

- 2005, 24(2): 275-306.
- [7] 邓新国, 胡世兴, 贾小云, 等. 川芎嗪对 *rd* 和 *rds* 小鼠视网膜光感受器细胞干预作用的光镜观察 [J]. 中草药, 2006, 37(6): 891-894.
- [8] 田戈夫, 李金华, 余德顺. 超临界 CO₂ 萃取灵芝孢子油的 GC/MS 分析 [J]. 中国油脂, 2003, 28(9): 44-46.
- [9] 梁 坚, 杨俊峰, 何为涛, 等. 灵芝孢子油软胶囊对小鼠免疫功能调节的研究 [J]. 中国热带医学, 2005, 5(6): 1189-1191.
- [10] 张 伟, 曾园山, 陈小君, 等. 萌动激活灵芝孢子促进大鼠受损伤的脊髓运动神经元轴突再生的作用 [J]. 中草药, 2006, 37(5): 734-737.
- [11] Yoshizawa K, Nambu H, Yang J, *et al.* Mechanisms of photoreceptor cell apoptosis induced by *N*-methyl-*N*-nitrosourea in Sprague-Dawley rats [J]. *Lab Invest*, 1999, 79(11): 1359-1367.
- [12] 邓新国, 葛 坚, 何梅凤, 等. 不同 MNU 剂量诱导大鼠视网膜外核层损伤的视网膜电图和病理形态的改变 [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(4): 828-832.
- [13] Moriguchi K, Yoshizawa K, Shikata N, *et al.* Suppression of *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced photoreceptor apoptosis in rats by docosahexaenoic acid [J]. *Ophthalmic Res*, 2003, 36(2): 98-105.
- [14] Mizota A, Sato E, Taniai M, *et al.* Protective effects of dietary docosahexaenoic acid against Kainate-induced retinal degeneration in rats [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42(1): 216-221.
- [15] Semenova E M, Converse C A. Comparison between oleic acid and docosahexaenoic acid binding to interphotoreceptor retinoid-binding protein [J]. *Vision Res*, 2003, 43: 3063-3067.
- [16] 张伟敏, 钟 耕, 王 炜. 单不饱和脂肪酸营养及其生理功能研究概况 [J]. 粮食与油脂, 2005, 3: 13-16.
- [17] 朱蔚文, 刘焯霖, 徐浩文, 等. 灵芝孢子油对 MPTP 处理小鼠行为学及黑质区病理变化的影响 [J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(6): 667-671.

黄酮苷类与表皮生长因子受体结合模式的理论研究

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

(1. 天津医科大学 基础医学院, 天津 300070; 2. 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; 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类与表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 结合模式和能力进行理论研究。方法 从 RCSB Protein 数据库检索 EGFR 晶体结构为受体, 收集黄酮苷类配体, 用 Schrodinger 8.0 软件对受体和配体进行对接计算, 分析其作用模式和对接分数。结果 EGFR 和黄酮苷类配体能够较好对接, 其作用模式大致分为 3 种, 3 位和 2 位的取代对结合模式的影响较大, 3、5、7、4 位取代的变化对结合能力影响较大。结论 黄酮苷类化合物存在与 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, 对于研究黄酮苷类抗肿瘤药物具有参考价值。

关键词: 黄酮苷; 表皮生长因子受体; 对接计算; 结合模式

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2009)03-0420-04

Theoretic studies on binding model between flavonoid glycosides and epidermal growth factor receptor

WANG Jing-jing^{1,2}, LIU Wei², XU Wei-ren², LIU Peng², LIU Bing-ni², TANG Li-da³

(1. Basic Medical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China; 3. Tianjin State Key Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Abstract: Objective To study binding model and capacity between flavonoid glycosides and epidermal growth factor receptor (EGFR) with docking calculation. **Methods** Crystal structures of EGFR were downloaded from RCSB Protein Data Bank. Flavonoid glycosides were collected as the ligands. The software Schrodinger 8.0 was employed to dock the ligands into the receptors, and the binding models and docking scores were analyzed. **Results** Flavonoid glycosides and EGFR could bind well. The binding model could be classified into types , , and . Substitutions at position 3 and 2 mostly affect the binding model, and at position 3, 5, 7 and 4 mostly affect the binding capacity. **Conclusion** Among flavonoid glycosides, there might be selective EGFR inhibitors and multiple targeted PTKs inhibitors. The binding

* 收稿日期: 2008-08-22

基金项目: 科技部支撑项目 (项目编号 2007BAI41B00, 课题编号 2007BAI41B01); 天津市支撑项目 (07ZCKFSH00300)

作者简介: 王晶晶, 女, 山东人, 硕士研究生, 研究方向为新药设计和筛选。E-mail: jessicasnow77@yahoo.cn

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

model and capacity can be affected by the substitution of different positions or groups. The results suggest that flavonoid glycosides be potential anti-tumor leads.

