

基于极化荧光方法的人 LOX-1配体高通量筛选

张天泰, 黄镇太, 戴 瑛, 刘艾林, 朱 平, 杜冠华*

(中国医学科学院, 中国协和医科大学 药物研究所, 北京 100050)

摘要: 目的 建立以极化荧光为检测方法的高通量筛选技术, 通过大规模筛选发现氧化型低密度脂蛋白受体-1 (LOX-1)的天然配体。方法 密度梯度超速离心获得正常人血中低密度脂蛋白 (LDL), 然后用 CuSO_4 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 修饰为氧化型低密度脂蛋白 (oxLDL)。FITC标记 hLOX-1, 以受体 (LOX-1) 和配体 (oxLDL) 的相互作用为基础建立筛选模型, 用极化荧光检测方法, 在激发光 485 nm, 发射光 525 nm, 对 3 200 个样品进行高通量筛选, 并用 Z' 因子值评价实验。结果 Z' 因子值为 0.75, 根据建立的基于极化荧光的高通量筛选实验方法, 发现 3 个化合物与 hLOX-1 有较高的结合活性, IC_{50} 值小于 $31.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论 极化荧光检测方法适合于高通量筛选技术, 具有较高的稳定性、灵敏性和可重复性。

关键词: 极化荧光; 高通量筛选; 氧化型低密度脂蛋白受体-1; 动脉粥样硬化

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2005)09 - 0792 - 04

Identification of ligands for human LOX-1 through fluorescence polarization-based high throughput screening

ZHANG Tian-tai, HUANG Zhen-tai, DAI Ying, LIU Ai-lin, ZHU Ping, DU Guan-hua*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: **Aim** To develop a fluorescence polarization-based high throughput screening and identify ligands for human Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (hLOX-1). **Methods** Sequential ultracentrifugation at 4°C from normal lipemic fasting volunteers to obtain low density lipoprotein (LDL), which was modified by CuSO_4 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) at 37°C for 24 h. The assay was based on the interaction between receptor and ligand, and hLOX-1 was labeled by FITC and bound to its specific ligand, oxLDL. Different reaction time and DMSO concentration were optimized to determine the stability and tolerance of fluorescence polarization (FP) assay. 3 200 compounds were screened in black 384-well microplate by FP-based competitive displacement assay, at excitation filter of 485 nm and emission filter of 530 nm. Z' was used to assess the assay quality. **Results** The FP-based HTS was formatted in a 384-well microplate with a Z' factor of 0.75, and three active compounds for hLOX-1 were identified with IC_{50} below $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ from total 3 200 compounds. **Conclusion** The results indicated that the fluorescence polarization assay is stable, sensitive, reproducible and well suited for high throughput screening efforts.

Key words: fluorescence polarization; high throughput screening; LOX-1; atherosclerosis

最近研究发现一种新的主要表达于内皮细胞的膜受体, 凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体-1

(lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1), 在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的形成过程中发挥了重要的作用^[1], oxLDL 被内化而沉积在内皮下就是通过 LOX-1 而介导。发现和寻找 LOX-1 拮抗剂, 保护血管内皮和阻止 oxLDL 内化可能对 AS 的发生和发展具有重要的意义。目前, 高通量筛选 (high throughput screening, HTS) 是发现新

收稿日期: 2004-10-09.

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2002AA27343B); 国家自然科学基金资助项目 (30271504); 博士后科学基金资助项目。

* 通讯作者 Tel: 86 - 10 - 63165184, Fax: 86 - 10 - 63017757, E-mail: dugh@imm.ac.cn

先导化合物的重要途径,而其中 HTS 的检测方法直接制约着 HTS 的可靠性和筛选的通量。极化荧光 (fluorescence polarization, FP) 是近几年被广泛用于 HTS 的检测方法之一^[2], FP 方法是一种均相反应体系,具有快速、简单、灵敏的特点,反应体系稳定和实验结果的可重复性,操作过程中不用过滤和分离,不使用放射性物质等优势。由于极化值与荧光标记分子的大小密切相关,该方法主要用于分析分子之间的相互作用^[3]。本研究拟建立一种以 FP 为检测方法的 HTS 技术,发现和寻找 LOX-1 拮抗剂。

