

【药效学评价】

基于分子对接虚拟技术及 Western blotting 实验考察苍耳亭对肝癌上皮间质转化作用靶点的影响

吴育, 曹刚, 石美琴, 杨水英, 姜晓燕*
南通市中医院 药剂科, 江苏 南通 226001

摘要: 目的 用分子对接技术探讨苍耳亭在上皮间质转化 (EMT) 过程中的作用靶点, 并通过 Western Blotting 实验检测其对肝癌 HepG2 细胞相应靶点蛋白表达的影响。方法 选取在 EMT 过程中的关键因子蓬乱蛋白 (Dhs)、波形蛋白 (Vimentin)、Snail、血管内皮生长因子受体 3 (VEGFR3) 为作用靶点, 采用分子对接虚拟技术评价苍耳亭与其空间结合能力, 并与相应内源性物质烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、醋酸离子、黄素腺嘌呤二核苷酸、N-乙酰葡萄糖胺对比; 培养 HepG2 细胞, 给予 1、5、20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的苍耳亭, 利用 Western Blotting 实验检测其对 Dhs、Vimentin、Snail、VEGFR3 蛋白表达的影响。结果 分子对接结果显示, 苍耳亭与 EMT 过程中作用靶点均具有一定亲和力, 其中与 Dhs、Snail、VEGFR3 的亲和力高于内源性物质, 与 Vimentin 的亲和力不及内源性物质; Western Blotting 实验结果显示, 苍耳亭显著下调 Vimentin、Snail、VEGFR3 蛋白的表达, 显著上调 E-cadherin 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 苍耳亭对肝癌侵袭转移关键因子 E-cadherin、Vimentin、Snail、VEGFR3 有明显影响, 可能是其潜在靶点; 分子虚拟对接和 Western blotting 实验结果具有一定的相似性, 能预先提示潜在靶因子。

关键词: 苍耳亭; 上皮间质转化; 分子对接; Western blotting; 肝癌; 侵袭转移; 作用靶点

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)11-1535-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.11.003

Effect of Xanthatin on target of epithelial mesenchymal transition of HepG2 based on molecular docking technology and Western Blotting experiment in liver cancer

WU Yu, CAO Gang, SHI Mei-qin, YANG Shui-Ying, JANG Xiao-Yan
Department of Pharmacy, Nantong Chinese Medicine Hospital, Nantong 226001, China

Abstract: objective To explore the role of Xanthatin in the targets of epithelial-mesenchymal transition (EMT) process using molecular docking method, and the effect on the target protein expression of HepG2 cells was detected by Western assay. **Method** Dhs, Vimentin, Snail and VEGFR3 are critical targets in EMT process, the spatial binding ability of Xanthium was evaluated by molecular docking method, compared with the corresponding endogenous substances: nicotinamide adenine dinucleotide, Acetate ion, flavin adenine dinucleotide, and N-Acetyl-D-glucosamine. HepG2 cells were cultured, and the effects of Xanthatin of 1, 5 and 20 mol/L concentrations on Dhs, Vimentin, Snail and VEGFR3 protein expression were detected by Western Blotting assay. **Result** Molecular docking show that Xanthatin has obvious affinity to key factors of EMT process such as Dhs, Vimentin, and VEGF-R3, higher than that of endogenous substance; and the affinity with Vimentin was less than that of endogenous substance; Western Blotting experiments proved the virtual results. The expression of Vimentin, Snail, VEGFR3 protein was significantly lowered, and the expression of e-cadherin was significantly raised. **Conclusion** The influence of Xanthatin to key factor e-cadherin, Vimentin, Snail, VEGFR3 are obvious, Which is likely to be a potential target. The results of computer virtual experiment and Western Blotting have certain similarity. Molecular virtual docking can pre hint the potential target factor.