Key words: flavonoid glycoside; EGFR; docking calculation; binding model

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,研究报道其有抗癌作用^[1]。目前研究发现黄酮类化合物如染料木素 (genistein)、槲皮素 (quercetin) 等可以抑制蛋白酪氨酸激酶 (protein tyrosine kinase, PTK) 的活性,特别对表皮生长因子受体 (EGFR) 具有较强的抑制作用^[2]。EGFR 是受体型酪氨酸激酶,目前作为抗肿瘤的新靶点而备受重视。然而黄酮类与 EGFR 相互作用尚不清楚,本研究选择收集的 200 多个黄酮及黄酮苷类结构,利用理论方法研究其与 EGFR 晶体结构的结合模式,考察不同取代基对结合模式的影响,一方面为寻找活性更好的黄酮类衍生物提供依据,一方面为阐明中药的作用基础提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 受体准备:EGFR 属于 Ⅱ 型受体酪氨酸激酶,具有 NH₂ 端供配体结合的胞外区,23 个氨基酸残基构成的跨膜区和胞内区,胞内区又分为近膜区、酪氨酸激酶区、C-末端^[3]。目前发现的配体通过与酪氨酸激酶区结合发挥抑制 EGFR 的活性。在 RCSB Protein Data Bank 数据库检索到 EGFR 受体晶体结构 33 个,根据来源和完整性选出源于人体结构较为完整的 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,原始配体 Lpatinib 为作用于酪氨酸激酶区的抑制剂^[4],对受体结构进行必要的修正、加氢和结构优化。

1.2 配体准备:选取天津药物研究院植物活性成分数据库中的黄酮苷类化合物,以图 1 结构为母核^[5],选取其中的 2,3-二氢黄酮和黄酮,选出含单个葡萄糖 (或葡萄糖酸) 的黄酮苷结构 200 多个,其他取

代基主要为羟基、甲氧基。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:用 Schrodinger 软件的 Glide 模块对准备好的受体和配体进行对接,以原始配体为参考位置,选取其周围 1 nm 的空腔作为对接活性区域,以软件标准参数进行对接计算,每个配体选择最佳对接构象再进行优化。

1.4 结合模式分析:以原始配体为参考,考虑到受体 EGFR 上的催化位点 ARG841-ASP837 和活性带的 ASP855 位点^[6],以及和配体容易形成氢键作用的 THR790 位点,确定受体的活性中心,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 3 类。如图 2 所示,模式Ⅰ中配体必须占据活性空腔 A 和 B 区,也可以包含 C 和 E 区;模式Ⅱ中配体必须占据活性空腔 B 和 C 区,可以包含 D 和 E 区;模式Ⅲ中配体必须占据活性空腔 C、D 和 E 区的两个以上。

1.5 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,阳性配体中选择性 EGFR 抑制剂有 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,将黄酮苷与 EGFR 的 Ⅰ 模式、Ⅱ 模式按