材料与方 法

样品与试剂 高通量筛选样品由中国医学科学院药物研究所筛选中心样品库提供; hLOX-1 纯化蛋白由中国医学科学院药物研究所生物合成室提供(蛋白表达纯化的 SDS-PAGE 凝胶电泳分析如图 1 所示); 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 购自 Sigma 公司,用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解 ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 后置于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。Costar 384 孔微板购自美国 Coming Incorporated 公司。

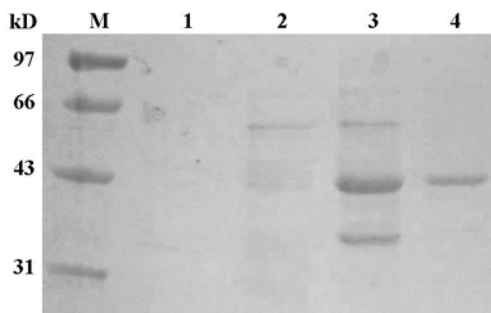


Figure 1 SDS-PAGE analysis of expression and purification of hLOX-1. M: Protein molecular mass maker; Lane 1: Elution fraction washed with $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ imidazole; Lane 2: Elution fraction washed with $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ imidazole; Lane 3: Elution fraction washed with $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ imidazole; Lane 4: Elution fraction washed with $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ imidazole, and obtain purified hLOX-1

仪器 GENios Pro 多功能分析检测系统,瑞士 Tecan 公司产品; PHERAstar 荧光发光仪: 德国 BMG 公司产品; SCP70H 型超速低温离心机 (70T), 日本 Hitachi 公司制造。

脂蛋白的分离与修饰 低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL, $1.019 \sim 1.063 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 由正常人血浆在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 经过密度梯度超速离心,以 $50\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 4 h 而获得^[4]。离心得到的

LDL 在 PBS 中 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 透析 24 h, 每 6 h 更换 1 次透析液, 除去 KBr 。LDL 中加入 CuSO_4 ($5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 置于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 氧化 LDL, 24 h 后加入 EDTA ($0.24 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 终止反应, 通过检测丙二醛了解氧化程度。oxLDL 反应液在含 EDTA ($0.24 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 PBS 中 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 透析 24 h, 每 6 h 更换 1 次透析液^[5], 后经 $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过除菌, Bradford 法^[6] 测定蛋白浓度, 于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

荧光标记 hLOX-1 表达纯化的 hLOX-1 蛋白对 pH 9.5 的碳酸盐缓冲液透析过夜, 透析后的蛋白移入 10 mL 小烧杯中, 在磁力搅拌下逐滴加入用 DMSO 溶解的 FITC ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ 蛋白), 标记体系用 PBS 加至 2.5 mL, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光搅拌 12 h 后, 以 PBS 透析, 换液直至无游离 FITC 析出为止。

极化荧光高通量筛选 hLOX-1 配体模型的建立实验应用黑色 384 孔微板, 反应总体积为 $40 \text{ } \mu\text{L}$, 缓冲液为 PBS。用 oxLDL 滴定不同浓度 ($50, 100$ 和 $200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) FITC 标记的 hLOX-1 受体, 根据极化值的变化确定 oxLDL 和 FITC-hLOX-1 的最佳浓度, oxLDL 滴定范围为 $0.007 \sim 250 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

