



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

《天津科技大学学报》网络首发论文

题目： 抗肿瘤 β -catenin/TCF 拮抗剂的研究进展
作者： 孙华, 齐艺诺, 刘璨
DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250044
收稿日期: 2025-03-11
网络首发日期: 2025-06-19
引用格式: 孙华, 齐艺诺, 刘璨. 抗肿瘤 β -catenin/TCF 拮抗剂的研究进展[J/OL]. 天津科技大学学报. <https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20250044>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250044

抗肿瘤 β -catenin/TCF 拮抗剂的研究进展

孙 华, 齐艺诺, 刘 璨

(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: Wnt/ β -catenin 信号通路在胚胎发育、癌症干细胞稳态及肿瘤发生发展中发挥重要作用, β -catenin (β -连环蛋白) 作为该通路的核心蛋白, 其异常表达和功能与多种癌症相关。开发靶向 β -catenin/TCF (T-细胞因子) 相互作用的拮抗剂已成为抗癌药物研发的重要方向。近年来, 随着 β -catenin/TCF 复合物晶体结构的解析, 基于其结构的药物设计、合成与筛选取得了突破性进展。本文对抗肿瘤 β -catenin/TCF 小分子拮抗剂进行分类综述和展望, 旨在为靶向该通路的创新药物研发提供参考。

关键词: 抗肿瘤; Wnt 信号通路; β -连环蛋白; T-细胞因子 (TCF); 小分子拮抗剂

中图分类号: R962

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510 (0000)00-0000-00

Research Progress on Anti-Tumor β -catenin/TCF Antagonists

SUN Hua, QI Yinuo, LIU Can

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The Wnt/ β -catenin signaling pathway plays an important role in embryonic development, cancer stem cell homeostasis and tumorigenesis. β -Catenin, as the core protein of this pathway, is associated with various cancers due to its abnormal expression and function. Developing antagonists targeting the interaction between β -catenin and T-cell factor (TCF) has become an important direction for the development of anticancer drugs. In recent years, with the analysis of the crystal structure of β -catenin/TCF complex, breakthrough progress has been made in structure-based drug design, synthesis and screening. This article provides a classified review and outlook on small molecule antagonists targeting the β -catenin/TCF interaction, aiming to provide references for the development of innovative drugs targeting this pathway.

Key words: anti-tumor; Wnt signaling pathway; β -catenin; T-cell factor (TCF); small molecule antagonist

Wnt(wingless int-1)信号通路是目前已知的胚胎发育所必需的信号转导途径, 同时在肿瘤的发生、发展中也占据着重要的地位^[1]。现已证实, 该通路的过度激活与多种人类肿瘤的发生有着密切的联系^[2], 尤其在结肠癌的发生、发展上, 约 90%的结肠癌与该通路过度激活有关^[3-5]。Wnt 信号转导途径致癌的关键是该通路中 β -catenin 在胞质中累积, 继而进入核内激活 T-细胞因子 (TCF), 过表达的 β -catenin 与 TCF 形成复合体, 激活下游靶基因的表达, 导致肿瘤的产生。这是细胞恶性转化的标志, 也是维持恶性表型所必需的。因此, 抑制 β -catenin 与 TCF 相互作用能够有效地阻止多种癌症的发生与发展, 如结肠癌、胰腺癌、肝癌^[6]、乳腺癌^[7]和黑色素瘤等。目前已报道了多种靶向 β -catenin/TCF 小

分子拮抗剂, 本文依据化合物的来源进行分类和综述。

1 Wnt/ β -catenin 信号通路

Wnt 蛋白是一种脂质修饰的糖蛋白, 它可以激活细胞表面受体介导的信号转导, 调节一系列细胞活动, 参与生物体多种生理过程, 包括干细胞的再生、增殖、分裂、迁移和极化等^[8]。Wnt 信号通路是胚胎发育和组织稳态所必需的系统。经典 Wnt/ β -catenin 信号通路如图 1 所示。Wnt 配体是一种分泌型糖蛋白, 可结合卷曲(Frizzled)受体, 与低密度脂蛋白受体相关蛋白 LRP5/6 在细胞表面形成一个更大的复合体。当 Wnt 信号缺失时 (Wnt-OFF),

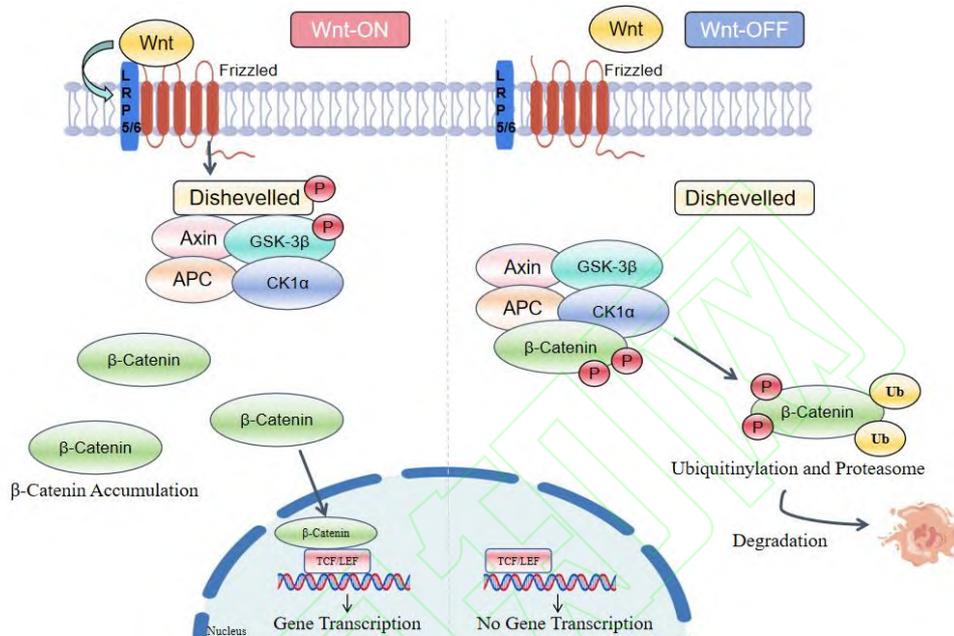
收稿日期: 2025-03-11; 修回日期: 2025-05-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(21502138)

作者简介: 孙 华(1977—), 女, 天津人, 教授, sunhua@tust.edu.cn

β -catenin 受到细胞质中多蛋白破坏复合物的调控，该多蛋白破坏复合物包含腺瘤性结肠息肉病蛋白 (APC)、轴蛋白 (Axin)、糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β) 和酪蛋白激酶 1 α (CK1 α) [9]，导致 β -catenin 泛素化和被蛋白酶体降解。当 Wnt 信号激活时 (Wnt-ON)，Wnt 蛋白与细胞表面受体 Frizzled 及 LRP5/6 结合后，启动细胞内信号转导，导致胞

质内散乱蛋白 (Dsh) 被激活^[10]，活化的 Dsh 蛋白抑制多蛋白破坏复合物的活性，阻止 β -catenin 的磷酸化，致使 β -catenin 在细胞质中不断积累并进入细胞核，与 TCF/LEF (T-cell transcription factor/lymphoid enhancer factor) 结合，激活下游靶基因 (如 c-myc、cyclin D1 等) 的转录，从而调节细胞的生长、分化、增殖等多种生物学过程。



注：LRP5/6 (lipoprotein receptor-related protein5/6) 为脂蛋白受体相关蛋白5/6，Frizzled 为细胞表面的卷曲蛋白受体家族，GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β) 为糖原合成酶激酶 3 β ，CK1 α (casein kinase 1 α) 为酪蛋白激酶 1 α ，Axin 是一种支架蛋白，APC (adenomatous polyposis coli) 为结肠腺瘤息肉易感蛋白，Ub (ubiquitination) 为泛素化，TCF (T cell factor) 为 T-细胞因子，LEF (lymphoid enhancer-binding factor) 为淋巴增强结合因子。

