

黄酮苷元类与表皮生长因子受体结合模式的理论研究

刘 鹏¹, 王晶晶^{1,2}, 徐为人^{1*}, 刘 巍¹, 刘冰妮¹, 汤立达³

1 天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193

2 天津医科大学基础医学院, 天津 300070

3 天津药物研究院 天津药代动力学与药效动力学省部共建国家重点实验室, 天津 300193

摘 要 目的: 利用对接方法对黄酮苷元类与表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 结合模式和能力进行研究, 以阐明黄酮苷元类生物活性作用的理论基础。**方法:** 从 RCSB Protein Data Bank 数据库检索受体表皮生长因子受体晶体结构, 收集黄酮苷元类配体, 用 Schrodinger 8.0 软件对受体和配体进行对接计算, 分析受体和配体的作用模式 and 对接分数。**结果:** EGFR 和黄酮苷元类配体能够较好对接, 其作用模式大致分为 I、II 和 III 3 种, 结合能力强的配体在活性结合位点可见氢键形成和亲脂基团, 5、7 位和 4' 位的取代对结合模式的影响较大。3、7、3'、4' 位的取代的变化对结合能力影响较大。**结论:** 黄酮苷元类化合物存在与 EGFR 较好的结合, 其中可能有选择性和多靶标的 EGFR 抑制剂存在, 其取代位置和方式可以影响结合模式和能力, 对于研究黄酮苷元类抗肿瘤药物具有参考价值。

关键词 表皮生长因子受体; 黄酮苷元; 对接计算; 结合模式

中图分类号: R962 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2009) 01-0048-06

Theoretic studies on binding mode between flavonoid aglycones and epidermal growth factor receptor

LIU Peng¹, WANG Jing-jing^{1,2}, XU Wei-ren^{1*}, LIU Wei¹, LIU Bing-ni¹, TANG Li-da³

1 Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2 Basica Medical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

3 Tianjin State Key Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract Objective: To elucidate the mechanism of bioactivities of flavonoid aglycones, the interaction ability and mode between flavonoid aglycones and epidermal growth factor receptor (EGFR) were studied with docking calculation. **Methods:** The crystal structures of EGFR were downloaded from RCSB Protein Data Bank. The structures of flavonoid aglycones were collected as the ligands. The Schrodinger 8.0 software was employed to dock ligands into receptor, and the binding mode and docking scores were analyzed. **Results:** Flavonoid aglycones and EGFR can bind well. The binding mode can be classified into type I, II and III. H-bond and lipophilic interaction can be seen at active sites in the well binding modes. Substitution at position 5, 7 and 4' will mostly affect the binding-mode, and at position 3, 7, 3' and 4' will mostly affect

收稿日期: 2009-06-21

基金项目: 科技部支撑项目 (2007BAI41B00; 2007BAI41B01); 天津市支撑项目 (07ZCKFSH00300)。

作者简介: 刘 鹏, 男, 天津市人, 硕士研究生, 研究方向为天然药物。E-mail: lpml@163.com

* 通讯作者: 徐为人 Tel: (022) 23003529, E-mail: xwrtj@yahoo.com.cn

the binding ability. **Conclusion:** Among flavonoid aglycones, there might be selective EGFR inhibitors and multiple targeted PTKs inhibitors. The binding mode and ability can be affected by the substitution of different positions or groups. The results suggest that flavonoid aglycones be potential anti-tumor leads.

Key words epidermal growth factor receptor(EGFR); flavonoid aglycone; docking calculation; binding mode;

黄酮类化合物是一类广泛存在于植物中的天然酚性化合物,文献报道有抗癌作用^[1]。天然黄酮类化合物多以苷类形式存在,并且由于糖的种类、数量、联接位置及联接方式不同可以组成各种各样黄酮苷类,黄酮苷也可以通过化学衍生化反应形成黄酮苷元,黄酮苷元可以直接被吸收进入血液,黄酮苷元比黄酮苷具有更高的生物利用率^[2]。本实验室已对黄酮苷与 EGFR 受体的作用进行讨论^[3],本研究进一步对200多个黄酮苷元和 EGFR 晶体结构的结合模式进行更深入的理论研究,比较黄酮苷和黄酮苷元与 EGFR 的作用,进一步研究黄酮类化合物抗肿瘤作用的构效关系。

1 材料和方法

1.1 受体准备

选取之前研究中筛选的 EGFR 晶体结构(pdb 代码: 1XKK)为研究对象。用 Schrodinger 8.0 软件对 1XKK 结构进行处理,除去水分子和重复的蛋白质链,留下原始配体 Lpatinib,对受体结构进行必要的修正、加氢和结构优化^[3]。