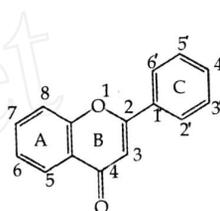


图 1 黄酮的基本结构
Fig. 1 Stem nucleus of flavone

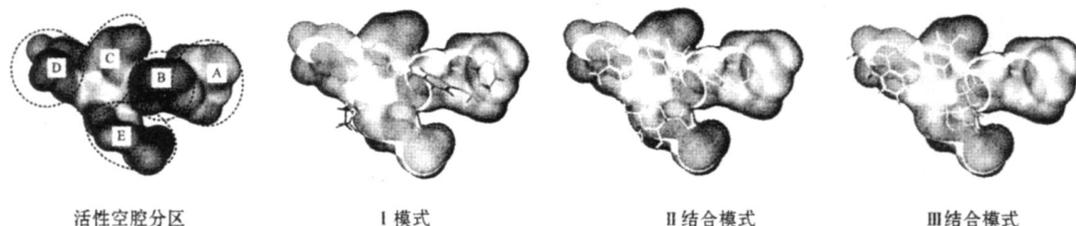


图 2 活性空腔的分区及配体-受体的结构模式

Fig. 2 Parts of active zone and binding-model of ligand and receptor

照对接分数小于 - 8.5、- 7.5 ~ - 8.5, 大于 - 7.5 分为 3 个等级: -1、-2、-3 以及 -1、-2、-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 1 级可能为选择性的 EGFR 抑制剂, 第 2 级可能是对应于多靶标抑制剂, 第 3 级可能具有较小的实际价值。模式只有 8 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: 2,3-二氢黄酮和黄酮的比例, 在 模式中分别为 29% 和 71%, 在 模式中分别为 12% 和 88%; 在 模式中分别为 2% 和 98%。结果表明, 黄酮在 2,3-二氢化后对配体与受体的结合模式存在一定的影响, 有利于形成模式 而不利于形成模式 的结构。3 位置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 模式, 取代基为葡萄糖易形成 模式。5 位取代基以羟基取代出现最多, 变化对结合模式的影响不大; 葡萄糖取代易形成 模式, 出现频率为 17%; 葡萄糖酸和甲氧基取代容易形成 模式, 取代出现频率均为 14%。6 位各取代基出现频率均较低, 甲氧基取代出现频率为 29%, 易形成 模式。7 位羟基取代多形成 模式, 出现频率为 82%, 其次为 模式和 模式, 分别为 43% 和 34%; 葡萄糖取代多形成 模式, 出现频率为 45%; 甲氧基取代多形成 模式, 出现频率为 43%。8 和 2 位各取代基出现频率均较低, 2 位取代影响较大, 葡萄糖取代均易形成 模式, 取代出现频率均为 14%。3、4 位羟基取代出现频率较高, 易形成 模式, 出现频率分别为 55%、91%。4 位葡萄糖取代易形成 模式, 出现频率为 29%。5 和 6 位较少有取代, 对对接模式的影响不大。见表 1。

2.2 取代基和对接分数的关系: 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 -1 组出现频率为 8%, -2 组为 11%, -3 组为 17%。模式 2,3-二氢黄酮出现频率分别为 -1、-2 组均为 0, -3 组为 5%, 可判断 C2-C3 饱和度主要影响结合模式, 对结合的分数的影响较小。

3 位羟基取代主要对 模式对接分数影响较大, -1、-2、-3 组出现频率为 38%、24%、11%, 羟基取代有利于较好的结合。5 位羟基取代在 -1、-2、-3 组出现频率为 85%、82%、72%, 取代有利结合; 葡萄糖取代在 -1、-2、-3 组出现频率分别为 8%、16%、28%, 表明其取代不利于结合。

表 1 3 种模式中 4 种取代基在不同取代位置的取代频率
Table 1 Frequency of four substituents in different positions of three binding models

模式	取代基	取代频率/ %									
		3	5	6	7	8	2	3	4	5	6
模式 1	羟基	0	57	14	43	0	0	14	29	0	0
	葡萄糖	14	0	0	0	14	14	0	29	0	0
	葡萄糖酸	0	14	0	14	0	0	0	0	0	0
	甲氧基	0	14	29	43	0	0	0	0	0	0
模式 2	羟基	24	79	11	34	5	0	34	69	3	0
	葡萄糖	9	17	8	45	5	0	1	5	0	0
	葡萄糖酸	0	0	0	8	3	0	0	0	0	0
	甲氧基	2	0	7	10	8	3	4	10	0	0
模式 3	羟基	3	96	5	82	0	0	55	91	9	0
	葡萄糖	73	1	2	2	5	0	0	2	0	0
	葡萄糖酸	2	0	0	11	0	0	0	0	0	0
	甲氧基	0	3	12	5	4	0	12	2	5	0

7 位葡萄糖取代在 -1、-2、-3 组出现频率为 62%、39%、33%, 有利于提高结合能力。7 位葡萄糖酸取代 -1 组出现频率为 33%, -2 和 -3 两组为 0%, 有利于结合。4 位取代基不同主要对 模式影响较大, 取代为羟基在 -1、-2、-3 组出现频率为 100%、63%、44%, 取代为葡萄糖在 -1、-2、-3 组出现频率为 0%、5%、11%, 羟基有利于结合, 葡萄糖不利于结合。见表 2 和 3。

表 2 -1、-2、-3 组中 4 种取代基在不同取代位置的取代频率

Table 2 Frequency of four substituents in different positions of groups -1, -2, and -3

模式	取代基	取代频率/ %									
		3	5	6	7	8	2	3	4	5	6
-1	羟基	38	85	0	31	0	0	46	100	8	0
	葡萄糖	8	8	8	62	8	0	0	0	0	0
	葡萄糖酸	0	0	0	8	8	0	0	0	0	0
	甲氧基	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0
-2	羟基	24	82	21	21	5	0	34	63	3	0
	葡萄糖	3	16	5	39	8	0	3	5	0	0
	葡萄糖酸	0	0	0	16	3	0	0	0	0	0
	甲氧基	0	0	3	13	8	8	8	18	0	0
-3	羟基	11	72	11	50	11	0	22	44	0	0
	葡萄糖	17	28	11	33	0	0	0	11	0	0
	葡萄糖酸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	甲氧基	6	0	11	17	17	0	6	11	0	0

8 位羟基取代在 -1、-2、-3 组出现频率 0%、5%、11%, 表明取代不利于结合; 3 位羟基取代在 -1、-2、-3 组羟基取代出现频率分别为 46%、34%、22%; 5 位羟基取代出现频率在 -1、-2、-3 组分别为 8%、3%、0%, 羟基取代促进对接。这些位置对结合能力影响较小。见表 2。

