

参赛队员姓名：于昊飞

中学：北京市鼎石学校

省份：北京市

国家/地区：中华人民共和国

指导教师姓名：李琪

指导教师工作单位：加拿大多伦多病童医院

论文题目：SYK突变导致的免疫失调和系统性炎症的药物筛选

2021 S.-T. Yau High School Science Award

摘要

免疫系统作为人体的防御系统对于健康是至关重要的。免疫系统功能失活或过度激活都将影响人体健康。有数以千万计的人受到免疫系统异常的影响，其中大部分患者虽展现出较轻的病症，然而这些病症也在一定程度上影响着他们的生活。例如每年秋天我就会受到过敏这一免疫疾病的影响，这给我的外出带来了诸多不便。而严重的病人甚至受到生命威胁。在诸多导致免疫失调的原因中，单基因突变所致的免疫失调是最严重的，同时单基因也是很好的疾病研究模型。例如 2021 年的一篇研究报道，病人携带脾酪氨酸激酶 (Spleen Tyrosine Kinase, SYK) 突变，全身免疫系统受到损害导致很严重的免疫病，其中包括重症炎症性肠病和关节炎等[1]。根据以往研究，携带 SYK 突变体的患者在出生后几周就会展现出免疫失调，包括发烧、全身出疹、无血性腹泻、慢性肠道溃疡和炎症性关节炎等病症。然而现在医学界还没有好的针对 SYK 基因突变患者的治疗方法[2]。

SYK 致病方面的研究大部分集中在调控 B 细胞增殖、分化和存活的方面。促分裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPKs) 信号通路是免疫信号通路中的重要部分，它是受到 SYK 基因调控的。而 MAPK 下游重要的细胞外信号调节激酶这一通路 (extracellular-regulated protein kinases pathway, ERK pathway) 和 c-Jun N-末端激酶通路 (c-Jun N-terminal kinase pathway, JNK pathway) 在调控人体免疫平衡中起到重要作用。当磷酸化 SYK (pSYK) 水平在 SYK 突变细胞中大幅上升就会过度激活细胞内的 ERK 和 JNK 信号通路，从而产生大量炎症因子和异常的细胞凋亡[3][4]。以 SYK 为切入点，我们希望探索并为免疫疾病提供新的治疗方案。首先，我们在 SYK 突变敲入小鼠 (Knock-in) 的大肠切片免疫荧光染色实验中，验证了 SYK 单基因突变位点增强了磷酸化 SYK 的表达。然后我们建立了 SYK 突变的过量表达细胞模型，进一步在细胞水平验证了四个 SYK 点突变过度的 SYK 磷酸化。我们利用这个细胞模型，通过高通量筛药鉴别到 8 种被 FDA 批准药物对磷酸化 SYK 有不同程度的抑制作用。为了进一步验证这几种药物对 SYK 突变的影响，我们在过量表达的细胞水平测定了磷酸化 SYK、ERK、JNK 在不同药物处理下的激活状态，携带突变体 Ser550Thr 或 Ser550Phe 的细胞的 SYK 过度磷酸化被不同药物在不同程度上抑制。同时，我们还在小鼠 SYK 突变基因敲入模型中测定了不同药物对磷酸化

SYK 的抑制作用。我们的研究表明苯二氮（Benzodiazepine, BCDs）可能治疗 SYK 突变的病人有一定作用。为免疫疾病的治疗提供了新的思路。

关键词：免疫疾病、SYK 突变、SYK 磷酸化、ERK 信号通路、JNK 信号通路、苯二氮、福坦替尼

Abstract

The immune system is vital to health as the body's defense system. Immune system dysfunction arising from different factors affects human health to various degrees. Tens of millions of people are affected by immune system abnormalities, with most presenting milder symptoms that nonetheless impact their lives to some extent. For example, every fall I suffer from seasonal allergy, which brings a lot of inconvenience to my life. Severe cases of immune dysfunction can even be life-threatening.

Among many causes of immune disorders, single gene mutations cause the most serious forms of immune disorders, while also presenting a good model for disease research. An example is a recent report of a mutation of Spleen Tyrosine Kinase (SYK) causing damage to the immune system of patients, leading to severe immune diseases such as severe inflammatory bowel disease and arthritis [1]. According to previous studies, patients with the SYK mutation develop immune disorders in the first few weeks of life, including fever, rash, bloody diarrhea, chronic intestinal ulcers and inflammatory arthritis. However, there is currently no good treatment for patients with SYK mutations [2].

Studies on the mechanism of SYK mainly focus on immune-related signaling pathways and the regulation of B cell proliferation, differentiation and survival. For example, the mitogen-activated protein kinase (MAPKs) signaling pathway is regulated by SYK. The downstream signaling pathways of MAPK, extracellular regulated protein kinases pathway (ERK Pathway), and C-Jun N-terminal kinase pathway (JNK Pathway), play important roles in regulating human immune hemostasis. A significant increase in phosphorylated SYK (pSYK) levels in SYK mutated cells leads to over-activation of ERK and JNK signaling pathways, resulting in a large number of inflammatory factors and abnormal cell apoptosis [3] [4].

With SYK as the entry point, we aim in this paper to explore and present new treatment ideas for immune diseases. First, we verified that the SYK single gene mutation site enhanced

the expression of phosphorylated SYK through immunofluorescence staining experiment of large intestine sections of knock-in mice with SYK mutation. We then established an SYK mutation overexpression cell model, and further verified at the cellular level that SYK phosphorylation was enhanced at four SYK point mutations. Using this cellular model, we identified 8 FDA-approved drugs with varying degrees of inhibition of phosphorylated SYK levels through high-throughput screening. In order to further verify the influence of these drugs on SYK mutation, we measured the activation states of phosphorylated SYK, ERK and JNK under the stimulation of different drugs at the level of overexpressed cells, and over-phosphorylation of SYK in cells carrying mutant S550Thr or S550TPhe was inhibited by different drugs to varying degrees. At the same time, we also measured the inhibition of different drugs on phosphorylated SYK in the mouse SYK mutant knock-in model. Our study suggests that Benzodiazepine may play a role in the treatment of patients with SYK mutations, presenting a new idea for the treatment of immune diseases.

Key words: immune diseases, SYK mutation, SYK phosphorylation, ERK signaling pathway, JNK signaling pathway, benzodiazepines, fostamatinib

目录

1、研究背景和研究思路	6
1.1 免疫与免疫疾病	6
1.2 SYK 基因突变导致的严重免疫缺陷	6
1.3 研究思路	8
2、研究方法	9
2.1 贴壁细胞培养 (adherent cell culture)	9
2.2 细胞转染 (cell transfection)	9
2.4 高通量筛药	9
2.5 定量聚合酶链反应 (qPCR)	10
2.6 免疫印迹/蛋白印迹实验 (Western Blot)	11
2.7 ELISA 实验 (Enzyme Linked Immunosorbent)	12
2.8 免疫荧光实验 (immunofluorescent)	12
3、研究结果	13
3.1 SYK 筛药模型鉴定	13
3.2 抑制磷酸化 SYK 药物筛选	14
3.3 苯二氮、福坦替尼、塞来昔布在 HEK293 细胞中深入鉴定	18
3.4 苯二氮、福坦替尼、塞来昔布在 SYK knock-in 小鼠结肠细胞中的鉴定	22
4、总结	23
5、致谢	23
引用文献	24

1、研究背景和研究思路

1.1 免疫与免疫疾病

免疫系统是通过产生免疫反应来保护身体的细胞和组织免受外来物质侵害的身体防御系统。皮肤和粘膜可物理隔绝病原体（导致疾病的生物或病毒），组成了人体最外层的免疫屏障。深入到细胞层面，先天免疫细胞上的 Toll 样受体在识别病原体中的分子结构之后将诱导一系列免疫反应，如吞噬作用等，并激活后天免疫系统。T 细胞和 B 细胞是后天免疫系统的重要部分，它们的抗原受体会与病原体上的抗原（病原体的一部分）相互结合。辅助 T 细胞被激活后释放一系列细胞因子，然后激活细胞毒性 T 细胞与 B 细胞。其中，毒性 T 细胞的作用是释放特定蛋白，杀死被感染的细胞，而 B 细胞会增殖分化成记忆 B 细胞、浆细胞，浆细胞最终产生免疫球蛋白（抗体）。因此，免疫系统为人体提供的重要防御措施——一方面，抗体通过与病原体结合让其更容易被免疫细胞识别或将其中和；另一方面，记忆 B 细胞可在体内存活很长时间，让人体再次被感染时可产生相应抗体[5]。