1.2 配体准备

选取天津药物研究院植物成分库中的黄酮苷元类化合物,选取其中的 2, 3-二氢黄酮和黄酮结构 200 多个,黄酮母核结构见图 1,取代基主要为羟基、甲氧基和碳链。选取上市药物 Imatinib、Dasatinib、Sunitinib、Erlotinib、Gefitinib、Lpatinib 和临床研究药物 Dovitinib、Canertinib、Cediarnib、Vandetanib 作为阳性配体。用 Schrodinger 8.0 软件对选取的所有小分子物质进行加电荷和结构优化,备用。

1.3 分子对接及结合模式分析

分子对接采用 Schrodinger 8.0 软件的 Glide 模块进行,对获得评分最低的结构再进行优化。结合模式分析采用已经确定的方法^[3],根据活性中心

的空腔划分为 5 个区域(A、B、C、D 和 E)。通过对配体和结合模式的分析,根据配体占据的活性空腔的区域,结合模式分为 I、II 和 III 等 3 类,如图 2 所示。

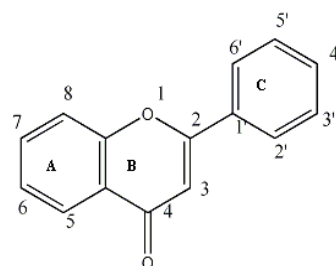


图 1 黄酮的基本结构

Fig.1 Basic structure of flavone

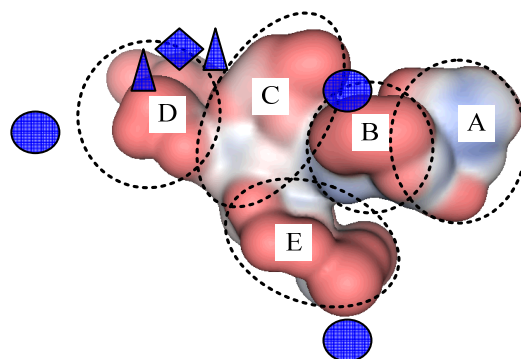


图 2 活性空腔的分区及活性作用位点

Fig. 2 Partition of active pocket and active sites

1.4 对接分数的分析

根据阳性配体与受体的对接分数进行分组,阳性配体中选择 EGFR 的抑制剂 Lapatinib、Gefitinib、Erlotinib,其对接分数分别为-13.8、-9.84、-8.61,其他多靶标的 PTK 抑制剂的对接分数在-7.5 ~ -7.0,参考阳性配体的对接分数,与先前的研究结果比较,将黄酮苷元与 EGFR 的 II 模式、III 模式按照对接分数<-8.5、-8.5~-7.5、>-7.5 分为 3 个等级 II-1、II-2、II-3 以及 III-1、III-2、III-3,对配体各位置的取代基与对接分数进行比较,考察

取代基的不同对配体受体的结合模式和结合能力的影响。分数的第一级可能为选择性的 EGFR 抑制剂, 第二级可能是对应于多靶标抑制剂, 第三级可能具有较小的实际价值。I 模式只有 9 个配体, 数量较少, 没有进一步分组。

2 结果

2.1 取代基和作用模式的关系

在研究的 200 多个黄酮苷元结构中 2,3-二氢黄酮和黄酮的比例, 在 I 模式中分别为 11 % 和 89 %, 在 II 模式中分别为 12 % 和 88 %; 在 III 模式中分别为 15 % 和 85 %, 结果表明, 黄酮在 2, 3-二氢化后对配体与受体的结合模式影响不大, 而黄酮苷中 2, 3-二氢化对配体和受体的结合模式有一定影响^[3]。

3 位的取代基的变化对结合模式的影响较大, 取代基为羟基易形成 II 模式, 与黄酮苷的研究结果一致; 取代基为甲氧基不易形成 II 模式。5 位取代基以羟基取代出现最多, 羟基取代多形成 II、III 模式, 出现频率为 77 % 和 82 %, I 模式羟基取代出现频率均为 22 %。6 位各取代基出现频率均较低, 甲氧基取代易形成 II 模式, 出现频率为 20 %, 不易形成 I 模式, 出现频率为 0 %, 这与黄酮苷的研究结果相反。7 位羟基取代多形成 III 模式, 出现频率为 83 %, 最少为 I 模式出现频率为 11 %, 黄酮苷的研究中也可见此趋势; 甲氧基取代多形成 II 模式, 出现频率为 36 %, 黄酮苷的研究中最多形成的为 I 模式; 碳链取代多形成 I 模式, 出现频率为 11 %。8 位和 2' 各取代基出现频率均较低, 8 位甲氧基和碳链取代容易形成 II 模式。2' 位羟基取代影响较大, 羟基取代均易形成 II 模式, 取代出现频率均为 21 %。3'、4' 位羟基取代出现频率较高, 易形成 III 模式, 出现频率分别为 44 %、85 %, 与黄酮苷的研究一致; 3' 位碳链取代多形成 I 模式, 出现频率为 22 %; 4' 位甲氧基取代易形成 II 模式, 出现频率为 20 %。5' 和 6' 位较少有取代, 对对接模式的影响

