

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002170

基于 IL-6R 运用分子对接筛选红芪防护 BMSCs 的活性成分

冯彩琴¹, 骆亚莉¹, 刘永琦¹, 靳晓杰², 石丹枫³, 朱永昌³, 刘东玲¹, 李玲¹, 李研¹

(1. 甘肃中医药大学甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究省级重点实验室, 兰州 730000;

2. 甘肃中医药大学药学院, 兰州 730000; 3. 兰州大学应用有机化学国家重点实验室, 兰州 730000)

【摘要】目的:通过分子对接筛选红芪防护白介素-6(interleukin-6, IL-6)诱导后骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)生物学特性稳定的活性成分。**方法:**选取 43 个红芪小分子化合物为配体, 以白介素-6 受体(interleukin-6 receptor, IL-6R)为靶蛋白, 运用 Schrodinger2015 软件 Glide 模块进行对接, 选取对接打分较好且符合类药五原则的小分子化合物, MST 检测筛选所得小分子化合物与 IL-6R 的结合亲和力, 拟合结合曲线, 计算结合程度。**结果:**分子对接筛选出与 IL-6R 在空间形状匹配较好且符合类药五原则的小分子化合物槲皮素、维斯体素、龙胆山酮酚, MST 实验得到 3 个小分子化合物中槲皮素、维斯体素与 IL-6R 有较好的结合亲和力。**结论:**槲皮素、维斯体素可能是中药红芪发挥维持 IL-6 诱导后 BMSCs 生物学特性稳定的活性成分。

【关键词】白介素-6 受体; 红芪; 骨髓间充质干细胞; 分子对接**【中图分类号】**285.5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-11-19

Screening for active components in Radix Hedysari that protect bone marrow stromal cells using molecular docking based on IL-6R

Feng Caiqin¹, Luo Yali¹, Liu Yongqi¹, Jin Xiaojie², Shi Danfeng³,Zhu Yongchang³, Liu Dongling¹, Li ling¹, Li Yan¹

(1. Provincial-Level Key Laboratory for Molecular Medicine of Major Diseases and Study on Prevention and Treatment of Traditional Chinese Medicine, Gansu University of Chinese Medicine; 2. College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine; 3. State Key Laboratory of Applied Organic Chemistry, Lanzhou University)

【Abstract】Objective: To screen out the active components in Radix Hedysari that maintain the biological stability of bone marrow stromal cells (BMSCs) induced by interleukin-6 (IL-6) using molecular docking. **Methods:** The glide module of Schrodinger2015 software was used for molecular docking with 43 small-molecule compounds of Radix Hedysari as ligands and interleukin-6 receptor (IL-6R) as a target protein; small-molecule compounds with relatively good docking scores and having drug-likeness were selected and tested for binding affinity for IL-6R by microscale thermophoresis (MST); then the binding curves were fitted and the binding levels were calculated. **Results:** Small-molecule compounds with a relatively good geometrical match with IL-6R and having drug-likeness screened out by molecular docking were quercetin, vestitol, and 1,5,8-trihydroxy-3-methoxy-9H-xanthene-9-one, among which the former two showed relatively good binding affinity for IL6R in the MST assay. **Conclusion:** Quercetin and vestitol may be the active components in Radix Hedysari that maintain the biological stability of BMSCs induced by IL-6.

【Key words】interleukin-6 receptor; Radix Hedysari; bone marrow stromal cell; molecular docking

作者介绍: 冯彩琴, Email: 1434189112@qq.com,

研究方向: 中西医结合防治肿瘤。

通信作者: 刘永琦, Email: liuyongqi73@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金地区基金资助项目 (编号: 81760804);

甘肃中医药大学研究生创新基金资助项目 (编号: CX2018-

14); 甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究重

点实验室开放基金资助项目 (编号: FZYX17-18-1)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190521.0928.002.html>

(2019-05-21)

