



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104101714 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 15

(21) 申请号 201410335052. 4

(22) 申请日 2014. 07. 15

(71) 申请人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明南路 422 号

(72) 发明人 王洪睿 郭磊 王梅林 曾涛玲  
林琦

(74) 专利代理机构 厦门南强之路专利事务所  
(普通合伙) 35200

代理人 马应森

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/539 (2006. 01)

C12Q 1/02 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页 附图3页

### (54) 发明名称

以抑制 Smurf1 泛素化降解 RhoB 为靶点的抗肿瘤药物筛选方法

### (57) 摘要

以抑制 Smurf1 泛素化降解 RhoB 为靶点的抗肿瘤药物筛选方法, 涉及抗癌症药物筛选。将候选化合物与物质实体接触; 观察候选化合物对所述一种抑制 E3 泛素连接酶 Smurf1 泛素化降解其底物 RhoB 的检测结果的影响, 所述候选化合物若能够使细胞内的检测结果发生负向改变, 即表征 Smurf1 泛素化降解 RhoB 的能力减弱, 则表明该候选化合物是抗肿瘤的潜在药物。所述表明该候选化合物是抗肿瘤的潜在药物后, 可进一步选择能提高癌细胞中 RhoB 蛋白含量的化合物, 其具体方法: 将候选化合物与不同类型的肿瘤细胞接触; 观察候选化合物对不同类型的肿瘤细胞中 RhoB 蛋白含量的影响。实验周期短、检测过程快、灵敏度高、应用范围广。

1. 一种抑制 E3 泛素连接酶 Smurf1 泛素化降解其底物 RhoB 的检测方法,其特征在于选自但不限于细胞分子生物学检测方法或化学生物学检测方法,所述细胞分子生物学检测方法包括但不限于免疫共沉淀方法、免疫印迹、体内和体外泛素化及流式细胞技术检测细胞凋亡;所述化学生物学检测方法包括但不限于荧光滴定法、BIAcore 方法。

2. 一种抑制 E3 泛素连接酶 Smurf1 泛素化降解其底物 RhoB 在用于抑制 Smurf1 泛素化降解 RhoB 为靶点的抗肿瘤药物的筛选中应用。

3. 一种以抑制 Smurf1 泛素化降解 RhoB 为靶点的抗肿瘤药物筛选的方法,其特征在于包括以下步骤:

(a) 将候选化合物与物质实体接触;

(b) 观察候选化合物对所述一种抑制 E3 泛素连接酶 Smurf1 泛素化降解其底物 RhoB 的检测结果的影响,所述候选化合物若能够使细胞内的检测结果发生负向改变,即表征 Smurf1 泛素化降解 RhoB 的能力减弱,则表明该候选化合物是抗肿瘤的潜在药物。

4. 如权利要求 3 所述一种以抑制 Smurf1 泛素化降解 RhoB 为靶点的抗肿瘤药物筛选的方法,其特征在于在步骤 (a) 中,所述物质实体选自细胞或体外表达纯化的蛋白质。

5. 如权利要求 3 所述一种以抑制 Smurf1 泛素化降解 RhoB 为靶点的抗肿瘤药物筛选的方法,其特征在于在步骤 (b) 中,所述表明该候选化合物是抗肿瘤的潜在药物后,进一步选择能提高癌细胞中 RhoB 蛋白含量的化合物。

6. 如权利要求 5 所述一种以抑制 Smurf1 泛素化降解 RhoB 为靶点的抗肿瘤药物筛选的方法,其特征在于所述进一步选择能提高癌细胞中 RhoB 蛋白含量的化合物的具体方法为:

(1) 将候选化合物与不同类型的肿瘤细胞接触;

(2) 观察候选化合物对不同类型的肿瘤细胞中 RhoB 蛋白含量的影响。

7. 如权利要求 6 所述一种以抑制 Smurf1 泛素化降解 RhoB 为靶点的抗肿瘤药物筛选的方法,其特征在于在步骤 (2) 中,所述观察候选化合物对不同类型的肿瘤细胞中 RhoB 蛋白含量的影响后,对筛选出的且能够提高不同肿瘤细胞中 RhoB 含量的潜在化合物进行进一步的细胞凋亡实验和裸鼠成瘤模型实验,以选出有效抗肿瘤的药物。

## 以抑制 Smurf1 泛素化降解 RhoB 为靶点的抗肿瘤药物筛选方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及抗肿瘤药物筛选,尤其是涉及以抑制 Smurf1 泛素化降解 RhoB 为靶点的抗肿瘤药物筛选方法。

### 背景技术

[0002] 2010 年,癌症已超过心脑血管疾病成为第一大危害人类健康的疾病。2013 年世界卫生组织公布,全世界每年患癌症人数大幅度增长,至今每年检验出的新增癌症患者数已经超过 1400 万名。这与 2008 年的统计结果 1270 万人相比,人数明显增加。同期,癌症患者的死亡人数也有所增加,从过去的 760 万人增加到 820 万人。癌细胞区别正常细胞的一个重要标志就是逃逸细胞程序性死亡,即细胞凋亡(apoptosis)。细胞凋亡是由于内外环境变化或死亡信号触发,在相关基因调控下引起的细胞主动死亡过程,在生理状态下能消除机体内老化细胞及潜在性异常生长细胞,对于保持机体稳态发挥重要作用。凋亡调控失调可引起人体多种疾病,也是肿瘤发生的重要原因之一。近年研究也发现,放化疗等多种抗肿瘤治疗的部分机制与诱导凋亡有关。因此,探明凋亡的相关机制以及利用凋亡机制对肿瘤进行治疗具有重要意义。肿瘤细胞通常具有一定的凋亡抵抗机制,利用细胞凋亡机制针对肿瘤的治疗也就是在凋亡调节的各个水平上使促凋亡和抗凋亡的平衡发生改变,诱导肿瘤细胞凋亡。

