

24-羟基-人参二醇的抗癌作用及基于分子对接的机制

郑茜^{1,2,3}, 王朝晖³, 祁增², 李平亚^{2*}

(1. 山西医科大学, 太原 030001; 2. 吉林大学药学院, 长春 130021;
3. 哈佛大学医学院 麻省总医院 移植研究中心, 波士顿 02129)

[摘要] 目的:为研究人参皂苷 20(S)-达玛-20,25-环氧-3 β ,12 β ,24 α -三醇(24-OH-PD)对多种癌细胞的增殖抑制及诱导凋亡作用并探讨其作用机制。方法:采用噻唑蓝(MTT)比色法或 CellTiter Glo[®] 发光试验检测 24-OH-PD 在不同质量浓度(12.5,25,50,100 mg·L⁻¹),不同作用时间(24,48,72 h)下对 CCRF-CEM, Jeko-1, M14, MD-MBA-231 癌细胞的增殖抑制作用,并与 20(R)-Rg₃,20(S)-Rh₂ 进行比较。采用流式细胞术检测 24-OH-PD 对以上 4 种癌细胞的凋亡诱导作用。采用药物设计平台薛定谔 Maestro 6.7 软件对癌症相关的 40 种蛋白与 24-OH-PD 进行分子对接研究。结果:24-OH-PD 对 4 种癌细胞均具有明显的细胞活性抑制作用,且具有时间、剂量依赖性。24-OH-PD 对 CCRF-CEM, Jeko-1, M14, MD-MBA-231 细胞作用 48 h 时半抑制浓度(IC₅₀)分别为 25.36,39.29,21.74,19.35 mg·L⁻¹,与 20(S)-Rh₂ 作用效果相似(IC₅₀分别为 23.35, 65.79, 18.95, 19.67 mg·L⁻¹);远远强于 20(R)-Rg₃,仅对 Jeko-1 细胞有抑制作用(IC₅₀ 49.5 mg·L⁻¹)。磷脂结合蛋白 V/碘化吡啶(Annexin V/PI)双染实验结果显示,24-OH-PD 对 4 种细胞均具有不同程度的促凋亡作用(P<0.05),且具有剂量依赖关系。分子对接实验表明 32 个癌症相关蛋白中有 11 个能够与 24-OH-PD 对接成功,包括嘌呤核苷磷酸化酶(PNP),蛋白络氨酸激酶,蛋白激酶 C(PKC),B 淋巴细胞瘤基因-2(Bcl-2),B 淋巴细胞瘤基因-xl(Bcl-xl),含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-8 等,表明 24-OH-PD 的抗肿瘤作用可能与直接作用于这些蛋白相关。结论:人参皂苷 24-OH-PD 对 CCRF-CEM, M14, MD-MBA-231, Jeko-1 癌细胞具有增殖抑制作用,其机制可能与 PNP,PKC 等蛋白相关;同时 24-OH-PD 还具有诱导癌细胞凋亡的作用,机制可能与 Bcl-2, Bcl-xl 等蛋白相关。

[关键词] 人参皂苷; 抗癌; 分子对接; 24-羟基-人参二醇

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)06-0081-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190622

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181210.1609.004.html>

[网络出版时间] 2018-12-12 10:28

Anticancer Effect and Molecular Docking Mechanism of 24-OH-panaxadiol

ZHENG Qian^{1,2,3}, WANG Zhao-hui³, QI Zeng², LI Ping-ya^{2*}

(1. Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China;

3. Center for Transplantation Sciences, Massachusetts General Hospital and
Harvard Medical School, Boston 02129, USA)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of ginsenoside 20(S), 25-epoxydammarane-3 β , 12 β , 24 α -triol (24-OH-panaxadiol, 24-OH-PD) on inhibiting proliferation and inducing apoptosis of tumor cells, and explore its mechanism of action. **Method:** The inhibitory effect of 24-OH-PD (12.5, 25, 50, 100 mg·L⁻¹) on proliferation of CCRF-CEM, M14, MD-MBA-231 and Jeko-1 cells with different treatment periods (24, 48, 72 h) was evaluated by methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay and CellTiter Glo[®] test, and the

[收稿日期] 20180710(016)

[基金项目] 吉林省科技成果转化计划项目(201603033YY);吉林省重大科技项目(吉人才办[2016]3号);中国博士后科学基金项目(2018M641678)

[第一作者] 郑茜,博士,在站博士后,讲师,从事药物化学结构及其生物活性研究,E-mail:qianz88@163.com

[通信作者] *李平亚,博士,教授,从事天然药物化学成分及其生物活性研究,E-mail:lipy@jlu.edu.cn

results were then compared with 20 (R)-Rg₃ and 20 (S)-Rh₂. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis caused by 24-OH-PD. Besides, the potential anticancer mechanism was studied by docking analysis with 40 cancer related proteins and 24-OH-PD by using drug design platform Schrodinger Maestro 6.7 Software. **Result:** 24-OH-PD inhibited the proliferation of all the 4 cancer cell lines significantly in a time and dosage dependent manner. The IC₅₀ value of 24-OH-PD on CCRF-CEM, Jeko-1, M14, and MD-MBA-231 cell lines was 25.36, 39.29, 21.74, and 19.35 mg·L⁻¹, respectively, similar to 20 (S)-Rh₂ (IC₅₀ 23.35, 65.79, 18.95, 19.67 mg·L⁻¹) and much better than 20 (R)-Rg₃ (only effective for Jeko-1 cells, IC₅₀ 49.5 mg·L⁻¹). Annexin V/PI double staining experiment showed that 24-OH-PD could also induce apoptosis of the 4 kinds of cancer cells ($P < 0.05$) in a dose-dependent manner. In the molecular docking test, 24-OH-PD was docked successfully with 11 tumor related proteins, including purine nucleoside phosphorylase (PNP), protein tyrosine kinase, protein kinase C (PKC), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), B-cell lymphoma-x1 (Bcl-x1) and Caspase-8 et al, which demonstrated that the anti-tumor effect of 24-OH-PD may be related to the direct effects on these proteins. **Conclusion:** 24-OH-PD could inhibit cell proliferation and induce apoptosis for CCRF-CEM, M14, MD-MBA-231 and Jeko-1 cell lines, which may through directly acting on Bcl-2, Bcl-x1, and other proteins.