免疫系统失调无疑会导致一系列疾病。一方面，免疫系统的功能降低后人体便无法有效的抗击病原体，从而让病人更容易被病原体感染。而另一方面，免疫系统的过度激活也会导致自身免疫疾病，例如人们所熟悉的炎症性关节炎（Inflammatory arthritis, IA）、红斑狼疮（lupus erythematosus）以及炎症性肠病（inflammatory bowel disease, IBD）等。在炎症性关节炎中，过度激活的免疫系统将会无差别的攻击病原体和自身关节处的细胞导致炎症，使得关节疼痛和僵硬[6]。红斑狼疮也是因为过度激活的免疫细胞攻击自身的肾、皮肤、心脏和肺导致的严重免疫疾病，如发烧、全身不适、关节痛、肌痛、头痛等病症[7]。

1.2 SYK 基因突变导致的严重免疫缺陷

脾酪氨酸激酶（spleen tyrosine kinase, SYK）是免疫系统中的重要功能基因，它的突变是诱导系统失调和全身性炎症的原因[1]。其中最具代表性的突变点为 SYK-S550Thr 和 SYK-S550TPhe。研究发现 6 位有 SYK 突变的病人都患有严重的炎症性肠病（以下用 IBD 表

示)、关节炎,导致全身免疫系统受损[2]。这项研究中还建立了SYK-Ser544Tyr(人源Ser550Tyr突变点)的老鼠knock-in模型,与病人的症状几乎完全相似,更说明了SYK基因在免疫、炎症中的关键作用。

炎症性肠病是发生在结肠和小肠中的炎症的统称。是一种重要的免疫疾病。一般有肠道炎症、组织损伤、腹痛、频繁腹泻、体重持续降低、直肠出血等病症[8]。免疫系统被病态激活也是导致IBD的主要因素。过度激活的免疫系统使免疫细胞处于持续激活状态,并攻击患者自身的肠道细胞,进而引发炎症。同时,免疫系统过度激活也可以导致过多的免疫细胞从固有层中渗透到肠道中而引发炎症。炎症使得细胞因子过度释放,从而导致下游炎症信号通路的过度激活[9][10]。

SYK在免疫系统的具体功能在以往的研究中显示,是与调控B细胞的增殖分化及存活相关的。SYK与B细胞上的受体(B cell receptor, BCR)结合后启动BCR, BCR将信号传递下去,例如NF- κ B信号通路(调控细胞因子); ARP2/3信号通路(调控肌动蛋白细胞骨架重塑); 调控增殖和分化的MAPK信号通路等[5]。

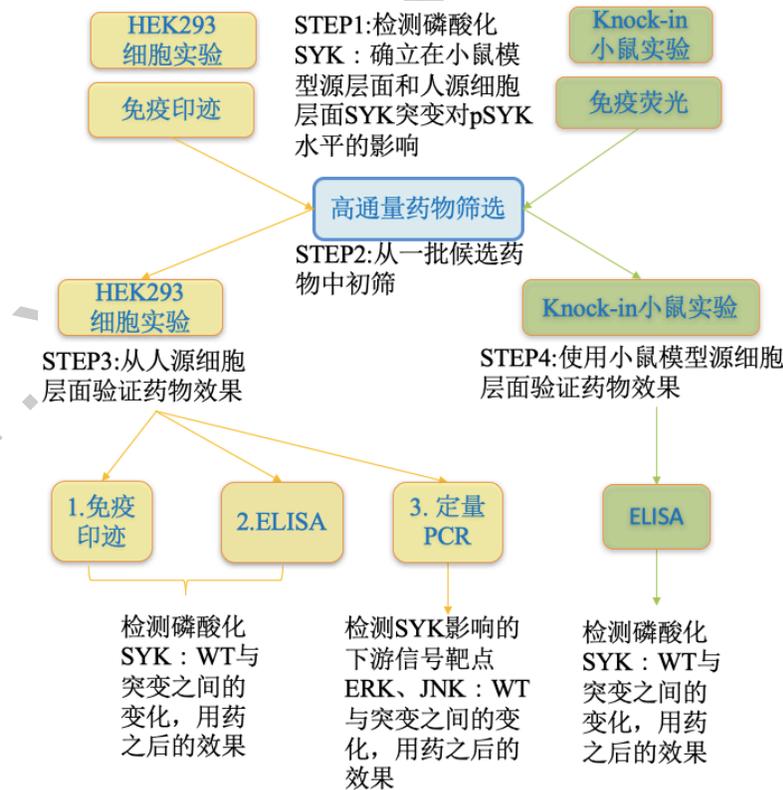
促分裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPKs)是对一系列蛋白质丝氨酸、苏氨酸激酶的统称,这类酶通过磷酸化丝氨酸和苏氨酸上的羟基(OH基团)来触发细胞中的一系列活动。促分裂原激活蛋白激酶在三个不同的信号通路中有重要功能:一是细胞外信号调节激酶信号通路(extracellular-regulated protein kinases pathway, ERK pathway),二是c-Jun N-末端激酶通路(c-Jun N-terminal kinase pathway, JNK pathway),三是p38通路[11]。

首先, ERK信号通路和许多免疫活动相关。T细胞的激活、细胞增殖分化发育和肿瘤形成都被证实受到ERK信号通路调控。生长因子和荷尔蒙等可以在不同程度上激活ERK信号通路。ERK信号通路中起到重要作用的酶为ERK1/2、MEK1/2以及激酶RAF1[10]。其次, MAPKs也在JNK信号通路中起到关键作用。上述的细胞增殖凋亡、胚胎发育、细胞因子的生产和炎症的发生都和JNK信号通路息息相关。根据目前的研究,炎症细胞因子、生长因子和环境压,如DNA损坏,环境中的离子、热量、辐射和氧化压力都是JNK信号通路的激活物。JNK信号通路中起到重要作用的酶为JNK1/2/3和MEK4/7[11]。因为SYK是

MAPK信号通路上游的重要激酶，所以SYK的表达异常很有可能将导致MAPK信号通路的表达异常，从而影响细胞正常的增值，发育和分化的活动以及影响炎症因子的生产并最终导致炎症。研究显示 SYK的抑制物：福坦替尼（Fostamatinib）可能能够缓解SYK突变所导致的一些病症，如B细胞导致的炎症和关节炎等。福坦替尼是被美国FDA批准的第一款靶点在SYK的特异性抑制剂，它用于治疗紫茜合剂对慢性免疫性血小板减少症（Chronic immune thrombocytopenia, ITP）。ITP是免疫系统功能紊乱所致的血小板减少的一种病症，患者的黏膜、皮肤出血，严重时会有胃肠道、泌尿生殖系统或颅内出血的反应。由于该病症与SYK的突变有所联系，所以福坦替尼的使用可以较为有效的帮助病人缓解以上病症[11]。

1.3 研究思路

为了更好的发掘新的免疫疾病治疗方案，SYK 被我们认为是一个很好的突破点。我们以 SYK 为中心点，利用磷酸化 SYK 在细胞与 Ser544Thr 老鼠敲入模型中的重要改变，筛选更多候选药物，以希望在未来能帮助携带 SYK 突变的病人缓解症状。



2、研究方法

2.1 贴壁细胞培养 (adherent cell culture)

3.1.2 培养基配方：DMEM 高葡萄糖溶液中加入 10%FBS、0.1mM 的氨基酸、10mM 的 HEPES 缓冲液，再加入 2 μ l 的左旋谷酰胺和 100U/ml 的青霉素或链霉素。

