【实验研究】

沙苑子苷A通过抑制血管生成抗肿瘤作用研究

于 猛[1]，热增才旦[2]，杨 科[3]，贾红梅[1]，张宏武[1]，王英锋[4*]，邹忠梅[1*]

1. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所，北京 100193
2. 青海民族大学药学院，青海 西宁 810007
3. 浙江工业大学·绿色制药协同创新中心，浙江 杭州 310012
4. 首都师范大学分析测试中心，北京 100048

摘 要：目的 研究沙苑子苷A潜在的抗肿瘤作用。**方法** 利用计算机模拟方法，采用Discovery Studio™ 4.0（DS）软件反向寻靶，初步探讨沙苑子苷A潜在的抗肿瘤靶点，并通过CDOCKER进行分子对接初步验证结果；建立体外鸡胚绒毛尿囊膜（CAM）模型实验，血管计数法观察沙苑子苷A（0.2、0.4、0.8 mg/mL）对CAM新生血管生成的影响。**结果** 反向寻靶结果表明，沙苑子苷A可调控原癌基因酪氨酸蛋白激酶（ABL1）、原癌基因酪氨酸蛋白激酶（SRC）、靶点蛋白纤维生长因子受体1（FGFR1）、纤维生长因子受体（FGFR2）和转化生长因子-β（TGF-β）；分子对接结果证明，沙苑子苷A能够调控血管生长相关靶点；体外CAM实验结果发现，与对照组比较，沙苑子苷A能显著抑制新生中、小血管的生成（P<0.05、0.01）。**结论** 沙苑子苷A可能是沙苑子发挥抗肿瘤作用的主要活性成分，可能通过调控肿瘤基因的表达和抑制新生血管的生成发挥作用。

关键词： 沙苑子苷A；反向寻靶；分子对接；鸡胚绒毛尿囊膜；抑制血管生成

中图分类号： R962 **文献标志码：** A **文章编号：** 1674-6376（2020）01-0021-06

DOI： 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.01.004

A pilot study on anti-tumor effect of complanatoside A

YU Meng[1], REZENG Caidan[2], YANG Ke[3], JIA Hongmei[1], ZHANG Hongwu[1], WANG Yingfeng[4], ZOU Zhongmei[1]

1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China
2. The College of Pharmacy of Qinghai University for Nationalities, Xining 810007, China
3. The Collaborative Innovation Center of Yangtze River Delta Region Green Pharmaceuticals, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310012, China
4. The Analysis and Test Center, Capital Normal University, Beijing 100048, China

Abstract: Objective To study the potential anti-tumor effect of complanatoside A. **Methods** Target Searching of the anti-tumor protein correlated with complanatoside A based on reverse seeking target method, and further validated the target protein through the CDOCKER molecular docking approach. Finally, to validate neovascularization of complanatoside A (0.2, 0.4 and 0.8 mg/mL), the model of chick embryo chorioallantoic membrane was established. **Results** DS reverse seeking target found that the proto-oncogene of ABL1, SRC and 3 protein of FGFR1, FGFR2 and TGF-β, which were involved in tumor angiogenesis, were regulated by complanatoside A. Moreover, complanatoside A significantly inhibited small blood and medium vessels growth in Chick Embryo CAM model (P < 0.05 or 0.01). **Conclusion** The results suggested that CA might be an anti-tumor active ingredient of Astragalus

收稿日期： 2019-04-02

基金项目： 国家“重大新药创制”科技重大专项（2019ZX09735-002）

第一作者： 于 猛（1983—），男，博士，助理研究员，研究方向为中药及复方药效物质基础和作用机制研究。E-mail：myu@implad.ac.cn

***通信作者：** 王英锋 Tel：（010）68902687 E-mail：wangyf@cnu.edu.cn

邹忠梅 Tel：（010）57833290 E-mail：zmzou@implad.ac.cn

complanatus. The anti-tumor mechanism of CA was involving in regulating the tumors gene expression and significantly suppressing angiogenesis in Chick Embryo CAM model.