以上面确定的 FITC-hLOX-1 浓度, 用 oxLDL 滴定后分别在 10 min, 20 min, 40 min, 1 h 和 2 h 测定极化值, 以检测试验的稳定性, 确定最佳反应时间。筛选样品原液均用 DMSO 溶解, 在竞争解离实验中, 向缓冲体系中分别加入 0, 1%, 3% 和 5% 的 DMSO, 以观察 DMSO 浓度对实验的影响。

oxLDL 和 FITC-hLOX-1 达到最大结合后, 用非 FITC 标记的 hLOX-1 滴定, 观察 FITC-hLOX-1 与 oxLDL 的解离, hLOX-1 的滴定浓度范围是 $0.03 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

hLOX-1 配体的高通量筛选 3 200 个化合物按上述方法确定的最佳条件进行初筛, 阳性对照为非 FITC 标记的 hLOX-1 受体, 阴性对照为 PBS。根据初筛结果计算有效率后对高活性样品进行复筛, 复筛程序同前, 并设复孔, 样品依次稀释 5 个浓度, 分别为 $1, 1 \times 10^{-1}, 1 \times 10^{-2}, 1 \times 10^{-3}$ 和 $1 \times 10^{-4} \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。最后根据测定结果计算 EC_{50} 。

极化荧光检测 在激发光滤光片波长 (485 ± 20) nm, 发射光滤光片波长 (530 ± 25) nm, 测定荧光极化值, 每孔闪烁 3 次, 取其平均值。荧光极化值以 mP (milli-polarization) 表示。

高通量筛选实验评价方法 按照确定的 oxLDL 和 hLOX-1 浓度, 分别测定 320 个完全游离和最大结合时荧光基团的极化值, 计算 Z 因子值评价以 FP

为检测方法的 HTS 实验^[7], Z' 计算公式如下: $Z' = 1 - [(3\sigma_{\text{free}} + 3\sigma_{\text{bound}}) / (mP_{\text{bound}} - mP_{\text{free}})]$, 其中 σ_{free} , σ_{bound} , mP_{bound} 和 mP_{free} 分别表示荧光标记物在完全游离状态下极化值的标准差、最大结合状态下的标准差、最大结合状态下的极化值、完全游离状态下的极化值。

统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验。

结果

1 极化荧光实验条件的优化

α LDL 滴定不同浓度 FITC-hLOX-1 的结果如图 2 所示, α LDL 在 $2.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时极化值开始升高, $25 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到平台期, mP 值的波动范围约在 $100 \sim 250$ 。FITC-hLOX-1 浓度在 $50, 100$ 和 $200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时各对等极化值之间没有显著性差异 ($P > 0.05$), 因此以下实验 FITC-hLOX-1 均设定为 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。为了减小游离荧光标记物对竞争解离的影响, 选择过量的 $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为 α LDL 的最终实验浓度。

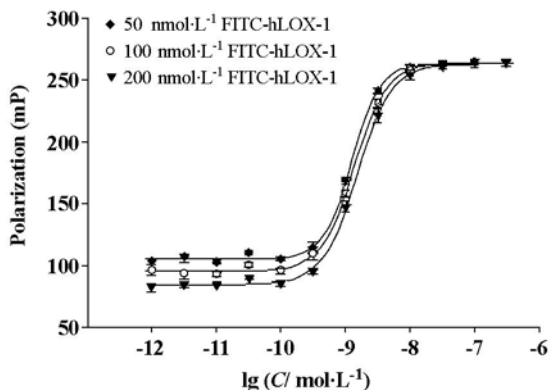


Figure 2 Titration FITC-labeled hLOX-1 concentrations by various α LDL concentration. The concentration of α LDL from 0.007 to $250 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ titrated with $50, 100,$ and $200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ of FITC-labeled hLOX-1 receptor. Each plotted point represents the average of three data points for a given concentration

2 极化荧光实验的稳定性和 DMSO 的影响

α LDL 和 FITC-hLOX-1 在不同反应时间内所测定的极化值之间无显著性差异 ($P > 0.05$); Z' 因子值结果显示在 DMSO 分别为 $0, 1\%, 3\%$ 和 5% 时无显著性差别 ($P > 0.05$)。因此在下面的 HTS 实验中, 反应时间选择为 20 min , DMSO 在反应体系终浓度为 1% 。

