

基于 SPR 技术的表皮生长因子受体与新疆紫草中 4 种活性成分的相互作用

王嫚, 李书文, 董旭, 申刚义*

(中央民族大学 中国少数民族传统医学国家民委—教育部重点实验室, 北京 100081)

[摘要] 目的:以人表皮生长因子受体(EGFR)为靶标,从左旋紫草素,乙酰紫草素, β,β -二甲基丙烯酰紫草素, β -乙酰氧基异戊酰紫草素等新疆紫草所含的4种萘醌类活性成分中筛选潜在的EGFR抑制剂。方法:利用表面等离子体共振(SPR)技术,首先通过预吸附实验,优化固定的pH和浓度,选择最佳条件,构筑EGFR生物芯片。在此基础上,以pH 7.4,浓度 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲溶液(含0.005%聚山梨酯-20)作为相互作用时的缓冲溶液,实时动态研究EGFR与4种单体的相互作用。通过软件计算动力学参数,基于结合动力学常数大小,筛选抑制剂。结果:选择pH 4.5, $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的乙酸缓冲液、质量分数为 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的EGFR为其最佳的固定条件,最终固定量为250 RU。相互作用结果显示4种单体中, β,β -二甲基丙烯酰紫草素与EGFR有明显的结合作用,其他3种单体无明显响应。动力学参数计算结果显示,EGFR与 β,β -二甲基丙烯酰紫草素相互作用的结合速率常数 k_a 为 $1.27\times 10^4\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$,解离速率常数 k_d 为 $2.92\times 10^{-2}\text{ s}^{-1}$,解离平衡常数 K_D 为 $2.31\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$,卡方值(Chi^2)为3.25。 $K_D < 1\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$,表明他们有较强的亲和力。结论: β,β -二甲基丙烯酰紫草素可能为EGFR的一种抑制剂。

[关键词] 表皮生长因子受体; 新疆紫草; 表面等离子体共振技术; β,β -二甲基丙烯酰紫草素

[中图分类号] Q943.2;Q94-23;R932 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)13-0032-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181008

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180313.1032.007.html>

[网络出版时间] 2018-03-13 13:14

Interactions Between EGFR and Four Compounds from *Arnebia euchroma* Based on SPR

WANG Man, LI Shu-wen, DONG Xu, SHEN Gang-yi*

(Key Laboratory of Chinese Minority Traditional Medicine,
Minzu University of China, Beijing 100081, China)

[Abstract] **Objective:** To screen the potential inhibitor for human epidermal growth factor receptor (EGFR) from four kind compounds including shikonin, acetylshikonin, β -acetoxyisovalerylshikonin and β,β -dimethylacrylshikonin contained in *Arnebia euchroma*. **Method:** Through adsorption experiment, the best conditions of the pH and concentration for immobilization of EGFR were determined by using the surface plasmon resonance (SPR) method to construct EGFR biochip. The interactions between EGFR and four compounds were studied on real time after the EGFR immobilization on the chip with PBST ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4, including 0.005% tween 20) as the interaction buffer. The kinetic parameters were calculated by software, and the inhibitors were then screened based on the combination with kinetic constant. **Result:** The optimal immobilization conditions were as follows: with $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ acetate buffer ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 4.5), and was immobilized with a 250

[收稿日期] 20170908(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573834,81001595);国家科技支撑计划项目(2014BAC15B04)

[第一作者] 王嫚,在读硕士,从事药物分析方法研究,Tel:010-68939942,E-mail:18101203672@163.com

[通信作者] *申刚义,博士,副研究员,从事药物分析方法研究,Tel:010-68939942,E-mail:shengy@muc.edu.cn

response unit finally. The interaction results showed that only β , β -dimethylacrylshikonin had good interaction with EGFR among them, and other three compositions had no clear response. The kinetic parameters were calculated further, with binding rate constant $k_a = 1.27 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, dissociation rate constant $k_d = 2.92 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, dissociation equilibrium constant $K_D = 2.31 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and Chi square value (Chi^2) of 3.25. $K_D < 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, suggesting that they had a strong affinity. **Conclusion:** It was indicated that the β , β -dimethylacrylshikonin could be a potential EGFR inhibitor.

