

# 蛋白酪氨酸磷酸酶SHP2抑制剂高通量筛选模型的建立和应用

高炜<sup>1</sup>, 邵伟<sup>2</sup>, 苏刚<sup>2</sup>, 李佳<sup>3</sup>, 谢小冬<sup>2</sup>

1. 兰州军区总医院普胸外科, 兰州 730050

2. 兰州大学基础医学院, 甘肃省新药临床前研究重点实验室, 兰州 730020

3. 中国科学院上海药物研究所, 国家新药筛选中心, 上海 201203

**摘要** 为了建立体外蛋白酪氨酸磷酸酶SHP2抑制剂的高通量筛选模型, 筛选潜在的SHP2抑制剂, 通过应用大肠杆菌系统克隆表达GST-SHP2融合蛋白, 经过GST-Sepharose亲和层析分离得到纯化的GST-SHP2蛋白, 建立384孔板的高通量筛选模型, 对48000个有明确结构的小分子化合物进行体外筛选, 筛选出75个活性化合物对SHP2的抑制作用大于50%, 确定3个化合物具有较高的抑制活性。该筛选模型灵敏、稳定, 对SHP2抑制剂药物研发打下了基础。

**关键词** SHP2; 抑制剂; 高通量筛选

**中图分类号** Q812

**文献标志码** A

**doi** 10.3981/j.issn.1000-7857.2014.h1.015

## Establishment and Application of High-throughput Screening Model for SHP2 Inhibitors

GAO Wei<sup>1</sup>, SHAO Wei<sup>2</sup>, SU Gang<sup>2</sup>, LI Jia<sup>3</sup>, XIE Xiaodong<sup>2</sup>

1. Department of General Thoracic Surgery, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, China

2. Key Lab of Preclinical Study for New Drugs of Gansu Province, School of Basic Medical Science of Lanzhou University, Lanzhou 730020, China

3. National Center for Drug Screening, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Science, Shanghai 201203, China

**Abstract** The aims of this study is to set up a high throughput screening model for SHP2 inhibitors and screen the potential inhibitors. By the E. coil expression system GST-SHP2 fusion protein is cloned and over expressed. High-purity SHP2 protein is purified through GST-Sepharose column. After establishing the high through screening system with the colorimetric assay of SHP2, a library of 48000 pure compounds is screened using the 384 micro-plate. Among them 75 compounds have inhibitory effects over 50%. Ultimately, three inhibitors are identified as SHP2 inhibitors with high activity. The high throughput screening is a highly sensitive, inexpensive, and operationally simple assay method in identifying SHP2 inhibitors.

**Keywords** SHP2; inhibitor; high throughput screening

蛋白酪氨酸磷酸酶SHP2(Src homology phosphotyrosyl phosphatase 2)是一种由PTPN11基因编码, 在细胞质内广泛表达的非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatase, PTP)。SHP2分子结构包括N端的2个Src同源区、中部具有一个酪氨酸磷酸(酯)酶活性区域、C端具有一个

包含多个酪氨酸磷酸化位点及一个富含脯氨酸Motif尾巴的区域<sup>[1,2]</sup>。SHP2作为细胞因子、生长因子及其他胞外刺激因素的下游信号分子, 参与多种细胞内信息传递如促细胞分裂剂激酶(MAP kinase)、信号转导转录激活蛋白(Jak-stat)及肌醇三激酶(PI3 kinase)等途径<sup>[3]</sup>, 与许多重要的细胞生命活动, 如

收稿日期: 2013-08-10; 修回日期: 2013-11-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(81272454)

作者简介: 高炜, 主任医师, 研究方向为肿瘤临床及肿瘤遗传学, 电子信箱: 329921879@qq.com; 谢小冬(通信作者), 教授, 研究方向为医学遗传学及生物工程, 电子信箱: xdxie@lzu.edu.cn

引用格式: 高炜, 邵伟, 苏刚, 等. 蛋白酪氨酸磷酸酶SHP2抑制剂高通量筛选模型的建立和应用[J]. 科技导报, 2014, 32(4/5): 91-94.