根据流行病学对肿瘤的统计分析发现,由炎症引起的肿瘤占 15%左右^[1],慢性炎性微环境中存在着大量的炎性介质,它们能够改变细胞周围的正常环境^[2],使正常细胞发生 DNA 损伤、原癌基因突变、基因组不稳定,从而诱发癌变^[3]。白介素-6(interleukin-6, IL-6)被认为是一种多功能的细胞因子,与许多肿瘤的癌变过程相关^[4]。研究报道,IL-6 诱导骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)体外培养可发生恶性转化并成瘤^[5],其机制可能与白介素-6 受体(interleukin-6 receptor, IL-6R)的过度激活和表达有关^[6]。红芪性甘,微温,归肺、脾经,具有良好的补气功效,可通过“精气互化”来加强对先天之精 BMSCs 的巩固作用,从而达到扶正固本,祛毒攻邪,维护细胞生物学特性的效果。研究发现,在体外培养条件下,红芪不仅可以促进 BMSCs 增殖,且能维持其遗传物质染色体的稳定性^[7],但红芪发挥作用的具体物质基础尚不清楚。分子对接技术是利用计算机模式识别和优化技术,依据配体与受体作用的“锁-钥”原理及“诱导契合”原理,模拟小分子配体与受体生物大分子相互作用,实现计算机辅助药物筛选,其在中药活性成分的虚拟筛选和药物作用靶点发现等方面已有了成功的例子^[8]。因此,基于 IL-6R 利用分子对接进行虚拟筛选可从理论上推测出与其结合较稳定的红芪小分子化合物主要成分,从而为进一步研究红芪发挥调控、维持 BMSCs 生物学特性作用的具体物质基础提供探索思路,有利于加快研发防护 BMSCs 生物学特性稳定的新药。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 软件、数据库及设备 Schrodinger 2015(由兰州大学应用有机化学国家重点实验室提供支持),RCSB-PDB(Protein data bank, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)数据库,TCM-SP(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform)数据库,TTD(Therapeutic Target Database)数据库,微量热泳动仪(Monolith NT.115-德国 NanoTemper 公司)。

1.1.2 试剂 IL-6R(751504)购自 Biolegend 公司,槲皮素(1002567791)购自 SIGMA 公司,维斯体素(358778-41-2)购自上海源叶生物科技有限公司,龙胆山酮酚(2798-25-6)购自四川省维克奇生物科技有限公司,Monolith NTM 蛋白标

记试剂盒(L001)购自 NanoTemper China 公司。

1.2 方法

1.2.1 受体结构信息来源及处理 在 RCSB-PDB 搜索下载 IL-6R 三维结构,PDB 编码为 1P9M,采用 Schrodinger 2015 软件蛋白质预处理工具 Protein Preparation Wizard 对其进行分析 and 预处理,包括删去自带配体,加氢,分配相关电荷,并以自带配体位置为中心,确定活性区域的中心坐标。

1.2.2 红芪小分子化合物库准备 在 TCMSP 下载红芪小分子化合物成分,小分子化合物 3D 结构在 Schrodinger 2015 软件采用 MMFFs 力场优化,Ligand preparation 模块对小分子化合物进行能量优化,并将其转换成 Schrodinger 2015 软件认可的 SDF 格式。

1.2.3 红芪化合物成分与 IL-6R 进行分子对接 红芪小分子化合物与靶蛋白 IL-6R 空间形状的匹配情况采用 Schrodinger 9.4.5 软件的 Glide 模块进行分子对接,根据系统能量的大小进行打分。Glide -Grid 坐标参照靶蛋白自带配体的坐标。

1.2.4 微量热泳动检测小分子化合物与 IL-6R 结合亲和力 按 Monolith NTM 蛋白标记试剂盒操作,平衡脱盐柱 A 柱,将 100 μ L IL-6R 转移至 A 柱,3 000 r/min 离心 30 s 完成蛋白脱 Tris;取 93 μ L Label buffer 于脱 Tris 蛋白中,混匀后再添加 7 μ L 染料,常温避光孵育 30 min;平衡纯化柱 B 柱,将 200 μ L 蛋白-染料混合液转至 B 柱,悬空滴加,勿碰壁,待混合液全部进入柱子填料后,向 B 柱补加 300 μ L 蛋白 Tris-buffer 至 Buffer,待全部进入柱子填料后持续补加 600 μ L 蛋白 Tris-buffer,去除第 1、第 2 滴,从第 3 滴开始收集目标蛋白,最后 1 滴流出液弃掉(体积约为 500 μ L,终浓度约为 2 μ mol/L),将收集的目标蛋白稀释至终浓度 400 nmol/L,待用。分子对接筛选得到的打分较好的红芪小分子化合物按梯度稀释共计 16 个浓度梯度,除第 1 个梯度外,其余 15 个梯度分别添加 10 μ L 蛋白 Tris-buffer,随后向第 1 及第 2 梯度分别添加 10 μ L 小分子化合物母液(浓度为 1 mmol/L)。将第 2 梯度混匀后取 10 μ L 于第 3 梯度,将第 3 梯度混匀后取 10 μ L 至第 4 梯度,依次稀释至第 16 个梯度,待用。分别取 10 μ L IL-6R 蛋白添加至 16 个红芪小分子化合物梯度稀释液中混匀,依次转至毛细管,上机检测。