3.1.3 细胞传代步骤：用胰蛋白酶消化 293T 细胞，接用离心机分离细胞（转速 1000 转/分 x5 分钟）。倒掉上层清液，将细胞的颗粒状物放入培养基中重悬，留其中一部分在新的 T-75 细胞瓶中继续培养，根据实验需要均匀传入六孔板或 12 孔板等。剩下细胞放到 37°C、CO₂ 水平 5% 的培养箱中作为种子培养。

2.2 细胞转染 (cell transfection)

将细胞接种进 6 孔板 20 小时后，配置溶液（每孔）：

溶液一	240 μ l 无血清培养基	10 μ l 脂质体
溶液二	240 μ l 无血清培养基	4 μ l 质粒

将两种溶液混合后在室温停放 20 分钟后将每个空中加入 500 μ l 混合液。在培养箱中培养 24 小时。

2.3 小鼠解剖和取样

用手抓住小鼠尾巴后按压小鼠，用力拉小鼠尾部使其脱颈。使小鼠腹部朝上并纵向剪开小鼠腹部。使用手术刀切下肠道组织；用镊子将组织放入冰的 PBS 中，在 PBS 中将组织切成条状并放入冰上的 1.5ml 离心管。

2.4 高通量筛药

我们使用了 Promega 公司的试剂盒 ADP-Glo 进行了高通量筛药。我们检测了不同药物对携带 SYK 突变体 (Ser550Tyr) 的 HEK 细胞中磷酸化 SYK 水平的影响。

2.5 定量聚合酶链反应 (qPCR)

3.5.1 qPCR 引物设计: 引物需包含和模板序列部分相同的序列 (3'端的一段序列于模板 DNA 完全相同。设计引物有以下注意事项: 引物为 18-24 个碱基长、40-60% G/C 含量、序列的收尾含有 1-2 个 G/C 碱基对、融化温度为 50-60 摄氏度、引物不能有互补区域。

3.5.2 引物设计结果:

ERK1

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTCATCGGCATCCGAGACAT	Plus	20	298	317	59.97	55.00	8.00	3.00
Reverse primer	CCGTCGGGTCATAGTACTGC	Minus	20	1012	993	59.97	60.00	6.00	2.00
Product length	715								

JNK1

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CAGCCCTCTCCTTTAGGTGC	Plus	20	1317	1336	60.11	60.00	4.00	2.00
Reverse primer	AGGCTGGGAAGCTGGAAATC	Minus	20	3242	3223	60.03	55.00	4.00	2.00
Product length	1926								

SYK1

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CGCGTTAAGGAAGTTGCCCA	Plus	20	164	183	61.23	55.00	4.00	2.00
Reverse primer	GTGTTCCCCGTAACCTCCTC	Minus	20	361	342	59.75	60.00	4.00	0.00
Product length	198								

3.5.3 荧光定量 PCR 实验过程: 混合 SYBR Green Master Mix (2X), 模板 DNA 和引物。根据下图计算每种物质的体积:

成分	终浓度 H ₂ O/体积
H ₂ O	使最终体积在 20 μl-10μl 之间
qPCR master mix	1X
正向引物	200nM
反向引物	200nM
模板 DNA	<20ng

然后将混合液转移到 PCR 管中并将其进行短时间的离心 (4000 rpm, 10 秒) 将 PCR 管放入 PCR 仪中, 设定 PCR 仪上的参数和循环模式如下:

步骤 1: 20 秒-30 秒的 95 摄氏度酶活化;

步骤 2: 1-3 秒的 95 摄氏度升温变性;

步骤 3: 大于等于 20 秒的 60 摄氏度退火;

步骤 4: 将步骤 2 和 3 重复 40 循环。

2.6 免疫印迹/蛋白印迹实验 (Western Blot)

3.6.1 准备细胞裂解液: 将细胞置于冰上并用 PBS 冲洗。抽出磷酸盐缓冲盐水并加入 1ml 1xTirs-HCl 裂解缓冲液。收集细胞到离心管中停放 30 分钟。在四度下进行 20 分钟, 12000 转速的离心。

将离心管置于冰上冰上并将上清抑制新的试管中, 丢弃沉淀物。

3.6.2 准备组织裂解液: 将组织在冰上切细放入离心管中并在离心管中加入 5 粒直径 5mm 的玻璃珠 (帮助物理裂解)。加入 100 μ l 0.1% triton, 80 μ l 蛋白酶抑制剂和 900 μ l RIPA 裂解液, 然后冰上放置 20 分钟。

3.6.3 样本准备: 将 10 μ l 样品加入 EP 管中并加入 2 μ l loading buffer, 将样品加热到 95 摄氏度并持续 5 分钟。

3.6.4 点样: 在胶内侧加满 1xSDS running buffer。将 SDS running buffer 加到外侧的 1/3。在孔位中加入 10 μ l 蛋白 marker 和样品并开始跑胶。

3.6.5 湿转膜: 该图所示将海绵, 滤纸, 胶, NC 膜以及夹子排列:



然后再转膜液 (700ml 去离子水, 200ml 甲醇, 100ml 10x 电转液) 中转膜: 电压设为 80V 转膜 (1kDa 对应 1 分钟)。

3.6.6 抗体染色: 室温 30rpm 摇 1 小时。加入 10 μ l 1 抗在摇床上过夜 4 度 30rpm。倒掉牛奶, 用 1xTBST 冲洗 3 此膜, 每次 5 分钟。加入 10ml 2%牛奶以及 10 μ l 二抗, 在室温摇

床上 30rpm 1 小时。倒掉牛奶，用 1xTBST 冲洗 3 此膜，每次 5 分钟。最后在显影仪下观察结果。

2.7 ELISA 实验 (Enzyme Linked Immunosorbent)

在将质粒转染至 HEK 细胞 24-48 小时后，通过 ELISA 测定磷酸化 SYK 水平。用胰蛋白酶消化 HEK293 细胞，吸入 15 毫升离心管中离心 (1500rpm, 4 摄氏度离心 10 分钟)。在聚氯乙炔 24 孔板中的每个孔位中加入 5 ml 一号抗体溶液，抗体在 1XPBS 溶液中的浓度为 20g/ml。4 度冰箱过夜。第二天使用 PBS 将加入抗体的孔位润洗 2 次。配置成分为 3%PBS 和 0.02%叠氮化钠的溶液，室温下静置 2 小时。用 PBS 润洗 2 次并在每个孔位中加入 50 μ l 一号抗体溶液并在室温下静置 2 小时。接着用 PBS 润洗 4 次然后加入 50 μ l 2 号抗体在室温下静置 2 小时。然后用 PBS 再洗 2 次后加入蛋白样品在室温下放置 1 小时。用酶标仪检测 450nm 波长。

2.8 免疫荧光实验 (immunofluorescent)

将玻片在聚乙烯亚胺中室温浸没 1 小时，然后用去离子水润洗玻片，在玻片完全干燥后将其置于紫外灯灭菌 4 小时。接种的细胞用 1XPBS 冲洗有细胞的玻片将细胞无水甲醇中培养 5 分钟，将细胞浸没在含有 4%多聚甲醛溶液的 PBS 中 10 分钟。使用 PBS 冲洗 3 次细胞，将细胞浸没在 PBS (含有 0.5%聚乙二醇辛基苯基醚) 中 10 分钟。吸出残留用 PBS 每次五分钟清洗两次。将样品置于含有 10%抗体的 PBS 中孵育 30 分钟，而后吸出并加入 3 μ l 一号抗体 (在 1ml PBS 中)。在 37 度静置 1 小时。PBS 冲洗 3 次 (暗处)，每次 5 分钟。将细胞浸没在 1mg/ml 的 DAPI 中并静置 1 小时。向样品中加入一滴封固剂，使用免疫荧光显微镜进行拍照。

