EGFR-RTK 具有自身磷酸化和底物磷酸化的生物活性。

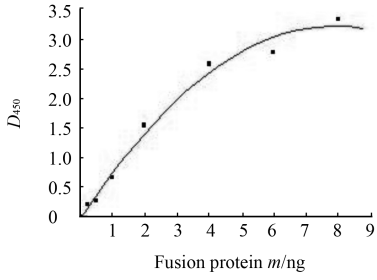

图 2　ELISA 法检测酪氨酸激酶活性

Fig 2　Tyrosine kinase activity assay by ELISA

2.3　EGFR-RTK 蛋白的偶联结果　EGFR-RTK 蛋白偶联的传感图(图 3)表明:以反应时间对 RU 连续作图得到 EGFR-RTK 蛋白偶联至 CM5 芯片的传感图,记录了整个反应过程包括结合和解离过程,偶联至芯片的蛋白共振信号约为 30 000 RU。

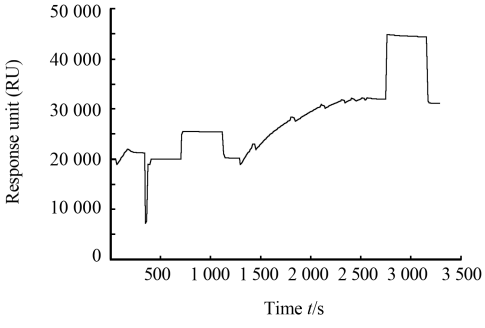

图 3　EGFR-RTK 蛋白的偶联传感图

Fig 3　Sensorgrams for immobilization of EGFR-RTK

2.4　表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂筛选模型的验证　阳性化合物 EI 188 与 EGFR 酪氨酸激酶结合的传感图(图4A)表明:结合属于缓慢模式,其动力学分析采用 1∶1 (Langmuir) 结合拟合模型。结合速率常数(k_{on}) 和解离速率常数(k_{off}) 采用公式(1)拟合,其中 R 代表共振单位 RU,C 是抑制剂浓度。结合的平衡常数 Kd 采用公式(2)计算。EI 188 与 EGFR 酪氨酸激酶结合的 Kd 值为 5.00×10^{-7} mol · L^{-1},表明 EGFR 蛋白具有结合活性。ELISA 法测定 EI 188 对酪氨酸激酶活性的抑制,IC_{50} 为 12.37 μmol · L^{-1}(图 4B)。

$$dR/dt=k_{on}\times C\times(R_{max}-R)-k_{off}\times R \quad (1)$$

$$Kd=k_{off}/k_{on} \quad (2)$$

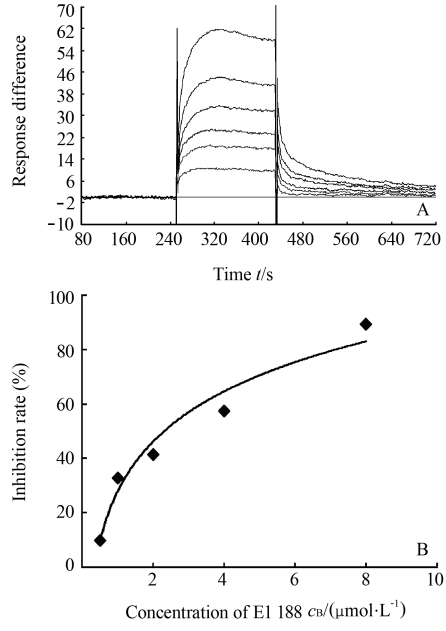

图 4　不同浓度的 EI 188 与 EGFR 酪氨酸激酶结合的传感图(A)及 EI 188 的 EGFR 酪氨酸激酶抑制活性(B)

Fig 4　Sensorgrams for different concentrations of EI 188 binding to EGFR-RTK(A) and inhibition of EGFR-RTK activity by EI 188 (B)

2.5　表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂的筛选　共筛选化合物 31 个,6 个化合物显示了与 EGFR 酪氨酸激酶的结合活性和抑制活性,筛选结果见表 1。

表 1　部分待筛选化合物的筛选结果

Tab 1　Screening results of some compounds

Compound	TKI-3	TKI-12	TKI-13	TKI-22	TKI-27	TKI-29
M_W	220.2	236.2	204.2	202.1	266.3	186.1
Kd c_B/(mol · L^{-1})	1.59×10^{-5}	1.67×10^{-5}	2.09×10^{-5}	1.27×10^{-5}	3.3×10^{-6}	2.65×10^{-5}
IC_{50} c_B/(μmol · L^{-1})	947.54	245.66	301.27	421.83	87.45	518.74

3　讨　论

本研究选择 SPR 技术建立高通量药物筛选模型具有以下优越性:仅需微克级样品、样品不需标记、无需纯化,能在数分钟内完成传统 ELISA 方法数小时的工作量,1 d 可筛选上百个待测化合物。利