[0003] 随着对肿瘤细胞凋亡机制的深入研究,药物诱导肿瘤细胞凋亡已成为目前肿瘤治疗的重要途径之一。在目前的抗癌药物中,无论是细胞周期特异性药物,还是细胞周期非特异性药物,对癌细胞的杀伤作用都服从一级动力学原理,即只能按比例而不能全部杀伤肿瘤细胞。目前,临床上用于治疗肿瘤的药物大都无法避免对机体产生副作用,因此寻求高效诱导细胞凋亡的药物,在杀伤残存的癌细胞的同时,又能避免对正常细胞的杀伤,具有重要的意义。

[0004] Smurf1(SMAD Ubiquitination Regulatory Factor1)是一种 E3 泛素连接酶,在 1999 年由 Zhu 等人以 Smad1 为诱饵利用酵母双杂交技术,在非洲爪蟾中发现并鉴定出来。它能选择性地结合受体调节蛋白 Smad 家族的成员,并使其泛素化降解,进而调节 TGF $\beta$  信号通路。近几年的研究发现,Smurf1 在肠癌、胰腺癌和前列腺癌中高表达,提示其可能作为一个原癌基因促进肿瘤的发生。有文献报道,Smurf1 可以泛素化降解 RhoA 促进肿瘤细胞的上皮-基质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程,还可以通过单泛素化 TRAF4 分子促进乳腺癌细胞的迁移。而且,Smurf1 还可以通过稳定细胞内 MDM2 的蛋白水平抑制 P53 蛋白的稳定性,从而抑制细胞凋亡。

[0005] RhoB 和其同家族的 RhoA 和 RhoC 在氨基酸序列有 86 % 的同源性,生物学功能也有重合:以前的观点认为,RhoA, RhoB, RhoC 协同调控细胞骨架运动(Etienne-Manneville, S., and Hall, A. 2002. Nature 420, 629-635)。但更多的证据显示, RhoB 具有许多独特于 RhoA 和 RhoC 的性质。最有意思的是,与 RhoA 和 RhoC 促进细胞增长

的作用不同, RhoB 作为一个抑癌基因, 抑制细胞增长。虽然 RhoB 敲除的小鼠没有明显的生理缺陷, 但是 RhoB<sup>-/-</sup> 的小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 在纤维蛋白原 (fibronectin) 上的运动能力明显减弱。过表达 RhoB 基因的细胞生长缓慢, 并易于发生凋亡。小鼠腹腔注射 RhoB<sup>-/-</sup> 细胞的成瘤效率明显高于 RhoB<sup>+/+</sup> 细胞。而且, 用 DMBA, 一种导致皮肤癌变的化学诱变剂处理野生型和 RhoB 敲除型小鼠的皮肤, 敲除小鼠的皮肤瘤发生率显著增高 (Liu, A. X., 2001. Mol Cell Biol 21, 6906-6912)。临床样本也显示, 随着肺癌、头颈癌和脑癌肿瘤恶性程度的增加, RhoB 蛋白水平呈逐渐下降的趋势, 提示其可能作为一个抑癌基因发挥抗肿瘤的功能 (Adnane, J., 2002. Clin Cancer Res 8, 2225-2232; Karlsson, R., 2009. Biochim Biophys Acta 1796, 91-98; Mazieres, J., 2004. Clin Cancer Res 10, 2742-2750)。

[0006] RhoB 这种抑制细胞增殖的功能可能和其在外界环境压力下协助细胞走向凋亡途径相关。经 E1A 和突变的 H-Ras 转化过的 RhoB<sup>-/-</sup>MEF 细胞在  $\gamma$  射线, 拓扑异构酶抑制剂阿霉素 (Doxorubicin, DOX) 等 DNA 损伤试剂处理后, 其凋亡程度明显低于野生型对照组 (Liu, A. X., 2001. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 6192-6197)。而呼吸链阻断剂叠氮化钠 (NaN<sub>3</sub>) 引起的细胞凋亡似乎和 RhoB 无关, 说明 RhoB 独特应答由 DNA 损伤 (DNA damage) 引起的凋亡信号。同样, 干涉内源的 RhoB 后, 人胃癌细胞 NUGC-3 对抗癌药物表现出不敏感性, 凋亡比例明显下降 (Kim, B. K., 2011. Carcinogenesis 32, 254-261)。因此, RhoB 被认为是一个良好的药物靶点。

## 发明内容

[0007] 本发明的第一目的在于提供一种抑制 E3 泛素连接酶 Smurf1 泛素化降解其底物 RhoB 的检测方法。

[0008] 本发明的第二目的在于提供一种抑制 E3 泛素连接酶 Smurf1 泛素化降解其底物 RhoB 的用途。

[0009] 本发明的第三目的在于提供一种以抑制 Smurf1 泛素化降解 RhoB 为靶点的抗肿瘤药物筛选的方法。

[0010] 所述一种抑制 E3 泛素连接酶 Smurf1 泛素化降解其底物 RhoB 的检测方法, 选自但不限于细胞分子生物学检测方法或化学生物学检测方法, 所述细胞分子生物学检测方法包括但不限于免疫共沉淀方法、免疫印迹、体内和体外泛素化及流式细胞技术检测细胞凋亡等; 所述化学生物学检测方法包括但不限于荧光滴定法、BIAcore 方法等。

[0011] 所述一种抑制 E3 泛素连接酶 Smurf1 泛素化降解其底物 RhoB 可用于抑制 Smurf1 泛素化降解 RhoB 为靶点的抗肿瘤药物的筛选。

[0012] 所述一种以抑制 Smurf1 泛素化降解 RhoB 为靶点的抗肿瘤药物筛选的方法, 包括以下步骤:

[0013] (a) 将候选化合物与物质实体接触;

[0014] 在步骤 (a) 中, 所述物质实体可选自细胞或体外表达纯化的蛋白质等。

[0015] (b) 观察候选化合物对所述一种抑制 E3 泛素连接酶 Smurf1 泛素化降解其底物 RhoB 的检测结果的影响, 所述候选化合物若能够使细胞内的检测结果发生负向改变, 即表征 Smurf1 泛素化降解 RhoB 的能力减弱, 则表明该候选化合物是抗肿瘤的潜在药物。