3 极化荧光竞争性解离试验

$100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ FITC-hLOX-1 和 $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$

α LDL 达到最大结合后, 加入非荧光标记的 hLOX-1, 观察 α LDL 与 hLOX-1 的竞争性结合与解离, 滴定的非荧光标记 hLOX-1 达到 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 极化值开始下降, $300 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时极化值不再变化, 结果如图 3 所示。

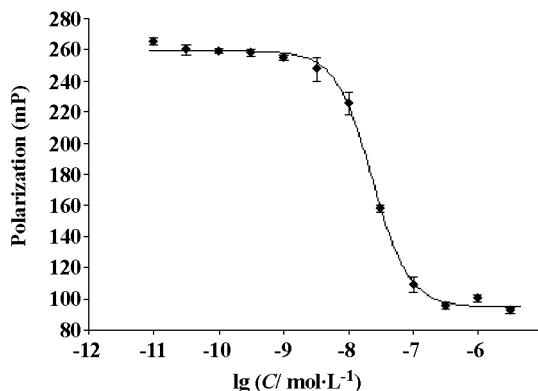


Figure 3 Displacement experiment competed by non-labeled hLOX-1. After fixed concentration of $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ FITC-hLOX-1 and $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ α LDL binding equilibrium, non-labeled hLOX-1 was titrated from $0.03 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ to $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Each plotted point represents the average of three data points for a given concentration

4 高通量筛选实验评价

Z' 因子是被广泛用于评价 HTS 实验的参数指标, Z' 因子值在 $0.5 \sim 1$ 时, 说明该 HTS 方法可行、结果可靠。本实验在完全游离和最大结合状态时, 极化值 mP 分别为 96 ± 8 和 250 ± 8 , Z' 因子值为 0.75 , 见图 4。

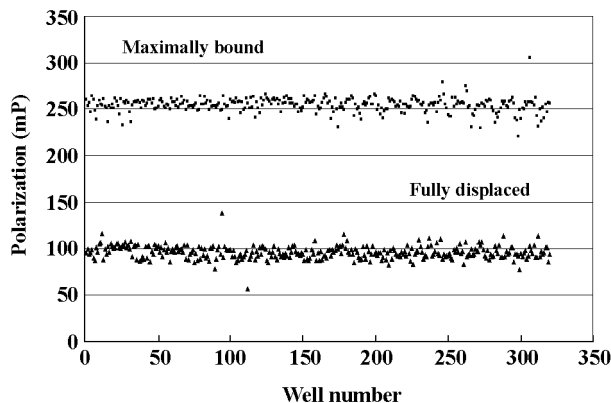


Figure 4 Fully displaced and maximally bound of FITC-hLOX-1 to α LDL assay. $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ FITC-hLOX-1 ($\triangle - \triangle$) was measured with $40 \mu\text{L}$ total volume in 384-well microplate as negative parameter; the maximal bound ($\square - \square$) of $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ hLOX-1 and $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ α LDL was measured as positive parameter. The calculated Z' value was 0.75

5 筛选结果

按照以上建立的 HTS 实验方法,对 3 200 个样品(包括 2 080 个单体化合物和 1 120 个天然产物)进行了筛选,对其中 16 个样品进行了复筛,最终确定 3 个化合物与 hLOX-1 有较高的结合活性,复孔结果基本一致, J 6302, J 6343 和 J 6294 计算的 IC_{50} 值分别为 31.6, 27.7 和 28.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

讨论

极化荧光(FP)方法是一种均相反应系统,生物分子之间相互作用后不用过滤分离游离的荧光标记物,而可以直接测定信号的“同质”技术^[8]。一个带有荧光基团分子的极化值与分子的旋转松弛时间或旋转 68.5°所需时间成正比,旋转松弛时间与溶液黏度和分子体积成正比例,而与体系的绝对温度和气体常数成反比例,如果溶液黏度和体系温度固定不变,则极化值只与分子大小成正比。极化值信号与溶液中荧光团分子的旋转速度有密切的关系,而分子的旋转速度又与其大小正相关。该方法可用于分析 DNA 蛋白、蛋白-蛋白、蛋白-小分子等之间的相互作用,因此 FP 检测技术在新药的研究中具有天然的优势,分子体积的变化可源于两个分子的结合或解离、分子降解、构象改变等^[9]。