细胞增殖、分化、移动、凋亡等密切相关<sup>[4]</sup>。

研究发现, *PTPN11* 作为 PTP 家族第一个原癌基因<sup>[5]</sup>, *SHP2* 胚系突变可以造成努南氏综合征 (noonan syndrome)<sup>[6]</sup> 和豹皮综合征 (leopard syndrome)<sup>[7]</sup>, 而体细胞突变与许多恶性血液病, 如幼年型粒单核细胞白血病 (juvenile myelomonocytic leukemia, JMML)<sup>[8]</sup>, 急性髓细胞样白血病 (acute myeloid leukemia, AML)<sup>[9]</sup>, 骨髓增生异常综合症 (myelodysplastic syndrome, MDS)<sup>[10]</sup> 等相关。SHP2 在调节信号转导及介导各种生物学过程中起到非常重要的作用, SHP2 突变可以影响酶活性, SHP2 结构域的结合率及底物特异性, 其改变与各种恶性疾病的发生有密切关系。因此, SHP2 作为恶性疾病的潜在药物新靶点日益受到重视。鉴于 SHP2 作为新的治疗靶点, 在药物的研发中的应用价值, 研究和筛选 SHP2 的抑制剂对预防和治疗相关疾病具有重要意义<sup>[11]</sup>。

高通量筛选 (high-throughput screening, HTS) 是近年来发展起来的药物筛选技术, 是以微孔板为基础, 在分子或细胞水平上, 检测药物在靶点上的生物活性, 通过对化合物库进行大规模的筛选, 找到能选择性地作用于药物靶点的化合物, 具有微量、快速、灵敏、准确等特点, 是新药发现的强有力的筛选工具<sup>[12]</sup>。

通过以人 SHP2 为靶点, 构建 SHP2 抑制剂的高通量药物筛选模型, 筛选针对 SHP2 的高效、专一的抑制剂。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

仪器与耗材: GeneAmp PCR System2400 (Perkin Elmer 公司, 美国), GSTrap FF 亲和层析柱, HiPrep 26/10 分子筛 (GE 公司, 美国), FPLC system (Pharmacia Biotech 公司, 德国), Biomek 2000 自动加样系统 (Beckman 公司, 美国), Hydra 96 自动加样系统 (Robbins Scientific 公司, 美国), 96 孔板紫外/可见分光光度计 (Molecular Devices 公司, 美国), 96 孔酶标板 (Greiner 公司, 德国)。

药品和试剂: SHP2 cDNA (武汉三鹰生物技术有限公司), pGEX-KG (密歇根州大学 Kunliang Guan 提供), Ex Taq 和限制性内切酶 (Takara 公司, 日本), 大肠杆菌 BL21 (DE3), pLysS 菌株 (Stratagene 公司, 美国), 底物 p-nitrophenylphosphate pNPP (Calbiochem 公司, 美国), 高通量筛选样品由国家新药筛选中心化合物库提供, 其他试剂纯度为分析纯。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 SHP2 基因的克隆表达

根据 SHP2 催化区设计引物, 将含 SHP2 全长基因序列的 EST 克隆 cDNA 片段 PCR 扩增, 连接到含有 Xba I 位点和 Hind III 位点的表达载体 pGEX-KG 上, 将含有 SHP2 催化域的重组质粒 pGEX-KG/GST-SHP2 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞中进行高效表达。

#### 1.2.2 SHP2 蛋白分离纯化

将含有重组质粒的大肠杆菌 BL21 在含 50 mg/L 氨苄青

霉素的 LB 培养基中扩大培养, IPTG (100 mmol/L 诱导表达收获细胞, 裂解缓冲液 (1×PBS, 0.1% Triton X-100, 2 mmol/L EDTA, 2 mmol/L DTT) 进行超声细胞裂解处理, 上清液用 GSTrap FF 亲和柱分离纯化。洗脱缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 10 mmol/L 谷胱甘肽, 2 mmol/L EDTA 和 2 mmol/L DTT) 洗脱目的蛋白, 再用脱盐缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L DTT) 经 HiPrep 26/10 柱脱盐, 测定纯化的 GST-SHP2 蛋白浓度后分装, -80℃ 保存。