[Key words] ginsenoside; anticancer; docking; 24-OH-panaxadiol

化疗是目前癌症治疗的最有效手段之一,尤其对一些有全身散播倾向的肿瘤及已经转移的中晚期肿瘤。然而化疗药物的耐药性产生是导致其疗效降低甚至无效的重要原因,因此寻找更多,更好的化疗药物具有极其重要的意义。从天然药物中寻找具有抗癌作用的先导化合物是近年来各国科学家研究的热点。

人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* 的干燥根。人参皂苷作为人参中的主要有效物质,具有增强机体免疫力、改善心血管功能、抗血小板聚集、神经保护、抗炎、抗氧化、抗癌等生物活性的作用^[1],其中抗肿瘤活性引起了人们的广泛关注,人参皂苷能够抑制多种癌细胞生长^[2],抑制肿瘤血管形成^[3],抗侵袭^[4],影响肿瘤相关的免疫反应等^[5]。红参由鲜参经过高温蒸制加工获得,过程中有大量的人参皂苷产生水解、构象改变等变化,形成一系列稀有皂苷,使其在吸收、生物利用度等方面优于原型皂苷,同时生物活性也有所增强^[1]。皂苷类化合物具有活性强,毒性低,市场前景广阔的特点,据报道,来自红参的成分人参皂苷 CK, PPD, Rg₃, Rh₂ 等皂苷类成分均具有很好的抗癌活性,其中人参皂苷 Rg₃ (参一胶囊)已由国家药品监督管理局批准上市^[6],成为我国首个一类中药单体抗癌药物。

20 (S)-达玛-20, 25-环氧-3 β , 12 β , 24 α -三醇 (24-OH-PD),是一种天然二醇型达玛烷型人参皂苷元类化合物^[7]由本课题组首次从红参中提取分离获得,依据人参皂苷抗癌活性的规律,二醇型强于三醇型、苷元强于苷,推断其可能具有较好的抗癌活

性。本研究对其进行了体外抗癌活性实验,并在此基础上,通过计算机辅助分子模拟对接实验对其进行抗癌活性筛选及机制进行探索,为抗癌活性、药理学研究及进一步的新药开发提供科学依据和理论基础。

1 材料

1.1 细胞 急性淋巴细胞白血病细胞 CCRF-CEM, 人套细胞淋巴瘤细胞 JeKo-1,购自美国 ATCC 公司,货号分别为 CRL-3006, CRL-3006;人黑色素瘤细胞 M14,人乳腺癌细胞 MD-MBA-231 由麻省总医院 Soldano Ferrone 赠送,实验前经抗体检测确认。

1.2 药品与试剂 细胞培养液 RPMI 1640,胎牛血清(FBS),非酶类细胞分离剂(美国 Corning 公司,批号分别为 10-040-CV, 35-015-CV, 25-056-CI);100 \times 盘尼西林/链霉素, Hank's 缓冲液(美国 Giboco 公司,批号分别为 10378016, 11575032);磷脂结合蛋白 V 核酸染料 (FITC-Annexin V, 美国 Biolegend 公司,批号 640906); CellTiter Glo[®] 试剂盒(美国 Promega 公司,批号 G7571);碘化吡啶(PI),叠氮化钠,二甲基亚砜,噻唑蓝(MTT)(美国 Sigma 公司,批号分别为 81845, 71289, D8418, M2128)。

24-羟基人参二醇,批号 20141207,人参皂苷 20 (R)-Rg₃, 20(S)-Rh₂ 由人参创新药物开发国家地方联合工程研究中心提供。

1.3 仪器与设备 BD FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司), Forma 371 型恒温培养箱; ECO1.5 型超净工作台(美国 Thermo 公司); TS2 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司); 680 型酶标仪(美国 Bio-Rad

公司);ST40R 型台式离心机(美国 Thermo Fisher 公司)。

2 方法

2.1 药物溶液的配制 取人参皂苷 24-OH-PD, 20(R)-Rg₃, 20(S)-Rh₂, 加入一定量二甲基亚砜, 分别配成质量浓度为 10 g·L⁻¹ 的溶液, 4 °C 保存待用。使用前取细胞培养液稀释, 质量浓度为 1 000, 500, 250, 125 mg·L⁻¹。

2.2 细胞培养 CCRF-CEM, M14, MD-MBA-231 细胞株用含 10% FBS 的 RPMI 1640 细胞培养基, Jeko-1 细胞株用含 20% FBS 的 RPMI 1640 细胞培养基, 放置于 37 °C 5% CO₂ 条件下恒温培养。

2.3 MTT 检测细胞增殖 取 M14, MD-MBA-231 细胞, 以每孔 1 × 10⁴ 个细胞接种于 96 孔板。37 °C 5% CO₂ 孵育 18 h, 加入含不同质量浓度药物培养液 (0, 12.5, 25, 50, 100 mg·L⁻¹), 继续培养 24, 48, 72 h 后采用 MTT 比色法检测细胞活力, 490 nm 下用酶标仪测定其吸光度 A。分别设置空白组、空白细胞组、培养液组、不同浓度给药组。