在 FP 实验中,荧光标记分子的体积或量变化越大,则极化值的变化越大,当荧光素标记于小分子时,其与大分子结合后分子量增大,旋转速度明显减小,则引起极化值的显著升高,有利于活性化合物的发现;当标记于大分子时,其与小分子结合后引起复合物分子的体积或量的变化不明显,旋转速度的变化较小,极化值的改变不显著,就可能使活性化合物不被发现,因此荧光物通常被标记于分子量相对小的分子。

本研究以 hLOX-1 为靶点, hLOX-1 与其配体 oxLDL 的相互作用为基础,建立了竞争性置换结合的 FP 检测分析方法,并进行 HTS,发现和寻找其特异性配体。hLOX-1 分子质量约为 43 kD,由于其分子质量远远小于 oxLDL(3 000 kD)的分子质量,作者将 FITC 标记在 hLOX-1 上,经过条件优化,在 oxLDL 过量的情况下使 FITC-hLOX-1 与 oxLDL 充分结合,然后加入待筛小分子化合物,如果加入的小分子化合物置换出 oxLDL 而与 hLOX-1 结合,则它们的旋转速度会明显增加,极化值降低,根据加入待筛选样品前后极化值的变化,发现 hLOX-1 的配体。结果显示, FITC-hLOX-1 在完全游离和最大结合时,

极化值的变化大于 100 mP,而且在 10 min 至 2 h 的不同反应时间内,检测极化值没有显著差异,说明本实验建立的方法具有较高的灵敏性和稳定性。样品库化合物原液均用 DMSO 溶解,本实验也排除了 DMSO 对极化值的影响。

HTS 的最终目的是发现活性化合物,为了保证所筛选出化合物的“质量”,有必要对 HTS 实验体系进行评价, Z 因子是目前被广泛用于评价 HTS 方法的参数^[7]。本实验 Z 因子为 0.75,表明本实验所建立的 HTS 实验方法有较高的可靠性。

AS 是引起严重心血管疾病的基础,本实验结合最新研究成果,以 hLOX-1 为靶点,建立了灵敏、稳定和可靠的基于 FP 的 HTS 方法,为寻找和发现针对 AS 的新药进行了初步的研究。

References

- [1] Sawamura T, Kume N, Aoyama T, *et al.* An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein [J]. *Nature*, 1997, **386**(6620): 73 - 77.
- [2] Burke TJ, Loniello KR, Beebe JA, *et al.* Development and application of fluorescence polarization assays in drug discovery [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2003, **6**(3): 183 - 194.
- [3] Hertzberg RP, Pope AJ. High-throughput screening: new technology for the 21st century [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2000, **4**(4): 445 - 451.
- [4] Hojnacki JL, Nicolosi RJ, Hoover G, *et al.* Comparison of two ultracentrifugation procedures for separation of nonhuman primate lipoproteins [J]. *Anal Biochem*, 1978, **88**(2): 485 - 494.
- [5] Cominacini L, Garbin U, Davoli A, *et al.* A simple test for predisposition to LDL oxidation based on the fluorescence development during copper-catalyzed oxidative modification [J]. *J Lipid Res*, 1991, **32**(2): 349 - 358.
- [6] Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248 - 254.
- [7] Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays [J]. *J Biomol Screen*, 1999, **4**(2): 67 - 73.
- [8] Jameson DM, Crony JC. Fluorescence polarization: past, present and future [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2003, **6**(3): 167 - 173.
- [9] Owicki JC. Fluorescence polarization and anisotropy in high throughput screening: perspectives and primer [J]. *J Biomol Screen*, 2000, **5**(5): 297 - 306.