#### 1.2.3 SHP2 酶活性测定及反应条件优化

以对硝基苯磷酸 (pNPP) 为 SHP2 作用底物, 通过其水解产物 pNP (对硝基酚) 在 405 nm 处有光吸收值特性, 测定 SHP2 的活性。酶反应体系组成为: 缓冲液 (50 mmol/L Bis-Tris pH 6.0, 2 mmol/L DTT, 2 mmol/L EDTA, GST2-SHP2, 2 mmol/L pNPP)。反应体系混匀后, 室温动态测定 405 nm 波长条件下的光吸收值, 计算酶活性。

检测在不同 pH 值的缓冲液条件下的 SHP2 活性, 以确定测活反应体系的最适 pH 值; 确定最适 pH 值后, 在反应溶液 (包括 50 mmol/L Bis-Tris pH 6.0, 2 mmol/L pNPP, 20 mmol/L SHP2) 中, 加入不同浓度的 NaCl、DTT、EDTA, 检测 SHP2 在不同体系中的活性, 优化并确定 SHP2 的反应体系。

#### 1.2.4 $K_m$ 值和 $k_{cat}$ 测定

测定不同底物浓度时, 酶促反应的初速度。对测得的反应速度与相应底物浓度进行回归分析, 求出  $K_m$  值 (米氏常数, mol/L)。计算公式为米氏方程 (Michaelis-Menten equation):

$$V = V_{max}S / (K_m + S) \quad (1)$$

式中,  $V$  为反应初速度;  $V_{max}$  为最大反应速度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ;  $S$  为底物浓度, mol/L。此运算可同时得到  $V_{max}$ 。根据公式

$$V_{max} = k_{cat} \cdot E \quad (2)$$

计算催化常数  $k_{cat}$ ,  $\text{s}^{-1}$ ; 其中,  $V_{max}$  为最大反应速度, 在计算  $K_m$  值时求得;  $E$  为酶浓度, mol/L。

#### 1.2.5 高通量筛选

对国家新药筛选中心库中的 48000 个有明确化学结构式的小分子化合物进行筛选, 化合物在反应体系中的最终浓度是 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , DMSO 质量分数为 2%。利用 Biomek 加样系统, 将 5  $\mu\text{L}$  化合物加入黑色浅孔低吸附 384 孔板 (Corning), 加入 10  $\mu\text{L}$  酶液后孵育 10 min, 再加入 10  $\mu\text{L}$  底物溶液后启动酶动力反应, 送入读板仪器 Envision (Perkin Elmer 公司, 美国) 5 min 动态检测 405 nm 处的光吸收, 整个过程通过 Sagian (Beckman 公司, 美国) 系统自动完成。每块筛选板均设置  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (12.5 mmol/L, 2  $\mu\text{L}$ ) 和 DMSO (质量分数为 2%, 2  $\mu\text{L}$ ) 分别作为阳性和阴性对照, 用于计算样品对酶活性的抑制率评价筛选质量控制参数  $Z$  因子等。IC<sub>50</sub> 值由 Graphpad 公司的 Prism 软件, 以抑制剂浓度对抑制率非线性拟合计算得到。

#### 1.2.6 SHP2 抑制剂的选择性

为了研究 SHP2 酶抑制剂对 PTP 家族其他成员的选择性, 表达 N-端 GST 标签的 SHP1 (224-570 according to BC002523)、LAR-D1 (1275-1613 according to gi18860871)、

CD45 (1698-3791 according to gi115385976) 重组蛋白。在 SHP1、LAR-D1、CD45 最适测活体系中含一系列抑制剂浓度梯度(最终浓度分别为 20、6.67、2.22、0.74、0.25、0.082、0.027 g/mL), 动态测定酶反应的初速度, 以含有质量分数为 2% 的 DMSO 作为对照, 计算不同浓度抑制剂作用下剩余酶活的百分比, 并运用规划求解计算抑制剂的  $IC_{50}$ 。

