

基于分子反向对接方法的槲皮素抗肿瘤机制研究

张明波,李莉,孙艳涛,郭晏华,孟宪生*
(辽宁中医药大学药学院,辽宁 大连 116600)

[摘要] **目的:**确定槲皮素抗肿瘤作用的靶标和分子机制。**方法:**采用 Autodock Vina 软件,把槲皮素与 91 个抗肿瘤的靶蛋白进行对接。利用 Ligplot 软件对槲皮素与靶蛋白的作用模式进行了分析。**结果:**槲皮素与多个抗肿瘤靶标具有较好的亲和性,其中与槲皮素结合能在 $-9.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 以下的有 8 个。**结论:**槲皮素可以通过抑制基质金属蛋白酶-8、二氢乳氨酸脱氢酶、二氢叶酸还原酶和胸苷酸合成酶以及几种蛋白激酶的活性,发挥抗肿瘤作用。

[关键词] 槲皮素; 抗肿瘤; 分子反向对接; 靶标

[中图分类号] R285.5; R289.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0145-04

Study on Antitumor Mechanism of Quercetin based on Molecular Reverse Docking Method

ZHANG Ming-bo, LI li, SUN Yan-tao, GUO Yan-hua, MENG Xian-sheng*

(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the target and molecular mechanism for the antitumor action of quercetin. **Method:** Using Autodock Vina software, dock quercetin with 91 antitumor targets; analyze the binding mode of quercetin with the targets. **Result:** Quercetin shows high affinity to many antitumor targets. There are 8 targets with binding free energy to quercetin lower than $-9.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$. **Conclusion:** Quercetin exerts antitumor action by inhibiting the activity of human neutrophil collagenase (MMP-8), dihydroorotate dehydrogenase, dihydrofolate reductase, thymidylate synthase as well as several protein kinases.

[Key words] quercetin; antitumor; molecular reverse docking; target

中药由于其副作用小、不易产生耐受性等特点,在肿瘤疾病的预防和治疗中发挥着重要作用^[1]。槲皮素(quercetin)是一种多羟基黄酮类物质,广泛地存在于多种中药中,具有多种生理和药理活性,如抗肿瘤、抗炎抗病毒、降血脂、抗血小板聚集和清除自由基等^[2]。研究表明槲皮素可以通过多种途径发挥抗肿瘤作用,对于多种恶性肿瘤疾病包括乳腺癌、结肠癌、肺癌、前列腺癌和肝癌等都具有治疗作用^[3]。目前,对槲皮素的抗肿瘤机制具有一定的认识^[4-5],但是大多数研究还停留在细胞实验和动物

实验阶段,而对于其抗肿瘤的作用靶点和分子机制却知之甚少。因此,有必要对此进行深入的研究。

计算机虚拟筛选技术已经广泛地应用于中药有效成分的确定和作用机制的研究^[6]。其中,分子反向对接方法可以用来探索药物的作用靶标和作用机制,也可以用于药物的毒副作用分析^[7]。本论文利用分子反向对接方法,把槲皮素与已知的抗肿瘤靶标进行反向对接,确定了槲皮素抗肿瘤可能的作用靶标和分子机制,为槲皮素作为抗肿瘤药物的进一步开发奠定基础。

1 资料与方法

用绘图软件得到槲皮素的立体结构,并利用 MM2 力场对槲皮素的结构进行了优化。从中国科学院上海药物研究所的靶标数据库(<http://www.dddc.ac.cn/pdt/index.php>)下载得到抗肿瘤药物的靶蛋白的结构 91 个^[8]。利用 Autodock Tool

[收稿日期] 20120515(006)

[第一作者] 张明波,博士,副教授,从事中药物质基础和组分配伍研究, Tel: 0411-87586007, E-mail: mbzhang76@hotmail.com