2.4 CellTiter Glo® 发光实验检测发光强度 取 CCRF-CEM 和 Jeko-1 细胞, 细胞孵育、加药和实验组设置同 2.3 项。CellTiter Glo® 试剂按照说明书操作, 实验前将培养板室温平衡 30 min, 每孔加入 CellTiter Glo® 试液 100 μL, 震荡平衡后酶标仪测定发光强度。

2.5 流式细胞技术检测细胞凋亡率 将 CCRF-CEM, Jeko-1, M14 和 MD-MBA-231 细胞, 按照每孔 2.5 × 10⁵ 个/mL 细胞接种至 24 孔板, 设置空白细胞组和给药组, 分别加入不同质量浓度的 24-OH-PD 溶液 (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 mg·L⁻¹) 50 μL, 培养 48 h。消化收集细胞, FACS 缓冲液洗后弃上清, 加入 FITC-Annexin V 5 μL, PI 10 μL, 避光孵育 15 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡率^[8], CellQuest 软件进行流式细胞术数据采集, Flowjo X 软件进行数据处理, 实验重复 3 次。

2.6 数据分析 实验数据采用 Prism 6.0 软件进行分析, 统计学方法采用单因素方差分析和 t 检验, P < 0.05 表示具有差异有统计学意义。

2.7 抗癌药物靶蛋白的选取 随着计算机辅助药物设计学科的发展, 应用分子对接的方法设计小分子抗癌药物, 或通过计算机模拟研究药物抗癌作用靶点的报道越来越多, 本研究通过查找文献及数据库, 获得癌症相关的药物靶蛋白, 包括 25 种蛋白, 32 个蛋白亚型及活性位点, 其名称及蛋白库编号

(PDB ID), 见表 1。

表 1 抗癌药物相关靶点蛋白

Table 1 Cancer-relevant biochemical targets

蛋白	蛋白库编号	参考文献
蛋白络氨酸激酶 (PTK)	1M17	[9]
	1XKK	
	1T46	
蛋白激酶 C (PKC)	1XJD	[9]
	3PFQ	
	4RA4	
基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)	1L6J	[10]
	1CK7	
氨肽酶 N (APN)	4FYT	[11]
细胞色素 P450 1A1 (P450 CYP1A)	2HI4	[12]
丝裂原激活蛋白激酶 (p38α MAPK)	1P38	[13]
	3PY3	
拓扑异构酶 (Topoisomerase)	2RGR	[14]
	1SC7	
人表皮生长因子受体 2 (HER2)	3PP0	[15]
端粒酶 (TLMA)	3DU5	[16]
鸟氨酸脱羧酶 (ODC)	1D7K	[17-18]
双吡啶基马来酰亚胺 2, Bisindolylmaleimide II	1SZM	[19]
聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1 (PARP-1)	4PJJ	[20]
细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK)	2BHE	[21]
	10IR	
B 淋巴细胞瘤基因-2 (Bcl-2)	2W3L	[22]
B 淋巴细胞瘤基因-x1 (Bcl-x1)	2YXJ	[22]
骨髓细胞白血病基因-1 (MCL-1)	3KZ0	[22]
组蛋白去乙酰化酶 (HDACs)	2UQJ	[23]
	含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3 (Caspase-3)	1QX3
含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-8 (Caspase-8)	2C2Z	[25]
胸苷酸合成酶 (thymidylate synthase)	1JUJ	[26]
血管内表皮生长因子 (VEGF)	2XV7	[27]
细胞表面受体酪氨酸激酶 (c-Met)	3G0F	[28]
嘌呤核苷酸磷酸化酶 (PNP)	1RT9	[29]
蛋白激酶 B (PKB)	3CQU	[30]
表皮生长因子 (EGF)	1IVO	[31]

2.8 分子对接 靶蛋白和配体的准备, 本研究采用药物设计平台薛定谔 Maestro 6.7, 选用 Glide 模块对 24-OH-PD 与靶点蛋白结合活性的差异进行

比较。通过靶标蛋白 PDB ID 导入其分子晶体结构。通过 protein prep 模块优化处理蛋白进行相关前处理和能量优化等,设置靶点蛋白键序调整,除去水分子,加极性氢及 OPLS 力场能量最小化等处理,然后设定 RMSD 为 0.30 Å,以减少三维结构的冲突^[32]。使用 receptor grid generation 模块制作活性口袋,从晶体结构中提取共结晶配体,以其为中心确定受体活性位点坐标,选取盒子大小 20 Å 作为对接区域。使用 Maestro Elements 2.2 及 Maestro 的 Lig prep 模块对 24-OH-PD 进行 3D 化、加极性氢、加电荷等处理优化,选用 OPLS3 分子力场,使能量最低化。

分子对接和结果展示,使用薛定谔 Maestro GLIDE 6.7,调入经过处理的蛋白和 24-OH-PD,选用 XP(额外精度)模式,进行柔性分子对接,最终获得结果。使用 PyMol 将对接文件进行展示,显示形成的极性键、及连接蛋白的氨基酸残基。

3 结果

3.1 24-OH-PD 对细胞活力的抑制 不同质量浓度下 24-OH-PD(12.5, 25, 50, 100 mg·L⁻¹) 处理 24, 48, 72 h 后 CCRF-CEM, Jeko-1, M14, MD-MBA-231 细胞的活力,24-OH-PD 对以上 4 种细胞均具有不同程度地抑制作用($P < 0.05$),且呈时间、剂量依赖关系,24,48,72 h 组统计学上无显著性差异。24-OH-PD 作用的 M14 肿瘤细胞在 24,48,72 h 的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 25.73, 21.39, 22.10 mg·L⁻¹; MD-MBA-231 肿瘤细胞 IC₅₀ 分别为 30.16, 19.05, 19.98 mg·L⁻¹; CCRF-CEM 肿瘤细胞 IC₅₀ 分别为 34.41, 26.95, 25.74 mg·L⁻¹; Jeko-1 肿瘤细胞 IC₅₀ 分别为 50.00, 38.16, 36.82 mg·L⁻¹。见表 2。