图 1 经典 Wnt/ β -catenin 信号通路
Fig. 1 Canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway

2 β -catenin/TCF 相互作用的分子机制

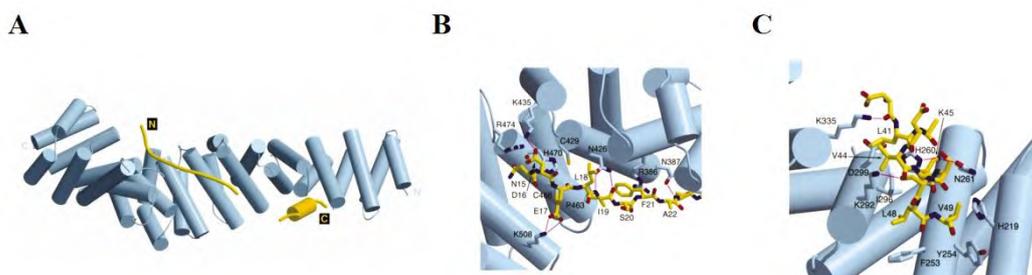
2.1 β -catenin 的结构

人源的 β -catenin 由 781 个氨基酸组成^[11-12]，包含一个具有动态 N 和 C 端区域的中央犰狳重复结构域 (Armadillo repeat domain)，其结构呈现螺旋状。该结构域结合多种蛋白 (如 TCF3、TCF4 和 BCL9 等) 发挥信号转导的功能，该结构域中 N 端的一些氨基酸残基比较关键，如丝氨酸和苏氨酸残基等。Wnt 信号未激活时，CK1 α 能将 β -catenin 的 Ser45 位点磷酸化，随后 GSK3 β 将 β -catenin 的 Thr41、Ser37、Ser33 等位点磷酸化，因此，这一结构域对于 β -catenin 的降解调控至关重要。该结构域 C 端对 β -catenin 的整体结构稳定性以及与其它蛋白质的相互作用也具有一定的调节作用，但目前尚无

深入系统的研究。

已报道的 β -catenin 复合物晶体结构有 3 种，包括 β -catenin 与 TCF4 复合物 (PDB ID 1JPW)、 β -catenin 与 BCL9 复合物 (PDB ID 3SL9) 和 TCF4- β -catenin-BCL9 三元配合物 (PDB ID 2GL7)，这些晶体结构为小分子拮抗剂的理性药物设计提供了有力的依据。 β -catenin/TCF4 复合物的结构如图 2 所示。图 2 (A) 显示 β -catenin 的犰狳重复结构域 (蓝色) 与 TCF4 (黄色) 有两个相互作用位点，包括氨基酸残基 13-25 (N 端) 组成的延伸区域和残基 40-50 (C 端) 组成的螺旋区域。这两个区域之间的 14 个残基，以及 N 端的残基 8-12 和 C 端的残基 51-54 是无序的。图 2 (B) 显示扩展区域中 TCF4 的天冬氨酸 16 和谷氨酸 17 分别与 β -catenin 的赖氨酸 435 和赖氨酸 508 形成盐桥和氢键。图 2 (C) 显示 β -catenin 的 C 端螺旋区域与 TCF4 的亮氨酸 41、

缬氨酸 44、亮氨酸 48 和缬氨酸 49 形成两亲性螺旋的疏水表面。



(A) TCF4 (黄色)与 β -catenin 的猿猴重复区 (蓝色) 的两个相互作用位点 (B) 扩展区域中相互作用的细节 (C) C 端螺旋区域的相互作用细节

图 2 β -catenin/TCF4 复合物的结构

Fig. 2 Structure of the β -catenin/TCF4 complex

2.2 β -catenin 与 TCF 的相互作用

TCF/LEF 转录因子家族主要包括 TCF1、TCF3、TCF4 和 LEF1, 目前已报道的 β -catenin/TCF 复合物晶体结构包括人源 TCF4, 鼠源 LEF1, 和爪蟾 TCF3^[13]。这些结构揭示了 β -catenin 与 TCF 之间的蛋白-蛋白相互作用。TCF 的 C 端 α -螺旋可识别 β -catenin 蛋白结构中由氨基酸 F253、F293、I296、H219、K292 和 K335 组成的疏水沟槽, 该疏水沟槽与 TCF4 的疏水残基 L41、V44 和 L48 相互作用; 此外, TCF4 的极性残基 D40 和 K45 与 β -catenin 的 N21、H260、K292、K335 和 R376 的相互作用, 可以促进上述 α -螺旋与疏水槽的结合。在 TCF/LEF 与 β -catenin 结合的延伸区域中, β -catenin 具有许多带正电的残基, 例如 K435、R469、H470 和 K508 等, 其可与 TCF/LEF 相互作用。另外, TCF4 的一些疏水残基, 如 Leu41、Val44、Leu48 等, 也参与了与 β -catenin 的结合, 且 TCF4 的前 53 个氨基酸构成了该蛋白的连环蛋白结合域 (CBD), 它是与 β -catenin 高亲和相互作用的必要条件。TCF4 的残基 D16 与 β -catenin 的 K435 和 H470 的相互作用对其结合以及 Wnt 信号通路起着至关重要的作用, 也被称为热点区域 (hot spot), 为靶向 Wnt 信号通路和肿瘤干细胞的抗癌药物的设计提供了依据^[14]。

3 靶向 β -catenin/TCF 相互作用的拮抗剂

靶向 β -catenin/TCF 拮抗剂可特异性地结合 β -catenin 或 TCF, 干扰其相互作用, 抑制 β -catenin 与 TCF 复合物的形成, 从而抑制靶基因 (如 c-myc、cyclin D1 等) 的激活, 抑制 SOX2、OCT4^[15] 等干性相关基因的表达, 影响肿瘤干细胞的自我更新和维持能力。近年来, 通过不同的方法获得了多种靶向 β -catenin/TCF 的小分子拮抗剂, 在结肠癌、肝癌、

肺癌^[16-17] 等治疗中展现出了良好的应用前景, 有望在未来的肿瘤靶向疗法中发挥作用。

3.1 基于提取分离获得的天然小分子拮抗剂

天然产物由于其独特的化学结构和作用机制, 成为发现抗癌药物的重要来源之一。靶向 β -catenin/TCF 相互作用的天然小分子拮抗剂的结构式如图 3 所示。血根碱 (Sanguinarine, **1**) 是一种苯并吡啶类生物碱, 存在于多种植物中, 具有抗肿瘤、抗炎及抗骨质疏松等多种生物活性^[18]。

Yang 等^[19] 从中药白屈菜叶中发现血根碱通过下调 Wnt/ β -catenin 信号通路的自我更新途径, 抑制肺癌干细胞的增殖、侵袭和转移。Chen 等^[20] 运用表面等离子共振 (SPR) 等方法, 也证明了血根碱及其衍生物对 β -catenin/TCF4 相互作用具有抑制作用 (结合常数 $K_D=50.8 \mu\text{mol/L}$)。Liu 等^[21] 从冬凌草 (*Isodon rubescens* var. *lushanensis*) 中首次发现鄂西香茶菜素 (henryin, **2**) 通过干扰 β -catenin/TCF4 的结合下调 cyclin D1 和 c-myc 基因的表达, 从而将结肠癌细胞阻滞在 G1/S 期。Li 等^[22] 从棕榈叶 (*Eleutherine palmifolia*) 中提取分离出化合物 **3** 和 **4**, 能有效抑制结肠癌细胞的增殖, 并能抑制 β -catenin/TCF4 的转录。