不大^[3]。见表 1。

对阳性配体与活性位点结合模式的药效团分析见图 2。可见 C 区为核心骨架结合区有供氢体以及受氢体出现 (图中分别表示为三角形和菱形标志), 形成氢键, 使受体和配体结合稳定, 其他区域可见亲脂基团 (图中表示为圆形标志), 亲脂基团的疏水作用有助于受体和配体的结合。图 3 所示为阳性配体 Erlotinib 和受体的结合模式, 配体占据活性中心 B、C、D 区, C 区可见氢键形成, B 和 D 区可见亲脂基团。对 200 多个黄酮苷元结构和 EGFR 受体的结合模式的活性结合位点分析, 结果显示对接分数较高的配体均可见在黄酮母核结构各取代位置出现羟基取代与活性位点作用。4 位的羰基作为受氢体, 3、5、6、7、8 位点出现羟基取代作为供氢体, 形成核心结合区, 且 4 位羰基和 5 位羟基可形成分子内氢键, 促使结合稳定。黄酮母核结构的 C 环出现于 B 区, 作为亲脂基团, 与活性位点形成疏水作用, 即三种结合模式对接分数较好者均为在 C 区核心骨架结合区有氢键作用, B 区有亲脂基团的疏水作用, 促使配体和受体结合稳定。

2.2 取代基和对接分数的关系

按照对接分数分组, II 模式中 <-8.5 的配体只有 2 个, 2 个配体的结构中取代基未见甲氧基; III 模式中没有, 故没有对 II-1 和 III-1 组进行讨论。

对取代基和取代位置的不同与对接分数进行分层统计分析, 2, 3-二氢黄酮在 II-2 组出现频率为 16 %, II-3 组为 8 %, 这和黄酮苷研究的趋势相反。III 模式 2, 3-二氢黄酮出现频率分别为 III-2、III-3 组均为 19 % 和 11 %, 黄酮苷元相对黄酮苷较多可见黄酮 2, 3-二氢化^[3]。可判断 C2-C3 饱和度对黄酮苷元也是主要影响结合模式, 对结合的分数的影响较小。

3 位羟基取代主要对 II 模式对接分数影响较大, II-2、II-3 组出现频率为 47 %、18 %, III-2、III-3 组分别为 19 % 和 6 %, 羟基取代有利于较好的结合, 与黄酮苷的研究结果一致。与黄酮苷相同,

黄酮苷元配体 5 位以羟基取代为主对结合的影响不大。6 位羟基取代在Ⅲ-2、Ⅲ-3 组出现频率分别为 16 %和 25 %；甲氧基取代在Ⅱ-2、Ⅱ-3 组出现频率分别为 7 %和 33 %，Ⅲ-2、Ⅲ-3 组出现频率为 6 %和 22 %，说明羟基和甲氧基取代不利于结合。7 位羟基取代在Ⅱ-2、Ⅱ-3 组出现频率为 76 %、47 %，Ⅲ-2、Ⅲ-3 组出现频率为 100 %和 67 %，取代有利于提高结合能力；甲氧基取代在Ⅱ-2、Ⅱ-3 和Ⅲ-2、Ⅲ-3 组取代频率为 22 %、49 %和 0 %、33 %，取代不利于结合。8 位羟基取代在Ⅲ-2、Ⅲ-3 组出现频率为 16 %和 3 %，取代利于结合，与黄酮苷的研究结果相反；甲氧基取代在Ⅱ-2、Ⅱ-3 和Ⅲ-2、Ⅲ-3 组出现频率分别为 4 %、19 %和 3 %、11 %，取代不利于结合；碳链在Ⅲ-2、Ⅲ-3 组出现频率为 3 %和 14 %，取代不利于结合。3' 位羟基取代在Ⅱ-2、Ⅱ-3 组取代出现频率分别为 42 %、16 %，Ⅲ-2、Ⅲ-3 组羟基取代出现频率为 52 %和 36 %，