[**Key words**] epidermal growth factor receptor (EGFR); *Arnebia euchroma*; surface plasmon resonance (SPR); β , β -dimethylacrylshikonin

恶性肿瘤是当前威胁人类健康和生命的世界三大顽症之一。世界卫生组织(WHO)2014年发布的《世界癌症报告》中显示,2012年全球新增癌症1410万例,其中我国新增病例位居世界首位。预计未来20年内,每年新增患者将多达2398万^[1]。我国发布的《2015年中国肿瘤登记年报》中显示新增癌症病例337.2万,癌症死亡221.3万,位居发病死亡率首位^[2]。如何遏制癌症疾病的发展并有效降低其死亡率已成为医学界正面临的严重挑战之一。

解决该问题的策略之一是研发高效的抗肿瘤药物。在众多类型中,以蛋白酶为靶标的分子靶向药物因具有特异性强、耐药性低、毒副作用低等优点而异军突起,已成为抗肿瘤药物研发的主要方向^[3-4]。当前70%以上的分子靶向药物是以酪氨酸蛋白激酶为靶标的抑制剂^[2]。

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)作为受体酪氨酸激酶家族的一种常见的跨膜蛋白,广泛分布于哺乳动物的上皮细胞。现代医学研究表明,许多实体肿瘤的发生、发展、愈后不良等与EGFR的过量表达密切相关,阻断EGFR信号传导则能有效的抑制肿瘤的生长^[5],它是分子靶向药物研究的重要靶点之一^[2,6]。

天然产物中蕴含丰富的类型多样的活性成分,是新药发现的源头和基础。从植物中发现或筛选新型高效的酶抑制活性物质一直是众多医药研究者孜孜以求的目标^[7]。近年来药理学研究发现,我国特色民族药材新疆紫草 *Arnebia euchroma* 能明显降低EGFR及酪氨酸激酶水平,抑制多种肿瘤细胞生长增殖^[8-13],可能存在酪氨酸激酶抑制剂成分。

目前,有关新疆紫草抗肿瘤作用的研究多集中于新疆紫草粗提物细胞实验^[14-15],而对于其各种单体成分的抗肿瘤靶向分子研究则较少。因此,进一步研究新疆紫草中的单体组分与EGFR的相互作用,探索筛选其中酶抑制剂成分,对于新型抗肿瘤靶向药物的研发具有重要意义。

酶抑制剂筛选方法主要分为细胞筛选和生化测定筛选两大类。相对于前者,生化测定筛选方法因具有快速简单有效等优点,得到了广泛应用^[7,16]。生化测定筛选方法主要包括光谱法,色谱法,质谱法,表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)等。其中SPR技术作为近年来药物高通量筛选方法,具有免标记,实时,快速等优点,可以从大量化合物中快速筛选出与酶有较大结合力的潜在的酶抑制剂,比传统药物筛选方法省时、省钱和省力^[17]。许多研究者利用SPR技术开展了药物筛选相关研究。如邓宏伟等^[18]研究了小分子NSC51186与EGFR的相互作用。笔者基于SPR技术,研究了血清白蛋白与色氨酸对映异构体的手性识别相互作用^[19]。

本文以EGFR为靶标分子,构筑EGFR生物芯片,研究了其与新疆紫草中4种萘醌类色素化合物,左旋紫草素, β , β -二甲基丙烯酰紫草素,乙酰紫草素及 β -乙酰氧基异戊酰紫草素的相互作用,从中筛选出了与EGFR有较强结合力的 β , β -二甲基丙烯酰紫草素。相关研究可为新型抗肿瘤分子靶向药物的研究提供参考。

1 材料

ProtenOn XPR36型生物分子相互作用系统, GLH型传感芯片;氨基偶联试剂盒(批号8800630)包括 *N*-羟基硫代琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS), *N*-乙基-*N'*-(二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC), $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸乙醇胺(pH 8.5);固定化缓冲试剂盒(批号8800503),包括4种浓度为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 分别为4.0, 4.5, 5.0, 5.5的乙酸缓冲液;芯片再生试剂盒(批号8801160)包括0.5% SDS, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl, 以上试剂均购自美国BioRad公司。人EGFR(批号029K4078)购自美国Sigma公司。新疆紫草的4种单体,包括左旋紫草素, β , β -二甲基丙烯酰紫草素,乙酰紫草素及 β -乙酰氧基异戊酰紫草素由实验室分离提取制备,纯度 \geq