## 2 结果

### 2.1 SHP2 蛋白分离纯化

SHP2 在上清中表达量很高(图 1), 经 GSTrap FF 层析柱的纯化, 1 L 的 LB 培养基表达产物中最终可以得到 10 mg 左右、纯度 90% 以上的 GST-SHP2 融合蛋白。样品用 12% SDS-PAGE 凝胶电泳, 考马斯亮蓝染色。泳道 1 为标准蛋白标记(KD 为分子量单位), 泳道 2 为纯化的 GST-SHP2 蛋白。

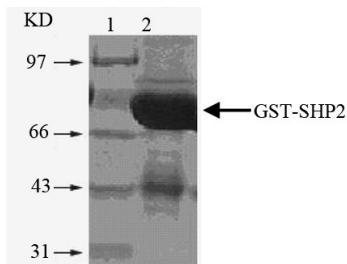


图 1 纯化 GST-SHP2

Fig. 1 Purified GST-SHP2

### 2.2 SHP2 酶活性测定及反应条件优化

#### 2.2.1 pH 对 SHP2 酶活性的影响

20 nmol/L GST-SHP2 在不同 pH 值的缓冲体系中测活, 结果显示, pH 值为 6.0 时酶活性最大(图 2), 所以确定 50 mmol/L pH 值为 6.0 的 Bis-Tris 作为测活缓冲溶液。

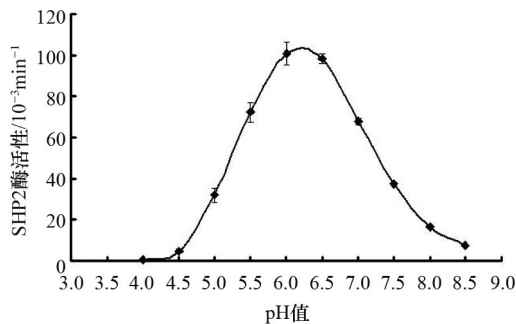


图 2 SHP2 在不同 pH 值下的活性

Fig. 2 Activity of SHP2 vs pH value

#### 2.2.2 NaCl 对 SHP2 酶活性的影响

在反应溶液中 NaCl 的最终浓度分别为 10、22.5、35、60、110、210、410 mmol/L, 发现酶活性随着 NaCl 浓度的增高而减少(图 3), 故测活体系中含 NaCl。

通过上述实验, 最终确定了 GST-Shp2 反应的最适缓冲溶液, 即 50 mmol/L Bis-Tris (pH 6.0), 2 mmol/L EDTA, 2 mmol/L DTT。

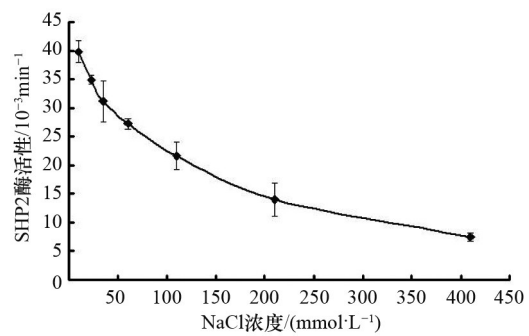


图 3 SHP2 在不同 NaCl 浓度下的活性

Fig. 3 Activity of SHP2 vs. concentration of NaCl

### 2.3 $K_m$ 值和 $k_{cat}$ 测定

如图 4 所示, 通过测定和式(1)拟合得到 20 nmol/L 的 SHP2 在 pH 6.0 时酶学参数分别为:  $K_m=10.96$  mmol/L,  $V_{max}=246.53$  m OD $\cdot$ s $^{-1}$ , 再根据仪器 FlexstationII 384 对 pNPP 底物的转化系数换算通过式(2), 计算得到:  $k_{cat}=34.58$  s $^{-1}$ ,  $k_{cat}/K_m=3.15$  L $\cdot$ s $^{-1}\cdot$ mmol $^{-1}$ 。以 pNPP 为底物的酶学参数为:  $K_m=14.4$  mmol/L,  $k_{cat}=5.3$  s $^{-1}$ ,  $k_{cat}/K_m=0.368$  L $\cdot$ s $^{-1}\cdot$ mmol $^{-1}$ [3]。与本文数据相比,  $K_m$  比较接近, 而  $k_{cat}$  略有差别, 可能是由于测活方法和测活体系不同造成的, 表明在大肠杆菌内表达的重组 SHP2 蛋白结构和功能都正常。