[0016] 在步骤 (b) 中, 所述表明该候选化合物是抗肿瘤的潜在药物后, 可进一步选择能

提高癌细胞中 RhoB 蛋白含量的化合物；所述进一步选择能提高癌细胞中 RhoB 蛋白含量的化合物的具体方法可为：

[0017] (1) 将候选化合物与不同类型的肿瘤细胞接触；

[0018] (2) 观察候选化合物对不同类型的肿瘤细胞中 RhoB 蛋白含量的影响。

[0019] 在步骤 (2) 中，所述观察候选化合物对不同类型的肿瘤细胞中 RhoB 蛋白含量的影响后，可对筛选出的且能够提高不同肿瘤细胞中 RhoB 含量的潜在化合物进行进一步的细胞凋亡实验和裸鼠成瘤模型实验，以选出有效抗肿瘤的药品（化合物）。

[0020] 本发明的主要优点在于：

[0021] 1、首次提供了一种以抑制 Smurf1 泛素化降解 RhoB 的抗肿瘤药物靶点，提供了一种以抑制 Smurf1 泛素化降解 RhoB 为靶点的抗肿瘤药物筛选方法，所述方法包含蛋白-蛋白相互作用的检测，RhoB 泛素化水平的检测，细胞凋亡检测以及裸鼠成瘤实验模型。

[0022] 2、本发明的方法包含了三个层层递进的筛选方法，靶点功能明确，作用效果直观，系统稳定，结果可靠，具有实验周期短、检测过程快、灵敏度高、应用范围广等特点，为高通量的抗肿瘤药物的筛选提供了新的方法，可应用于药品开发前沿，及建立化合物规模筛选的技术平台。

## 附图说明

[0023] 图 1 为过表达 E3 泛素连接酶 Smurf1 影响 HeLa 细胞内源 RhoB 蛋白水平。实验结果表明，Smurf1 野生型 (Smurf1WT) 可以有效降低 RhoB 的蛋白水平，而其 E3 连接酶失活体 (Smurf1CA) 却对 RhoB 的蛋白稳定性无影响。Flag-Smurf1WT 和 Flag-Smurf1CA 质粒转染 HeLa 细胞，24h 后常规收集细胞，然后进行免疫印迹实验 (Western blotting) 检测细胞裂解液中 RhoB 的蛋白水平。

[0024] 图 2 为干涉细胞内源 E3 泛素连接酶 Smurf1 后对 RhoB 蛋白水平的影响。实验结果表明，用两种特异干涉细胞内 Smurf1 的干涉 RNA (sh-Smurf1-1, sh-Smurf1-2) 可以提高 RhoB 蛋白的稳定性。分别用 Smurf1 的干涉 RNA (sh-Smurf1-1, sh-Smurf1-2) 转染 HeLa 细胞，48h 后用免疫印迹实验 (Western blotting) 检测 RhoB 的蛋白水平。

[0025] 图 3 为 Smurf1 和 RhoB 的体外 GST-Pulldown 实验。实验结果表明，大肠杆菌表达的 GST-Smurf1 和 RhoB 可以直接结合。利用大肠杆菌 BL21 表达的 GST-Smurf1 和 RhoB 蛋白可以相互结合。

[0026] 图 4 为细胞内 Smurf1 对 RhoB 泛素化水平的影响。实验结果表明，Smurf1 可以增强 RhoB 的泛素化水平。Myc-Smurf1WT, Myc-Smurf1CA, Flag-RhoB 及 HA-Ub 按图所示共同转染 293T 细胞 20h 后用蛋白酶体抑制剂 MG-132 处理细胞 (5  $\mu$  M, 18h)。然后常规收集细胞，并用 Flag 抗体进行免疫沉淀实验 (Co-immunoprecipitation assay)，然后用免疫印迹实验 (Western blotting) 检测免疫沉淀复合物中 Flag-RhoB 泛素化水平。

[0027] 图 5 为细胞内 Smurf1 的蛋白水平对 RhoB 泛素化水平的影响。实验结果表明，抑制细胞内 Smurf1 的蛋白表达可以降低 RhoB 的泛素化水平。Smurf1 的干涉 RNA (sh-Smurf1-1, sh-Smurf1-2)，Flag-RhoB 及 HA-Ub 按图所示共同转染 293T 细胞 48h 后用蛋白酶体抑制剂 MG-132 处理细胞 (5  $\mu$  M, 18h)。然后常规收集细胞，并用 Flag 抗体进行免疫沉淀实验 (Co-immunoprecipitation assay)，然后用免疫印迹实验 (Western blotting) 检测免疫沉

淀复合物中 Flag-RhoB 泛素化水平。

[0028] 图 6 为 Smurf1 和 RhoB 的体外泛素化实验。实验结果表明,大肠杆菌表达的 GST-Smurf1 可以泛素化 RhoB。利用大肠杆菌 BL21 表达的 GST-Smurf1 可以利用泛素 (Ub) 对 RhoB 蛋白进行泛素化。

[0029] 图 7 为化合物 XM01 对 HeLa 细胞中 RhoB 蛋白稳定性的影响。实验结果表明,XM01 可以有效提高 HeLa 细胞内 RhoB 蛋白的稳定性。XM01 按不同浓度处理细胞 24h 后,用免疫印迹实验 (Western blotting) 检测细胞裂解液中 RhoB 的蛋白含量。

[0030] 图 8 为免疫印迹方法检测化合物 XM01 对 Smurf1 泛素化降解 RhoB 能力的影响。实验结果表明,XM01 可以有效抑制 Smurf1 泛素化降解 RhoB。Flag-Smurf1WT、Flag-Smurf1CA 和 Flag-RhoB 质粒共转染 293T 细胞,24h 后用不同浓度的化合物 XM01 处理细胞,然后常规收集细胞进行免疫印迹实验 (Western blotting) 检测细胞裂解液中 RhoB 的蛋白水平。

[0031] 图 9 为体外泛素化方法检测化合物 XM01 对 Smurf1 泛素化降解 RhoB 能力的影响。实验结果表明,XM01 可以在体外系统中有效抑制 Smurf1 泛素化降解 RhoB。