Key words: complanatoside A; reverse seeking target; molecular docking; chorioallantoic membrane of chicken embryo; anti-angiogenesis

肿瘤是临床常见病之一，因其发病率呈持续增长趋势，已经严重影响了人类的生命健康。肿瘤血管的形成与生长在肿瘤的发生发展过程中占有极其重要的地位，为肿瘤的快速增长提供营养，是肿瘤侵袭和转移最直接的途径[1]。因此，抑制血管生成在临床上肿瘤治疗中具有非常重要的意义。鸡胚绒毛尿囊膜（CAM）是研究肿瘤生物学行为的重要模型，因其易于观察、操作简单、可重复性高、实验周期短、易于大样本重复等特点，是目前研究血管生成的经典方法，广泛应用于抗肿瘤药物的初步筛选研究[2-3]。

沙苑子为豆科植物扁茎黄芪 *Astragalus complanatus* R. Br. 的干燥成熟种子，性味甘、温，归肝、肾经，具有温补肝肾、固经、缩尿、明目等功效。沙苑子主要含有黄酮、生物碱、酚类、鞣质、甾醇和三萜等成分，其中黄酮类成分是其发挥药效的主要活性成分[4-5]。现代药理研究表明，沙苑子特别是沙苑子总黄酮（TFS）具有明确的抗肿瘤作用[5]。白勇等[6]采用S180肉瘤小鼠模型评价了TFS的体内抗肿瘤作用，结果显示，TFS抗肿瘤作用明确，但其药效物质基础至今尚不明确。本课题组前期从TFS中分离得到一种黄酮苷，对其结构进行鉴定确定为沙苑子苷A，并采用已建立的UPLC方法对TFS中沙苑子苷A的含量进行测定[7]，结果发现其在TFS中的含量较高，鉴于此，推测沙苑子苷A可能是TFS发挥抗肿瘤作用的主要成分，但其作用靶点和机制仍不清楚。随着计算机辅助药物设计方法在药物开发中的作用越来越受到重视，反向寻靶和分子对接技术可快速、准确的预测药物潜在的作用靶点[8-9]，已广泛用于中药和天然产物的研究。

本研究首先采用分子反向寻靶结合正向分子对接技术对其潜在的抗肿瘤靶点蛋白进行预测，然后采用体外CAM模型，研究沙苑子苷A给药后对CAM新血管生成的抑制作用，为进一步明确TFS抗肿瘤的药效物质基础提供科学依据。

1 材料

1.1 药物与主要试剂

沙苑子苷A，实验室自制，质量分数大于98%；苏拉明，购于Sigma-Aldrich；生理盐水（批号1706152004），山东七都药业有限公司；明胶海绵（批号20180308），南昌市祥恩堂医疗器械有限公司；医用酒精（批号20180407），北京鸿达志伟达工贸有限公司；丙酮（批号20180706），北京化工厂；固定液，丙酮与甲醇混合溶液（体积比1∶1）；新洁尔灭，实验室自制；种鸡蛋鸡胚，德国罗曼种鸡蛋，购于中国农业大学孵化厂。

1.2 主要仪器

超净工作台，上海净化设备厂；AB135-S电子分析天平，瑞士Mettler公司；KQ-118B超声振荡仪，昆山超声仪器有限公司；320040型解剖显微镜，日本Olympus公司；FT-XJDF4型恒温孵育箱，北京方通孵化器厂；u700型数码相机，日本Olympus公司。

2 方法

2.1 基于反向寻靶技术的沙苑子苷A抗肿瘤作用靶点研究

利用Discovery Studio™4.0（DS）的pharmocphores模块进行反向寻靶，寻找沙苑子苷A潜在的作用靶点，并根据药效团的FitValue值筛选相关靶点。最后，进一步采用DS的receptor-ligand interaction模块中的CDOCKER将所筛选的靶点与沙苑子苷A分子对接，初步验证沙苑子苷A的药效作用。