3、研究结果

3.1 SYK 筛药模型鉴定

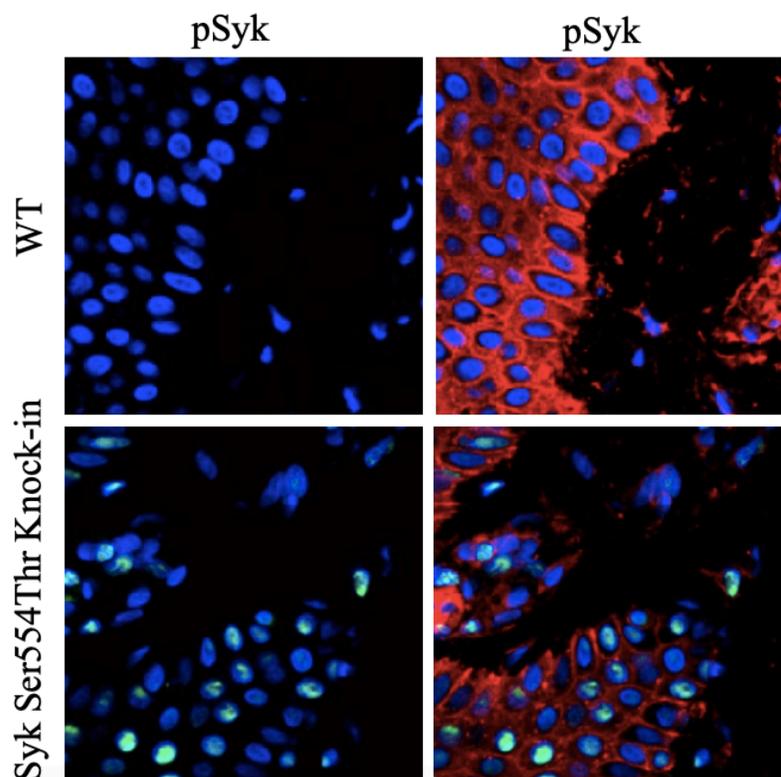


图 1: Syk knock-in 小鼠结肠组织免疫荧光实验

SYK 的磷酸化能激活下游一系列信号通路。因此 SYK 磷酸化的失调将会诱导人体一系列疾病的产生。例如严重的 IBD 和全身免疫疾病。（小鼠 SYK 用 Syk 表示）我们在已有携带 Syk 突变体 Ser554Thr（相当于人体中的 Ser550Tyr）的小鼠。我们通过免疫荧光实验测定了小鼠结肠组织（colon tissue）磷酸化 Syk 水平（图 1）。图中蓝色：细胞核 (DAPI 染色)。红色显示全蛋白 Syk 信号，而绿色则为磷酸化 Syk。和 WT 小鼠相比，Syk Ser554Tyr 小鼠中 Syk 水平明显下降，但是其磷酸化 Syk 水平有显著上升，这表明 Syk 的 Ser554Tyr 突变导致 Syk 磷酸化水平的异常。

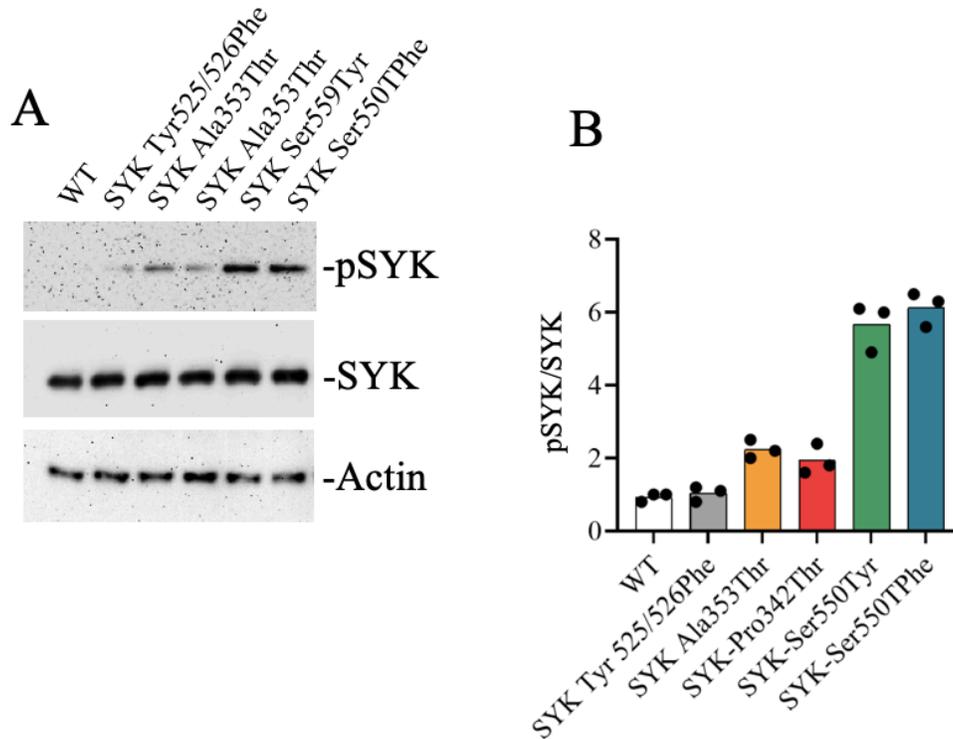


图 2: 携带 SYK 突变的 HEK 细胞中的 SYK 磷酸化水平 (WB 实验)

然后我们构建了这几组人源 SYK 表达载体: SYK 野生型 (WT)、SYK 的突变体 (Tyr525/536Phe, Ala353Thr, Pro342Thr, Ser550Tyr, Ser550TPhe), 将它们分别转染至 HEK293 细胞中 (转染详细过程在“研究方法”中) Ala353Thr、Pro342Thr、Ser550Tyr 和 Ser550TPhe 四个突变体与免疫 B 细胞、关节炎和炎症性肠病等炎症的发生有重要关系 [19]。免疫印迹染色 (WB) 实验结果显示 (图 2A), SYK-WT 和阴性对照 Tyr525/536Phe 不激活磷酸化 SYK, 而 Ala353Thr 和 Pro342Thr 不同程度激活了磷酸化 SYK, 特别是关键的两个突变 Ser550Tyr 和 Ser550TPhe。同时 SYK 全蛋白和内参 Actin 并没有相应激活, 它们和磷酸化 SYK 的浓度比值如图 2B 所示。

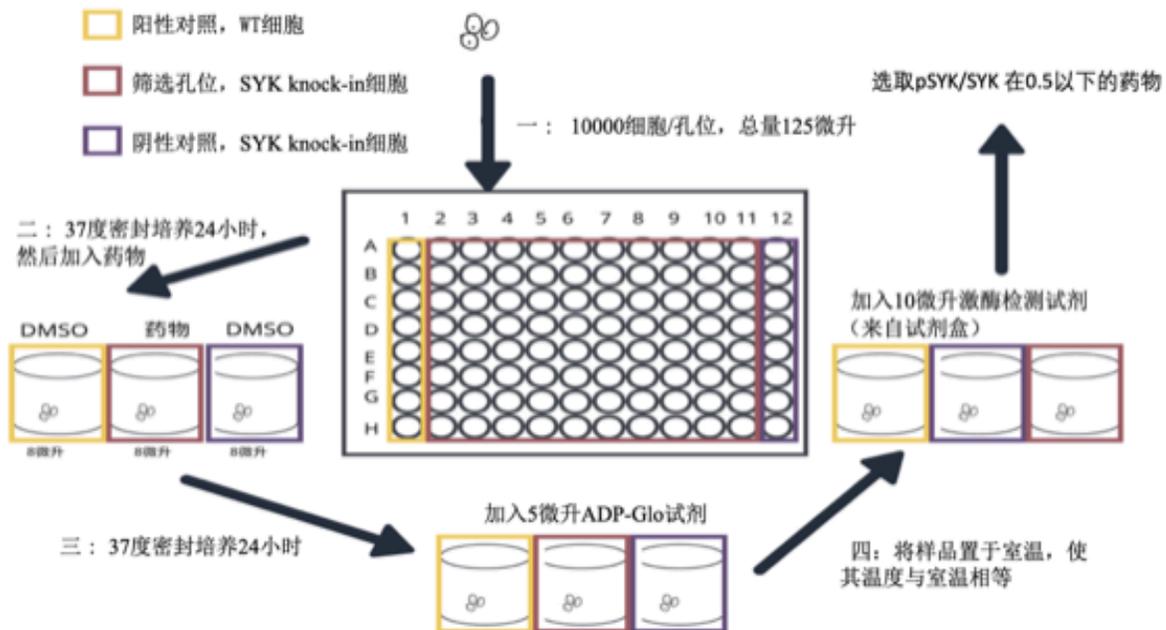
3.2 抑制磷酸化 SYK 药物筛选

在细胞中找到靶点表型之后, 我们用 Promega 公司的 ADP-Glo 试剂盒进行了筛选药物的工作。流程如图 3A 所示。图 3B, 从 48 个候选药物中, 我们共挑选了其中 9 种进行后续实验。除了塞来昔布 (Celecoxib) 作为未加药组之外的另一个阴性对照之外, 其他 8 种药