24-OH-PD 和 20(S)-Rh₂ 对 4 种癌细胞均显示出不同程度的抑制作用,具有剂量依赖性,而 20(R)-Rg₃ 仅对 B 淋巴细胞癌细胞株(Jeko-1)有一定的抑制作用(IC₅₀ 49.5 mg·L⁻¹)。24-OH-PD 抑制 CCRF-CEM, Jeko-1, M14 和 MD-MBA-231 细胞的 IC₅₀ 分别为 25.36, 39.29, 21.74, 19.35 mg·L⁻¹; 20(S)-Rh₂ 分别为 23.35, 65.79, 18.95, 19.67 mg·L⁻¹。见表 3。

3.2 24-OH-PD 诱导细胞凋亡的作用 FITC-Annexin V/PI 双染试验显示,与空白组比较,24-OH-PD 对 4 种癌细胞具有不同程度的促凋亡作用($P < 0.05$),且呈剂量依赖性。见表 4。

3.3 24-OH-PD 与抗癌作用靶点的对接 通过与 32 个癌症相关蛋白进行精确对接,最终有 9 种蛋白,11 个蛋白亚型与 24-OH-PD 存在相互作用,见表 5。

表 2 24-OH-PD 对 CCRF-CEM, Jeko-1, M14 和 MD-MBA-231 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of 24-OH-PD on cell viability of CCRF-CEM, Jeko-1, M14 and MD-MBA-231 cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

细胞	质量浓度 /mg·L ⁻¹	24 h	48 h	72 h
CCRF-CEM	12.5	0.96 ± 0.08	0.94 ± 0.11	0.99 ± 0.03
	25	0.77 ± 0.08 ²⁾	0.61 ± 0.06 ²⁾	0.55 ± 0.15 ²⁾
	50	0.20 ± 0.08 ²⁾	0 ²⁾	0.01 ²⁾
	100	0 ²⁾	0 ²⁾	0 ²⁾
jeko-1	12.5	0.92 ± 0.06	0.91 ± 0.07	0.91 ± 0.02 ²⁾
	25	0.87 ± 0.07 ¹⁾	0.82 ± 0.07 ²⁾	0.81 ± 0.11 ¹⁾
	50	0.54 ± 0.07 ²⁾	0.29 ± 0.02 ²⁾	0.25 ± 0.07 ²⁾
	100	0 ²⁾	0 ²⁾	0 ²⁾
M14	12.5	0.97 ± 0.10	0.99 ± 0.07	0.99 ± 0.01 ¹⁾
	25	0.43 ± 0.16 ²⁾	0.28 ± 0.05 ²⁾	0.30 ± 0.18 ²⁾
	50	0.23 ± 0.13 ²⁾	0.20 ± 0.05 ²⁾	0.03 ± 0.01 ²⁾
	100	0.05 ± 0.03 ²⁾	0.04 ± 0.06 ²⁾	0.02 ²⁾
MD-MBA-231	12.5	0.90 ± 0.12	0.91 ± 0.02 ²⁾	0.93 ± 0.07
	25	0.59 ± 0.14 ²⁾	0.19 ± 0.08 ²⁾	0.23 ± 0.12 ²⁾
	50	0.27 ± 0.08 ²⁾	0.02 ± 0.01 ²⁾	0.01 ± 0.02 ²⁾
	100	0.01 ± 0.02 ²⁾	0 ²⁾	0.01 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 3, 4 同)。

表 3 24-OH-PD, 20(R)-Rg₃, 20(S)-Rh₂ 对 CCRF-CEM, Jeko-1, M14 和 MD-MBA-231 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 3 Effect of 24-OH-PD, 20(R)-Rg₃ and 20(S)-Rh₂ on cell viability of CCRF-CEM, Jeko-1, M14 and MD-MBA-231 cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

细胞系	质量浓度 /mg·L ⁻¹	24-OH-PD	20(R)-Rg ₃	20(S)-Rh ₂
CCRF-CEM	12.5	0.95 ± 0.09	1.07 ± 0.03	0.97 ± 0.03
	25	0.52 ± 0.19 ²⁾	1.09 ± 0.03	0.40 ± 0.12 ²⁾
	50	0.01 ²⁾	0.96 ± 0.02 ²⁾	0 ²⁾
	100	0 ²⁾	0.75 ± 0.04 ²⁾	0 ²⁾
Jeko-1	12.5	0.91 ± 0.06 ¹⁾	1.07 ± 0.18	0.93 ± 0.08
	25	0.85 ± 0.08 ¹⁾	1.07 ± 0.07	0.92 ± 0.11
	50	0.30 ± 0.02 ²⁾	0.43 ± 0.08 ²⁾	0.67 ± 0.08 ²⁾
	100	0 ²⁾	0 ²⁾	0.26 ± 0.04 ²⁾
m14	12.5	1.00 ± 0.07	0.86 ± 0.05 ²⁾	0.75 ± 0.03 ²⁾
	25	0.30 ± 0.03 ²⁾	0.89 ± 0.08	0.31 ± 0.03 ²⁾
	50	0.19 ± 0.03 ²⁾	0.99 ± 0.25	0.13 ± 0.01 ²⁾
	100	0.03 ± 0.07 ²⁾	0.93 ± 0.02 ²⁾	0 ± 0.05 ²⁾
MD-MBA-231	12.5	0.90 ± 0.02 ²⁾	0.94 ± 0.04 ²⁾	0.90 ± 0.01 ²⁾
	25	0.21 ± 0.09 ²⁾	0.86 ± 0.01 ²⁾	0.24 ± 0.05 ²⁾
	50	0.02 ± 0.01 ²⁾	0.91 ± 0.01 ²⁾	0.01 ²⁾
	100	0 ²⁾	0.73 ± 0.03 ²⁾	-0.01 ²⁾