Key words: Xanthatin; EMT; molecular docking technology; Western Blotting; liver cancer; invasion and metastasis; target

收稿日期: 2017-06-15

基金项目: 江苏省南通市青年基金资助项目 (WQ2016056)

*通信作者 姜晓燕, 主任中药师 E-mail: 2314652303@qq.com

上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是指上皮细胞在形态学上发生向间质细胞类型的转变, 并获得迁移能力的过程^[1], 在胚胎发育早期较为多见。EMT 参与肿瘤侵袭转移, 癌细胞通过 EMT 获得间质细胞表型和侵袭性, 实现对周围组织的浸润^[2]。

E-钙黏素 (E-cadherin) 的缺失是 EMT 的典型特征, E-cadherin 是维持上皮表型的重要分子, E-cadherin 丢失的细胞粘附能力减弱, 侵袭性增加; 同时细胞表型发生改变, 如角蛋白丝、E-cadherin 等上皮表型逐渐缺失, 间质表型, 如波形蛋白 (Vimentin)、纤维连接蛋白、E-cadherin、Snail、Slug 等的表达逐渐增加^[3]; 且 E-cadherin 的表达水平通常与肿瘤的分期呈负相关。血管内皮生长因子 (VEGF) 是目前已知的诱导血管生成最重要的生长因子, 其作为血管内皮细胞特异性有丝分裂原可以促进内皮细胞分裂增殖, 还能刺激内皮细胞分泌多种蛋白酶和血浆酶原激活物, 降解血管基底膜, 从而促进新生血管的形成。研究表明, VEGF 在很多恶性肿瘤中高表达, 且与肿瘤侵袭转移相关^[4]。肿瘤发生时, Wnt 与其受体卷曲蛋白 (frizzled, Frz) 结合, Frz 作用于细胞质内的蓬乱蛋白 (Dishevelled, Dsh 或 Dvl), 该蛋白能够抑制糖原合成酶激酶-3 β (Gsk-3 β) 的活性, 阻断 β -链蛋白 (β -catenin) 的降解, 使 Wnt/ β -catenin 信号通路在癌症的发生发展及转移中发挥促进作用。

苍耳亭是苍耳草中倍半萜内酯类的主要活性成分, 其抗肿瘤、抗菌、抗疟原虫等活性引起国内外学者的关注^[5-7]。体外实验表明, 苍耳亭对 A549 (人肺癌非小细胞)^[8-9]、MKN-45 (乳腺癌)^[10]、B16F10 (黑色素瘤)^[11] 具有显著的诱导凋亡作用。肝细胞性肝癌 (Hepatocellular Carcinoma, HCC, 以下简称肝癌) 是世界上最常见十大恶性肿瘤之一, 侵袭和转移是肝癌的基本特征, 也是影响肝癌治疗效果的关键, 使得针对肿瘤复发、转移后的治疗成为延长患者生存的关键因素。苍耳亭对肝癌细胞 HepG2 的体外抑制作用及对其侵袭转移的影响尚无报道, 机制不明确。

计算机辅助药物设计 (Computer aided drug design, CADD) 中的分子对接、相似性搜索、药效团搜索等技术减少了寻找新药的盲目性和偶然性, 使药物研究方便、直观、有效, 已渗透到药物设计进程的各个环节, 并逐渐地成为连接中药与现代化

的重要纽带^[12-13]。本研究利用分子对接技术, 探讨在 EMT 过程中, 苍耳亭是否存在潜在诱导凋亡和抑制侵袭的作用靶点, 并体外培养 HepG2 肝癌细胞株、应用 Western blotting 技术验证相应靶点。