[0032] 图 10 为流式细胞技术检测细胞凋亡。实验结果表明,随着化合物 XM01 浓度的升高,HeLa 细胞的凋亡程度也随之升高,说明 XM01 可以通过引起细胞凋亡抑制肿瘤生长。

[0033] 图 11 为裸鼠成瘤能力的检测。将 HeLa 细胞以  $5 \times 10^6$  的密度接种于裸鼠后腿腿根的侧皮下,四周后用化合物 XM01 处理右侧皮下肿瘤,对照溶剂 DMSO 处理左侧皮下肿瘤,一周后再观察肿瘤大小。实验结果表明,化合物 XM01 显著抑制了肿瘤细胞在裸鼠体内的生长。

## 具体实施方式

[0034] 本发明的结果表明,E3 泛素连接酶 Smurf1 通过泛素化降解 RhoB,从而调控细胞在 DNA 损伤条件下发生的凋亡。在正常条件下,Smurf1 泛素化降解 RhoB 将其蛋白保持在较低的水平。而在 DNA 损伤的条件下,Smurf1 自身泛素化降解增强,从而导致 RhoB 的蛋白稳定性增强,促进细胞发生凋亡。

[0035] 基于以上结果,建立了抑制 Smurf1 泛素化降解 RhoB 的检测系统,并能够从候选化合物中筛选出能够抑制 Smurf1 泛素化降解 RhoB 的化合物,从而为抗肿瘤新药开发提供一个有利的技术平台。重要的是,针对这一靶点的药物,将可能解决现有的抗肿瘤药物靶点特异性不强、副作用强及药物毒性等问题,从而为治疗癌症提供更好的治疗手段。

[0036] 抑制 E3 泛素连接酶活性的靶点

[0037] 本发明提供了一种 E3 泛素连接酶降解其底物的靶点,即 Smurf1 降解 RhoB 靶点。实验表明,通过常规手段(但不限于)可检测该底物的泛素化强度,并可观察候选化合物对该泛素化强度的影响,用于筛选抗肿瘤的化合物。

[0038] 所述的检测 Smurf1 降解 RhoB 的手段包括但不限于:免疫共沉淀、免疫印迹、体内及体外泛素化实验。只要适用于检测泛素化强度的其它方法也被包含在本发明中。作为本发明的优选方式,所述的检测方法是体内-体外泛素化及流式细胞技术。该方法的优点是快速准确,结果更可靠。

[0039] 筛选方法

[0040] 所述的筛选方法是抑制 Smurf1 泛素化降解 RhoB 的检测方法,可以是细胞水平上

的检测方法,也可以是对体外表达纯化的蛋白质进行检测的方法。通过在细胞培养物中加入候选化合物,或者使体外纯化表达的蛋白质与候选化合物接触产生作用,观察候选化合物对所述 Smurf1 泛素化降解 RhoB 的影响,从而筛选潜在的抗肿瘤化合物。

[0041] 因此,本发明还提供一种以抑制 Smurf1 泛素化降解 RhoB 为靶点的筛选抗肿瘤的潜在药物(化和物)的方法,所述方法包括步骤:

[0042] (a) 将候选化合物与所述的相互作用检测方法中的物质实体(如细胞,体外表达纯化的蛋白质)接触;和

[0043] (b) 观察候选化合物对所述的相互作用检测方法中的检测结果的影响;

[0044] 其中,如果候选化合物能够使细胞内的检测结果发生负向改变,即表征 Smurf1 泛素化降解 RhoB 能力减弱,则表明该化合物是抗肿瘤的潜在药物(化合物)。

[0045] 作为本发明的优选方式,将分别携带所述的两种蛋白的编码序列的重组载体瞬时共同转染哺乳动物细胞,通过免疫印迹方法检测所述两种蛋白间的相互作用,筛选潜在的抗肿瘤药物。为了实现上述目的,采用以下技术:Smurf1 表达载体及 RhoB 表达载体的构建;Smurf1 表达载体、RhoB 表达载体瞬时共同转染系统的构建;免疫印迹方法检测 Smurf1 对 RhoB 泛素化能力。

[0046] 通过上述方法初步筛选出的化合物可构成一个筛选库,以便于最终可以从中选择到对肿瘤生长有抑制作用的药物。

[0047] 在另一优选例中,所述的方法还包括选择能提高肿瘤细胞内 RhoB 蛋白水平的化合物。所述方法包括步骤:

[0048] (a) 将候选化合物与肿瘤细胞接触;和

[0049] (b) 观察候选化合物对肿瘤细胞内 RhoB 蛋白水平的影响。

[0050] 通过上述方法,可以对初步筛选到的化合物进行进一步的筛选或验证。

[0051] 在另一优选例中,所述的方法还包括步骤:对如上获得的潜在化合物进行进一步的流式细胞凋亡检测及裸鼠成瘤实验,以选出有效抗肿瘤的化合物。

[0052] 通过上述方法,可从上两次筛选出的潜在化合物中选择到抗肿瘤药物(化合物)。

[0053] 以下结合具体实施例,对本发明作进一步说明。应理解,以下实施例仅用于说明本发明而非用于限定本发明的范围。任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明中。所述的优选实施方法与材料仅做示范之用。

[0054] 实施例 1

[0055] 采用免疫印迹分析(Western blotting)方法检测 Smurf1 对 RhoB 蛋白稳定性的影响。

[0056] 试验方法如下:

[0057] 1) 细胞转染:

[0058] 将细胞接种于直径 12 孔培养板,24h 后转染,转染前细胞换新鲜的培养液。转染步骤为:取 1.5mL 离心管,依次加入水 180  $\mu$ L,相应质粒,2.5M  $\text{CaCl}_2$  20  $\mu$ L, HBS200  $\mu$ L,轻柔混匀后,于室温静置 15 ~ 30min,随后缓慢滴加到培养液中,轻轻晃动培养盘,使分布均匀。

[0059] 转染 12h 后,将细胞培养液换为新鲜的 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium),继续培养 12h 后,常规收集细胞以用于后续实验。