1.2.5 数据分析与作图 得到的 IL-6R 与红芪小分子化合物对接结果图用 Pymol 进行处理优化;通过 Monolith NT.115 检测的红芪小分子化合物与 IL-6R 结合亲和力,用 MO.Affinity Analysis v2.2.6 进行分析,拟合反应曲线,计算结合程度。

2 结果

2.1 IL-6R 活性位点准备

PDB 下载 IL-6 与 IL-6R 复合物晶体结构,其中 IL-6R 的 D3 结构域提供了 IL-6 的大部分接触表面,占整个埋藏表面积 70%以上,IL-6R 提供的接触残基中,D3 结构域的苯丙

氨酸 229(Phenylalanine 229,Phe 229)和 Phe279 占主导地位^[9],利用 schrodinger2015 将 IL-6 抽离,对 IL-6R 结构进行加氢、去水、补侧链等结构优化(图 1),以 Phe 229、Phe279 为中心定义活性区域的中心坐标,即 $x,y,z(-37.196,170.960,47.862)$ 。

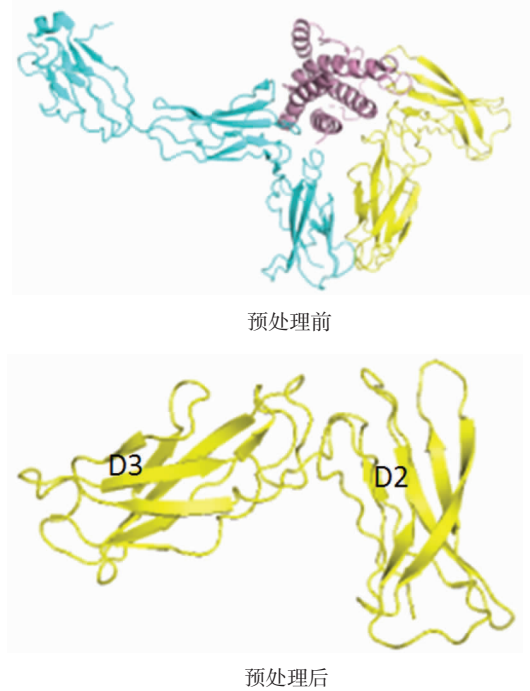


图 1 IL-6R 预处理前后的三维结构图

2.2 与 IL-6R 对接打分较好且符合类药五原则的红芪小分子化合物

将 43 个红芪小分子化合物的空间结构分别与 IL-6R 空间结构对接,根据空间形状匹配程度进行打分,筛选对接打分绝对值大于 5kcal/mol 且符合类药五原则的小分子化合物(表 1)。类药五规则即:分子量(molecular weight,MW)小于 500;氢键给体(hydrogen bond donor,donorHB)数目小于 5;氢键受体(hydrogen bond accept,acceptHB)数目小于 10;脂水分分配系数(Qplogpo/W)小于 5;可旋转键(rotary keys)的数量不超过 10,最终筛得 TCMSP 号为 MOL000098(槲皮素),MOL000575(龙胆山酮酚),MOL000500(维斯体素)的三个小分子化合物。

2.3 槲皮素、龙胆山酮酚、维斯体素与 IL-6R 相互作用模式

槲皮素、龙胆山酮酚、维斯体素与 IL-6R 分子对接如图 2A 所示:Phe279 与槲皮素之间形成 $\pi-\pi$ 堆积作用,Phe 229、谷氨酸 163(glutamic acid 163,Glu 163)与槲皮素通过氢键相互作用。如图 2B 所示:Phe 279 与龙胆山酮酚之间存在