1 计算机虚拟评价苍耳亭与 EMT 过程关键因子空间结合能力

1.1 配体的文件准备

运用 ACD/Chem-Sketch 专业化学画图软件画出苍耳亭结构, 并且采用 MOL2 文件格式导出。制备分子 (Preparing molecules) 采用 UCSF Chimera 分子图形软件, 将 MOL2 文件中苍耳亭结构进行加氢 (essential hydrogen)、加电荷、合并非极性氢原子、计算 Gasteiger-Hückler 电荷等常规处理, 最后使用 MM2 算法对苍耳亭的三维结构进行能量最小化或结构优化 [迭代次数 1 000 次, 最小的均方根 (RMS) 梯度为 0.10 nm]。所得结构转化生成 PDB 格式文件, 以备使用。使用 AutoDockTools (ADT) 软件定义苍耳亭分子的柔性部分 (可旋转键), 以 PDBQT 格式存储, 以备 Autodock 使用。Dsh、Vimentin、Snail、血管内皮生长因子受体 3 (VEGFR3) 内源性配体分别为 1、DHYS: 1DHS, Nicotinamide adenine dinucleotide (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸); 2、VIME: 1KG4, Acetate ion (醋酸离子); 3、Snail: 2Y48, Flavin adenine dinucleotide (黄素腺嘌呤二核苷酸); 4、VEGFR: 4BSJ; N-Acetyl-D-glucosamine (N-乙酰葡萄糖胺), 文件准备操作同“苍耳亭”文件步骤。

1.2 对接蛋白的准备和处理

从 RCSB PDB 蛋白结构数据库 (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) 下载对接需要的蛋白晶体结构。利用 Q-SiteFinder (<http://www.modelling.leeds.ac.uk/qsite-finder/>) 以及 metaPocket (<http://metapocket.eml.org/>) 在线提交对接蛋白的 PDB 格式文件, 预测出目的蛋白的活性位点。采用 AutodockTools 软件将目标蛋白中水分子去除, 加极性氢原子及 Kollman 电荷, 保存为 pdbqt 文件用于与阳性配体及苍耳亭的对接。

1.3 对接计算的参数设置

使用 Autodock 4.2 软件^[14], 采用拉马克遗传算法 (Lamarckian Genetic Algorithm, LGA) 将局部能量搜索与遗传算法相结合, 以半经验势函数作为能量打分函数, 对小分子构象和位置进行全局搜索。对接选用的受体格点盒子大小为 2.25 nm \times 2.25 nm \times

2.25 nm (60 点×60 点×60 点), 格点间距 0.375 nm, 格点盒子中心位于各个蛋白活性位点的中心。将该算法中的种群数 *ga_pop_size* 从默认值 100 增大为 150, 能量评估最大值 *ga_num_evals* 由默认值 2.5×10^6 增大为 1×10^7 , 运算循环数从默认值 10 增大为 100, 其余参数使用默认值, 这样采用了较大的运算参数, 利于提高底物分子在对接过程中的柔性, 使每次计算更为充分、精确。

2 细胞实验的材料和方法

2.1 试验药物

苍耳经南京中医药大学李伟东教授鉴定为苍耳 *Xanthium sibiricum Patr. ex Widder* 全草, 本课题组制备色谱柱从苍耳全草中分离获得苍耳亭, 经核磁共振解析及高效液相色谱分析鉴定, 质量分数达 98%。实验前用 DMSO 配成 32 mmol/L 浓度, 经 0.22 μm 无菌过滤后分装, -20 °C 保存, 使用时用培养液稀释至所需浓度。

2.2 细胞株

HepG2 肝癌细胞株, 由南通市中医院中心实验室提供, 于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中、37 °C、5% CO₂ 培养箱中常规培养。

2.3 主要试剂

DMEM 培养基、0.25% 胰蛋白酶、小牛血清, 均购于 Gibco 公司; E-cadherin 一抗 (货号 14472)、Snail 一抗 (货号 3895)、VEGFR3 (货号 2485), 均购自 Cell Signaling Technology; Vimentin 一抗 (Abbkine, 货号 ANT-245); GAPDH (Bioworld, 货号 PA116779); 化学发光试剂 (PIERCE, 货号 HK108231、IA110436)。

2.4 主要仪器

pH 计 (HANNA, 型号 HI221); 电泳仪 (Bio-Rad, 型号 DYY-C); 电泳槽 (Bio-Rad); 水平脱色摇床 (南京大学南达生物技术开发公司, 型号 TY-80S); 曝光仪 (Bio-Rad)。