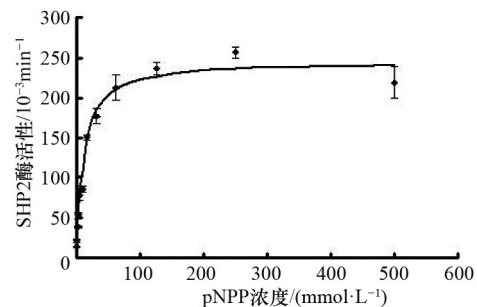


图 4 SHP2 以 pNPP 为底物的酶动力学参数

Fig. 4 The enzyme kinetics parameter curve of SHP2

### 2.4 高通量筛选

#### 2.4.1 高通量筛选质量控制

通过各种反应条件的优化, 建立 SHP2 抑制剂高通量筛选模型, 其微孔板孔间及板间的变异系数均小于 10%,  $Z$  因子是常用于判断高通量筛选模型稳定性和可靠性的统计参数[14], 可以接受的  $Z$  因子应大于 0.4, 结果显示  $Z$  因子大于 0.5, 符合高通量筛选的质量控制要求。该模型可在 1 d 内完成 48000 个样品的筛选,  $Z$  因子平均值达到 0.69, 在 2  $\mu$ g/mL 的浓度条件下, 共有 75 个样品抑制率大于 50%。

#### 2.4.2 发现小分子抑制剂

通过对高通量筛选发现的候选化合物进行验证及剂效关系的确定, 发现了化合物 LGH00009(图 5), 化学名称为 1H,3H-2-Thia-1,3-diaza-phenalene-2,2-dioxide, 对 SHP2 的抑制活性  $IC_{50}$  值达到 0.54  $\mu$ g/mL。

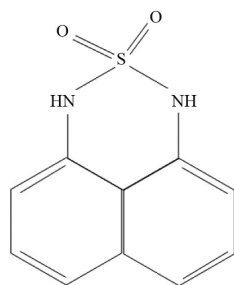


图5 化合物LGH00009的结构

Fig. 5 Chemical structure of LGH00009

## 2.5 SHP2抑制剂LGH00009对PTPs的选择性

通过选择性研究发现, LGH00009选择性的抑制非受体类PTPs, 如: SHP1、SHP2、CD45, 其 $IC_{50}$ 值在1 mol/L左右, 同时说明LGH00009对非受体类之内的PTPs不具有明显的选择性; 而对受体类PTPs, 如LAR, 在测试最高剂量40 mol/L不具有抑制效果(表1)。

表1 化合物LGH00009对PTPs的选择性

Table 1 Electivity of LG00009 for PTPs

PTPs	$IC_{50}$ 值/ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
SHP2	0.34±0.07
SHP1	0.28±0.05
CD45	0.66±0.10
LAR-D1	>20

## 3 讨论

SHP2属于蛋白酪氨酸磷酸酶(proteintyrosinephosphatase, PTPase)家族成员之一, 在多种组织和细胞中均有表达, 蛋白酪氨酸磷酸化是其信号转导中的基础步骤, 并且参与多种信号转导过程, 而细胞内蛋白磷酸化水平的提高是细胞恶变的重要表现之一, 也可能是细胞异常增殖分化机理的关键。编码SHP2蛋白的PTPN11基因突变会导致努南(N Noonan)综合征及豹斑综合征。某些血液病的恶性肿瘤中也会发生体细胞PTPN11基因突变, 但现在对SHP2内在分子机制还知之甚少, 随着这些作用机制的阐明, SHP2将成为药物干扰肿瘤转移的新型作用靶标。