2.2 沙苑子苷A对鸡胚CAM血管生成的影响

2.2.1 鸡胚CAM模型的建立　选取亮度相近，质量为（50±5）g，表壳无污染、无破损的新鲜白皮种鸡蛋（产后1周内）80枚，洗净，用0.5%新洁尔灭溶液浸泡约3 min。移至孵化箱中，气室向上，保持37 ℃、相对湿度65%～70%的环境中孵育，孵育7 d，每日早晚各翻转1次。孵育7 d后，取出已孵育的种鸡蛋，置于照卵灯下检查鸡胚孵育及存活状况，弃去死胎及胚胎发育不良的种鸡蛋。然后在超净台上，取已孵育好的种蛋，于气室一端用70%酒精消毒。取用解剖剪尖端轻轻在气室端的顶部开1个大小约为1.2 cm×1.2 cm的小孔。用吸有医用生理盐水的注射器轻轻挑开蛋膜，并滴入少量的无菌生理盐水，使气室膜与CAM分离，然后用镊子轻轻去除上层的气室膜，暴露下层的CAM。

2.2.2 实验分组及药物处理 选取发育良好的鸡胚随机分为5组，每组8枚，即对照组、苏拉明（阳性药）组及沙苑子苷A低、中、高剂量组。取医用一次性明胶海绵，平铺在桌面上并压平，用打孔器制成大小统一直径约为5 mm的明胶海绵膜，高压湿热灭菌。分别在药膜上滴加生理盐水溶液、0.2 mg/mL的苏拉明生理盐水溶液及沙苑子苷A低、中、高浓度（0.2、0.4、0.8 mg/mL）溶液各10 μL，并置于紫外灯下消毒后，立即转入无菌环境中风干，即得各实验组药膜。用镊子轻轻将含药的明胶海绵膜置于CAM和卵黄囊膜两条大血管间血管相对较少的区域，然后用灭菌透明胶带封闭卵壳，继续孵育72 h。

2.2.3 观察方法 实验结束后，取出鸡胚，揭去透明胶带，加入1 mL固定液，室温下固定约10 min，剥离气室端蛋壳，充分暴露绒毛尿囊膜，小心剥离绒毛尿囊膜，平铺于载玻片上，置于解剖镜下观察并进行图像采集。

采用计算机图像处理系统（Image-Proplus）对CAM进行处理，按照血管直径大小进行统计分析，直径小于50 μm为小血管，50～100 μm为中血管，大于100 μm为大血管，统计结果以$\bar{x} \pm s$表示，应用SPSS 13.0统计软件进行统计分析，单因素方差分析比较各组间差异。

3 结果

3.1 沙苑子苷A反向寻靶预测结果

利用DS反向寻靶对沙苑子苷A的靶点蛋白进行初步筛选，根据药效基团模型吻合度拟合分值，按照得分由高到低排序，如表1所示，整合得到排名前10关键的靶标蛋白（NO.8 3cyq重复）。然后基于GO数据库和KEGG数据库进行基因功能和通路的富集分析，涉及多个肿瘤相关的蛋白，2g2f表示原癌基因酪氨酸蛋白激酶（ABL1）；3dqx表示原癌基因酪氨酸蛋白激酶（SRC）。结果初步提示，沙苑子苷A能调控癌症基因的表达。

3.2 沙苑子苷A与血管生成靶点蛋白正向分子对接结果验证

根据反向寻靶的研究结果，通过DS软件对小分子沙苑子苷A和靶标蛋白进行对接分析，结果发现沙苑子苷A与3个肿瘤血管生成相关蛋白纤维生长因子受体1（FGFR1）、纤维生长因子受体（FGFR2）、转化生长因子-β（TGF-β）能够较好的结合，得到沙苑子苷A与靶蛋白表面疏水区域和氢键供体与受体区域的三维（3D）和二维（2D）结合模式图（图1）。以沙苑子苷A与FGFR1的分子对接结果为例，解释其结合的极性作用、疏水作用等：沙苑子苷A与FGFR1的氨基酸残基LEU484、ALA564、ASN628、LYS514、ASP64之间形成6个稳定的氢键；与GLY643、LEU644、ARG627、THR658、PHE489、GLY485、ALA512、TYR563之间存在范德华力；与VAL561、ALA640、ILE545、VAL492、LEU630之间存在疏水作用（图1A和B）。结果提示，沙苑子苷A可能调控肿瘤血管生成蛋白，进而影响肿瘤血管的生成而发挥抗肿瘤作用。