[0060] 溶液配方:

[0061] HBS :280mM NaCl, 10mM KCl, 1.5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12mM Glucose, 50mM HEPES, pH7.05。

[0062] 2) Western-blot 检测 :

[0063] a. 蛋白电泳 :

[0064] 取 20 ~ 40  $\mu$ g 蛋白样品, 加等体积 4 $\times$ SDS 样品缓冲液, 95 $^{\circ}$ C 煮沸 5min, 于不连续 SDS-PAGE 胶中电泳, 电压 100V, 待样品进入分离胶后将电压调为 150V。

[0065] b. 电转移 :

[0066] 电转液于 4 $^{\circ}$ C 预冷, 切好胶后将同样大小的甲醇预处理的 PVDF 膜以及滤纸浸于电转液中 ;PVDF 膜贴于胶后, 两面覆盖滤纸, 赶尽气泡, 按膜朝正极的顺序装于电转槽中, 于 -20 $^{\circ}$ C 电转 (100V, 60min)。

[0067] c. 抗原抗体反应 :

[0068] ①封闭 :封闭液室温封闭 1h ;

[0069] ②一抗反应 :封闭后膜与相应一抗于室温孵育 1 ~ 3h ;

[0070] ③二抗反应 :TBST 洗 3 次, 每次 5min, 之后加入相应的二抗, 于室温孵育 1 ~ 3h。

[0071] d. ECL 检测 :

[0072] TBST 洗 3 次, 每次 10min。ECL 的 A 液和 B 液以 1 : 1 (V/V) 混和, 滴加于膜表面, 孵育 1min 后曝光。

[0073] 试验结果如下 :

[0074] 如图 1 及图 2 所示, ;Smurf1 野生型 (Smurf1WT) 可以有效降低 RhoB 的蛋白水平, 而其 E3 连接酶失活体 (Smurf1CA) 却对 RhoB 的蛋白稳定性无影响。同样, 用两种特异干涉细胞内 Smurf1 的干涉 RNA (sh-Smurf1-1, sh-Smurf1-2) 可以提高 RhoB 蛋白的稳定性。

[0075] 试验结果表明, Smurf1 可以调经细胞内 RhoB 蛋白的稳定性。

[0076] 实施例 2

[0077] 用 GST 融合蛋白沉降技术 (GST-Pulldown) 检测 Smurf1 和 RhoB 的结合。

[0078] 试验方法如下 :

[0079] 1) 蛋白的体外表达及纯化

[0080] 首先将目的 DNA 片段克隆到合适的细菌表达载体中, 正确的质粒转化 E. coli BL-21 或 DH-5  $\alpha$  细胞, 在 LB/ 氨苄青霉素平板上选择转化子, 接种到适量的 LB/amp 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇动培养过夜。第二天以此为种子, 以 1 : 100 的比例接种到大体积的 LB/amp 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇动培养到 OD<sub>600</sub> 大约为 0.6, 加入 IPTG 到终浓度为 1mmol/L 以诱导融合蛋白的表达, 20 $^{\circ}$ C 低温诱导以减少包涵体的形成, 继续培养 6h 以上。对于不同的载体或不同的蛋白, 最佳的诱导前细菌浓度, 诱导所需的 IPTG 浓度和诱导的温度、诱导的时间均不同。

[0081] 蛋白表达完成后, 离心收集菌体, 用适量预冷的裂解缓冲液 (lysis buffer) 重悬菌体, 用超声破碎仪破碎菌体, 超声前加入蛋白酶抑制剂 PMSF 到终浓度为 1mmol/L。超声破碎的功率及时间根据不同的细菌浓度和不同大小的蛋白而不同。破碎后的菌体以 12000r/min 的转速, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 上清转移到新的管子中。加入预先洗好的 GST beads, 在 4 $^{\circ}$ C 的旋转混合仪上混合 3h 以上。亲和有蛋白的 GST beads 用预冷的裂解缓冲液洗几次后, 得到相对较纯的融合蛋白。

[0082] 2) 蛋白质体外 GST pull down 实验

[0083] 利用谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST) 基因融合载体体外表达纯化出 GST、GST-RhoB 和 GST-Smurf1CA 融合蛋白,其中, GST-RhoB 蛋白用 TEV 酶将 GST 标签去除,得到 RhoB 蛋白。按图 2 所示加入相应量的纯化蛋白。旋转摇床 4℃ 孵育 1h,加入 20  $\mu$  L 4× loading buffer 终止反应,加热至 95℃,5min。样品进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析。

[0084] 试验结果如下:

[0085] 如图 3 所示, GST-Smurf1 蛋白可以在体外直接和 RhoB 蛋白相互结合。

[0086] 实施例 3

[0087] 通过细胞内泛素化实验检测 Smurf1 是否影响 RhoB 的泛素化水平。

[0088] 试验方法如下:

[0089] 以  $1.5 \sim 2 \times 10^5$  个 /mL 的密度接种细胞于 10cm 细胞培养盘中,待细胞密度达到 40% 至 50% 时,用磷酸钙法转染相应组合的质粒。转染 24h 后换液同时加药,10  $\mu$  M MG-132 处理细胞,加药的目的是抑制已经被不同程度泛素化的底物蛋白通过溶酶体途径降解,转染后 36h 收集细胞,用含有 PMSF 和 NEM 的 TNTE (0.5%) buffer 进行裂解。从得到的 1mL 细胞裂解液中,取 45  $\mu$  L 作为 total lysate 加入 15  $\mu$  L 4× loading buffer 用于 Western blot 分析,剩余 955  $\mu$  L 用于第一次 IP。第一次 IP 时细胞裂解液中加入 1  $\mu$  L Flag 一抗,旋转摇床 4℃ 孵育 2h,加入 30  $\mu$  L 预先封闭好的 protein A/G,旋转摇床 4℃ 孵育 2h。用 TNTE (0.1%) buffer 洗涤 3 次,加入 60  $\mu$  L 的 1% SDS,加热至 95℃,5min,使被 IP 下来的各种处于结合状态的蛋白质相互分离。取上清,用 TNTE (0.1%) buffer 稀释至 500  $\mu$  L 的体积,进行第二次 IP,步骤同上。制备好的样品用于 Western blot 分析,其中用 HA 抗体检测检测底物蛋白的泛素化情况。