[通讯作者] * 孟宪生, Tel: 0411-87406496, E-mail: mxsvvv@126.com

V1.5.4 软件^[9]把槲皮素和靶蛋白的结构转成 Autodock 文件格式(pdbqt),用于对接计算。

对接软件采用的是 Autodock Vina V1.1.2,与 Autodock 4 相比其在对接精度和计算速度上都具有了显著的提高^[10]。以靶蛋白原配体的中心作为活性位点的中心。以距离原配体每侧 0.65 nm 为界,作为靶蛋白的活性位点。在对接过程中,只改变配体的构象,而保持蛋白构象不变。除特别指明外,所有参数均采用默认值。

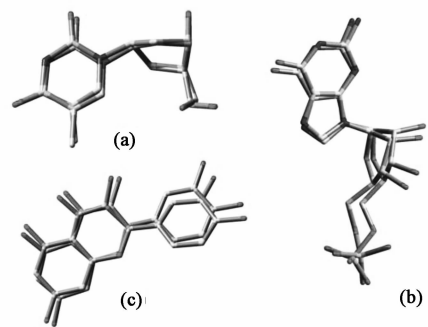
利用 Autodock Vina 软件,计算得到槲皮素与靶蛋白的结合能。在结果处理过程中,对于具有多个 PDB 代码的同一种蛋白,只保留与槲皮素结合能最低的一个。同时根据公式 $K_i = \exp[(\Delta G \times 1000)/(R_{cal} \times T)]$,其中 ΔG 单位为 $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, $T = 300 \text{ K}$, $R_{cal} = 1.98719 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$,计算得到槲皮素对靶蛋白的抑制常数(K_i)。对接结构模式的图形化用 Ligplot 软件^[11]实现。

2 结果与讨论

2.1 对接方法的检验 为了检验对接方法的可靠性,选择 3 个晶体结构(PDB 编号分别为 1KIM, 1HMP,3LM5),把配体与空蛋白进行对接。在图 1 中,比较了配体的对接构象与晶体中构象的差异。1KIM 中的配体只有 4 个可旋转键,刚性较好,整个分子为电中性。从图 1(a)中可以看出,1KIM 中配体的 2 个构象基本重合。晶体 1HMP 的配体具有 7 个可旋转键,而且包含一个带负电的磷酸基团。从图 1(b)中可以看出,对接的构象与晶体结构符合得也很好,尤其是磷酸基团的方向与晶体结构基本一致。上述结果说明,对接方法对于刚性较大的配体,具有一定的可靠性。为了进一步确认对接方法对于槲皮素的适用性,我们选择了以槲皮素为配体的蛋白晶体结构(PDB 编号:3LM5),把槲皮素与空的蛋白结构进行了对接。从图 1(c)中可以看出,槲皮素的对接构象与晶体中的构象接近重合,只是在 B 环的位置稍有所偏离。所以,我们的对接方法适用于槲皮素的对接研究。

2.2 槲皮素作用的靶标 表 1 列出了与槲皮素的结合自由能 ΔG 在 $-9.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 以下靶蛋白,从中可以看出槲皮素与多种靶蛋白的抑制常数都在 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 量级。这说明槲皮素可以与多个抗肿瘤靶标具有较强的相互作用,与此前文献报道的槲皮素抗肿瘤作用的多靶点性相符合^[12]。

根据对接计算结果,在所有靶标中槲皮素与金属基质蛋白酶-8 结合能力最强,抑制常数为 37.38



a. 1 KIM; b. 1 HMP; c. 3LM5

图 1 配体的对接构象与晶体中构象的比较

表 1 槲皮素与抗肿瘤靶标对接的数据

PDB 代码	靶蛋白	结合自由能 ΔG / $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$	抑制常数 K_i / $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$
1BZS	基质金属蛋白酶-8	-10.2	37.38
1D3G	二氢乳氨酸脱氢酶	-9.9	61.81
1K74	过氧化物酶体增殖物激活受体	-9.7	86.43
1GIH	细胞周期素依赖性蛋白激酶	-9.6	102.21
1JBP	cAMP 依赖性蛋白激酶	-9.4	142.93
1DIS	二氢叶酸还原酶	-9.2	199.88
1JWH	蛋白激酶 CK2	-9.2	199.88
1CI7	胸苷酸合成酶	-9.0	279.52