取代有利于结合；Ⅲ-2、Ⅲ-3 组甲氧基取代出现频率为 6 %和 17%，取代不利于结合。4' 位以羟基取代基为主取代为羟基在Ⅱ-2、Ⅱ-3 组出现频率为 67 %、36 %，Ⅲ-2、Ⅲ-3 组出现频率为 100 %和 69 %，与黄酮苷配体的研究一致，取代有利于结合，取代为甲氧基在Ⅲ-2、Ⅲ-3 组出现频率为 0 %、11 %，甲氧基取代不利于结合。见表 2、表 3。

2'、5'、6' 位取代较少，这些位置对结合能力影响较小。2' 位羟基取代频率在Ⅱ-2、Ⅱ-3 组分别为 18 %和 24 %，取代不利于结合；甲氧基取代频率在Ⅲ-2、Ⅲ-3 组分别位 0 %、14 %，取代不利于结合。5' 位羟基取代出现频率在Ⅱ-2、Ⅱ-3 组分别为 16 %、6 %，甲氧基取代在Ⅲ-2、Ⅲ-3 组出现频率为 0 %和 14 %，羟基取代促进结合与黄酮苷的研究结果一致，甲氧基取代不利于结合则在之前的研究中未见到。见表 2。

表 1 三种模式中四种取代基在不同取代位置的取代频率

Table 1 Substituting frequency of four substituents in different sites of three binding-modes

模式	取代基	不同取代位置的取代频率 / %									
		3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'
I	羟基	0	22	11	11	0	0	0	33	0	0
	甲氧基	0	11	0	22	0	0	0	11	0	0
	碳链	0	0	0	11	0	0	22	0	0	0
II	羟基	32	77	2	61	3	21	29	52	11	3
	甲氧基	10	13	20	36	12	4	15	20	2	0
	碳链	0	0	10	2	17	0	2	1	0	0
III	羟基	12	82	21	83	9	4	44	85	6	4
	甲氧基	11	3	14	17	7	7	12	6	7	0
	碳链	0	0	5	0	9	2	4	0	4	0

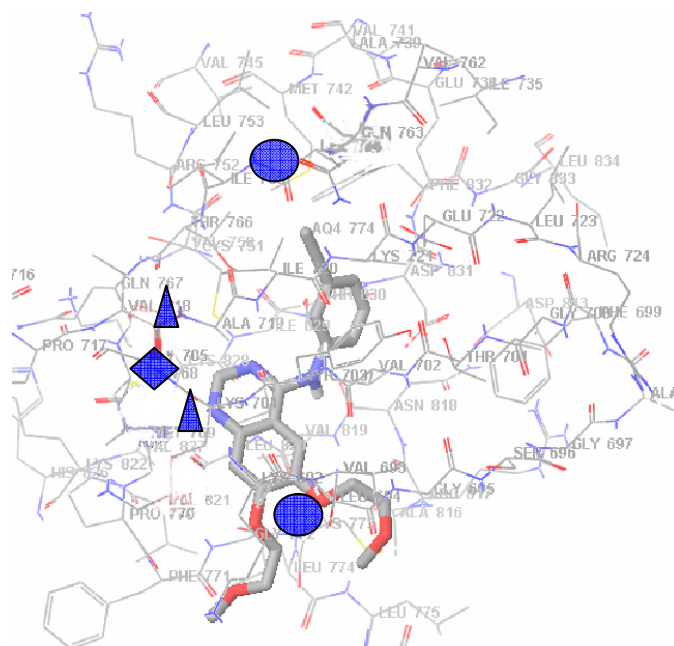


图3 阳性配体 Erlotinib 和受体的结合模式以及活性作用位点
Fig.3 Binding mode and active sites of Erlotinib and receptor

表2 II-2、II-3组中三种取代基在不同取代位置的取代频率

Table 2 Substituting frequency of three substituents in different sites of groups II-2 and II-3

模式	取代基	不同取代位置的取代频率 / %									
		3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'
II-2	羟基	47	72	0	77	0	16	42	67	14	2
	甲氧基	7	12	7	23	5	5	14	9	0	0
	碳链	0	0	12	0	14	0	2	2	0	0
II-3	羟基	18	81	3	47	7	24	16	36	6	3
	甲氧基	14	15	33	49	19	3	16	32	3	0
	碳链	0	0	8	1	18	0	2	0	0	0

表3 III-2、III-3组中三种取代基在不同取代位置的取代频率

Table 3. Substituting frequency of three substituents in different sites of groups III-2 and III-3