利用以活性为导向的分离策略, Park 等^[23] 从牛角瓜 (*Calotropis gigantea*) 的甲醇提取物中分离出强心苷 (cardenolides) 类化合物 **5—8**, 均具有较强的抑制 β -catenin/TCF 转录活性 ($IC_{50}=0.7\sim 3.6 \text{ nmol/L}$), 且对 3 种 Wnt 依赖性结肠癌细胞系 (SW480、DLD1 和 HCT116) 均表现出良好的细胞毒性。其中, 化合物 **5** (Calotropin) 通过减少细胞核和细胞质中的 β -catenin 来抑制 Wnt 信号传导, 并通过 CK1 α 增加 β -catenin 中 Ser45 的磷酸化, 从而促进 β -catenin 的降解。Fuentes 等^[24] 从野甘草 (*Scoparia dulcis*) 中分离的二萜 Scopadulciol (**9**)

能够抑制人胃腺癌细胞 AGS 中 β -catenin/TCF 的转录，下调靶基因的表达和存活素 (survivin) 的蛋白水平。

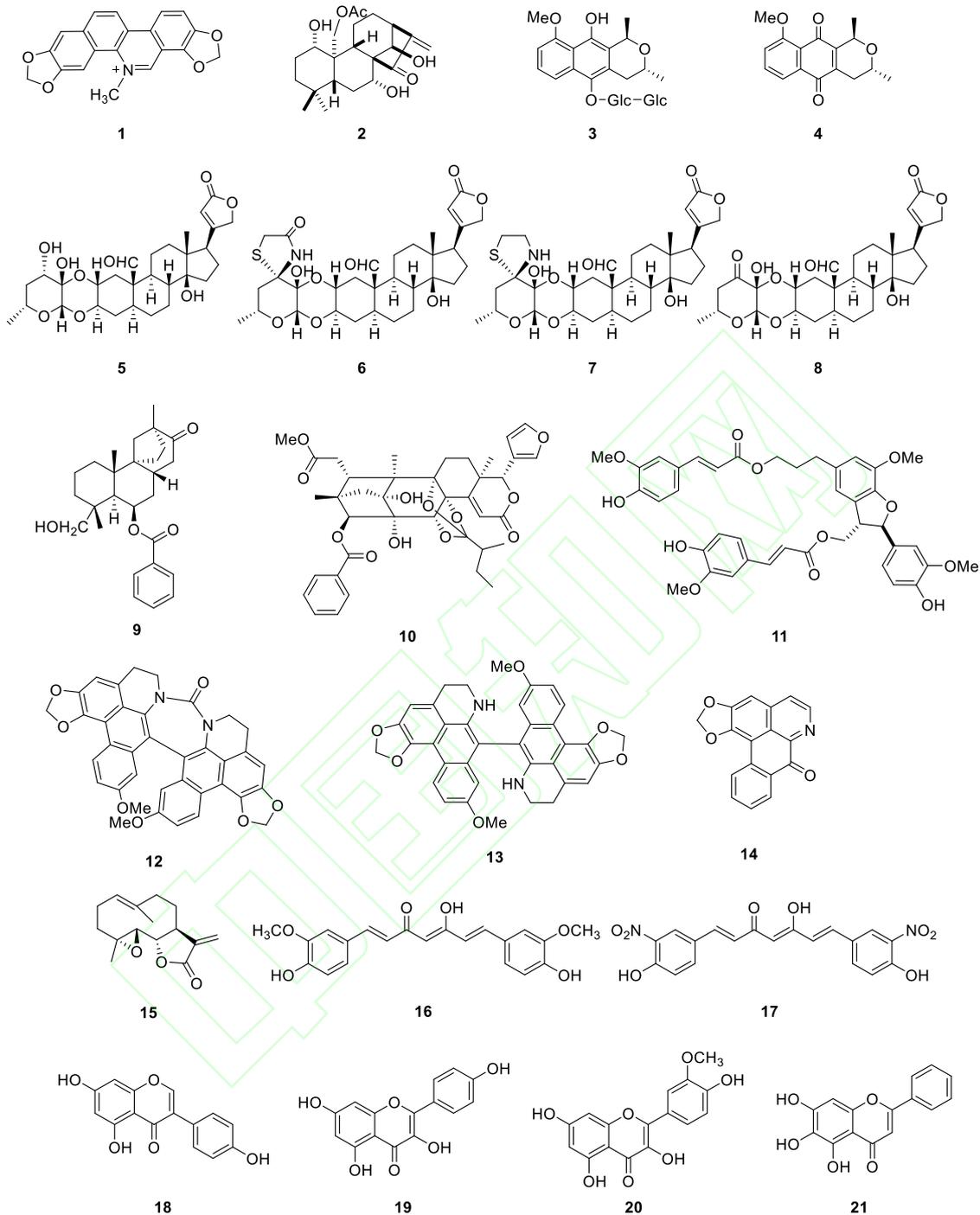


图 3 靶向 β -catenin/TCF 相互作用的天然拮抗剂的结构式

Fig. 3 Structures of natural β -catenin/TCF interaction inhibitors

Toume 等 [25] 从木果楝 (*Xylocarpus granatum*) 叶中分离到 Xylogranin B (10)，该化合物能显著降低细胞核内的 β -catenin 蛋白水平，从而抑制 β -catenin/TCF 的转录 ($IC_{50} = 48.9$ nM)，但对细胞质中 β -catenin 蛋白水平无影响。另外，从木槿 (*Hibiscus ficulneus*) 中分离得到赤

麻木质素 (Boehmenan, 11) 对 Wnt 不依赖型 (RKO) 和依赖型 (HCT116) 细胞均具有较强的细胞毒性，可以降低 ST6/293 细胞的细胞质和细胞核中的 β -catenin 水平和下游 c-myc 水平，并能够抑制 β -catenin/TCF 转录的活性 [26]。从樱桃暗罗 (*Polyalthia cerasoides*) 根中分离得到双阿朴啡生

物碱 Cerasoidine (12) 和双阿朴啡生物碱 Bidebinine E (13) 以及单体阿朴啡生物碱 Liriodenine (14), 这3种化合物均通过减少细胞核中 β -catenin 的积累, 来抑制 Wnt 信号的传导^[27]。其中, Liriodenine 还可以剂量依赖性的降低 β -catenin、c-myc 和 PPAR δ 三种蛋白的水平。

Zhu 等^[28]通过高通量筛选获得了一种天然倍半萜内酯 PTL (15), 其剂量依赖性地抑制 HEK293 细胞中 Wnt3a 和 CHIR 诱导的转录活性, 并能降低转录因子 TCF4/LEF1 的水平, 而不影响 β -catenin 的稳定性或亚细胞分布。此外, siRNA 介导的 PTL 结合的核糖体蛋白 RPL10 的敲除降低了 TCF4/LEF1 蛋白水平, 也降低了 Wnt3a 诱导的 TOPFlash 活性, 因此, PTL 的作用机制是抑制 Wnt/ β -catenin 信号传导, 从而抑制 β -catenin/TCF 的相互作用。

姜黄素 (16) 具有多种生物活性, Park 等^[29]发现姜黄素及其衍生物 CHC007 (17) 通过减少细胞核内 β -catenin 和 TCF4 蛋白量, 从而降低 β -catenin/TCF 的转录活性。黄酮类化合物染料木素 (18)、山奈酚 (19)、异鼠李素 (20) 和黄芩素 (21) 能够抑制 β -catenin/TCF 信号通路, 并通过电泳迁移率变动分析 (EMSA) 实验证明其能够

抑制 TCF 复合物与其特定 DNA 结合位点的结合, 干扰 β -catenin 与 TCF-4 的结合^[30]。此外, 染料木素还可以降低细胞核中 β -catenin 水平, 并能降低 Akt 和 GSK3 β 的磷酸化水平。