$\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。基质金属蛋白酶能够降解细胞外基质的有效成分,调节细胞黏着,在肿瘤的侵袭和转移中发挥着关键作用^[13]。Vijayababu 等发现前列腺癌细胞经槲皮素处理后,癌细胞中基质金属蛋白酶的活性降低,而且癌细胞的体外侵袭和转移能力呈剂量依赖性下降^[14]。Saragusti 等证实槲皮素在体外能够抑制基质金属蛋白酶-9 的活性,抑制常数低于 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[15]。这与我们的研究结果相符合。所以,直接抑制基质金属蛋白活性是槲皮素抗肿瘤的可能作用机制之一。

体外药理实验表明槲皮素能够减少 DNA 的复制,导致细胞分裂的延迟^[3]。根据计算结果,槲皮素对于二氢乳氨酸脱氢酶、二氢叶酸还原酶和胸苷酸合成酶具有一定的抑制作用,抑制常数分别为 61.81,199.88,279.52 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这 3 种酶在合成核酸过程中都发挥着重要作用。抑制这 3 种酶的活性,将使核酸的合成受阻,从而阻滞细胞的增殖。所以,抑制与核酸合成相关的酶的活性是槲皮素发挥抗肿瘤作用的另外一种可能机制。

目前,以蛋白激酶为靶点的药物已经成为抗肿

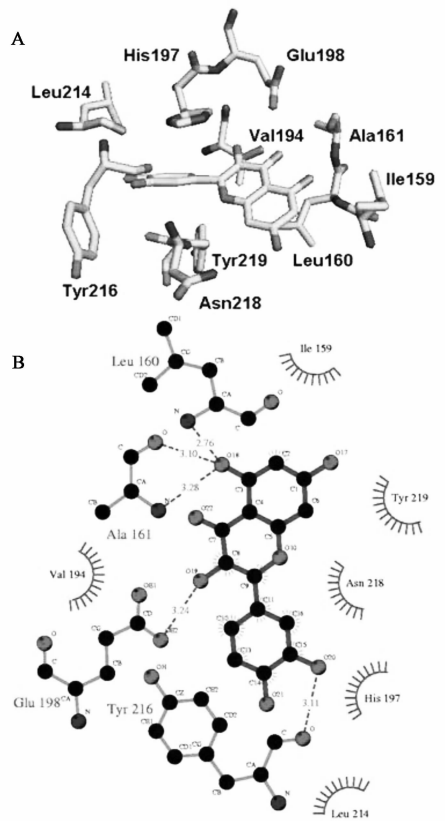
瘤药物研究的热点。槲皮素对于癌细胞中多种蛋白激酶具有明显的抑制作用^[16]。文献报道槲皮素是体外 CK2 有效的抑制剂,其 IC₅₀ 值约为 50 nmol·L⁻¹^[17]。研究结果表明槲皮素对于周期素依赖性蛋白激酶 CDK2, cAMP 依赖蛋白激酶和蛋白激酶 CK2 具有一定的抑制作用,抑制常数分别为 102.21, 142.93, 199.88 nmol·L⁻¹。所以,抑制癌细胞中蛋白激酶活性,阻滞细胞复制过程,也是槲皮素抗肿瘤可能作用机制之一。

除此之外,槲皮素对过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARs)也具有一定的亲和力,解离常数为 86.49 nmol·L⁻¹。PPARs 是配体激活的翻译因子,参与肿瘤的发展,分化和凋亡。据报道 PPARs 配体能够激活 PPARs 信号,在体内和体外均表现出具有预防和治疗肿瘤的作用^[18]。因此,激活 PPARs 也是槲皮素抗肿瘤作用的一个可能机制。