2.5 Western blotting 实验

2.5.1 细胞培养 取对数生长期的 HepG2 细胞, 按 1.0×10^7 /皿的量种至 10 cm 培养皿中, 在 37 °C、5% CO₂ 温箱中培养 24 h, 向平皿中加入 1、5、20 μmol/L 的苍耳亭, 对照组加入等体积的 DMEM 培养液, 继续培养 24 h。

2.5.2 细胞总蛋白的提取 倒尽培养液, 用 4 °C 预冷的 PBS 清洗细胞 3 次, 将 PBS 弃净。加入裂解液 (含 1 mmol/L PMSF), 于冰上裂解 30 min 后,

用移液器将细胞碎片和裂解液移至 1.5 mL 离心管中。4 °C 下 12 000 r/min 离心 10 min, 离心完毕后, 小心将上清移至第 2 套 EP 管中, 放于 -20 °C 保存。留少许上清做蛋白含量的测定, 其余按每 100 μL 蛋白上清加入 20 μL 6×loading buffer, 煮沸 5~10 min 变性, 短暂离心后放置冰上。考马斯亮蓝法测定蛋白浓度, 严格按照 BCA 蛋白含量测定试剂盒说明书操作。

2.5.3 SDS-PAGE 电泳 配制 10% 分离胶和 4% 浓缩胶。取出蛋白样品加入 5×SDS 上样缓冲液至终浓度为 1 倍, 并将样品于沸水中煮 5 min 使蛋白变性, 蛋白上样量为 50 μg。电泳浓缩胶时用稳压 80 V, 到分离胶以后用稳压 110 V, 至溴酚蓝刚跑出即可终止电泳, 电转至 PVDF 膜上。

将转移后的 PVDF 膜用 TBST 清洗 2 遍后, 转入含 5% 脱脂奶粉的封闭液中, 室温下脱色摇床上摇动封闭 1 h; 封闭后用 TBST 洗膜 3 遍, 然后再将膜放入杂交袋中与一抗 (Dsh、Vimentin、Snail、VEGFR) 反应, 4 °C 过夜, 反应后用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 3 次, 每次 5 min; 将膜放入杂交袋中, 与标记了辣根过氧化物酶的二抗反应, 室温下孵育 1 h。反应后再用 TBST 洗 4 次, 每次 5 min, 然后进行化学发光反应。将化学发光试剂 A 和 B 两种试剂等体积混合, 将混合液加到膜上反应 5 min, 然后将膜移至另一保鲜膜上, 去尽残液, 包好, 放入曝光仪中曝光显影, Photoshop5 软件进行蛋白条带灰度分析。

2.6 统计学分析

所有数据均由 SPSS 18.0 统计软件进行处理, 单因素方差分析进行统计学检验。

3 结果

3.1 计算机虚拟对接结果

苍耳亭与 Dsh、Snail、VEGFR3 有良好的结合能力, 所需结合能均比相应内源性物质低, 证明其比内源性物质亲和力高; 与 Vimentin 的亲和能力不及内源性物质, 苍耳亭是否对其有影响还需实验验证。与各个 EMT 过程相关靶因子结合数据见表 1, 与各靶点结合图见图 1。

苍耳亭与 Dsh 蛋白的 ASN A: 106、SER A: 317、THR A: 131 位点结合较强, ASN A: 106 位点同样存在于内源性配体中, 苍耳亭与 Dsh 结合氢键集合所需能量低于内源配体, 具有较高亲和力。ARG A: 316 同时是 Snail 与内源性蛋白和苍耳亭的结合位点, 但苍耳亭明显具有较高亲和力。THR A:

398、SER A: 413、TYR A: 369 是苍耳亭与 VEGFR3 较明显的结合位点, 而内源性蛋白较牢固结合位点是 ASN A: 411, 苍耳亭在 VEGFR3 处结合优势并不明显。而苍耳亭对 Vimentin 并没有较显著的结合位点, 所以结合能高于内源性蛋白, 虚拟结果显示不存在优势。