3.2 基于高通量筛选获得的小分子拮抗剂

利用高通量筛选 (high throughput screening, HTS) 技术, 获得了大量干扰 β -catenin/TCF 相互作用的化合物, 结构式如图 4 所示。结合 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 化学遗传筛选策略和 HTS 技术, 从 2 个不同的小分子化合物库中分别筛选了 14997 个和 10752 个化合物, 从中得到了可以抑制 β -catenin/TCF4 相互作用的 iCRT3 (22)、iCRT5 (23) 和 iCRT14 (24)。基于 β -catenin 晶体结构, 利用计算机模拟对接分析显示 iCRT5 和 iCRT3 能与 β -catenin 蛋白特异性口袋结合, 与 Lys435 和 Arg469 产生特异性结合; iCRT14 不仅可以影响 β -catenin/TCF4 之间的相互作用, 还可以干扰 TCF 与 DNA 的结合, 从而达到抑制肿瘤生长的目的, 且可抑制先天免疫反应, 提升多种细胞系转基因表达^[31], 为未来靶向 β -catenin/TCF4 相互作用的小分子拮抗剂的研究, 提供了新的思路^[32]。

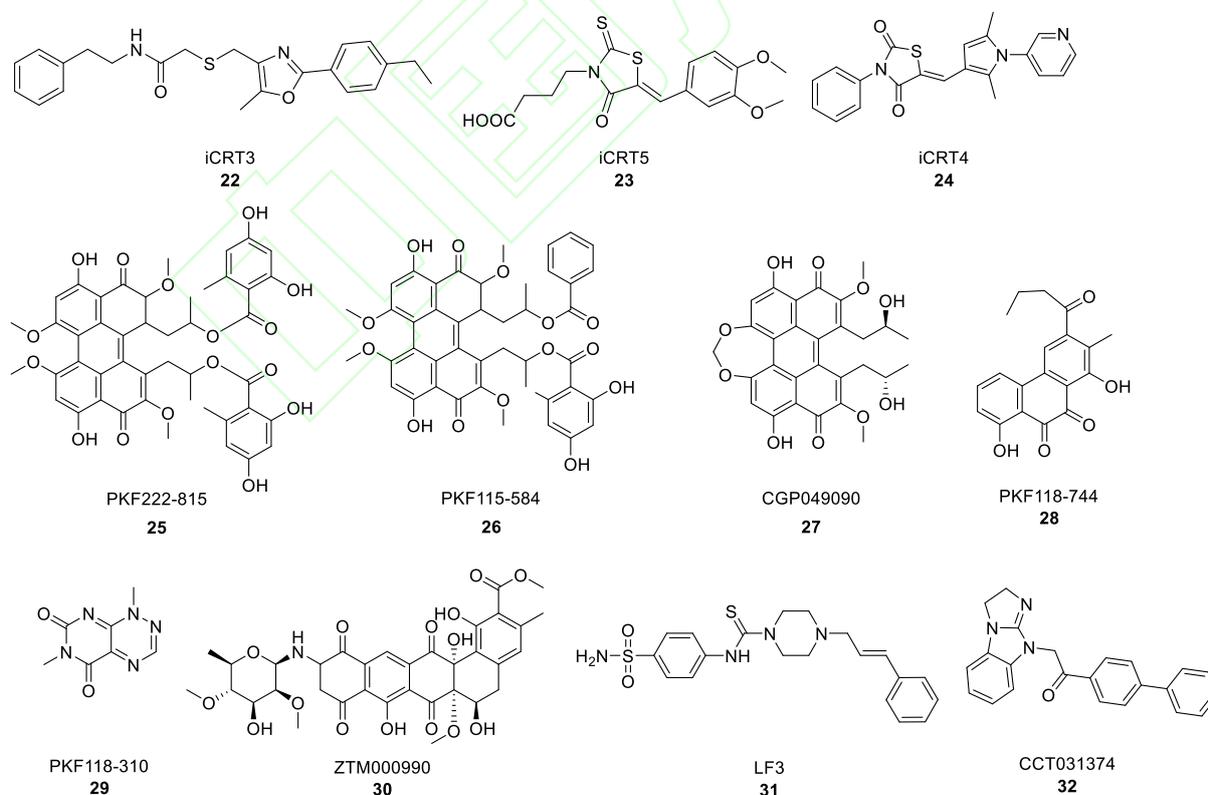


图 4 基于高通量筛选获得的靶向 β -catenin/TCF 相互作用拮抗剂的结构

Fig. 4 Structures of antagonists of β -catenin/TCF interaction obtained through high-throughput screening

Lepourcelet 等^[33]建立了一种 HTS 筛选方法,

将纯化的 β -catenin (aa 134-668) 包被于微量滴定

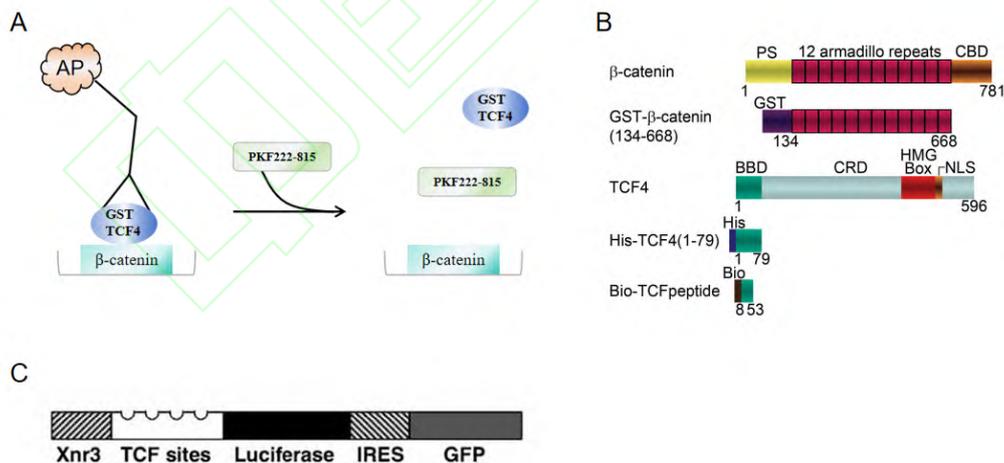
板, 依次与融合谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 的 TCF4 片段 (aa 8-54)、anti-GST 抗体和碱性磷酸酶 (AP) 偶联的二抗共孵育。如果化合物能干扰 β -catenin/TCF4 复合物, 便会与背景值产生差异, 如图 5 (A) 所示。利用该方法, 从约 7000 个天然产物中筛选出 6 种来源于真菌及放射菌代谢产物 PKF222-815 (25)、PKF115-584 (26)、CGP049090 (27)、PKF118-744 (28)、PKF118-310 (29) 和 ZTM000990 (30), 其中, ZTM000990 抑制 β -catenin/TCF4 结合的活性最强 ($IC_{50} = 0.64 \mu\text{mol/L}$)。此外, 还通过报告基因激活、c-myc 的表达、肿瘤细胞增殖和爪蟾胚胎背轴复制 (Xenopus embryonic dorsal axis) 等体内外方法对上述化合物的活性进行了验证^[34]。

Fang 等^[1]使用 AlphaScreen 结合 ELISA 高通量筛选模型, 从开源的 1.6 万个合成的化合物库 (ChemBioNet) 进行筛选。该模型使用 GST 标记的人源 β -catenin 猕猴重复结构域 (GST- β -catenin, aa 134-668) 和 His 标记的 TCF4 N 末端区域 (His-TCF4, aa 1-79), 如图 5 (B) 所示。在 ELISA 实验中, 重组 TCF4 (His-hTCF4) 和 TCF4 的 N 端肽 (Bio-TCF peptide, aa 8-53) 可以抑制 β -catenin/TCF4 结合, 而关键残基 Asp16 突变的 TCF4 (His-TCF4 (D16A)) 或无关蛋白质不能抑制结合。结合 AlphaScreens 筛选, 发现 132 个