2.3 槲皮素与部分靶标的作用模式 槲皮素及其衍生物抗肿瘤作用的物质基础一直受到人们的关注。为了在分子层次上揭示槲皮素抗肿瘤作用的机制,我们对槲皮素与金属基质蛋白酶-8 和二氢乳氢酸脱氢酶的结合构象和作用模式进行了分析。如图 2 所示,槲皮素的酚羟基与金属基质蛋白酶-8 的活性位点形成 5 个氢键相互作用。参与氢键相互作用的分别是槲皮素 3',3 和 5 位的 OH。值得指出的是 5 位的 OH,作为氢键供体与 Ala161 主链上的 C=O 形成一个氢键,同时作为氢键受体,与 Leu160 和 Ala161 的主链上的 NH 形成 2 个氢键。这 3 个氢键是稳定槲皮素与金属基质蛋白酶-8 相互作用的一个关键因素。另外,槲皮素的 A 环和 C 环形成一个平面的疏水性片段与活性位点的 5 个残基的侧链(Ala161, Ile159, Leu160, Val194 和 Tyr219)所构成的疏水性空腔形成疏水相互作用。

槲皮素在与二氢乳氢酸脱氢酶结合时,可以与活性位点形成 7 个氢键,如图 3 所示。槲皮素上 4' 位的 OH 作为氢键受体与 Asn284 和 Asn212 的 NH₂ 形成 2 个氢键。同时上 3' 位的 OH 与 Ser215 也形成氢键。槲皮素 4 位的 C=O 和 5 位 OH 与 Ser305 和 Thr357 形成了由 4 个氢键所构成的氢键网络,是槲皮素与二氢乳氢酸脱氢酶相结合的主要相互作用。此外,槲皮素的 A 环与 Tyr356 接近平行,形成了 π-π 相互作用。

由上述分析可以看出槲皮素可以通过酚羟基与金属基质蛋白酶-8 和二氢乳氢酸脱氢酶形成多个氢键相互作用。所以,槲皮素所包含的多个酚羟基,



A. 作用模式; B. 结合构象(图 3 同)

图 2 槲皮素与金属基质蛋白酶-8 的作用力分析

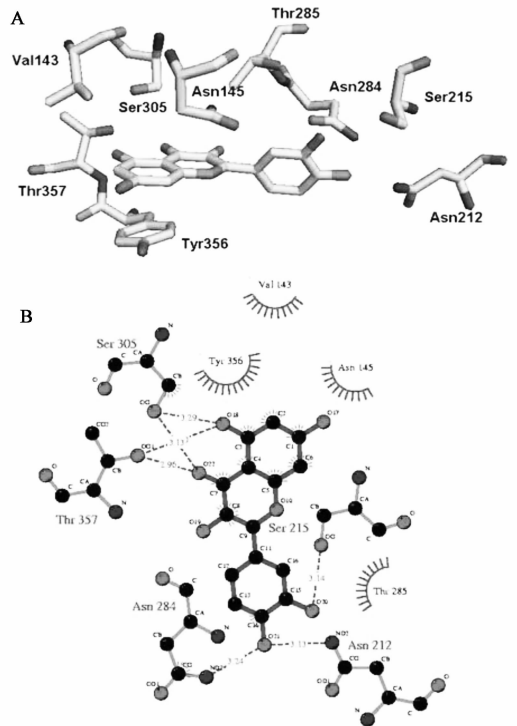


图 3 槲皮素与二氢乳氢酸脱氢酶作用力分析

是槲皮素多靶点抗肿瘤作用的物质基础。除此之外,槲皮素的 3 个六元环结构具有一定的疏水性,可

以与靶蛋白的疏水性区域形成疏水相互作用。

3 结论

槲皮素由于其广谱抗肿瘤作用,引起广泛的关注。本论文利用分子反向对接的方法,发现槲皮素对金属基质蛋白酶-8、二氢乳氢酸脱氢酶、二氢叶酸还原酶和胸苷酸合成酶以及几种蛋白激酶具有一定的抑制作用。这与此前文献报道的槲皮素可以通过抑制肿瘤细胞增殖、抑制信号转导和抑制肿瘤细胞侵袭等发挥抗肿瘤作用相一致^[4]。通过对槲皮素与金属基质蛋白酶和二氢乳氢酸脱氢酶的作用模式的分析,说明槲皮素上的多个酚羟基是槲皮素抗肿瘤作用的关键药效团。