3.2 Western blotting 实验结果

Western blotting 法分析苍耳亭对 HepG2 细胞中

E-cadherin、Vimentin、Snail、VEGFR3 蛋白表达的影响, 苍耳亭具有抑制细胞中 Vimentin、Snail、VEGFR3 蛋白表达的趋势, 1、5、10 μmol/L 浓度组显著抑制 Vimentin 蛋白表达 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$); 5、10 μmol/L 浓度组显著抑制 Snail、VEGFR3 蛋白表达 ($P < 0.01, 0.001$); 1、5、10 μmol/L 浓度组均显著上调细胞中 E-cadherin 蛋白表达 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。见图 2。

表 1 苍耳亭与靶因子结合能力

Table 1 The capabilities of Xanthatin combines with target factors

配体	物质	结合能 (pK _d /pK _i)	相互作用的残基	
			共有残基	非共有残基
Dhs	苍耳亭	4.88	THR A: 131、	SER A: 105、SER A: 317、THR A: 104
	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	5.77	ASN A: 106	THR A:308、GLY A:133、SER A:105、GLY A:283、SER A:109、ASP A:342、GLU A:137
Vimentin	苍耳亭	5.01		TRY A:383、LEU A:380、GLU B:382、HIS B:379
	醋酸离子	4.73		GLN A:205、CYS A:199、CYS A:208、CYS A:202、ALA A:211、CYS A:192
Snail	苍耳亭	6.85	ARG A: 316、	VAL A:288、GLY A:287、THR A:624
	黄素腺嘌呤二核苷酸	8.07	GLU A: 801、	THR A:810、GLY A:330、THY A:761、ALN A:331、SER PRO A: 626、
VEGFR3	苍耳亭	4.76	TYR A: 369	ALA A:400、THR A:398、SER A:413
	N-乙酰葡萄糖胺	4.84		ARG A:409、ASN A:411