[0090] 试验结果如下:

[0091] 如图 4 及图 5 所示, Smurf1 野生型 (Smurf1WT) 可以有效提高 RhoB 泛素化水平,而其 E3 连接酶失活体 (Smurf1CA) 却对 RhoB 的泛素化水平无影响。而干涉细胞内 Smurf1 后 RhoB 的泛素化水平明显降低。

[0092] 实施例 4

[0093] 采用体外泛素化实验检测 Smurf1 是否影响 RhoB 的泛素化水平。

[0094] 试验方法如下:

[0095] 体外表达纯化出泛素活化酶 E1,泛素结合酶 E2,泛素连接酶 E3, RhoB 蛋白,泛素 Ubiquitin。根据图 6 加入相应量的纯化蛋白。室温孵育 15min,使底物蛋白 RhoB 和 E3 泛素连接酶充分结合,然后加入 E1 启动泛素化反应,室温孵育 45min,等体积的 2% SDS 加热至 95℃,5min。取上清用 TNTE 0.5 扩大体积,加 Flag 抗体和 protein A/G 4℃ 孵育过夜,样品进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析。

[0096] 试验结果表明,如图 6 所示, Smurf1 野生型 (Smurf1WT) 而非其 E3 连接酶失活体 (Smurf1CA) 可以有效的提高 RhoB 泛素化水平。

[0097] 实施例 5

[0098] 化合物 XM01 对 HeLa 细胞中 RhoB 蛋白稳定性的影响。

[0099] 实验方法如下:

[0100] 利用实施例 1 采用的细胞培养及免疫印迹方法用不同浓度的化合物 XM01 处理 HeLa 细胞 24h,按常规收集细胞,然后进行免疫印迹实验 (Western blotting) 检测细胞裂

解液中 RhoB 的蛋白水平。

[0101] 实验结果表明,如图 7 所示,随着化合物 XM01 浓度的升高,HeLa 细胞中 RhoB 蛋白的稳定也逐步提高,表明 XM01 是潜在的抑制 Smurf1 泛素化降解 RhoB 的化合物。

[0102] 实施例 6

[0103] 免疫印迹方法检测化合物 XM01 对 Smurf1 泛素化降解 RhoB 能力的影响。

[0104] 利用实施例 1 采用的细胞培养、细胞转染及免疫印迹方法,用不同浓度的化合物 XM01 处理转染后的 293T 细胞,24h 后按常规收集细胞,然后进行免疫印迹实验 (Western blotting) 检测细胞裂解液中 RhoB 的蛋白水平。

[0105] 实验结果表明,如图 8 所示,随着化合物 XM01 浓度的升高,293T 细胞中 Flag-RhoB 蛋白的稳定也逐步提高,表明 XM01 是潜在的抑制 Smurf1 泛素化降解 RhoB 的化合物。

[0106] 实施例 7

[0107] 体外泛素化方法检测化合物 XM01 对 Smurf1 泛素化降解 RhoB 能力的影响。利用实施例 4 采用的体外泛素化方法检测用不同浓度的化合物 XM01 在体外系统对 Smurf1 对 RhoB 泛素化能力的影响。根据图 9 加入相应量的纯化蛋白及不同浓度的 XM01,反应后进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析。

[0108] 实验结果表明,如图 9 所示,随着化合物 XM01 浓度的升高,Smurf1 在体外系统对 RhoB 泛素化能力逐渐减弱,表明 XM01 抑制 Smurf1 泛素化降解 RhoB。

[0109] 实施例 8

[0110] 流式实验及裸鼠成瘤实验检测化合物 XM01 对肿瘤生长的抑制效果。

[0111] 利用实施例 1 采用的细胞培养方法检测用不同浓度的化合物 XM01 对 HeLa 细胞凋亡程度的影响。根据图 10 加入不同浓度 (对照,  $10\ \mu\text{M}$ ,  $20\ \mu\text{M}$ ) 的化合物 XM01, 24h 后收集细胞进行流式细胞仪检测。

[0112] 实验结果表明,如图 10 所示,随着化合物 XM01 浓度的升高,HeLa 细胞的凋亡程度也随之升高,表明 XM01 可以通过引起细胞凋亡抑制肿瘤生长。在图 10 中,图 (a) 为对照组,凋亡比率为 2.7%,图 (b) 为 XM01  $10\ \mu\text{M}$ ,凋亡比率为 37.6%,图 (c) 为 XM01  $20\ \mu\text{M}$ ,凋亡比率为 64.7%。

[0113] 利用实施例 1 采用的细胞培养方法检测化合物 XM01 对裸鼠成瘤能力的影响。将 HeLa 细胞以  $5 \times 10^6$  的密度接种于裸鼠后腿腿根的侧皮下,四周后用化合物 XM01 处理右侧皮下肿瘤,对照溶剂 DMSO 处理左侧皮下肿瘤,一周后再观察肿瘤大小。