$\pi-\pi$ 堆积作用,Glu 221、Glu 211 与龙胆山酮酚通过氢键相互作用。如图 2C 所示:Glu163、精氨酸 231(Arginine 231, Arg 231)、丝氨酸 228(Serine 228,Ser228)与维斯体素之间主要通过氢键相互作用。说明槲皮素、龙胆山酮酚、维斯体素与 IL-6R 的活性口袋均有很好的空间及电性的互补特征,易于形成稳定的结合构象。

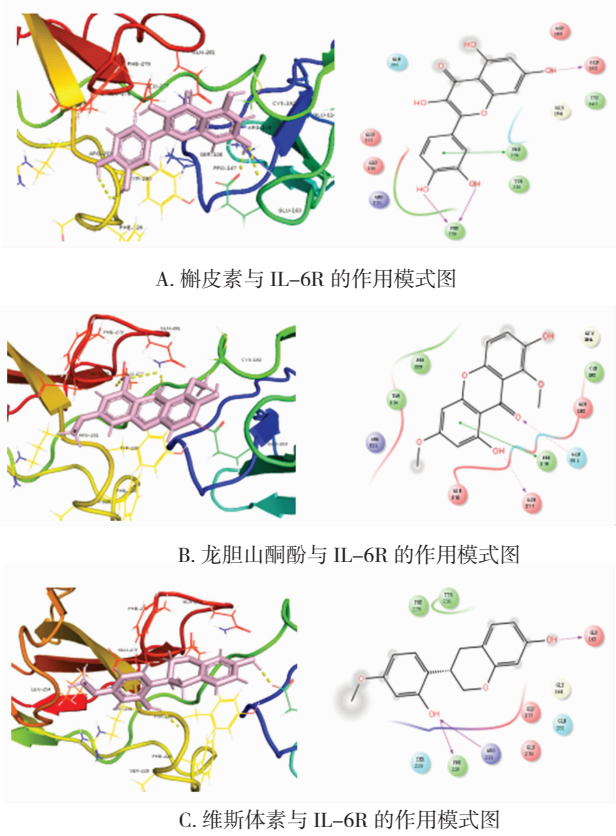


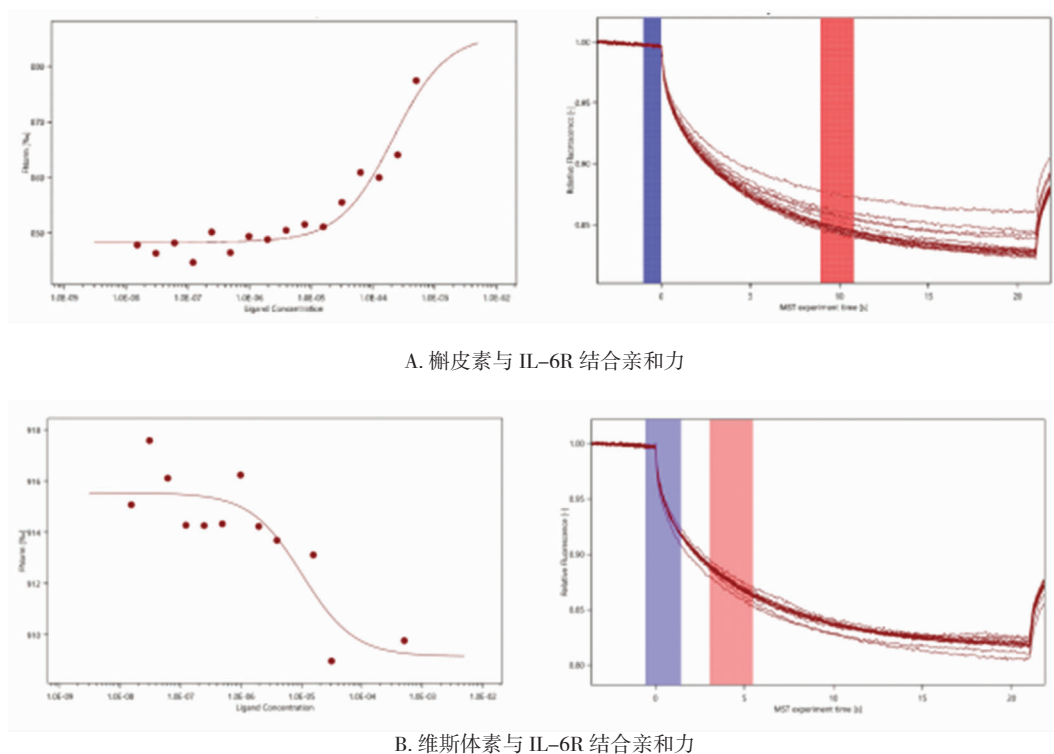
图 2 槲皮素、龙胆山酮酚、维斯体素与 IL-6R 作用模式

2.4 槲皮素、龙胆山酮酚、维斯体素与 IL-6R 结合亲和力

将 IL-6R 用赖氨酸荧光染料标记,进行预实验使其荧光强度达到 200~1 500,确定 IL-6R 的最终浓度为 400 nmol/L,小分子化合物的最终测定的最高浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$,最终结果使信噪比大于 5,用 12 个以上的浓度梯度拟合平衡解离常数 K_d 值,结果(图 3),分子对接筛选所得的 3 个小分子化合物中槲皮素、维斯体素与 IL-6R 的结合能拟合出反应曲线,并计算出 K_d 值,其中槲皮素与 IL-6R 的结合亲和力较强,用 16 个反应浓度做拟合曲线得 $K_d=(212 \pm 99.9) \mu\text{mol/L}$,维斯体素与 IL-6R 的结合亲和力较弱,得到的反应数据点较离散,用 12 个反应浓度做拟合曲线得 $K_d=(10.02 \pm 8.17) \mu\text{mol/L}$ 。

表 1 红芪中与 IL-6R 空间形状匹配较好且符合类药五规则的小分子化合物

TCMSP编号	对接打分	MW	acceptHB	donorHB	Qplogpo/W	rotary keys