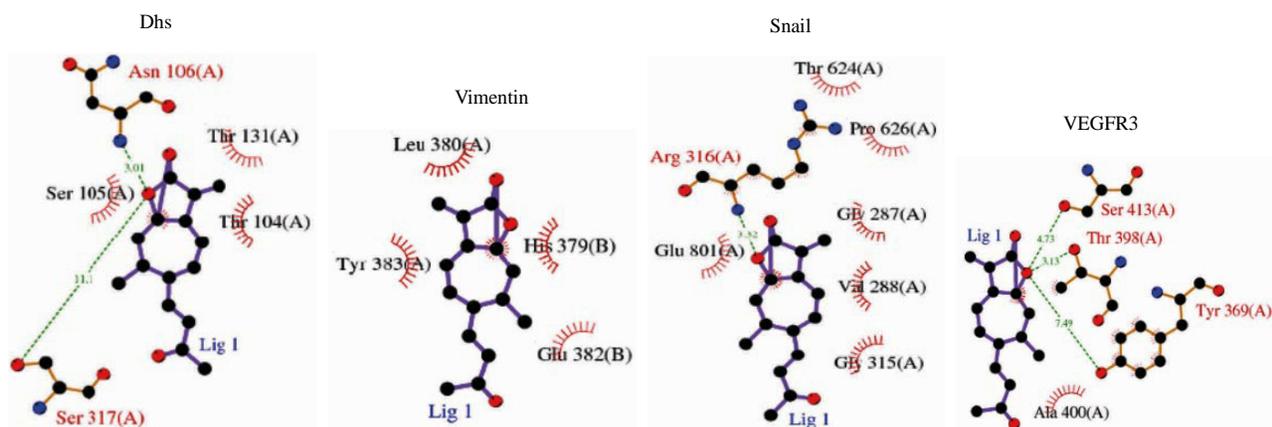


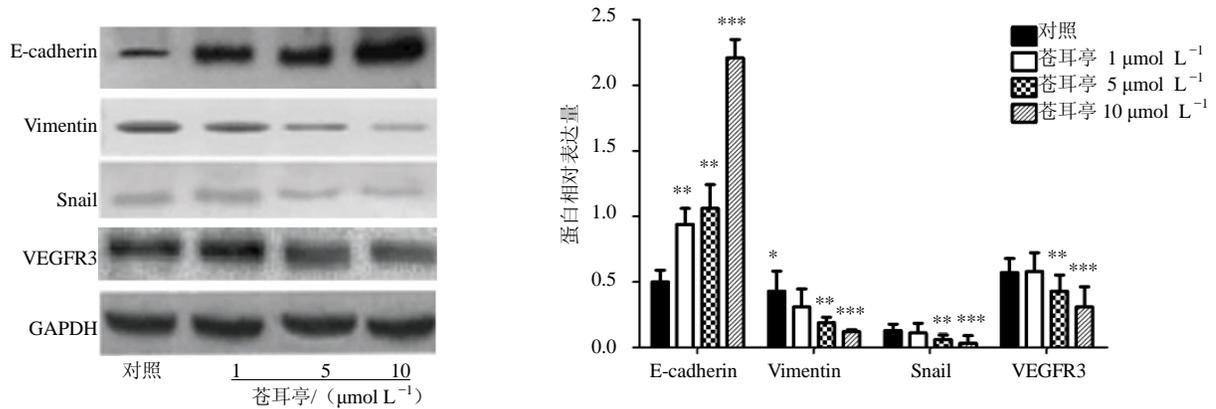
图 1 苍耳亭与各靶点的结合模式图

Fig. 1 Binding modes of Xanthatin with various targets

4 讨论

肝癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一, 其发病率和病死率在恶性肿瘤中分别位居第 5 和第 2

位, 全球每年大约有超过 70 万人死于肝癌^[15]。随着科学技术的不断发展, 早期诊断技术和外科治疗技术逐渐提高, 肝癌发病率和死亡率都呈下降趋势,



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

图2 苍耳亭对 EMT 过程相关蛋白表达的影响

Fig. 2 Impact of Xanthatin on the process of EMT related protein expression by western blotting analysis.

但是其术后复发转移率居高不下。

EMT 在胚胎发育、慢性炎症、组织重建和癌症转移中发挥了重要作用,其主要的特征有 E-cadherin/连环蛋白复合体的破坏、角蛋白细胞骨架转化为 Vimentin 为主的细胞骨架以及形态上具有间充质细胞的特征等。其中 Snail/E-cadherin 的表达改变使肿瘤细胞之间的粘附性下降,导致细胞易于脱离原发灶,而获得了间质表型,如 Vimentin、纤维连接蛋白、E-cadherin、Snail、Slug 等的表达。通过 EMT,上皮细胞失去了极性,获得了较高的侵袭与迁移、抗凋亡和降解细胞外基质的能力。

计算机虚拟对接的结果显示,苍耳亭对 EMT 过程中关键因子 Snail 具有较高的亲和能力,对 EMT 发生过程密切相关的 Wnt/ β -catenin 信号通路中的上源因子 Dsh 蛋白也具有较高亲和力,竞争性地与 Dsh 蛋白结合能够增加 Gsk-3 β 的活性,加快 β -catenin 的降解,从而抑制癌细胞增殖。VEGF 在很多恶性肿瘤中高表达,且与肿瘤侵袭转移相关,苍耳亭在乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和肝癌细胞 HepG2 中对血管内皮生成因子 VEGF 具有抑制作用^[16-17]。VEGFR3 是 VEGF 重要受体,苍耳亭对 VEGFR3 的抑制作用将对血管生成产生影响,而肿瘤的侵袭与转移依赖血管的供给,由此推断苍耳亭可能对癌细胞侵袭转移具有抑制作用。

虽然分子对接显示苍耳亭对 Vimentin 结合并不牢固,可能不是作用靶点,但 Western blotting 实验证实,苍耳亭对 EMT 关键因子 E-cadherin、