化合物在 $20 \mu\text{mol/L}$ 下抑制率大于 40%, 4-硫脲基-苯磺酰胺衍生物 LF3 (31) 活性最佳, IC_{50} 小于 $2 \mu\text{mol/L}$ 。此外, LF3 能有效抑制与 Wnt 通路相关的肿瘤细胞特征, 包括细胞迁移、细胞周期阻滞和 Wnt 靶基因过表达, 但不会导致细胞死亡或干扰钙黏蛋白 (cadherin) 介导的细胞间粘附。在小鼠异种移植结肠癌模型中, LF3 也能抑制肿瘤生长并诱导分化。此外, LF3 也通过抑制 β -catenin/TCF4 信号通路来减轻肝纤维化, 也为治疗肝纤维化的靶点提供了新的证据^[35]。

构建人上皮细胞系 (HEK293) 报告基因模型也可以进行高通量筛选, 该报告基因是双顺反子 TCF-luciferase-IRES-GFP, 包含来自 Xnr3 启动子的 Wnt 反应元件和 4 个 TCF 结合位点如图 5 (C) 所示。通过该方法筛选获得 CCT031374 (32, $IC_{50}=6.1 \mu\text{mol/L}$), 它能够阻断 TCF 依赖的细胞转导, 但不降低 β -catenin 蛋白表达; 它还能阻止 6-溴-3'-呋喃玉红 (GSK-3 抑制剂) 诱导的 β -catenin 的积累, 说明该化合物在该通路上可能存在多个靶点^[36]。

高通量筛选技术能快速从大量化合物库中筛选出有活性的化合物, 为药物研发提供更多潜在的先导化合物, 为未来靶向 β -catenin/TCF4 相互作用的小分子拮抗剂研究提供了新的思路。



注: (A) β -catenin/TCF4 拮抗剂 HTS 筛选模型示意图; (B) AlphaScreen 的高通量筛选和 ELISA 筛选模型中制备的 GST 标记的 β -catenin 猕猴重复结构域和 His 标记和生物素化的 TCF4 N 端区域的示意图; (C) 双顺反子 TCF-luciferase-IRES-GFP, 包含来自 Xnr3 启动子的 Wnt 反应元件和四个 TCF 结合位点。

图 5 β -catenin/TCF 相互作用的拮抗剂

Fig. 5 Antagonists of the β -catenin/TCF interaction

3.3 基于合理药物设计合成的小分子拮抗剂

合理药物设计 (rational drug design) 是化

学、生物学、数学、物理学、计算科学和人工智能交叉产物, 将是 β -catenin/TCF4 拮抗剂发现的

未来趋势。Neogi 等^[37]通过分析 β -catenin 与 TCF4 共结晶结构,根据 Gly13 到 Asp23 相互作用区域设计了一系列 4,7-二取代-8-甲氧基喹啉类化合物,其中化合物 18B (**33**, 结构见图 6) 活性最好,它能显著抑制 HCT116 和 HepG2 细胞的迁移,下调 β -catenin 和 TCF4 蛋白表达以及 cyclin D1 和 c-myc 的 mRNA 水平,并能够抑制原发性人胆囊癌细胞的增殖 ($IC_{50}=8.5 \mu\text{mol/L}$)。

Ahn 等^[38]设计合成的一系列萘黄酮类衍生物,其中 5,6-苯并黄酮 (**34**) 活性较好,剂量依赖性地抑制 SW480 ($IC_{50}=1.2 \mu\text{mol/L}$) 和 HEK293 ($IC_{50}=5 \mu\text{mol/L}$) 细胞的增殖。分子对接结果显示该化合物通过 4 个疏水相互作用 (Tyr306、Val346、Cal349 和 Asn38) 以及 3 个氢键 (Gly307、Lys312 和 Lys345) 结合到 β -catenin/TCF4 复合物上,从而干扰两者的相互作

用。Shin 等^[39]合成了化合物 HI-B1 (**35**), 分子对接分析表明,引入氮原子后增加了化合物与 β -catenin 间的氢键结合,从而干扰 β -catenin/TCF4 的相互作用。人源癌细胞异种移植 (PDX) 动物实验也证明了该化合物的有效性。针对前人发现的化合物溶解性差和代谢不稳定等问题,Dehnhardt 等^[40]设计合成了一系列新型二氨基喹啉类化合物,化合物 **36** 在体外能显著抑制结肠癌细胞的增殖,在体内能够抑制肿瘤的生长,联苯甲酯基团的置换解决了代谢稳定性和溶解性的问题。Mao 等^[41]对该类化合物也进行了改良,对化合物 **36** 的 6-氯烟酰胺基团进行替换,发现 3 个化合物 **37**~**39** 活性最好,体外能够抑制结肠癌细胞的增殖和克隆的形成 ($IC_{50}\approx 100 \text{ nmol/L}$),萤火虫报告基因抑制活性 ($IC_{50}=1.5\sim 2.5 \mu\text{mol/L}$)。

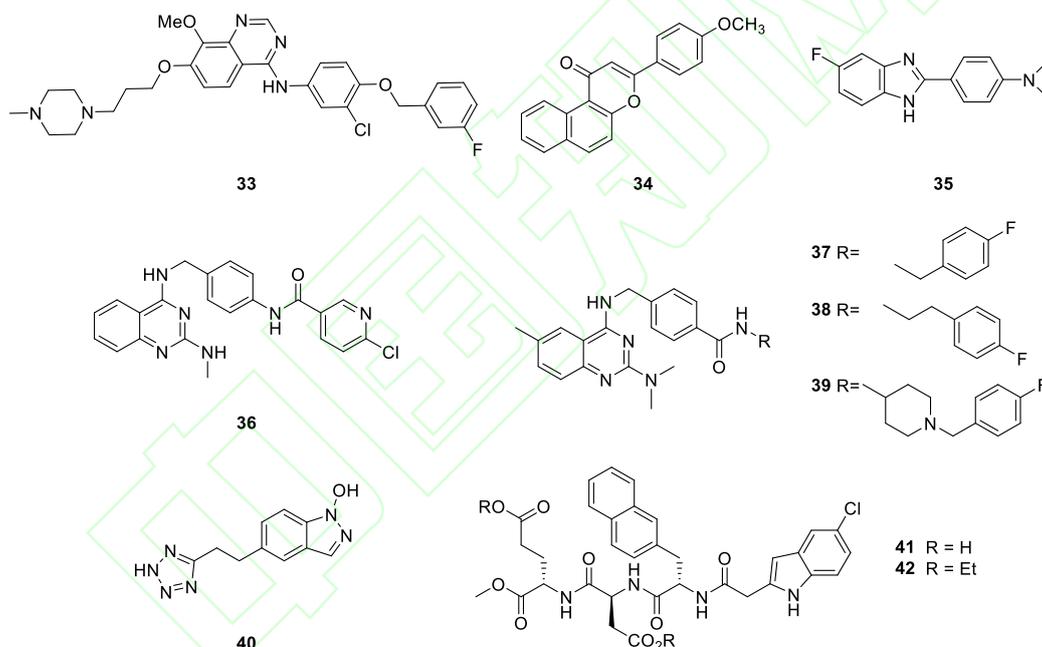


图 6 基于合理药物设计合成获得的 β -catenin/TCF 相互作用拮抗剂的结构

Fig. 6 Structure of β -catenin/TCF interaction antagonist synthesized based on rational drug design

针对相互作用的热点区域 (人源 TCF4 的 D16/E17 与 β -catenin 的 K435、K508、N430 等), 利用生物电子等排体替换策略, 设计与合成了拟肽类化合物, 化合物 **40** 可以与 β -catenin 结合 ($K_d=0.531 \mu\text{mol/L}$), 并竞争性干扰 β -catenin/TCF 相互作用 ($K_i=3.14 \mu\text{mol/L}$)^[42]。同一课题组通过丙氨酸扫描和生化分析等手段发现了一个选择性结合位点“TCF4 G¹³ANDE¹⁷”, 该位点可以选择性干扰 β -catenin/TCF 相互作用, 还可以区分 β -catenin/TCF、 β -catenin/cadherin 和 β -catenin/APC 的相互作用^[43]。进一步设计合成了拟