3.3 沙苑子苷A对CAM新生血管生成的影响

正常状态下CAM血管生长呈现叶脉状，以载体为中心向四周分级生长，主血管粗壮，分支血管清晰；苏拉明组与对照组比较，大血管数目无显著性差异，中、小血管及总血管数目显著减少（$P<0.01$、0.001）；沙苑子苷A给药后，大血管无显著性差异，与对照组比较，沙苑子苷A 0.4 mg/mL组中、

表1 反向寻靶预测蛋白信息列表

Table 1 Reverse targeting prediction protein information list

序号	药效团	基因	Uniprot	Kegg-Identifier	Target-Class-D	吻合度拟合分值
1	2g2f	ABL1	P00519	K06619	Others	0.939 8
2	3k6b	A4	Q10651	K04520	Others	0.936 9
3	3dqx	SRC	P00523	K05704	Others	0.916 0
4	3dcc	CAH2	P00918	K01672	Carbonate dehydratase	0.913 5
5	2zfp	THRB	P00734	K01313	Others	0.910 4
6	3n83	ALDH2	P05091	K00128	Aldehyde dehydrogenase (NAD+)	0.909 7
7	2wms	CHK1	O14757	K02216	Non-specific serine-threonine protein kinase	0.906 7
8	3cyq	MOTB	P56427	K02557	Motility protein B	0.892 1
9	3d9z	CAH2	P00918	K01672	Carbonate dehydratase	0.882 3