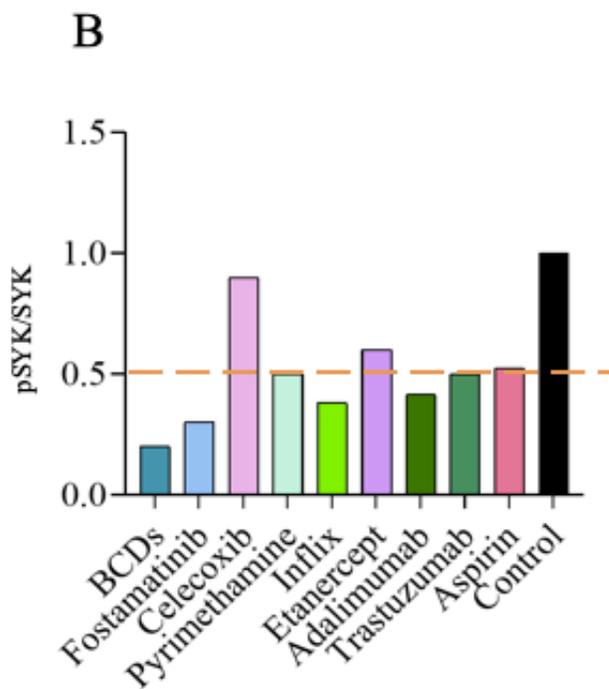
物对于磷酸化的抑制作用均在1/2左右甚至以下。图3C是这9种药物的详细功能作用。

接下来我们在HEK293细胞中对SYK进行过量表达。被转染的SYK质粒包括SYK-WT和SYK的三种突变：Ter525/526Phe（阴性对照）、Ser550Thr、Ser550TPhe。图4A，我们发现苯二氮(BCDs)和福坦替尼(fostamatinib)在WB实验中能有效降低突变Ser550TPhe和Ser550Thr的过量磷酸化，塞来昔布(Celecoxib)和其他6种药物（结果此处未显示）都没有有效抑制磷酸化的增加。细胞中磷酸化SYK有明显下降并与对照组的野生型SYK的磷酸化水平基本一致。但是SYK的磷酸化水平在被塞来昔布(Celecoxib)处理后并没有明显下降。该结果证明了在蛋白水平上，福坦替尼(fostamatinib)和苯二氮(BCDs)可以较为有效的抑制SYK的磷酸化，但是苯塞昔布(Celecoxib)对SYK磷酸化的抑制效果并不明显。因此，在接下来的研究中，我们将塞来昔布(Celecoxib)和福坦替尼(fostamatinib)作为对照在细胞与小鼠模型中探究苯二氮(BCDs)在SYK突变细胞中的抑制作用。

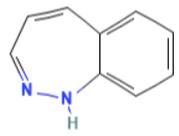
A

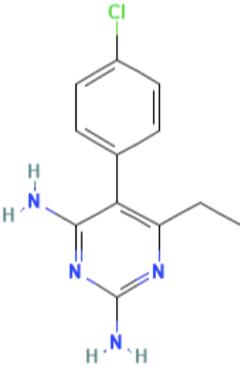
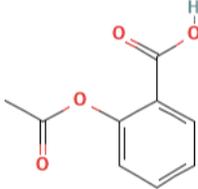


2022



C

药物名称	功能&人群	生产公司	化学信息
苯二氮 (BCDs) [14]	SYK 抑制物，抗炎症、抗癌、抗病 毒和抗寄生虫。用于骨质疏松或精 神疾病患者中。	Pfizer Multiple generic	
福坦替尼 (fostamatinib) [12]	SYK 抑制剂，用于治疗紫茜合剂对 慢性免疫性血小板减少症。	Rigel Pharmaceuticals, Inc.	

<p>乙胺嘧啶 (Pyrimethamine) [13]</p>	<p>SYK 抑制物，可以在细菌中抑制细菌对嘌呤的合成，从而抑制细菌 DNA 的生产。一般和另一种抗菌药物磺胺剂一起使用来抑制感染处的需氧菌和原生动物。</p>	<p>Turing Pharmaceuticals.</p>	
<p>英夫利昔 (inflix) [15]</p>	<p>TNF 抑制药。治疗自免疫疾病如 IBD，类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、银屑病和银屑病关节炎。</p>	<p>Janssen Biotech, Inc.</p>	<p>C₆₄₂₈H₉₉₁₂N₁₆₉₄O₁₉₈₇S₄₆</p>
<p>依那西普 (Etanercept) [16]</p>	<p>TNF 抑制药，需要皮下注射，被用于治疗关节炎，IBD 和慢性寻常型中重度银屑病。</p>	<p>Amgen</p>	<p>C₂₂₂₄H₃₄₇₅N₆₂₁O₆₉₈S₃₆</p>
<p>阿达木单抗 (Adalimumab) [17]</p>	<p>TNF 抑制药，治疗关节炎、斑块型银屑病、强直性脊柱炎和 IBD。</p>	<p>AbbVie</p>	<p>C₆₄₂₈H₉₉₁₂N₁₆₉₄O₁₉₈₇S₄₆</p>
<p>妥珠单抗 (Trastuzumab) [18]</p>	<p>TNF 抑制药，严重的类风湿关节炎。</p>	<p>UCB</p>	<p>C₆₄₂₈H₉₉₇₆N₁₇₂₀O₂₀₁₈S₄₂</p>
<p>阿司匹林 (Aspirin) [19]</p>	<p>血小板抑制的一种，又名乙酰水杨酸，被用于治疗疼痛、发烧、头痛和炎症。</p>	<p>Bayer</p>	

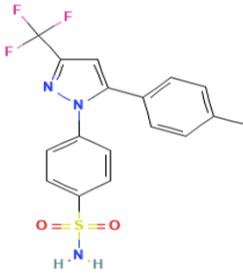
塞来昔布 (Celecoxib) [19]	缓解骨关节炎引起的疼痛、压痛、 肿胀和僵硬。	G. D. Searle & Company	
-----------------------------	---------------------------	---------------------------	---

图 3: SYK 的高通量筛药

3.3 苯二氮、福坦替尼、塞来昔布在 HEK293 细胞中深入鉴定

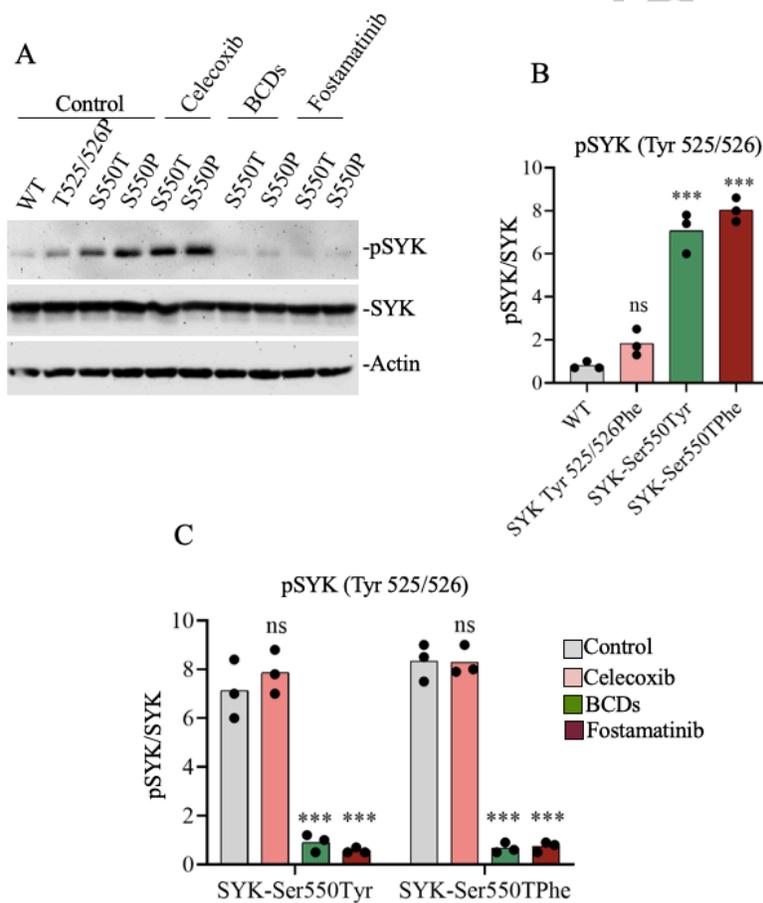


图 4: 塞来昔布、苯二氮和福坦替尼对磷酸化 SYK 的影响 (WB 结果)