95%, 结构经 NMR 和 MS 确证。其余分析纯试剂购自北京化学试剂公司。

运行缓冲液 (PBST) 由 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_3\text{PO}_4$ 和 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 配制, 用 HCl 调节 pH 至 7.4, 加入 0.005% 聚山梨酯-20, 使用前经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤。pH 由德国 Sartorius PB-10 pH 计测定。实验用水为美国 Millipore 公司 Milli-Q 纯水系统提供的去离子水。

2 方法

2.1 EGFR 在芯片上的固定 EGFR 固定采用氨基偶联法^[15]。首先进行预吸附试验, 确定 EGFR 在芯片上的最佳固定条件。预实验步骤为在 0.1 mL 超纯水中加入 EGFR $10 \mu\text{g}$, 使其充分溶解, 再用 pH 分别为 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 的乙酸缓冲液稀释 10 倍。之后将不同 pH 的 EGFR 溶液同时注入芯片通道, 根据信号响应单位 (response unit, RU) 选取适宜的 pH; 在选定的 pH 下分别配制质量浓度为 5, 10, 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EGFR 溶液, 依据 RU 确定 EGFR 在芯片上的最佳结合浓度。设置流速 $25 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 时间 350 s。然后进行 EGFR 固定, 步骤如下: ①将 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Sulso-NHS}$ 和 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ EDC}$ 按 1:1 混合后, 以 $25 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速流过传感芯片通道, 时间 200 s; ②以预吸附试验确定的 pH 和浓度配制 EGFR 溶液, 使其与芯片上活化的羧基反应, 流速设置为 $25 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 时间 200 s; ③用盐酸乙醇胺封闭残余活化的羧基, 流速 $25 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 时间 200 s; ④注入缓冲液, 除去非特异性吸附。另设第 2 个通道作为对照, 只进行活化和封闭而不标记 EGFR。

2.2 样品配制 将左旋紫草素等 4 种成分均由含 5% DMSO 的运行缓冲液 PBST 配制。最高浓度均为 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 经 2 倍倍比稀释得 5 个浓度梯度。另设置一个只含有 5% DMSO 的 PBST 的溶液作为空白对照。

2.3 相互作用 上述实验全部在 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 进行。待 EGFR 在芯片表面固定好之后, 将 6 种浓度的同一单体同时以 $30 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速垂直接流过 EGFR 固定通道并与其作用。实时采集响应信号, 结合时间为 200 s, 解离 200 s。

2.4 数据处理 利用 ProtenOn Manager 2.1.2 软件进行动力学分析处理, 分别计算各单体与 EGFR 的结合速率常数 k_a , 解离速率常数 k_d 和解离平衡常数 K_D 等相关参数。

3 结果

3.1 动力学参数 据 Langmuir 等温吸附模型, 假

设芯片表面双分子反应遵循假一级反应动力学公式^[19]为 $A + B \xrightleftharpoons[k_d]{k_a} AB$ 。其中, A 为分析物; B 为结合在芯片上的蛋白; AB 为芯片表面的结合物; k_a 是吸附过程的结合速率常数; k_d 是脱附过程的解离速率常数。

该反应结合阶段的动力学方程可表示为 $dR/dt = k_a C R_{\text{max}} - (k_a C + k_d) R$, 其中 R 为结合物时间 t 的响应信号; dR/dt 为结合物响应信号的变化速率; C 为分析物浓度; R_{max} 为结合物的最大量。结合反应的解离平衡常数 (K_D) 定义为 $K_D = k_d/k_a$ 。根据公式, 利用 ProtenOn Manager 2.1.2 软件可计算出 EGFR 对 β, β -二甲基丙烯酰紫草素相互作用的动力学参数, 分别为 $k_a = 1.27 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_d = 2.92 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, $K_D = 2.31 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $R_{\text{max}} = 51.3$, 卡方值 (Chi^2) = 3.25。因其他 3 种物质无明显的结合曲线, 很难拟合出它们的动力学数据。

K_D 反应了分子间结合能力的大小, K_D 越小, 表明结合力或亲和力越大。一般情况下, K_D 在 $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-12}$ 表明亲和力较强。由 K_D 值可看出, EGFR 与 β, β -二甲基丙烯酰紫草素有很强亲和力。 Chi^2 小于 R_{max} 的 10%, 在统计学中是可信的。