表 4 24-OH-PD 对 CCRF-CEM, Jeko-1, M14, MD-MBA-231 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	CCRF-CEM	Jeko-1	m14	MD-MBA-231
空白	-	11.60 ± 1.53	19.88 ± 9.19	10.11 ± 3.33	10.52 ± 5.27
24-OH-PD	10	12.32 ± 1.10	19.67 ± 3.44	13.94 ± 3.56	10.84 ± 4.53
	20	13.27 ± 0.85	21.94 ± 3.13	14.73 ± 1.96	9.82 ± 3.60
	30	26.79 ± 3.22 ²⁾	29.13 ± 0.98	24.44 ± 1.84 ²⁾	22.49 ± 4.43 ¹⁾
	40	83.06 ± 8.13 ²⁾	38.12 ± 4.16 ¹⁾	28.62 ± 2.13 ²⁾	33.83 ± 8.55 ¹⁾
	50	93.55 ± 6.22 ²⁾	53.35 ± 7.77 ²⁾	62.19 ± 8.31 ²⁾	68.97 ± 7.88 ²⁾
	60	93.64 ± 3.54 ²⁾	95.62 ± 4.68 ²⁾	80.95 ± 7.56 ²⁾	82.54 ± 4.08 ²⁾
	80	93.69 ± 4.32 ²⁾	95.29 ± 5.09 ²⁾	95.11 ± 1.85 ²⁾	91.30 ± 2.07 ²⁾

表 5 24-OH-PD 与癌症相关蛋白的分子对接

Table 5 Molecular docking of 24-OH-PD and cancer-relevant biochemical targets

蛋白	PDB 编号	对接得分	H 键受体	H 键键长/ Å
PNP	1RT9	-5.196	PRO-62	1.9
			ALA-116	1.9
			MET-219	2.3
			ALA-116	2.9
PKC	3PFQ	-4.012	ASP-427	1.85
			GLY-426	2.6
胸苷酸合成酶	1JUJ	-4.061	ILE-108	2.34
c-Met	3G0F	-3.402	CYS-673	2.7
Bcl-xl	2YXJ	-3.19	ASP-107	2.29
			4RA4	-2.588
			ASP-424	1.81
PTK	1T46	-3.285	ASP-810	2.55
			1M17	-1.771
Bcl-2	2W3L	-2.926	TYR-67	2.02
拓扑异构酶	1SC7	-2.505	ASN-631	2.3
			TYR-538	2.5
Caspase-8	2C2Z	-0.653	GLU-106	1.72

以嘌呤核苷磷酸化酶 PNP(PDB:1TR9) 为例说明, 24-OH-PD 与 1TR9 的亲密度较好, 共形成 4 个氢键(图 1)。通过构型的转换, 24-OH-PD 能较好地嵌入 PNP 蛋白的活性空腔, 具有空间互补性; 同时小分子药物的羟基能与蛋白质配体的氨基酸残基形成 4 个氢键使得其结合更紧密, 最终分子对接得分达到 -5.196, 表明药物分子与嘌呤核苷磷酸化酶 PNP 同时具有电互补性, 其结合较稳定。这表明 24-OH-PD 有可能通过抑制 PNP 发挥抑制肿瘤细胞的增殖作用, 由于 PNP 同时还与肿瘤细胞转移和侵

袭有关, 因而推断 24-OH-PD 可能也具有此活性^[33]。其他得分较高蛋白对接见图 2。

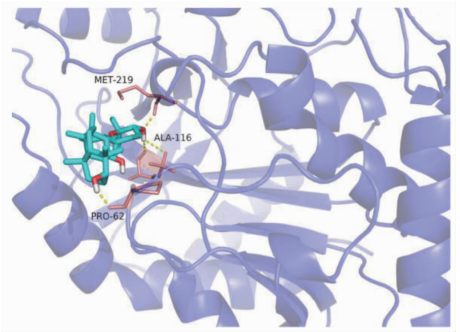
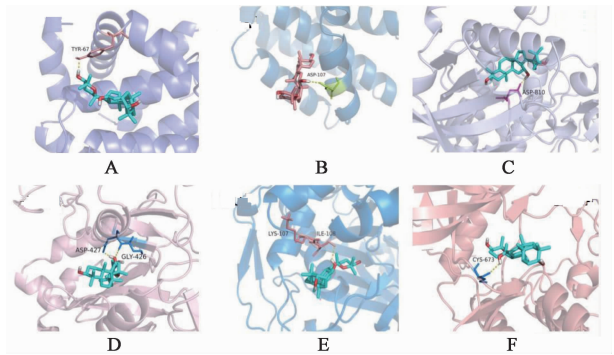


图 1 24-OH-PD 与嘌呤核苷磷酸化酶 (PNP) 的分子对接 (PDB: 1RT9)

Fig.1 Molecular docking of 24-OH-PD and PNP (PDB:1RT9)