苯二氮(BCDs)、福坦替尼(fostamatinib)和塞来昔布(Celecoxib)被用于处理有 SYK 突变的 HEK293 细胞，Western Blot 实验被用于检测 SYK 磷酸化水平。在携带突变 Ser550Thr 和 Ser550TPhe 的 HEK 细胞中，SYK 磷酸化水平有大幅上升（图 4A, 4B）。当细胞被福坦替尼(fostamatinib)以及苯二氮(BCDs)处理后，细胞中 SYK 两种突变体的磷酸化有明显下降，与对照组的 SYK-WT 的磷酸化水平基本一致。但是 SYK 磷酸化水平在被塞来昔布(Celecoxib)处理后并没有明显的下降。该结果证明了在蛋白水平上，福坦替尼(fostamatinib)和苯二氮(BCDs)可以较为有效的抑制 SYK 的磷酸化，但是苯塞来昔布(Celecoxib)对 SYK 磷酸化的抑制效果并不明显（图 4A, 4C）。

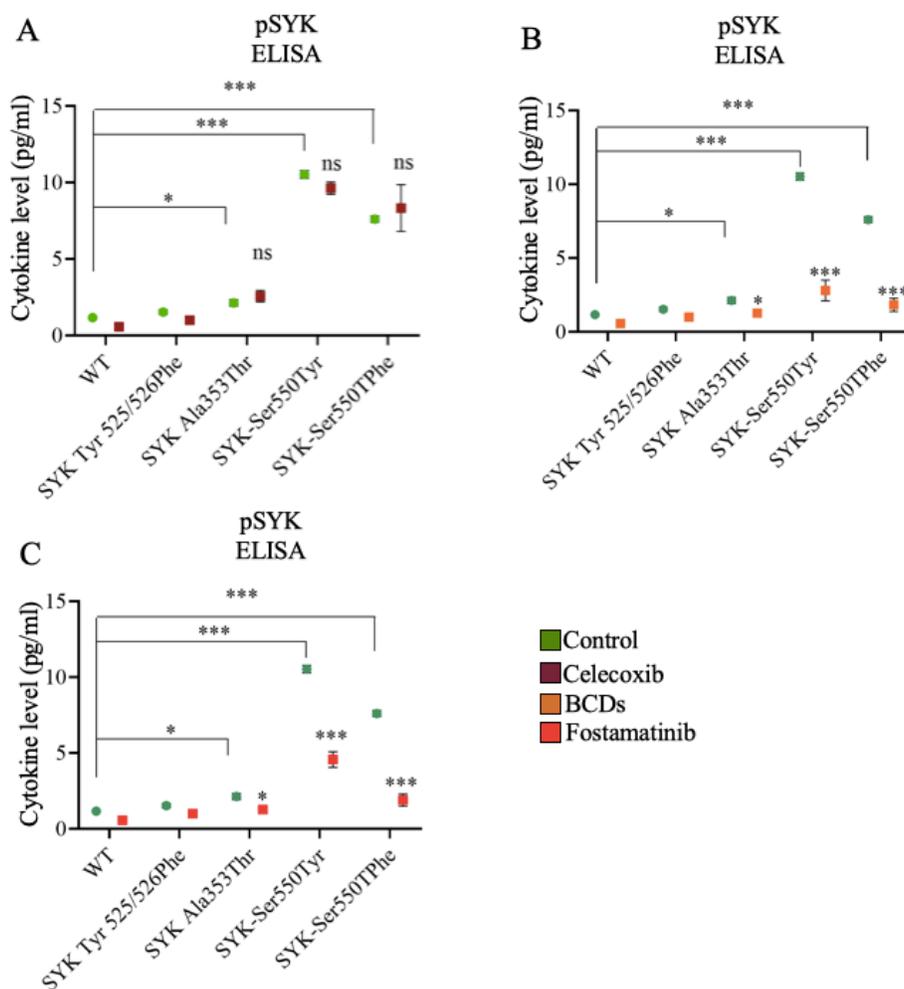


图 5: 塞来昔布、苯二氮和福坦替尼对磷酸化 SYK 的影响(ELISA 结果)

图 5B 和 5C，ELISA 结果验证了苯二氮(BCDs)和福坦替尼(fostamatinib)对 SYK 磷酸化起到抑制作用，而塞来昔布(Celecoxib)对 SYK 磷酸化的抑制作用不明显（图 5A）。