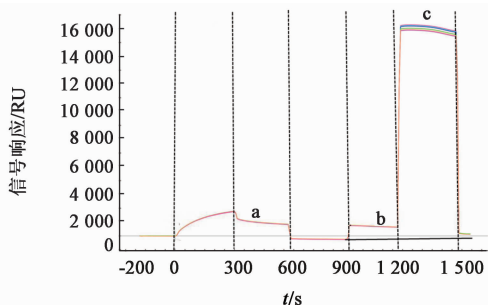
抑制剂对酶的抑制作用与他们之间的亲和性存在相关性^[20]。抑制剂与酶的亲和力越大, 结合就越牢固, 抑制作用也越强。结合的动力学性质实质反应了其生物活性。 β, β -二甲基丙烯酰紫草素与 EGFR 有很强亲和力, 揭示其可能为 EGFR 的一种抑制剂。

3.2 EGFR 的固定 以 pH 4.5, $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为 EGFR 最终的标记条件。图 1 显示了 EGFR 在芯片表面的动态固定曲线, 其固定量为 250 RU。该值较 BSA 等蛋白大大降低^[21], 这可能与本身的结构有关。但与文献[14]报道的 EGFR 固定量 (230 RU) 相比, 该方法的固定量明显提高。

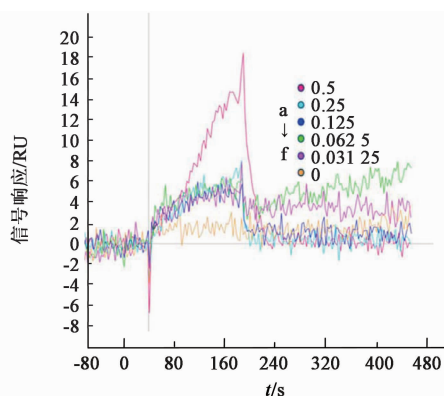
3.3 EGFR 与 4 种活性成分相互作用的动力学试验 以 EGFR 为靶标, 利用 SPR 实时研究了它与新疆紫草中 4 种单体成分的相互作用。实验结果显示, 在 4 种单体成分中, β, β -二甲基丙烯酰紫草素与 EGFR 有较强的相互作用, 其余 3 种则没有明确响应 (结果没有显示)。图 2 显示了 β, β -二甲基丙烯酰紫草素与 EGFR 的动态相互作用曲线。

4 讨论

4.1 EGFR 固定条件的选择 在 EGFR 固定前, 需要进行预吸附试验, 摸索适宜的标记条件。溶液的



a. 芯片表面活化; b. EGFR的固定; c. 芯片去活化
图1 EGFR在25 °C芯片表面上的动态固定过程
Fig.1 Immobilization of EGFR on chip at 25 °C



a~f 浓度梯度为 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0 mmol·L⁻¹
图2 β, β -二甲基丙烯酰紫草素与 EGFR 的相互作用
Fig.2 Kinetic analysis of interactions between EGFR and β, β -dimethylacrylyshikonin with six different concentrations at 25 °C

pH 和浓度是影响蛋白标记量的最主要因素。

4.1.1 pH 的影响 采用质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 不同 pH 的 EGFR 进行预吸附试验。EGFR 一般通过预先接在金膜表面的羧基进行连接。当蛋白带正电荷时更易吸附在羧基表面, 利于发生偶联反应, 所以一般选择 EGFR 溶液的 pH 小于其等电点。但当 pH 降到一定值时, 修饰表面的负电荷将起决定作用, 会导致吸附量降低。考虑到 EGFR 的等电点为 5.6, 实验选择的 pH 分别为 4.0, 4.5, 5.0, 5.5。实验发现 EGFR 在 pH 4.5 时吸附量最高, 表明 pH 过低或过高都不利于吸附。为此, 选择此条件作为 EGFR 溶液的 pH。

4.1.2 浓度的影响 增加 EGFR 的浓度会相应地增大固定量, 但浓度过高又会造成试剂浪费。最佳条件应是满足实验需求的最低 EGFR 浓度。实验进一步考察了 pH 4.5 时 EGFR 吸附量随质量浓度 ($5, 10, 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的变化。研究发现在起始阶段, 吸附量随 EGFR 浓度增大而增大, 而且吸附速率非常快; 在质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时吸附量达到最大; 但