肽类化合物 **41**, 它与 β -catenin 结合 ($K_d=0.418 \mu\text{mol/L}$), 并竞争性干扰 β -catenin/TCF 相互作用 ($K_i=3.16 \mu\text{mol/L}$), 该化合物是一种选择性干扰 β -catenin/TCF 相互作用的小分子拮抗剂, 化合物 **41** 的乙酯 **42**, 具有良好的细胞膜穿透性, 对结肠癌细胞的抑制活性更高。

3.4 其他方法获得的小分子拮抗剂

LOM612 (**43**, 结构见图 7) 是一种叉头盒 O 蛋白 (Forkhead box O, FOXO) 核质穿梭小分子激活剂和出口蛋白 1 (exportin 1) 抑制剂。体内外活性研究表明^[9], 该化合物能够显著增加乳腺

癌细胞核内 FOXO1 的累积, FOXO1 与细胞核中的 β -catenin 结合, 竞争性减少 β -catenin 与 TCF 的结合, 导致其下游 c-myc 和 cyclin D1 蛋白表达降低, 同时凋亡相关蛋白水平升高, 从而抑制乳腺癌细胞的增殖和迁移, 促进细胞凋亡, 达到抑制肿瘤的生长目的。

Schneider 等^[44]利用 AlphaScreen 和荧光偏振 (fluorescence polarization, FP) 的方法, 寻找对

β -catenin 与 TCF、E-钙黏蛋白或 APC 相互作用的 4 种有活性的化合物 L338192 (44)、R360163 (45)、R999636 (46) 和 T155535 (47), 利用 TOP/FOP 荧光素酶报告基因检测实验证明, 它们都对 β -catenin/TCF4 相互作用具有明显的抑制活性, 且均优于对 β -catenin/APC 的相互作用的抑制。

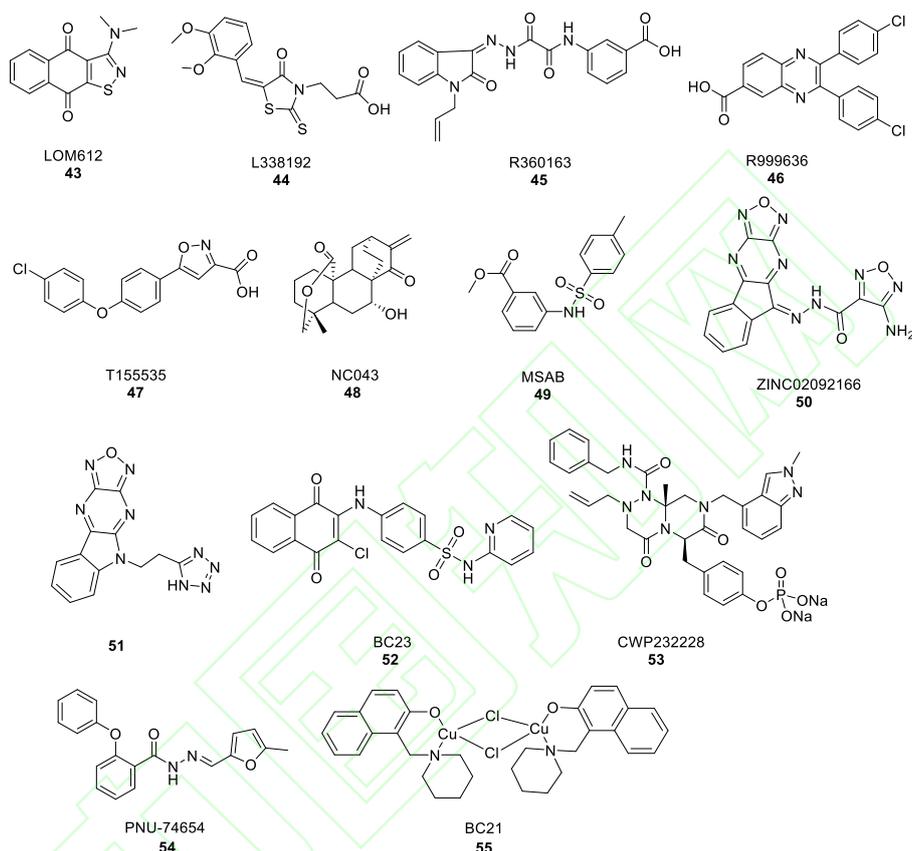


图 7 其他方法获得的小分子拮抗剂

Fig. 7 Small molecule antagonists obtained by other methods

Wang 等^[45]利用荧光素酶报告基因评价方法发现了化合物 NC043 (48), 可选择性抑制 β -catenin/TCF4 相互作用, 不影响 β -catenin 的稳定性和 β -catenin/E-钙黏蛋白的相互作用, 导致结肠癌细胞阻滞在 G2 期, 抑制其增殖。使用同样方法, Hwang 等^[46]筛选出 3-(4-甲基苯基磺酰氨基)苯甲酸甲酯 (MSAB, 49), 其与 β -catenin 结合, 促进其降解, 特异性下调 Wnt 靶基因。通过 AlphaScreen 和 FP 方法, Catrow 等^[13]也发现了新型 β -catenin/TCF 相互作用的小分子拮抗剂 ZINC02092166 (50)。进一步结构改造, 将其四环转变为芳体系, 将酰肼变为酰胺基等, 获得化学稳定性更强的化合物 51, 对 β -catenin/TCF 相互作用的抑制选择性高于 β -catenin 与 E-钙黏蛋白或 APC

的相互作用。

利用 FP 方法, 筛选获得 BC23 (52), 可剂量依赖性地抑制非小细胞肺癌细胞 H1299 的增殖, 抑制 β -catenin/TCF 相互作用, 并下调靶基因 *CYCLIN D1* 和 *C-MYC* 的表达^[47]。

Warrier 等^[48]发现 5-氟尿嘧啶和甲萘醌同时结合用药时, 可以通过破坏 β -catenin 与 TCF 相互作用来阻断 Wnt 信号传导, 抑制结肠癌细胞的增殖, 在结肠癌中发挥着协同抗癌作用。Kim 等^[49]发现 CWP232228 (53) 可拮抗细胞核中 β -catenin 与 TCF 的结合, 抑制 Wnt/ β -catenin 信号传导, 从而降低肝癌干细胞的自我更新能力和体内外的致癌性。

Trosset 等^[50]基于晶体结构“热点”, 用 HyPARE 计算方法从 17700 个化合物库中筛选获得

22个化合物,再结合核磁共振和等温滴定量热(Isothermal Titration Calorimetry, ITC)法进一步筛选出化合物 PNU-74654 (54),它可以竞争性与 β -catenin 结合 ($K_d = 450 \text{ nmol/L}$)。另一个课题组也基于晶体结构“热点”数据,用分子对接(Autodock4)的虚拟筛选方法,从国家癌症研究所(National Cancer Institute, NCI)数据库的1990个化合物中筛选获得了化合物 BC21 (55)^[51],该化合物能够抑制结肠癌细胞增殖和克隆形成,并下调 cyclin D1 和 c-myc 的表达,还可以竞争性干扰 β -catenin 与 TCF4 的结合。