A. 2W3L; B. 2YXJ; C. 1T46; D. 3PFQ; E. 1JUJ; F. 3G0F

图 2 24-OH-PD 与部分蛋白的分子对接

Fig.2 Molecular docking of 24-OH-PD and part proteins

4 讨论

4.1 24-OH-PD 抗癌活性的体外实验 目前已有大量研究表明很多人参皂苷类化合物具有抑制癌细胞活性的作用^[34], 如人参皂苷 CK, Rg₃, Rh₂ 等, 其中 Rg₃ 是已批准上市的人参皂苷类抗癌药物^[6]。且在抑制癌细胞增殖的活性方面, 20(R)-Rg₃ 和

20(S)-Rh₂表现出比 20(S)-Rg₃ 和 20(R)-Rh₂ 更强的作用^[35]。因此本研究选择 20(R)-Rg₃ 和 20(S)-Rh₂ 作为阳性对照,结果表明,24-OH-PD 对 CCRF-CEM, Jeko-1, M14 和 MD-MBA-231 癌细胞具有抑制细胞活性的作用,与 20(S)-Rh₂ 效果相当并远远强于 20(R)-Rg₃,有望作为新的化疗药物或先导化合物进行进一步研究。

研究表明大量人参皂苷类化合物的抗癌作用包括诱导癌细胞凋亡^[1],本研究对 24-OH-PD 对 CCRF-CEM, Jeko-1, M14 和 MD-MBA-231 不同类型的癌细胞的诱导凋亡作用进行了研究,结果表明 24-OH-PD 对 4 中癌细胞均具有不同程度的诱导凋亡能力,且呈剂量依赖关系。其中, M14 黑色素瘤对本化合物最为敏感,仅在 10 mg·L⁻¹时就显示出凋亡作用。

4.2 计算机辅助筛选 24-OH-PD 的抗癌作用靶点

利用计算机的分子对接技术以期快速、准确及较低的成本等优势,近年来已成为研究人员进行药物作用机制研究的重要手段^[36]。本研究对 24-OH-PD 的抗癌活性作用进行了初步确定和筛选,之后选择计算机辅助对接的方式进行其作用机制的初步筛选。薛定谔 Maestro 是 Schrödinger 药物设计软件的图形界面,该软件的 Glide 分子对接模块能够提供 SP(标准精度)和 XP(额外精度)2 种对接方式,使结果更准确,避免假阳性结果。软件的评分系统在计算亲脂性,金属配位体,氢键的贡献的同时排除了不合适的空间旋转和排斥,使得结果更加可靠有效减少假阳性。

本研究最终获得 24-OH-PD 能够与 9 种癌症相关蛋白的对接结果,包括 PNP, c-Met, Bcl-xl, Bcl-2, 胸苷酸合成酶, PTK, PKC, Caspase-8, 拓扑异构酶。

PNP, 胸苷酸合成酶和拓扑异构酶均是从 DNA 角度出发,抑制细胞增殖的靶点,PNP 是嘌呤核苷酸补救合成的关键酶,抑制其活性能够通过抑制脱氧鸟苷三磷酸(dGTP)的合成达到抑制 DNA 合成及抑制细胞增殖的作用^[37];胸苷酸合成酶是细胞 DNA 合成过程中一种重要的酶,是胸腺嘧啶核苷酸合成过程中的必经途径^[26];拓扑异构酶是 DNA 解旋过程的关键酶,参与 DNA 的复制、转录及重组过程,在多种肿瘤细胞中显示出高表达^[14]。近年来研究人员将这 3 种酶作为抑制肿瘤细胞增殖的重要靶点进行药物的设计,如药物 Forodesine 就是以 PNP 作为靶点,用于治疗恶性淋巴增殖性疾病^[38]。PTK 是一组蛋白酪氨酸残基磷酸化酶,使蛋白酪氨酸残

其磷酸化激活各种底物酶,并进一步影响细胞的增殖、分化。肿瘤细胞中 PTK 活性异常升高,并且与人类肿瘤相关的癌基因和抑癌基因其 80% 编码蛋白激酶, PTK 的过度表达与肿瘤的生成相关^[9]。PKC 是一种重要的细胞信号转导因子,在细胞的增殖调控、恶性转化以及癌变过程中起重要的调节作用。研究表明,PKC 作为某些促癌剂和佛波酯的受体,与多种癌症的发生及发展相关,抑制 PKC 活性能显著促进多种肿瘤细胞的凋亡,因而可以作为抑制肿瘤生长和转移的作用靶点^[9,39]。c-Met 是一种肝细胞生长因子的细胞表面受体,是一类多效性的细胞活素,能够传递促迁移、抗凋亡和促有丝分裂信号。而异常的 HGF/c-Met 信号转导与肿瘤发生,尤其是侵袭和转移密切相关,它已成为目前肿瘤治疗的热门靶点之一^[28],针对其的药物 Cabozantinib 已获得 FDA 的许可进入临床治疗^[40]。分子对接结果表明,24-OH-PD 的抑制癌细胞增殖作用可能是通过抑制 PNP、胸苷酸合成酶或拓扑异构酶作用,抑制其 DNA 的复制从而抑制增殖;或是通过抑制 PTK, PKC 及 c-Met 的作用进而达到抑制增殖作用。