Vimentin、Snail 均有影响。上调 E-cadherin 蛋白表达,提示苍耳亭对稳定细胞排列,保持上皮细胞有序粘合,防止细胞脱落、转移发挥重要作用;下调 Vimentin、Snail 表达,稳定细胞表型;下调 VEGFR3,抑制微血管形成,减少肿瘤的营养供给,提示可能抑制肿瘤增长。

苍耳亭对肝癌侵袭转移关键因子 E-cadherin、Vimentin、Snail、VEGFR3 有明显影响,可能是其潜在靶点;计算机虚拟结果和 Western blotting 实验结果具有一定的相似性,分子虚拟对接能预先提示潜在靶因子。

参考文献

- [1] Acloque H, Adams M S, Fishwick K, et al. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of chment and disease [J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1438-1449.
- [2] Thiery J P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(6): 442-454.
- [3] Huber M A, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression [J]. Curr Opin in Cell Biol, 2005, 17 (5): 548-558.
- [4] 牛艳清,肖鹏,王云峰. VEGF 与 EMT 相关蛋白 E-cadherin 在 NSCLC 中的表达及意义 [J]. 医学与哲学, 2015, 11(36): 64-66.
- [5] Kim Y S, Kim J S, Park S H, et al. Two cytotoxic sesquiterpene lactones from the leaves of xanthium strumarium and their *in vitro* inhibitory activity on farnesyltransferase [J]. Planta Med, 2003, 69(4): 375-

- 377.
- [6] Ramíre-Erosa I, Huang Y, Hickie R A, et al. Xanthatin and xanthinosin from the burs of *Xanthium strumarium* L.as potential anticancer agents [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2007, 85(11): 1160-1172.
- [7] Kim In-Tae, Park-Young-Mi, et al. Methanol extract of *xanthium strumarium* l. possesses anti-inflammatory and anti-nociceptive activitie [J]. *Bio Pharm Bull*, 2005, 28(1): 94-100.
- [8] Zhang L, Ruan J, Yan L, et al. Xanthatin induces cell cycle arrest at G2/M checkpoint and apoptosis via disrupting NF-kappaB pathway in A549 non-small-cell lung cancer cells [J]. *Molecules*, 2012, 17(4): 3736-3750.
- [9] Tao L, Sheng X, Zhang L, et al. Xanthatin anti-tumor cytotoxicity is mediated via glycogen synthase kinase-3 β and β -catenin [J]. *Biochem Pharmacol*, 2016, 115: 18-27.
- [10] Zhang L, Tao L, Ruan J, et al. Xanthatin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human gastric carcinoma MKN-45 cells [J]. *Planta Med*, 2012, 78(9): 890-895.
- [11] Li W D, Wu Y, Zhang L, et al. Characterization of xanthatin: Anticancer properties and mechanisms of inhibited murine melanoma *in vitro* and *in vivo* [J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(10):865-873.
- [12] Schneider G. Virtual screening: an endless staircase ? [J] *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(4): 273-276.
- [13] 吴可柱, 左 颖, 李爱秀. 计算机辅助药物设计在中药作用靶点研究中的应用 [J]. *武警后勤学院学报(医学版)*, 2012, 21(6): 479-483.
- [14] Morris G M, Huey R, Lindstrom W, et al. Autodock4 and AutoDock Tools4: automated docking with selective receptor flexibility [J]. *J Computational Chemistry*, 2009, 30(16): 2785-2891.
- [15] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [16] Yu Y, Yu J, Pei C G, et al. Xanthatin, a novel potent inhibitor of VEGFR2 signaling, inhibits angiogenesis and tumor growth in breast cancer cells [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9): 10355-10364.
- [17] Romero M, Zanuy M, Rosell E, et al. Optimization of Xanthatin extraction from *Xanthium spinosum* L. and its cytotoxic, anti-angiogenesis and antiviral properties [J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 90: 491-496.