用 SPR 技术还可以得到活性化合物与靶酶的亲和力常数 Kd 和动力学常数 Ka、Kd 等，克服了整体动物筛选提供药物作用机制信息少的缺点，使药物筛选有了更高的特异性。根据活性化合物亲和力的数据可以对活性化合物活性大小进行排序，可以快速去掉很多无活性的化合物，为药物的后续筛选省去了大量繁琐的工作[9]。

本研究选择的仪器 BIAcore 3000 可实时监测生物分子间的相互作用。因为全长 EGFR 蛋白相对分子质量较大，约为 170 000，限制了其在药物筛选中的应用。因此，本实验仅表达具有生物学活性的胞内 RTK 段。获得 EGFR 蛋白的传统方法是从细胞或组织中分离纯化或采用昆虫表达体系进行真核表达，但操作复杂、产量低。因此，本实验采用了原核表达系统来表达活性 EGFR-RTK。EGFR-RTK 在 *E. coli* 中绝大多数是以包涵体形式存在，可获得高表达、高纯度的重组蛋白质，避免细胞水解酶对蛋白质的破坏，但往往无法获得具有活性的蛋白而导致失败。本实验在包涵体增溶时加入还原剂 GSH 打开蛋白质中所有二硫键，避免含二硫键的杂蛋白影响包涵体的溶解。此外还加入了金属螯合剂 EDTA 螯合 Cu^{2+}、Fe^{3+} 等金属离子，以免与还原态的巯基发生氧化反应。复性采用了氧化型/还原型谷胱甘肽(GSH/GSSG)作为氧化-还原系统，通过促使不正确形成的二硫键的快速交换反应，提高了正确配对的二硫键的产率[10]。为提高蛋白的复性效率，复性液中变性蛋白浓度控制在 0.1～1 mg/ml，复性缓冲液的 pH 值 7.0～8.0，还应注意变性剂的起始浓度和去除速度、离子强度等[11]。

本研究采用酪氨酸激酶抑制剂 EI 188 作为阳性对照，BIAcore 检测证实其与重组 EGFR-RTK 有结合活性，进一步的 ELISA 方法测定其抑制激酶活性，IC_{50} 为 12.37 $\mu mol \cdot L^{-1}$，接近于该化合物的已知 IC_{50}(2～10 $\mu mol \cdot L^{-1}$)，证实已成功建立了筛选模型。但本研究建立的筛选模型也有一定的限制，不适于进行不可逆抑制剂的筛选。如果化合物与芯片上的激酶不可逆性结合，该芯片就会失活。因此需要定期采用阳性化合物验证芯片的活性。

综上所述，本研究采用自行表达的活性重组人 EGFR-RTK 作为药物靶点，应用表面等离子共振生物传感器并联合 ELISA 酶活性检测方法，建立了表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂的高通量筛选模型，大大提高了药物筛选的效率，为开发新型酪氨酸激酶抑制剂奠定了基础。

[参 考 文 献]

[1] Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment[J]. N Engl J Med, 2008, 358: 1160-1174.

[2] 李　林，华振浩，戴　兵，汤　兵，梅长林. 表皮生长因子及其受体在多囊肾病大鼠体液及肾组织中的表达及意义[J]. 第二军医大学学报，2009，30：14-18.
Li L, Hua Z H, Dai B, Tang B, Mei C L. Expression of EGF/EGFR in body fluids and kidney tissues of rats with polycystic kidney disease and its significance[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30: 14-18.

[3] Krause D S, Van Etten R A. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy[J]. N Engl J Med, 2005, 353: 172-187.

[4] Wakeling A E, Guy S P, Woodburn J R, Ashton S E, Curry B J, Barker A J, et al. ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy[J]. Cancer Res, 2002, 62: 5749-5754.

[5] McInnes C. Virtual screening strategies in drug discovery[J]. Curr Opin Chem Biol, 2007, 11: 494-502.

[6] Szabo A, Stolz L, Granzow R. Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA)[J]. Curr Opin Struct Biol, 1995, 5: 699-705.

[7] Visser N F, Heck A J. Surface plasmon resonance mass spectrometry in proteomics[J]. Expert Rev Proteomics, 2008, 5: 425-433.

[8] 李　林，赵海丹，李国伟，陈　静，沈　旭，梅长林. 表皮生长因子受体蛋白酪氨酸激酶的表达、纯化及活性测定[J]. 第二军医大学学报，2004，25：1353-1356.
Li L, Zhao H D, Li G W, Chen J, Shen X, Mei C L. Expression, purification and bioactivity determination of epidermal growth factor receptor protein tyro-sine kinase[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25: 1353-1356.

[9] Karlsson R. SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas[J]. J Mol Recognit, 2004, 17: 151-161.

[10] Clark E D. Protein refolding for industrial processes[J]. Curr Opin Biotechnol, 2001, 12: 202-207.

[11] Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies[J]. Protein Expr Purif, 2003, 28: 1-8.

[本文编辑]　贾泽军