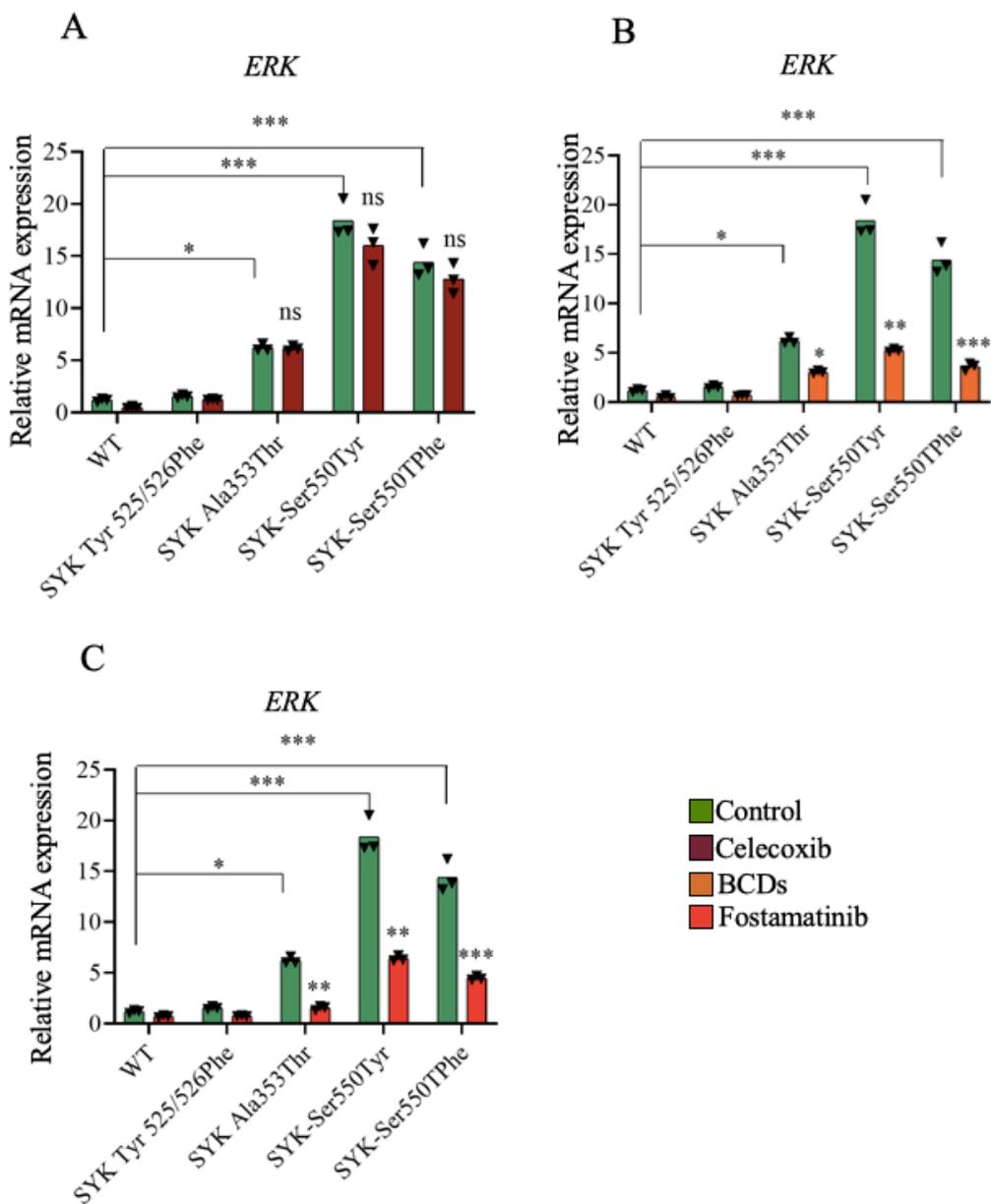


图 6: 塞来昔布、苯二氮和福坦替尼对 ERK 信号通路的影响

上文提到 ERK 信号通路是 SYK 下游的信号通路，在 SYK 突变体 Ser550Thr、Ser550Tphe 和 Ala353Thr（另一个和炎症有关的突变）中，ERK 信号通路的表达被上调

(图 6)。ERK 信号通路的失调被证明与炎症性有关。我们通过 qPCR, 在 RNA 水平测定了选取的三种药物对有 SYK 突变 (Ala353Thr, Ser550Thr 与 Ser550TPhe) 的 HEK293 细胞中 ERK 信号通路的影响[1][11]。如图 6B 和 6C 所示, 有 SYK 突变 Ala353Thr、Ser550Thr 与 Ser550TPhe 的 HEK293 细胞在被苯二氮(BCDs)或福坦替尼 (fostamatinib) 处理后, 细胞中 ERK 显著下降。但是细胞中的 ERK 水平在被塞来昔布 (Celecoxib) 处理后并没有显著下降 (图 6C)。该结果证明在 RNA 层面, 苯二氮(BCDs)与福坦替尼 (fostamatinib) 对 SYK 下游信号通路 ERK 有抑制作用。

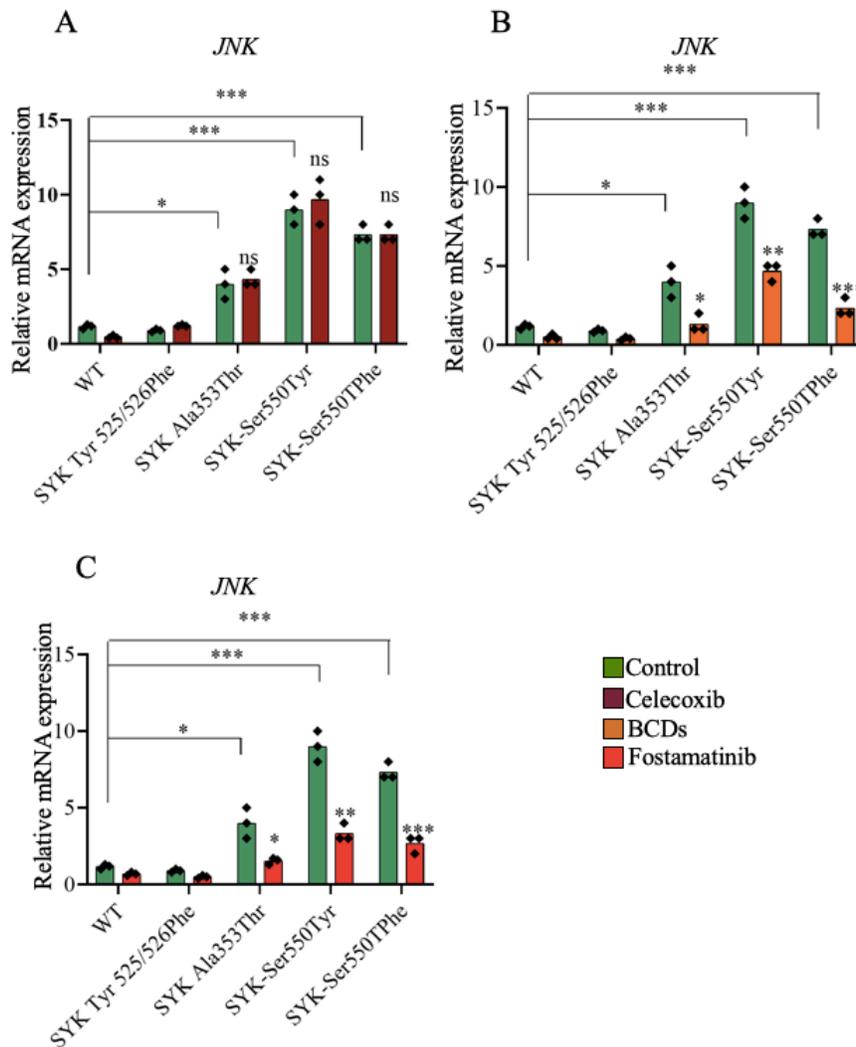


图 7: 塞来昔布、苯二氮和福坦替尼对 JNK 信号通路的影响

上文提到细胞凋亡、胚胎发育、细胞因子的生产和炎症的发生都受到 JNK 信号通路的调控，JNK 信号通路是与 IBD 发病息息相关的[19]。在 SYK 突变体 Ser550Thr、Ser550TPhе 和 Ala353Thr 中，JNK 信号通路的表达被上调（图 7）。通过 qPCR 实验，我们在 RNA 水平上测定了三种选定药物在有 SYK 突变体的 HEK293 细胞中对细胞内 JNK 信号通路的影响[10]。在使用苯二甲和福坦替尼 (fostamatinib) 处理细胞后,虽然细胞中 JNK 信号通路的激活水平依然高于野生型细胞，但是相比未被药物处理的 SYK 突变细胞 JNK 信号通路被得到了显著的抑制（图 7B, C）。但是如图 7A 所示，在使用塞来昔布 (Celecoxib) 处理细胞后，细胞中的 JNK 信号通路并没有受到显著的抑制。因此该结果证明在 RNA 层面福坦替尼 (fostamatinib) 与苯二氮 (BCDs) 对 SYK 下游信号通路 JNK 有显著的抑制作用，阴性对照塞来昔布 (Celecoxib) 对 JNK 的抑制作用不明显。

3.4 苯二氮、福坦替尼、塞来昔布在 SYK knock-in 小鼠结肠细胞中的鉴定

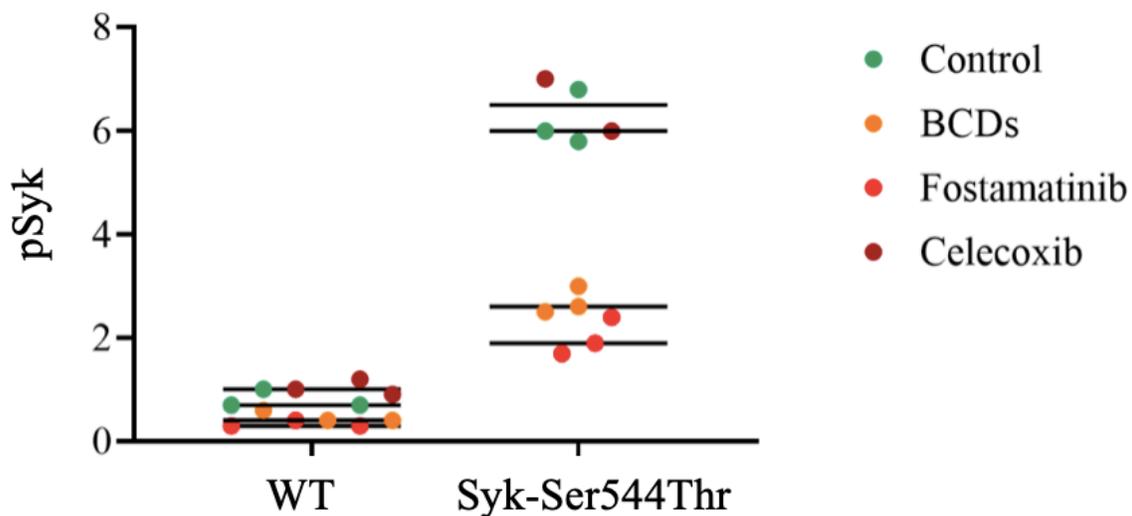


图 8: 塞来昔布、苯二氮和福坦替尼对 Syk knock-in 小鼠中 Syk 磷酸化的影响

为了进一步鉴定三种药物对磷酸化 SYK 的抑制作用和得到更加贴近人体的数据，我们运用了小鼠模型。ELISA 结果显示，在携带 Syk Ser544Tyr 突变体的小鼠的结肠细胞中，Syk 磷酸化水平有明显提高（图 8）。苯二氮 (BCDs) 和福坦替尼 (fostamatinib) 处理