Bcl-2 家族蛋白是重要的膜蛋白,在线粒体凋亡通路中扮演重要角色,根据功能不同分为促凋亡和抗凋亡两类, Bcl-2, Bcl-xl 具有抗凋亡作用,有分子对接研究表明人参皂苷类化合物可能通过调节 BCL 家族蛋白功能诱导多种癌细胞凋亡^[22],实验研究也证实人参皂苷 Rg₃ 能通过增加 Bax, 抑制 Bcl-2 表达,最终诱导前列腺癌细胞凋亡^[41]。本研究中,分子对接结果表明 24-OH-PD 能够与 Bcl-2 和 Bcl-xl 成功结合,因而极有可能通过抑制该家族蛋白表达达到诱导癌细胞凋亡的作用。Caspase 家族蛋白与真核细胞凋亡密切相关,并参与细胞生长、分化及凋亡的调节,其中 Caspase-8 是死亡受体介导的凋亡途径中关键的启动子,能够通过寡聚而自身切割活化,并能激活下游 Caspase,产生凋亡效应^[25],大量具有抗癌作用的化合物通过直接或间接调节 Caspase 家族蛋白作用达到诱导癌细胞凋亡作用^[42],而分子对接结果表明 24-OH-PD 可能能够直接调节 Caspase-8 作用,激活死亡受体通路,最终诱导癌细胞凋亡。

本课题研究发现 24-OH-PD 对 CCRF-CEM, Jeko-1, M14 和 MD-MBA-231 癌细胞具有抑制细胞活性及诱导其凋亡的作用,进一步通过分子模拟研究,提示 24-OH-PD 发挥抑制活性可能通过影响 PNP, 胸苷酸合成酶, 拓扑异构酶, PTK, PKC, c-Met 的作用;诱导癌细胞凋亡可能通过影响 Bcl-2,

Bcl-xl, Caspase-8 的作用, 这为进一步实验验证提供了方向。本研究表明 24-OH-PD 可以作为抗癌药物或先导化合物进行进一步研究, 或对其修饰以更适合与这些靶蛋白结合, 进而开发新的基于人参皂苷的抗肿瘤药物。

[参考文献]

[1] CHEN X J, ZHANG X J, SHUI Y M, et al. Anticancer activities of protopanaxadiol- and protopanaxatriol-type ginsenosides and their metabolites [J]. Evid Based Compl Alt Med, 2016, doi:10.1155/2016/5738694.

[2] Ota T, Maeda M, Odashima S, et al. G1 phase-specific suppression of the Cdk2 activity by ginsenoside Rh₂ in cultured murine cells [J]. Life Sci, 1997, 60 (2): PL39-44.

[3] ZHANG Q, KANG X, YANG B, et al. Antiangiogenic effect of capecitabine combined with ginsenoside Rg₃ on breast cancer in mice [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2008, 23(5):647-653.

[4] LIU T, ZHAO L, ZHANG Y, et al. Ginsenoside 20 (S)-Rg₃ targets HIF-1 α to block hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer cells [J]. PLoS One, 2014, 9(9):e103887.

[5] WU R, RU Q, CHEN L, et al. Stereospecificity of ginsenoside Rg₃ in the promotion of cellular immunity in Hepatoma H22-bearing mice [J]. J Food Sci, 2014, 79 (7):1430-1435.

[6] 权恺, 刘群, 李萍, 等. 人参皂苷抗癌活性的最新研究进展 [J]. 医学研究生学报, 2015, 28 (4): 427-431.

[7] ZHENG Q, LI Z, LIU J, et al. Two new dammarane-type triterpene saponinins from Chinese red ginseng [J]. Nat Prod Res, 2016, 30(1):95-99.

[8] WANG Z, Pratts S G, ZHANG H, et al. Treg depletion in non-human primates using a novel diphtheria toxin-based anti-human CCR4 immunotoxin [J]. Mol Oncol, 2016, 10(4):553-565.

[9] Stamos J, Sliwowski M X, Eigenbrot C. Structure of the EGF receptor kinase domain alone and in complex with a4-anilinoquinazoline inhibitor [J]. J Biol Chem, 2002, 75(36):2091-2092.

[10] Sarkar J, Nandy S K, Chowdhury A, et al. Inhibition of MMP-9 by green tea catechins and prediction of their interaction by molecular docking analysis [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 84:340-347.

[11] Revelant G, Al-Lakkis-Wehbe M, Schmitt M, et al. Exploring S1 plasticity and probing S1' subsite of mammalian Aminopeptidase N/CD13 with highly potent

and selective aminobenzosuberone inhibitors [J]. Bioorgan Med Chem, 2015, 23(13):3192-3207.

[12] Sansen S, Yano J K, Reynald R L, et al. Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2 [J]. J Biol Chem, 2007, 282(19):14348-14355.

[13] Vinh N B, Devine S M, Munoz L, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of tetra-substituted thiophenes as inhibitors of p38 α MAPK [J]. Chemistryopen, 2015, 4(1):56-64.

[14] Singh S, Das T, Awasthi M, et al. DNA topoisomerase-directed anticancerous alkaloids: ADMET-based screening, molecular docking, and dynamics simulation [J]. Biotechnol Appl Bioc, 2015, 63(1):125-137.

[15] Sartaj T, Mehvash Z, Mohd A, et al. Synthesis and characterization of Cu (II)-based anticancer chemotherapeutic agent targeting topoisomerase I α : *in vitro* DNA binding, pBR322 cleavage, molecular docking studies and cytotoxicity against human cancer cell lines [J]. Eur J Med Chem, 2014, 74 (5): 509-523.

[16] Gogoi D, Baruah V J, Chaliha A K, et al. 3D pharmacophore-based virtual screening, docking and density functional theory approach towards the discovery of novel human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) [J]. J Theor Biol, 2016, 411:68-80.

[17] WANG Y, CHENG F X, YUAN X L, et al. Dihydropyrazole derivatives as telomerase inhibitors: structure-based design, synthesis, SAR and anticancer evaluation *in vitro* and *in vivo* [J]. Euro J Med Chem, 2016, 112:231-251.

[18] Dufe V T, Ingner D, Heby O, et al. A structural insight into the inhibition of human and *Leishmania donovani* ornithine decarboxylases by 1-amino-oxy-3-aminopropane [J]. Biochem J, 2007, 405 (2): 261-268.