3 讨论

本研究以 EGFR 结构为受体, 以 200 多种黄酮

表 3 -1、-2、-3 组中 4 种取代基在不同取代位置的取代频率

Table 3 Frequency of four substituents in different positions of groups -1, -2, and -3

模式	取代基	取代频率/ %									
		3	5	6	7	8	2	3	4	5	6
-1	羟基	0	92	8	67	0	0	67	92	8	0
	葡萄糖	58	0	0	0	8	0	0	0	0	0
	葡萄糖酸	0	0	0	33	0	0	0	0	0	0
	甲氧基	0	8	8	0	0	0	0	0	0	0
-2	羟基	4	96	8	100	0	0	40	92	8	0
	葡萄糖	88	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	葡萄糖酸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	甲氧基	0	0	8	0	0	0	20	0	0	0
-3	羟基	5	100	0	79	0	0	58	89	11	0
	葡萄糖	74	0	5	5	5	0	0	5	0	0
	葡萄糖酸	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	甲氧基	0	0	21	16	11	0	16	5	16	0

苷为配体,研究了取代基的位置和种类变化对配体与受体结合模式和结合能力的影响,结果表明,黄酮苷类结构能够与 EGFR 具有良好的结合模式,3 位和 2 位的取代对结合模式的影响较大,3、5、7、4 位的取代的变化对结合能力影响较大。

黄酮的抗肿瘤作用及机制已有不少研究报道,目前还没有相关的晶体复合物报道,因为黄酮类结构变化较多,要充分阐明其与 EGFR 的作用规律,在实验上具有较大的困难。利用对接方法对黄酮苷类与 EGFR 结合模式和能力进行理论研究,简便易行。对比理论研究和实验研究的结果,理论研究的结果与实验具有相符性。理论研究表明,模式 3、5、4 的羟基取代促进模式的结合,有文献报道在 4 位羟基取代时,能加强对癌细胞抑制能力^[5],这和本研究的结果间接相符。羟基取代的位置也是黄酮类化合物抑制 PIK3 活性的重要影响因素^[7]。文献报道葡萄糖酸连在 A 环上黄酮类化合物会有抗肿瘤活性^[5],本研究也证实模式时 7 位葡萄糖酸取

代对接结果明显好于其他组。

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^[8,9]。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备受关注的新药研究方向。参考阳性配体的对接结果,本研究结果说明黄酮苷类化合物和 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: 19-21.
- [2] Gargala G, Baishanbo A, Favennec L. Inhibitory activities of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase-targeted dihydroxyisoflavone and trihydroxydeoxybenzoin derivatives on sarcocystis neurona, neospora caninum, and cryptosporidium parvum development [J]. *Antimicrob Agent Chemother*, 2005, 11: 4628-4634.
- [3] 吴健虹,谢秋玲,陈小佳,等. 表皮生长因子受体 EGFR 及其信号传导 [J]. *生命科学*, 2006, 18(2): 116-122.
- [4] Camp E R, Summy J, Bauer T. Molecular mechanism of resistance to therapies targeting the epidermal growth factor receptor [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 397-405.
- [5] 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.
- [6] Stamos J, Sliwkowski M X, Eigenbrot C. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor [J]. *Am Soc Biochem Mol Biol*, 2002, 277(48): 46265-46272.
- [7] 郑展,徐振晔. 表皮生长因子受体及其信号占到通路与中国药肿瘤靶向治疗 [J]. *中西医结合学报*, 2005, 3(4): 318-321.
- [8] 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.
- [9] 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.

《中草药》杂志售过刊信息

《中草药》杂志编辑部尚存部分过刊合订本,包括:1974-1975 年、1976 年、1979 年、1988 - 1993 年(80 元/年),1996、1997 年(110 元/年)、1998 年(120 元/年)、1999 年(135 元/年)、2000 年(180 元/年)、2001 - 2003 年(200 元/年)、2004 年(220 元/年)、2005 年(260 元/年)、2006 年(280 元/年)、2007 年(280 元/年)、2008 年(280 元/年)。1996 年增刊(50 元)、1997 年增刊(45 元)、1998 年增刊(55 元)、1999 年增刊(70 元)、2000 年增刊(70 元)、2001 年增刊(70 元)、2002 年增刊(65 元)、2003 年增刊(65 元)、2004 年增刊(65 元)、2005 年增刊(65 元)、2006 年增刊(65 元)、2007 年增刊(65 元)、2008 年增刊(55 元)。欢迎订购。订购者请直接与《中草药》杂志编辑部联系。

电话:(022) 27474913 23006821 传真:(022) 23006821 E-mail: zcyzzbjb@sina.com