[0114] 实验结果表明,如图 11 所示的两只裸鼠,化合物 XM01 显著抑制了肿瘤细胞在裸鼠体内的生长。

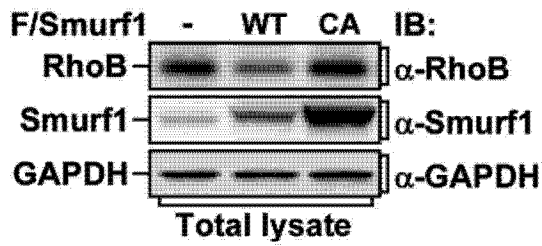


图 1

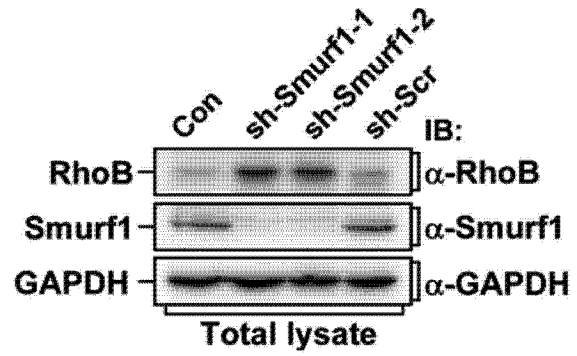


图 2

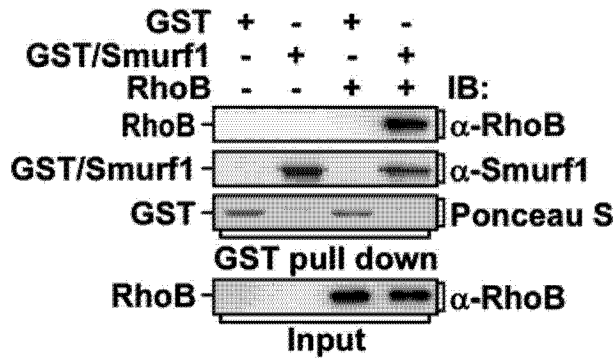


图 3

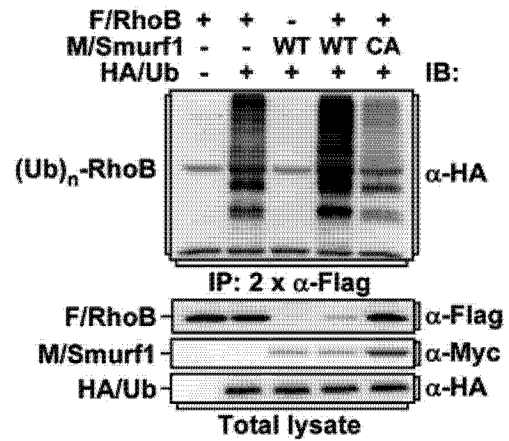


图 4

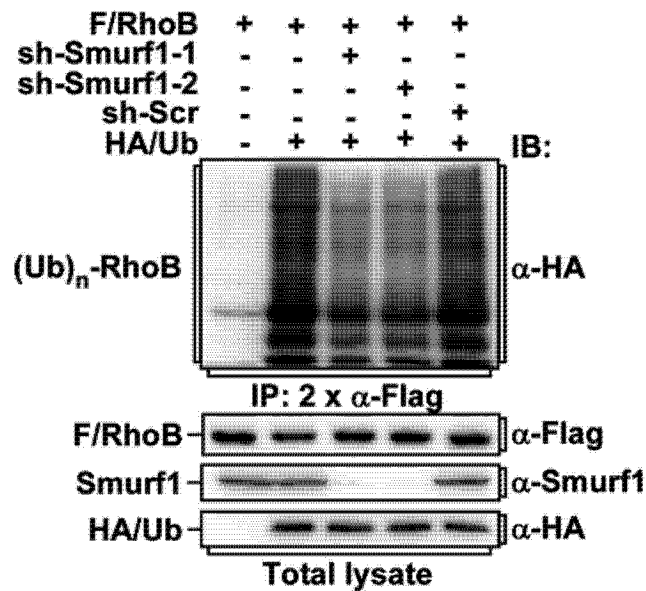


图 5

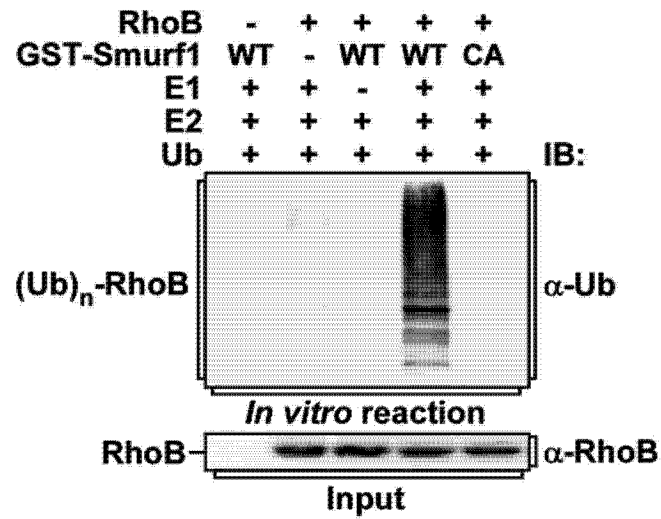


图 6

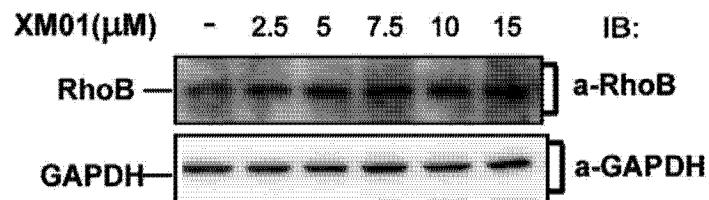


图 7

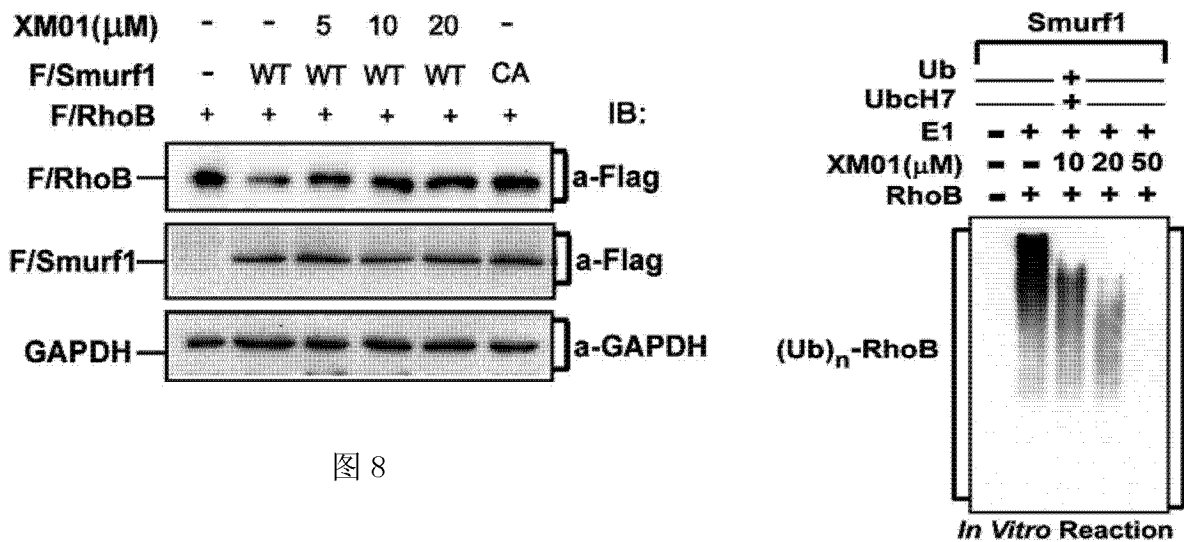


图 8

图 9

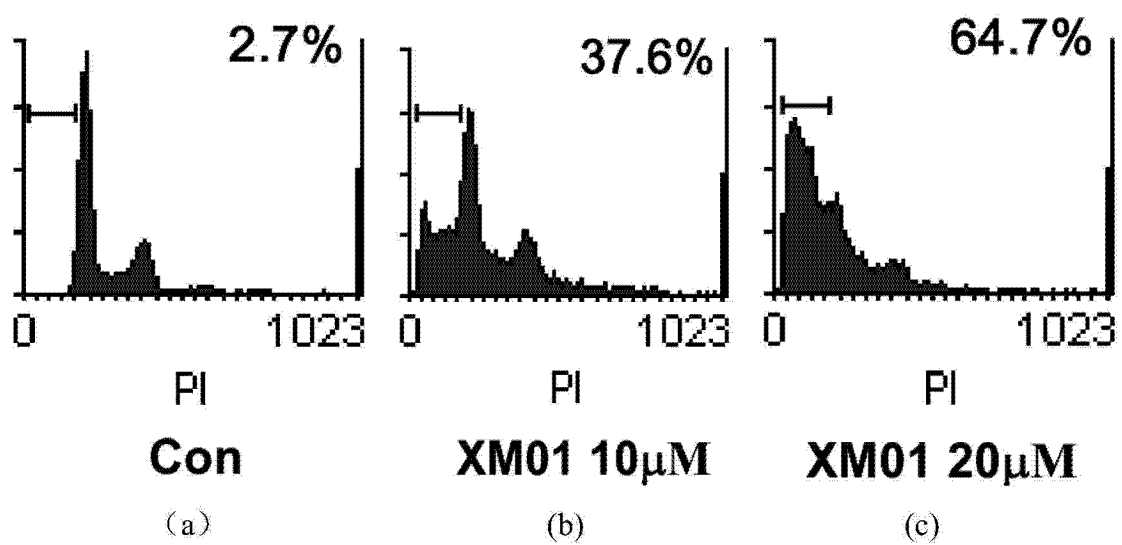


图 10

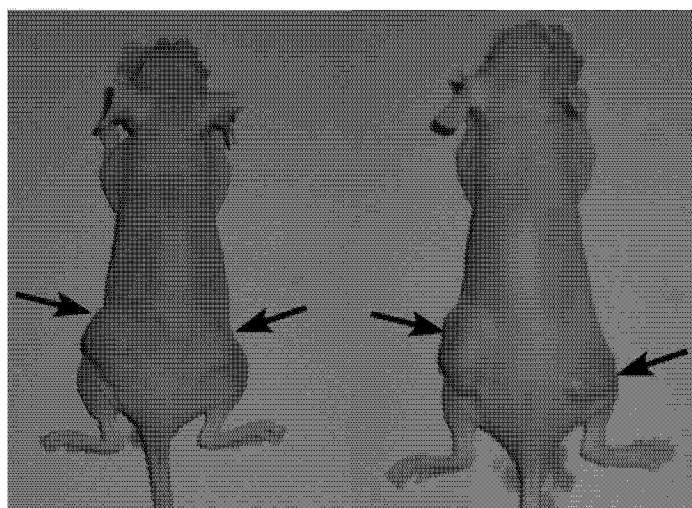


图 11

|                |                                                |         |            |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 以抑制Smurf1泛素化降解RhoB为靶点的抗肿瘤药物筛选方法                |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN104101714A</a>                   | 公开(公告)日 | 2014-10-15 |
| 申请号            | CN201410335052.4                               | 申请日     | 2014-07-15 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 厦门大学                                           |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 厦门大学                                           |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 厦门大学                                           |         |            |
| [标]发明人         | 王洪睿<br>郭磊<br>王梅林<br>曾涛玲<br>林琦                  |         |            |
| 发明人            | 王洪睿<br>郭磊<br>王梅林<br>曾涛玲<br>林琦                  |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/68 G01N33/539 C12Q1/02                  |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/573 G01N33/6863 G01N2500/00             |         |            |
| 其他公开文献         | CN104101714B                                   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

以抑制Smurf1泛素化降解RhoB为靶点的抗肿瘤药物筛选方法，涉及抗癌症药物筛选。将候选化合物与物质实体接触；观察候选化合物对所述一种抑制E3泛素连接酶Smurf1泛素化降解其底物RhoB的检测结果的影响，所述候选化合物若能够使细胞内的检测结果发生负向改变，即表征Smurf1泛素化降解RhoB的能力减弱，则表明该候选化合物是抗肿瘤的潜在药物。所述表明该候选化合物是抗肿瘤的潜在药物后，可进一步选择能提高癌细胞中RhoB蛋白含量的化合物，其具体方法：将候选化合物与不同类型的肿瘤细胞接触；观察候选化合物对不同类型的肿瘤细胞中RhoB蛋白含量的影响。实验周期短、检测过程快、灵敏度高、应用范围广。