4 结论与展望

靶向 β -catenin/TCF 相互作用的小分子拮抗剂来源广泛,不同来源途径各具优势与局限性。天然来源的拮抗剂,具有结构独特性、多样性、类药性好、生物相容性佳等优势,但也存在资源受限、天然含量低、分离纯化困难、开发周期长等问题;高通量筛选的方法,具有效率高、规模化、自动化、标准化、多模态检测灵活性等优势,但也存在因非特异性结合导致的假阳性问题,或因化合物库的局限性而导致的结构多样性与成药性不足的问题等;而合理药物设计与传统药物筛选具备鲜明特点,随着计算化学、生物信息学和结构生物学等技术不断进展,显著提高了药物发现的精准度和效率,具有靶向性强、成功率较高、节省时间和成本、结构优化更高效、适配难成药的靶点等优势,可能成为未来该靶点新药发现的主要途径。

虽然靶向 β -catenin 与 TCF 相互作用的小分子拮抗剂在癌症治疗领域前景广阔,但至今尚无该靶点的小分子拮抗剂进入临床试验。FOG-001 是首个也是唯一一个进入人体 I/II 期临床试验的靶向 Wnt/ β -catenin 信号通路的多肽药物,有潜力成为针对 β -catenin/TCF 通路的第一类抑制剂。但是,针对该靶点的小分子拮抗剂研发相对比较滞后,在研究中面临的主要挑战包括:(1)分子界面的复杂性及选择性问题: β -catenin 与 TCF 的相互作用界面大而平坦,缺乏传统小分子易于结合的活性口袋,小分子药物常常难以精确契合于结合位点处,难以有效的阻断其相互作用,无法满足临床实验对药物有效性和安全性的要求;(2)作用机制复杂: β -catenin 与 TCF 相互作用在细胞内涉及多个信号通路和蛋白质相互作用,这使得设计高选择性和高效的小分子抑制剂变得非常复杂和具有挑战性;(3)

缺乏有效递送系统: β -catenin 与 TCF 的相互作用位于细胞核内,如何将小分子拮抗剂递送到目标蛋白并保持其活性,是个需要解决的挑战。(4)耐药机制:长期治疗可能导致肿瘤通过突变 β -catenin/TCF 复合物或激活替代通路(如 YAP/TAZ)产生耐药性。

笔者认为,针对上述挑战的应对策略,或针对该靶点的小分子拮抗剂的未来发展方向有如下几点:(1)人工智能(AI)辅助:利用 AI 和深度学习预测结合位点或优化化合物库筛选策略。(2)多靶点协同调控: β -catenin/TCF 信号通路与多种其他信号通路相互交织,如 PI3K-AKT-mTOR 通路,通过多靶点联合治疗可系统性阻断信号通路,增强疗效并降低耐药风险。在动物模型中,多靶点联合治疗也显示出更好的抗肿瘤效果。以黑色素瘤小鼠模型为例,联合使用针对 β -catenin/TCF 靶点的抑制剂和免疫检查点抑制剂,不仅能够减小肿瘤体积,还能延长小鼠的生存期,其效果明显优于单一药物治疗^[52]。(3)深入研究 β -catenin 的入核过程,挖掘该过程中的潜在分子靶标和作用机制,并开发新型递送系统,既抑制 β -catenin 入核,又阻断 β -catenin 介导的转录调控复合体的形成,也将是高选择性 Wnt 抑制剂发展的重要方向之一。(4) β -catenin/TCF 抑制剂的开发需要跨学科合作,结合结构生物学、计算化学和临床医学,以克服现有挑战并推动转化应用。

参考文献:

- [1] FANG L, ZHU Q, NEUENSCHWANDER M, et al. A small-molecule antagonist of the β -catenin/TCF4 interaction blocks the self-renewal of cancer stem cells and suppresses tumorigenesis [J]. Cancer research, 2016, 76(4): 891-901.
- [2] LIU J, XIAO Q, XIAO J, et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities [J]. Signal transduction and targeted therapy, 2022, 7(1): 3.
- [3] FRÖHLICH J, ROSE K, HECHT A. Transcriptional activity mediated by β -CATENIN and TCF/LEF family members is completely dispensable for survival and propagation of multiple human colorectal cancer cell lines [J]. Scientific reports, 2023, 13(1): 287.
- [4] DIMITRIADIS A, VINCAN E, MOHAMMED I M. Expression of Wnt genes in human colon cancers[J]. Cancer letters, 2001, 166(2): 185-191
- [5] XIANG Z, WANG Y, MA X, et al. Targeting the notch2/adam10/tcf712 axis-mediated transcriptional

- regulation of wnt pathway suppresses tumor growth and enhances chemosensitivity in colorectal cancer [J]. *Advanced science*, 2025, 12(3): e2405758.
- [6] MA S, MENG G, LIU T, et al. The wnt signaling pathway in hepatocellular carcinoma: regulatory mechanisms and therapeutic prospects [J]. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 2024, 180: 117508.
- [7] XU X, ZHANG M, XU F, et al. Wnt signaling in breast cancer: biological mechanisms, challenges and opportunities [J]. *Molecular cancer*, 2020, 19(1): 165.
- [8] HAYAT R, MANZOOR M, HUSSAIN A. Wnt signaling pathway: a comprehensive review [J]. *Cell biology international*, 2022, 46(6): 863-877.
- [9] XU S, SHI Y, LI S. Enhanced anticancer synergy of LOM612 in combination with selinexor: FOXO1 nuclear translocation-mediated inhibition of Wnt/ β -catenin signaling pathway in breast cancer [J]. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 2024, 93(3): 191-202.
- [10] XU Y, YU Y, YAN R, et al. Modulating beta-catenin homeostasis for cancer therapy [J]. *Trends cancer*, 2024, 10(6): 507-518.
- [11] XING Y, TAKEMARU K, LIU J, et al. Crystal structure of a full-length beta-catenin [J]. *Structure*, 2008, 16(3): 478-487.
- [12] YANG P, ZHU Y, ZHENG Q, et al. Recent advances of beta-catenin small molecule inhibitors for cancer therapy: Current development and future perspectives [J]. *European journal of medicinal chemistry*, 2022, 243: 114789.
- [13] CATROW J L, ZHANG Y, ZHANG M, et al. Discovery of selective small-molecule inhibitors for the β -catenin/T-cell factor protein-protein interaction through the optimization of the acyl hydrazone moiety [J]. *Journal of biological chemistry*, 2015, 58(11): 4678-4692.
- [14] FASOLINI M, WU X, FLOCCO M, et al. Hot spots in Tcf4 for the interaction with beta-catenin [J]. *Journal of biological chemistry*, 2003, 278(23): 21092-821098.
- [15] LI Y, WANG X, HUANG M, et al. Bmp suppresses wnt signaling via the bcl11b-regulated nurd complex to maintain intestinal stem cells [J]. *EMBO Journal*, 2024, 43(23): 6032-6051.
- [16] CHEN W, WANG J, LIU S, et al. MicroRNA-361-3p suppresses tumor cell proliferation and metastasis by directly targeting sh2b1 in nscL [J]. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 2016, 35: 76.
- [17] GUO Y, TIAN J, GUO Y, et al. Oncogenic kras effector uspl3 promotes metastasis in non-small cell lung cancer through deubiquitinating beta-catenin [J]. *Cell reports*, 2023, 42(12): 113511.
- [18] HUANG L J, LAN J X, WANG J H, et al. Bioactivity and mechanism of action of sanguinarine and its derivatives in the past 10 years [J]. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 2024, 173: 116406.
- [19] YANG J, FANG Z, WU J, et al. Construction and application of a lung cancer stem cell model: antitumor drug screening and molecular mechanism of the inhibitory effects of sanguinarine [J]. *Tumor-biology*, 2016, 37(10): 13871-13883.
- [20] CHEN Y, FU Z, LI D, et al. Optimizations of a novel fluorescence polarization-based high-throughput screening assay for β -catenin/lef1 interaction inhibitors [J]. *Analytical biochemistry*, 2021, 612: 113966.
- [21] LIU C, LI X, PU J, et al. Henryrin, an ent-kaurane diterpenoid, inhibits Wnt signaling through interference with β -catenin/TCF4 interaction in colorectal cancer cells [J]. *PLOS ONE*, 2013, 8(7): e68525.
- [22] LI X, OHTSUKI T, KOYANO T, et al. New Wnt/ β -catenin signaling inhibitors isolated from eleutherine palmifolia [J]. *Chemistry-an Asian journal*, 2009, 4(4): 540-547.
- [23] PARK H Y, TOUME K, ARAI M A, et al. Calotropin: A cardenolide from calotropis gigantea that inhibits Wnt signaling by increasing casein kinase 1 α in colon cancer cells [J]. *ChemBioChem*, 2014, 15(6): 872-878.
- [24] FUENTES R G, TOUME K, ARAI M A, et al. Scopadulciol, isolated from scoparia dulcis, induces β -catenin degradation and overcomes tumor necrosis factor-related apoptosis ligand resistance in ags human gastric adenocarcinoma cells [J]. *Journal of natural products*, 2015, 78(4): 864-872.
- [25] TOUME K, KAMIYA K, ARAI MA, et al. Xylogranin B: a potent Wnt signal inhibitory limonoid from *Xylocarpus granatum* [J]. *Organic letters*, 2013, 15(23): 6106-6109.
- [26] SHONO T, ISHIKAWA N, TOUME K, et al. Boehmenan, a lignan from hibiscus ficulneus, showed Wnt signal inhibitory activity [J]. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 2015, 25(14): 2735-2738.
- [27] SHONO T, ISHIKAWA N, TOUME K, et al. Cerasoidine, a bis-aporphine alkaloid isolated from polyalthia cerasoides during screening for Wnt signal inhibitors [J]. *J Natural product research*, 2016, 79(8): 2083-2088.