当 EGFR 达到 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 后, 浓度虽然增大 1 倍而吸附量却呈下降状态。结合文献 [15] 和预吸附试验, 特别是考虑到分析物的相对分子质量 $< 250 \text{ Da}$, 最终选择 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为 EGFR 的标记浓度。

4.2 重复性试验 在另一块芯片上 3 个通道上并行固定同一浓度的 EGFR 分子, 平行考察与 4 种单体分子的相互作用。还比较了 4 种单体分子与不同固定浓度的 EGFR 分子的相互作用。重复结果均显示 β, β -二甲基丙烯酰紫草素与 EGFR 有较强作用, 其余 3 种无响应。表明该方法具有良好的重复性。

[参考文献]

- [1] Stewart B, Wild C. *World Cancer Report 2014* [M]. Lyon: IARC Nonserial Publication, 2014.
- [2] 蒋华良. 药学前沿精品讲坛 [M]. 北京: 科学出版社, 2015.
- [3] 张庆文, 尤启东, 周后元. 分子靶向抗肿瘤药物研究进展 [J]. 中国医药工业杂志, 2013, 44(2): 192-199.
- [4] 丁健. 分子靶向抗肿瘤药物十年历程启迪 [J]. 世界临床药物, 2012, 33(1): 40-44.
- [5] Balias T E, Rizzo R C. Quantitative prediction of fold resistance for inhibitors of EGFR [J]. *Biochem*, 2009, 48(35): 8435-8448.
- [6] Hsu K C, Sung T Y, LIN C T, et al. Anchor-based classification and type-C inhibitors for tyrosine kinases [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 10938.
- [7] ZHAO H, CHEN Z. Screening of neuraminidase inhibitors from traditional Chinese medicines by integrating capillary electrophoresis with immobilized enzyme microreactor [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1340: 139-145.
- [8] Singh F, GAO D, Lebwohl M G, et al. Shikonin modulates cell proliferation by inhibiting epidermal growth factor receptor signaling in human epidermoid carcinoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2003, 200(2): 115-121.
- [9] 詹志来, 胡峻, 刘谈, 等. 紫草化学成分与药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(21): 4127-4135.
- [10] 赵海青, 刘军锋, 刘珂. 新疆紫草羟基萘醌类化学成分的研究及对 PDE4 的抑制作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 96-99.
- [11] 贺金华, 芦韦华, 王芳. 高效液相色谱法测定新疆紫草毛状根中乙酰紫草素的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 39-41.
- [12] 郝鹤, 李鹏跃, 叶和春, 等. 新疆紫草 7 种萘醌类成分的同时测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18): 108-112.

- [13] 崔晓秋,刘云刚. HPLC 测定新疆紫草中紫草素的含量及提取方法的优化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014,20(16):94-97.
- [14] 裴凌鹏,田树革,申刚义,等. 新疆紫草粗提物对 MGC-80 人胃癌细胞的体外作用研究[J]. 新疆医科大学学报, 2012,35(4):483-486.
- [15] 韩洁,翁新楚,毕开顺. 紫草中活性成分的体外抗癌作用[J]. 精细化工,2007,24(5):473-476.
- [16] Sundberg S A. High-throughput and ultra-high-throughput screening: solution-and cell-based approaches[J]. Curr Opin Biotechnol, 2000, 11(1): 47-53.
- [17] 申刚义,高妍,刘越,余东来,等. 表面等离子体共振技术在药物研究中的应用[J]. 生命科学,2010,22(9):941-945.
- [18] 邓宏伟,郭妍,孙焯,等. 靶向表皮生长因子受体的全新小分子配体筛选[J]. 生物化学与生物物理进展, 2005,32(2):180-186.
- [19] Johnsson B, Löfås S, Lindquist G. Immobilization of proteins to a carboxymethyl dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors[J]. Anal Biochem,1991,198(2): 268-277.
- [20] 杨帆,杨秀荣. SPR 生物传感器测定胰蛋白酶与抑制剂的相互作用[J]. 化学传感器,2003(2):32-36.
- [21] 申刚义,高妍,张爱芹,等. 基于表面等离子体共振技术的血清白蛋白与色氨酸对映异构体手性识别的热力学研究[J]. 高等学校化学学报,2015,36(5): 881-885.

[责任编辑 顾雪竹]