高通量筛选是近年来迅速发展起来的新型药物筛选技术, 该技术已逐步成为寻找和研究新药的主要手段, 采用靶标进行药物筛选具有特异性和准确性, 也可以发现原有药物的新作用, 从而实现中药产品的二次开发。根据SHP2水解pNPP可生成可溶性的黄色化合物, 通过检测405 nm处的光吸收即可确定酶的活性。观察不同化合物对重组酶的活性的抑制, 可以初步评价化合物的药用效果。

## 4 结论

采用GST-SHP2融合表达蛋白, 以pNPP为底物, 建立了一个分子水平的高通量的SHP2抑制剂筛选模型, 经过各种

反应条件的优化和验证, 阳性对照药物在该模型上有很好的浓度依赖关系, 其检测灵敏度、准确度和重现性等均达到预期标准。由于引入自动工作站, 其操作程序完全由Biomek FX软件控制并分配到96孔微量板内, 大大提高了筛选速度, 减小了人工操作的误差, 其分析结果的重现性也更优于人工筛选的结果, 充分体现了该模型微量、快速、高效、灵敏等优点。经过对国家新药筛选中心库中的48000个有明确化学结构式的小分子化合物进行筛选, 发现了75个活性化合物对SHP2的抑制作用大于50%, 并发现LGH00009对PTPs有一定程度的选择性, 但仍需在细胞水平进行评价。

## 参考文献(References)

- [1] Lai L A, Zhao C, Zhang E E, et al. The Shp-2 tyrosine phosphatase[J]. Protein Phosphatases. 2004, 5: 275-299.
- [2] Neel B G, Gu H, Pao L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2003, 28(6): 284-293.
- [3] Cunnick J M, Meng S, Ren Y, et al. Regulation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway by SHP2[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(11): 9498-9504.
- [4] QU C K. The SHP-2 tyrosine phosphatase: Signaling mechanisms and biological functions[J]. Cell Research, 2000, 10(4): 279-288.
- [5] Chan R J, Feng G S. PTPN11 is the first identified proto-oncogene that encodes a tyrosine phosphatase[J]. Blood, 2007, 109(3): 862-867.
- [6] Tartaglia M, Zampino G, Gelb B D. Noonan syndrome: Clinical aspects and molecular pathogenesis[J]. Molecular Syndromology, 2010, 1(1): 2-26.
- [7] Edouard T, Combier J P, Nédélec A, et al. Functional effects of PTPN11 (SHP2) mutations causing LEOPARD syndrome on epidermal growth factor-induced phosphoinositide 3-kinase/AKT/glycogen synthase kinase 3 $\beta$  signaling[J]. Molecular and Cellular Biology, 2010, 30(10): 2498-2507.
- [8] Grossmann K S, Rosário M, Birchmeier C, et al. The tyrosine phosphatase SHP2 in development and cancer[J]. Advances in Cancer Research, 2010, 106: 53-89.
- [9] Bentires-Alj M, Paez J G, David F S, et al. Activating mutations of the noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 gene in human solid tumors and adult acute myelogenous leukemia[J]. Cancer Research, 2004, 64(24): 8816-8820.
- [10] Christiansen D H, Desta F, Andersen M K, et al. Mutations of the PTPN11 gene in therapy-related MDS and AML with rare balanced chromosome translocations[J]. Genes, Chromosomes and Cancer, 2007, 46(6): 517-521.
- [11] Yu Z H, Chen L, Wu L, et al. Small molecule inhibitors of SHP2 tyrosine phosphatase discovered by virtual screening[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2011, 21(14): 4238-4242.
- [12] Mayr L M, Bojanic D. Novel trends in high-throughput screening[J]. Current Opinion in Pharmacology, 2009, 9(5): 580-588.
- [13] Dechert U, Adam M, Harder K W, et al. Characterization of protein tyrosine phosphatase SH-PTP2. Study of phosphopeptide substrates and possible regulatory role of SH2 domains[J]. Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(8): 5602-5611.
- [14] ZHANG J, Chung T D Y, Oldenburg K R. Validation of high throughput screening assays[J]. Journal of Biomolecular Screening, 1999, 4(2): 67-73.

(编辑 田恬)