模式	取代基	不同取代位置的取代频率 / %									
		3	5	6	7	8	2 '	3 '	4 '	5 '	6 '
III-2	羟基	19	81	16	100	16	3	52	100	6	0
	甲氧基	10	0	6	0	3	0	6	0	0	0
	碳链	0	0	6	0	3	3	3	0	3	0
III-3	羟基	6	83	25	67	3	6	36	69	6	8
	甲氧基	14	6	22	33	11	14	17	11	14	0
	碳链	0	0	3	0	14	0	6	0	6	0

3 讨论

通过研究和分析,可以得到下列结论:EGFR和黄酮苷元类配体能够较好对接,其中可能有选择性和多靶标的EGFR抑制剂存在,其作用模式也可以大致分为I、II和III三种,结合能力强的配体在活性结合位点可见氢键形成和亲脂基团,5、7位和4'位的取代对结合模式的影响较大。3、7、3'、4'位的取代的变化对结合能力影响较大,3、7和4'位在黄酮苷中也有较大影响。

与先前研究的和黄酮苷结果相比,有相似的地方也有差别之处:黄酮苷元类结构能够与EGFR具有良好的结合模式,5、7位和4'位的取代对结合模式的影响较大,黄酮苷则为3位和2'位,黄酮苷元的3、7、3'、4'位的取代的变化对结合能力影响较大,其中3、7和4'位也是影响黄酮苷配体与受体结合能力的取代位置^[3]。

本文在对黄酮苷和EGFR受体作用的理论研究的基础上对黄酮苷元与EGFR受体作用进行了理论研究,对比黄酮苷和黄酮苷元与EGFR受体结合方面的结构影响因素的差异。研究表明,三种模式中结合能力强的均为与活性位点出现供氢体和受氢体形成氢键作用以及出现亲脂基团,这些因素促使受体和配体结合稳定。II模式3、7、3'、4'位的羟基取代促进II模式的对接,有文献报道多羟基黄酮结构的活性环为C环,B环3位羟基取代能增强C环活性^[5],在4'位羟基取代时,能加强癌细胞抑制能力^[6],这和本文的结果间接相符,羟基取代的位置也是黄酮类化合物抑制PIK3活性的重要因素^[5],同时在前黄酮苷的研究中也见到4'位的羟基取代促进II模式的对接。

在晶体结构已知的情况下,对接方法能够比较准确地预测配体与受体的结合模式和能力,是药物设计中的常用方法^[7,8]。EGFR在人体的信号传导中发挥着重要作用,近年作为抗肿瘤药物的靶点成为

一个研究热点,黄酮类化合物的抗肿瘤作用也是倍受关注的新药研究方向。参考阳性配体的对接结果,本文的研究结果说明黄酮苷元类化合物和EGFR具有较好的结合能力,其中可能有选择性和多靶标的EGFR抑制剂存在,其结合模式和能力与黄酮苷元类化合物的结构有密切关系,这为阐明黄酮类化合物抗肿瘤作用机制提供理论参考,为研究更强的EGFR抑制剂提供方向。

致谢 上海超算中心和华南理工大学网络计算中心提供计算支持。

参考文献:

- [1] 耿敬章,冯君琪. 黄酮类化合物的生理功能与应用研究[J]. 中国食物与营养, 2007, 7(7):19-21.
- [2] 刘萍,郑亚安,王怡斯,等. 沙棘叶黄酮糖苷生物转化黄酮苷元研究[J]. 高校化工工程学报, 2006, 20(6): 996-1000.
- [3] 王晶晶,刘巍,徐为人,等. 黄酮苷类和表皮生长因子受体结合模式的理论研究[J]. 中草药, 2009, 40(3): 420-423.
- [4] Stamos J, Mark X, Sliwowski, *et al.* Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor [J]. *The Am Soc Biochem Mol Biol*, 2002, 277(48): 46265-46272.
- [5] 石慧霞,蒋刚,高涛,等. 槲皮素及其异体结构分子的结构性质研究[J]. 化学研究和应用, 2006, 18(6): 1204-1208.
- [6] 张甘良,汪钊,鄢洪德,等. 生物类黄酮化合物的结构与生物活性关系[J]. 生物学杂志, 2005, 22(1): 4-7.
- [7] 陈凯先,蒋华良. 计算机辅助药物设计原理、方法和应用[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2000.
- [8] 陈正隆,徐为人,汤立达. 分子模拟的理论与实践[M]. 北京:化学工业出版社, 2007.