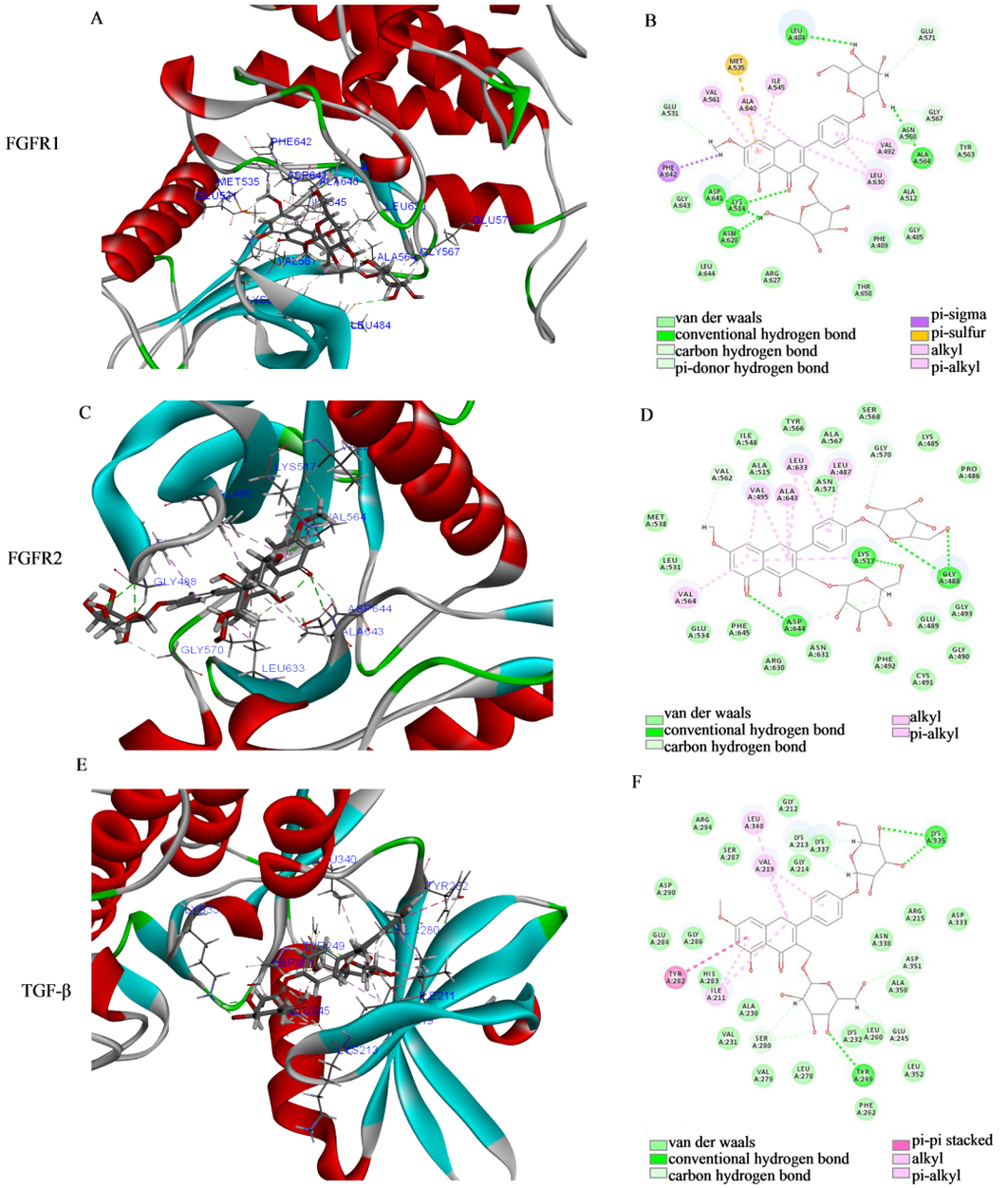

图 1　沙苑子苷 A 与 FGFR1（A、B）、FGFR2（C、D）和 TGF-β 结合（E、F）

Fig. 1　3D and 2D diagrams of CA bind to FGFR1 (A and B), FGFR2 (C and D) and TGF-β (E and F)

小血管及血管总数存在显著减少的现象（$P<0.05$、0.01），提示沙苑子苷 A 对新血管生成具有显著的抑制作用。结果见图 2 和表 2。

4　讨论

本研究利用 DS 反向寻靶及正向分子对接的计算机模拟方法，对沙苑子苷 A 潜在的抗肿瘤靶点蛋白进行预测，并通过体外鸡胚实验进行验证。反向寻靶结果发现，沙苑子苷 A 能够调控原癌基因酪氨酸蛋白激酶 ABL1、SRC，以及肿瘤血管生成相关的靶点蛋白 FGFR1、

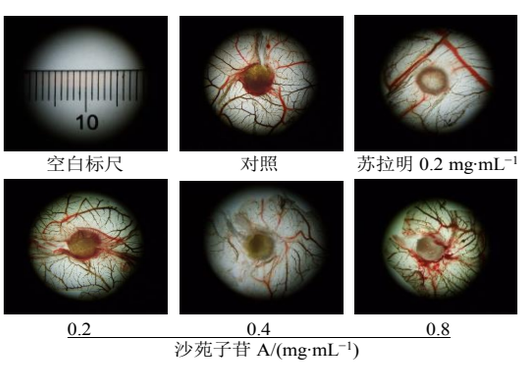

图 2　各实验组 CAM 血管计数

Fig. 2　Images of blood vessels in CAM experimental groups

表2 沙苑子苷A对CAM血管生成的抑制作用（$\bar{x}\pm s$，n=8）

Table 2 Inhibitory effect of CA on angiogenesis of CAM model（$\bar{x}\pm s$，n=8）

组别	浓度/（mg·mL^{-1}）	大血管/条	中血管/条	小血管/条	总血管/条
对照	—	3.9±2.1	8.8±3.1	13.1±4.3	25.8±3.2
苏拉明	0.2	3.9±3.0	4.1±2.6**	7.4±1.4***	15.4±2.3**
沙苑子苷A	0.2	4.6±1.7	8.7±3.0	11.4±2.6	24.7±3.7
	0.4	4.4±1.4	5.5±2.1*	9.2±3.3**	19.1±2.3*
	0.8	4.9±1.9	6.3±0.9	11.8±2.8	23.0±1.9

与对照组比较：*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

*P < 0.05 **P < 0.01 ***P < 0.001 *vs* control group

FGFR2和TGF-β，分子对接结果表明，沙苑子苷A能够很好的与肿瘤血管生成相关的靶点结合；体外鸡胚实验证实，沙苑子苷A对新生血管具有显著的抑制作用，推测沙苑子苷A可能是沙苑子中潜在的抗肿瘤有效成分之一，其能调控肿瘤基因的表达和抑制新生血管的生成而发挥抗肿瘤作用。