小鼠后，小鼠的 Syk 磷酸化水平有明显的下降，但是在被塞来昔布 (Celecoxib) 刺激后，磷酸化 Syk 水平并没有显著的下降。此次 ELISA 结果显示表明，苯二氮 (BCDs) 和福坦替尼 (fostamatinib) 在小鼠模型中对 SYK 磷酸化起到抑制作用，虽然无法使 Syk 磷酸化回归正常水平，但是这两种药物依然有较为显著的抑制效果。而塞来昔布 (Celecoxib) 在小鼠模型中对 Syk 磷酸化的抑制作用并不明显。

4、总结

根据已有研究 SYK 的突变与关节炎和炎症性肠病的免疫疾病有密切的联系。有单基因突变 SYK 的病人通常将忍受严重的免疫疾病。我们在 HEK293 细胞层面和小鼠 knock-in 模型层面，确立了特定致病 SYK 突变将会导致细胞中磷酸化 SYK 水平上升。为了寻找治疗方法，用来解决 SYK 突变所导致的磷酸化 SYK 水平上升，我们对 48 种药物进行了高通量药物筛选，发现苯二氮对靶点 pSYK 的抑制作用最为明显。使用携带 SYK 突变 HEK 293 细胞模型深入验证了这一点；免疫印迹和 ELISA 实验结果显示苯二氮对细胞中磷酸化 SYK 有显著的抑制作用。因为 JNK 和 ERK 信号通路的激活与磷酸化 SYK 有着密切的联系，同时还与免疫诸多疾病密切相关，我们进而使用定量 PCR 验证了苯二氮对 SYK 下游的 JNK 和 ERK 信号通路也有显著抑制作用。最后，为了进一步验证实验结果，我们通过 ELISA 在小鼠 knock-in 模型中确立了苯二氮对磷酸化 SYK 水平的抑制作用。

本研究较为深入的证实了苯二氮对 SYK 的抑制作用，为将来的免疫疾病治疗的研究提供了新的靶点和思路。

5、致谢

感谢李琪老师通过一系列课程培训，对我进行论文背景知识的探索、实验设计，实验方法，论文写作等方面的引导。同时也由衷的感谢高老师在北京为我提供实验场所和详细的实验指导，让我能够在比赛时间内完成所需的实验。最后，我真诚的感谢父母给予我精神上的支持，这进一步激发了我书写论文和进行实验的动力。

引用文献

1. I, A. (2021, March 29). *The sickening consequences of too much syk signaling*. Nature genetics. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33782606/>.
2. L, W. (2021). *Gain-of-function variants in syk cause immune dysregulation and systemic inflammation in humans and mice*. Nature genetics. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33782605/>.
3. I, W. (2011). *The ERK cascade distinct functions within various subcellular organelles*. Europe pmc. <https://europepmc.org/articles/PMC3128630>.
4. A, B. M. (2010). *c-Jun N-terminal kinase (JNK) SIGNALING: Recent advances and challenges*. Biochimica et biophysica acta. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19900593/>.
5. Campbell, N. A., Reece, J. B., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., Jackson, R., Stobrawa, K., Strzałko, J., Dabert, J., Urry, L. A., Dabert, M., Wiland-Szymańska, J., Woźny, A., Słocińska, M., Pacholska-Bogalska, J., Marciniak, P., Kasprzyk, A., Czarniewska, E., Rosiński, G., ... Szymczak, M. (2016). *Campbell Biologia*. Dom Wydawniczy REBIS.
6. Poudel, P., Lappin, S. L., Bansal, P., & Goyal, A. (2021). *StatPearls*. NCBI. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507704/>.
7. Fava, A., & Petri, M. (2019, January). *Systemic lupus erythematosus: Diagnosis and clinical management*. Journal of autoimmunity. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6310637/>.
8. Xincheng, Q. (2020, June). *IBD (inflammatory Bowel DISEASE) Treatment Market: Rise in the prevalence of inflammatory bowel diseases across the world to drive the market growth*. LeadLee. <https://www.leadleo.com/report/search?pageNo=1&includeIndustry=467>.
9. Uhlig, H. H. (2014). *The diagnostic approach to monogenic very early onset inflammatory bowel disease*. Gastroenterology. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25058236/>.
10. Abraham, C. (2009). Inflammatory Bowel Disease. *The New England Journal of Medicine*, 2066–2078.
11. R, K. Y. S. (2010). *The map kinase Signaling CASCADES: A system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20811974/>.
12. Fala, L. (2019, May 16). *Tavalisse (FOSTAMATINIB DISODIUM Hexahydrate) first SPLEEN tyrosine kinase Inhibitor approved for Chronic Immune thrombocytopenia*. American Health & Drug Benefits. <https://www.ahdbonline.com/select-drug-profiles/2766->

tavalisse-fostamatinib-disodium-hexahydrate-first-spleen-tyrosine-kinase-inhibitor-approved-for-chronic-immune-thrombocytopenia.

13. L., D. (2015). *Imidazopyridines as a source of biological activity and Their pharmacological POTENTIALS-IRRED and Raman spectroscopic evidence of their content in pharmaceuticals and plant materials*. Bioorganic & medicinal chemistry. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26314922/>.
14. J., M. E. S. S. (2008). *Syk inhibitors as treatment for allergic rhinitis*. Pulmonary pharmacology & therapeutics. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17669674/>.
15. Yoshida, S., Takeuchi, T., Kotani, T., Yamamoto, N., Hata, K., Nagai, K., Shoda, T., Takai, S., Makino, S., & Hanafusa, T. (2013, September 5). *Infliximab, a TNF- α inhibitor, reduces 24-h ambulatory blood pressure IN rheumatoid arthritis patients*. Nature News. <https://www.nature.com/articles/jhh201380>.
16. H., C. B. D. X. W. B. L. (2016). *Etanercept, an inhibitor OF TNF-A, prevents propofol-induced neurotoxicity in the developing brain*. International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27756568/#:~:text=Etanercept%2C%20a%20TNF-%20inhibitor%2C%20prevents%20propofol-induced%20short-%20or,but%20mTNF-%20expression%20in%20neurons%20is%20only%20>.
17. R., W. S. S. S. (2013). *Adalimumab (TNF A Inhibitor) Therapy Exacerbates IgA Glomerulonephritis acute Renal injury and induces Lupus autoantibodies in a PSORIASIS PATIENT*. Case reports in nephrology. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24558628/#:~:text=Adalimumab%20%28Humira%29%20is%20a%20tumour%20necrosis%20factor%20%20%20%20Preda%20%282009%29%2C%20Klinkhoff%20%282004%29%2C%20and%20Medicare%20Australia%29>.
18. Sharon, Y., & Chu, D. S. (2020, February 27). *Certolizumab pegol – tumor necrosis Factor inhibitor for refractory uveitis*. American Journal of Ophthalmology Case Reports. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2451993618301336#:~:text=Certolizumab%20has%20several%20features%20that%20differentiate%20it%20from,to%20polyethylene%20glycol%20%28PEG%29%20to%20enhance%20plasma%20half-life>.
19. National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summeary for CID 2244, Aspirin. Retrieved August 23, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aspirin>.

2021 S.-T. Yau High School Science Award