[19] 苏敬雷. 中药穿心莲和冬凌草的计算药理学研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2015.

[20] Fatima S, Jatavath M B, Bathini R, et al. Multiple receptor conformation docking, dock pose clustering and 3D QSAR studies on human poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors [J]. J Recept Sig Transd, 2014, 34(5):417-430.

[21] Abdel Latif N A, Batran R Z, Khedr M A, et al. 3-Substituted-4-hydroxycoumarin as a new scaffold with potent CDK inhibition and promising anticancer effect: Synthesis, molecular modeling and QSAR studies [J]. Bioorg Chem, 2016, 67:116-129.

- [22] Sathishkumar N, Sathiyamoorthy S, Ramya M, et al. Molecular docking studies of anti-apoptotic Bcl-2, Bcl-xl, and MCL-1 proteins with ginsenosides from *Panax ginseng* [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2012, 27 (5):685-692.
- [23] Pottel J, Therrien E, Gleason J L, et al. Docking ligands into flexible and solvated macromolecules. 6. development and application to the docking of HDACs and other Zinc metalloenzymes inhibitors [J]. *J Cheml Inf Model*, 2013, 54(1):254-65.
- [24] Balachandran C, Sangeetha B, Duraipandiyam V, et al. A flavonoid isolated from *Streptomyces* sp. (ERINLG-4) induces apoptosis in human lung cancer A549 cells through p53 and cytochrome C release caspase dependant pathway [J]. *Chem-Biol Interact*, 2014, 224:24-35.
- [25] Leong K H, Looi C Y, Loong X M, et al. Cycloart-24-ene-26-ol-3-one, a new cycloartane isolated from leaves of *aglaia exima* triggers tumour Necrosis factor-receptor 1-mediated Caspase-dependent apoptosis in colon cancer cell line [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4):e0152652.
- [26] Saloahen O M H, Tochowicz A, Pozzi C, et al. Hotspots in an obligate homodimeric anticancer target. Structural and functional effects of interfacial mutations in human thymidylate synthase [J]. *J Med Chem*, 2015, 58(8):3572-3581.
- [27] WANG Z, WANG N, HAN S, et al. Dietary compound isoliquiritigenin inhibits breast cancer neoangiogenesis via VEGF/VEGFR-2 signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):e68566.
- [28] ZHU W, WANG W, XU S, et al. Design, synthesis, and docking studies of phenylpicolinamide derivatives bearing 1H-pyrrolo [2, 3-b] pyridine moiety as c-Met inhibitors [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2016, 24 (8): 1749-1756.
- [29] Naresh K M, Thunuguntla V B S C, Veeramachaneni G K, et al. Molecular characterization of human ABHD2 as TAG lipase and ester hydrolase [J]. *Bioscience Rep*, 2016, 36(4):1-11.
- [30] Keerthy H K, Mohan C D, Siveen K S, et al. Novel synthetic biscoumarins target tumor necrosis factor- α in hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(46):31879-31890.
- [31] Kadioglu O, CAO J, Saeed M E M, et al. Targeting epidermal growth factor receptors and downstream signaling pathways in cancer by phytochemicals [J]. *Target Oncol*, 2015, 10(3):337-353.
- [32] 戴国梁, 马世堂, 刘史佳, 等. 二咖啡酰奎宁酸与入血浆阿司匹林酯酶的分子对接 [J]. *中成药*, 2014, 36(9):1901-1905.
- [33] Kojima S, Chiyomaru T, Kawakami K, et al. Tumour suppressors miR-1 and miR-133a target the oncogenic function of purine nucleoside phosphorylase (PNP) in prostate cancer [J]. *Brit J Cancer*, 2011, 106(2):405-413.
- [34] Popovich D G, Kitts D D. Structure-function relationship exists for ginsenosides in reducing cell proliferation and inducing apoptosis in the human leukemia (THP-1) cell line [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 406(1):1-8.
- [35] DONG H, BAI L P, WONG V K, et al. The *in vitro* structure-related anti-cancer activity of ginsenosides and their derivatives [J]. *Molecules*, 2011, 16(12):10619-10630.
- [36] 刘存, 刘丽娟, 周超, 等. 基于“蛋白质相互作用网络-分子对接技术-体外实验”三维模式分析青黛对慢性粒细胞白血病的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(21): 206-211.
- [37] Arpaia E, Benveniste P, Di Cristofano A, et al. Mitochondrial basis for immune deficiency: evidence from purine nucleoside phosphorylase-deficient mice [J]. *J Exp Med*, 2000, 191(12): 2197-2208.
- [38] Ravandi F, Gandhi V. Novel purine nucleoside analogues for T-cell-lineage acute lymphoblastic leukaemia and lymphoma [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2006, 15(12): 1601-1613.
- [39] 吴洁, 倪沛洲, 凌霞. 蛋白激酶 C 的研究进展 [J]. *中国药物化学杂志*, 2001, 11(3): 182-186.
- [40] You W K, Sennino B, Williamson C W, et al. VEGF and c-Met blockade amplify angiogenesis inhibition in pancreatic islet cancer [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(14): OF1-11.
- [41] Min J K, Kim J H, Cho Y L, et al. 20 (S)-Ginsenoside Rg₃ prevents endothelial cell apoptosis via inhibition of a mitochondrial caspase pathway [J]. *Biochem Biophys Res Co*, 2006, 349(3): 987-994.
- [42] 刘德明, 周春燕, 吴嘉思, 等. 大黄素通过线粒体通路诱导 HepG2 细胞凋亡 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(3):104-108.

[责任编辑 张丰丰]