反向寻靶结合正向分子对接技术是比较成熟的药物研究方法，可对不明确作用靶点的小分子化合物的靶点进行快速准确的预测[10]。本研究中反向寻靶结果证实沙苑子苷A能调控ABL1、SRC、FGFR1、FGFR2和TGF-β的表达；对接结果发现，沙苑子苷A能与潜在的靶蛋白的氨基酸残基形成多种分子间作用力而稳定的结合，且筛选出FGFR1、FGFR2、TGF-β 3个沙苑子苷A潜在的作用靶点。其中FGFR可参与机体许多生物过程，如调节器官发育、新生血管生成、细胞增殖等，FGFR蛋白的扩增，与许多恶性肿瘤的发生、发展具有密切联系[11]；而TGF-β信号通路的活化与肿瘤的发生发展也密切相关，可促肿瘤细胞增殖、促肿瘤血管生成、刺激细胞外基质表达等促进肿瘤的生长与转移，并在不同环境下表现出促癌或抑癌的双向功能[12]。上述结果进一步提示，沙苑子苷A具有潜在的抗肿瘤活性。

此外，CAM模型是研究肿瘤细胞实验性或自发性深入血管、转移、血管生成等的良好动物模型[2,13]，但其也存在一定局限性，由于鸡胚孵育的最佳时间是7～9 d，时间周期短，大多数肿瘤细胞在实验结束前未能呈现明显的肿瘤克隆[3,12]，只能作为抗肿瘤药物活性的初步筛选。本研究笔者仅从计算机辅助模拟筛选结合体外CAM模型考察沙苑子苷A对新生血管生成的影响，仅作为沙苑子苷A抗肿瘤作用的初步探索性研究。后续验证实验需要结合体外肿瘤细胞实验、整体动物模型等研究结果，进一步明确沙苑子苷A的抗肿瘤作用，可为明确沙苑子抗肿瘤的药效物质基础提供科学依据。

参考文献

[1] Ramjiawan R R, Griffioen A W, Duda D G. Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy ? [J]. Angiogenesis, 2017, 20(2): 185-204.

[2] Lokman N A, Elder A S F, Ricciardelli C, et al. Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an *in vivo* model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13: 9959-9970.

[3] Kauffmann P, Troeltzsch M, Brockmeyer P, et al. First experience of chick chorioallantoic membrane (CAM) assay in the clinical work flow with oral squamous cell carcinoma patients [J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2018, doi: 10.3233/CH-189315.

[4] 常玉华, 张清安. 沙苑子化学成分研究现状与展望 [J]. 陕西农业科学, 2011, 57(6): 129-131, 186.

[5] 吴 晓, 刘银芳, 刘春宇. 沙苑子化学成分研究 [J]. 安徽中医药大学学报, 2014, 33(3): 91-94.

[6] 白 勇, 孙安盛, 吴 芹, 等. 沙苑子总黄酮和百草酸的体内外抗肿瘤作用 [J]. 中国海洋药物, 2017, 36(2): 1-6.

[7] 于 猛, 竺 梅, 王英锋, 等. 沙苑子中沙苑子苷A超声波提取工艺及含量测定 [J]. 首都师范大学学报: 自然科学版, 2011, 32(2): 41-44.

[8] 陈芳玲, 李向前, 江 涛, 等. 抗肿瘤蛋白数据库的建立及其在海洋小分子化合物反向寻靶中的应用 [J]. 中成药, 2014, 36(4): 684-689.

[9] 郑春歌, 黄新安, 沈小玲, 等. 基于分子对接的孕甾烷酯类化合物的寻靶研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(4): 491-498.

[10] 周 域, 陆建图, 张小丁, 等. 苍术酮潜在靶点预测及正

向分子对接验证 [J]. 邵阳学院学报: 自然科学版, 2019, 16(1): 98-104.

[11] 黎晓龙, 邱 瑞, 李 珏, 等. 小分子抗肿瘤FGFR抑制剂与FGFR蛋白的作用关系研究及研发进展 [J]. 药学学报, 2016, 51(11): 1689-1697.

[12] 褚晓杰. 靶向TGF-β1主动免疫调控肿瘤微环境以及核酸与纳米材料佐剂对治疗性HPV疫苗作用的影响 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2018.

[13] 李 萍, 黄光武, 张 哲. 鸡胚绒毛尿囊膜模型与人类肿瘤研究 [J]. 广西医科大学学报, 2014, 31(3): 520-522.