明确中药的物质基础是中药现代化的一个重要目标。由于中药成分复杂,分离纯化困难,传统的分离-鉴定-药理学测试研究方式,成本昂贵,而且效率低下。特别是有的药物成分很难富集到药理学测试所需要的量,因此无法开展相关的药理学实验。本论文所采用的分子反向对接方法,仅仅利用化合物结构,根据它和已知药物靶标的相互匹配性就可预测出药物的活性和可能作用机制。根据预测的结果,可以进行有针对性的药理学实验验证,避免盲目的尝试,从而提高中药物质基础的研究效率,推动中医药现代化的研究进程。

[参考文献]

[1] 焦河玲,邓虹珠,王晓娟,等. 扶正抗癌方的辅助抗肿瘤研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 162.

[2] 许进军,何东. 槲皮素研究进展[J]. 实用预防医学, 2006,13(4):1095.

[3] 林增海,孟勇,马涛. 槲皮素对肿瘤作用的研究现状[J]. 实用医学杂志,2010,26(18):3446.

[4] 王刚,杜士明,杨光义,等. 槲皮素抗肿瘤的分子机制研究进展[J]. 中国医院药学杂志,2011,31(4):322.

[5] 顾生久,杨娜,朱开梅. 槲皮素抑制人鼻咽癌 CNE2 细胞生长并诱导其凋亡的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(13):192.

[6] 朱伟,姚丽梅. 肿瘤坏死因子- α 中药小分子抑制剂的计算机虚拟筛选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13):199.

[7] 赵丽琴,肖军海,李松. 分子对接在基于结构药物设

计中的应用[J]. 生物物理学报,2002,18(3):263

[8] Gao Z, Li H, Zhang H, et al. PDTD: a web-accessible protein database for drug target identification [J]. BMC Bioinformatics, 2008, 9:104.

[9] Scanner M F. A component-based software environment for visualizing large molecular assemblies [J]. Structure, 2005,13:447.

[10] Trott O, Olson A J. Autodock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. J Comput Chem, 2010, 31: 455.

[11] Morris G M, Goodsell D S, Halliday R S, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function [J]. J Comput Chem, 1998, 19:1639.

[12] Murakami A, Ashida H, Terao J. Multitargeted cancer prevention by quercetin [J]. Cancer Lett, 2008, 269: 315.

[13] 朱峰,刘新光,梁念慈. 基质金属蛋白酶及其组织抑制物与肿瘤侵袭转移[J]. 国外医学:临床生物化学和检验学分册,2001,22(5):229.

[14] Vijayababu M R, Arunkumar A, Kanag-araj P, et al. Quercetin downregulates matrix metalloproteinases 2 and 9 proteins expression in prostate cancer cells (PC-3) [J]. Mol Cell Biochem, 2006, 287(1/2):109.

[15] Saragusti A C, Ortega M G, Cabrera J L, et al. Inhibitory effect of quercetin on matrix metalloproteinase 9 activity molecular mechanism and structure-activity relationship of flavonoid-enzyme interaction [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 644:138.

[16] Boly R, Gras T, Lamkami T, et al. Quercetin inhibits a large panel of kinases implicated in cancer cell biology [J]. Int J Oncol, 2011, 38:833.

[17] Maekawa T, Kosuge S, Sakamoto S, et al. Biochemical characterization of 60S acidic ribosomal P proteins associated with CK-II from bamboo shoots and potent inhibitors of their phosphorylation *in vitro* [J]. Biol Pharm Bull, 1999, 22(7):667.

[18] Youssef J, Badr M. Peroxisome proliferator-activated receptors and cancer: challenges and opportunities [J]. B J Pharmacol, 2011, 164(1):68.

[责任编辑 邹晓翠]