- [28] ZHU X, YUAN C, TIAN C, et al. The plant sesquiterpene lactone parthenolide inhibits Wnt/ β -catenin signaling by blocking synthesis of the transcriptional regulators TCF4/LEF1[J]. *Journal of biological chemistry*, 2018, 293(14): 5335-5344.
- [29] PARK C H, HAHM E R, PARK S, et al. The inhibitory mechanism of curcumin and its derivative against β -catenin/Tcf signaling [J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(13): 2965-2971.
- [30] PARK S, CHOI J. Inhibition of β -catenin/Tcf signaling by flavonoids [J]. *Journal of cellular biochemistry*, 2010, 110(6): 1376-1385.
- [31] SPIVACK K, MUZZELO C, HALL M, et al. Enhancement of transgene expression by the beta-catenin inhibitor icrt14[J]. *Plasmid*, 2021, 114: 102556.
- [32] GONSALVES F C, KLEIN K, CARSON B B, et al. An rnai-based chemical genetic screen identifies three small-molecule inhibitors of the Wnt/wingless signaling pathway [J]. *Proceedings of the national academy of sciences USA*, 2011, 108(15): 5954-5963.
- [33] LEPOURCELET M, CHEN Y N, FRANCE D S, et al. Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/ β -catenin protein complex [J]. *Cancer cell*, 2004, 5(1): 91-102.
- [34] WEI W, CHUA M S, GREPPER S, et al. Small molecule antagonists of Tcf4/ β -catenin complex inhibit the growth of hcc cells in vitro and in vivo [J]. *International journal of cancer*, 2010, 126(10): 2426-2436.
- [35] GAO Y, FAN S, ZHAO P, et al. β -catenin/TCF4 inhibitors ICG-001 and LF3 alleviate bdl-induced liver fibrosis by suppressing LECT2 signaling [J]. *Chemico-biological interactions*, 2023, 371: 110350.
- [36] EWAN K, PAJAK B, STUBBS M, et al. A useful approach to identify novel small-molecule inhibitors of Wnt-dependent transcription [J]. *Cancer research*, 2010, 70(14): 5963-5973.
- [37] NEOGI K, MURUMKAR P R, SHARMA P, et al. Design, synthesis and evaluation of 4,7-disubstituted 8-methoxyquinazoline derivatives as potential cytotoxic agents targeting β -catenin/TCF4 signaling pathway[J]. *Translational oncology*, 2022, 19: 101395.
- [38] AHN S, AHN E, SUNG J, et al. Synthetic polyphenol compounds inhibit β -catenin/Tcf signaling: Structure-activity relationship [J]. *Journal of industrial and engineering chemistry*, 2017, 56: 258-269.
- [39] SHIN S H, LIM D Y, REDDY K, et al. A small molecule inhibitor of the β -catenin-TCF4 interaction suppresses colorectal cancer growth in vitro and in vivo[J]. *EBioMedicine*, 2017, 25: 22-31.
- [40] DEHNHARDT C M, VENKATESAN A M, CHEN Z, et al. Design and synthesis of novel diaminoquinazolines with in vivo efficacy for β -catenin/T-cell transcriptional factor 4 pathway inhibition [J]. *Journal of medicinal chemistry*, 2009, 53(2): 897-910.
- [41] MAO Y, LIN N, TIAN W, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of new diaminoquinazolines as β -catenin/Tcf4 pathway inhibitors[J]. *Journal of medicinal chemistry*, 2012, 55(3): 1346-1359.
- [42] YU B, HUANG Z, ZHANG M, et al. Rational design of small-molecule inhibitors for β -catenin/T-cell factor protein-protein interactions by bioisostere replacement[J]. *ACS Chemical biology*, 2013, 8(3): 524-529.
- [43] HUANG Z, ZHANG M, BURTON S D, et al. Targeting the Tcf4 G13ANDE17 binding site to selectively disrupt β -catenin/T-cell factor protein-protein interactions [J]. *ACS Chemical biology*, 2014, 9(1): 193-201.
- [44] SCHNEIDER J A, CRAVEN T W, KASPER A C, et al. Design of peptoid-peptide macrocycles to inhibit the β -catenin TCF interaction in prostate cancer [J]. *Nature communications*, 2018, 9(1): 4396.
- [45] WANG W, LIU H, WANG S, et al. A diterpenoid derivative 15-oxospiramilactone inhibits Wnt/ β -catenin signaling and colon cancer cell tumorigenesis [J]. *Cell research*, 2011, 21(5): 730-740.
- [46] HWANG S Y, DENG X, BYUN S, et al. Direct targeting of β -catenin by a small molecule stimulates proteasomal degradation and suppresses oncogenic Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Cell reports*, 2016, 16(1): 28-36.
- [47] LIU C, ZHANG Q, GAO M, et al. Enhancement of radiation sensitivity in lung cancer cells by a novel small molecule inhibitor that targets the β -catenin/Tcf4 interaction [J]. *PLOS ONE*, 2016, 11(3): e0152407.
- [48] WARRIER V P, VENKATACHALAM S, SAKTHIVEL R, et al. Combinatorial effects of 5-fluorouracil and menadione on Wnt/beta-catenin pathway in human colorectal cancer cells [J]. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2025, 197(2): 1280-1300.
- [49] KIM J Y, LEE H Y, PARK K K, et al. CWP232228 targets liver cancer stem cells through Wnt/ β -catenin signaling: a novel therapeutic approach for liver cancer treatment [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(15): 20395-20409.
- [50] TROSSET J Y, DALVIT C, KNAPP S, et al. Inhibition of protein-protein interactions: the discovery of druglike beta-

- catenin inhibitors by combining virtual and biophysical screening [J]. *Proteins*, 2006, 64(1): 60-67.
- [51] TIAN W, HAN X, YAN M, et al. Structure-based discovery of a novel inhibitor targeting the β -catenin/Tcf4 interaction [J]. *Biochemistry*, 2012, 51(2): 724-731.
- [52] WAALER J, MYGLAND L, TVEITA A, et al. Tankyrase inhibition sensitizes melanoma to PD-1 immune checkpoint blockade in syngeneic mouse models[J]. *Communications biology*, 2020, 3(1): 196.