MOL000098	-5.009	302.25	5.25	4	0.472	5
MOL000575	-5.047	288.00	4.50	1	2.335	4
MOL000500	-5.604	272.00	3.00	2	2.958	3



A. 槲皮素与 IL-6R 结合亲和力

B. 维系体素与 IL-6R 结合亲和力

图3 槲皮素、维系体素与 IL-6R 结合亲和力

3 讨论

BMSCs具有多向分化潜能和自我更新能力^[10],近年来,随着组织工程技术和基因工程技术的迅猛发展,BMSCs 以其易于获得、取材方便、免疫原性低等优势,成为组织工程研究中的优良种子细胞^[11],并被大量用于治疗多种疾病^[12-13],尤其肿瘤的靶向治疗^[14]。研究表明,BMSCs 作为组织工程中肿瘤靶向治疗的种子细胞,可能受到复杂的肿瘤微环境的影响而发生恶性转变^[15],其中,在肿瘤微环境中 IL-6 是炎症与细胞恶变之间最为关键的炎性因子^[16],其分泌增加后会迅速活化 IL-6/IL-6R/STAT3 信号通路,从而导致正常细胞生物学特性的改变^[2],有研究发现,IL-6 诱导 BMSCs 体外培养可发生恶性转化并成瘤^[5],其恶性转变与 IL-6R 的过度激活和表达有关^[6],因此,本研究以 IL-6R 作为靶点蛋白。

现代中医学认为 BMSCs 是先天之精在细胞层面的体现^[17],早在《素问·阴阳应象大论》云:“气归精……精化为气”。说明精气互化,气盛则精足,气虚则精亏,故补气促使 BMSCs(先天之精)转化为五脏

(心肌细胞、神经元、内皮细胞)之精气。气是精的外在表现,益气的本质是对精的影响,结合藏象理论,BMSCs 隐藏于内,主精,为藏;由 BMSCs 分化的功能细胞分布于外,主气,为象,这符合由 BMSCs 分化而来的细胞遍布全身的特征^[18]。红芪性甘,微温,归肺、脾经,具有良好的补气功效,可通过“精气互化”来加强对先天之精 BMSCs 的巩固作用。研究发现,在体外培养条件下,红芪不仅可以促进 BMSCs 增殖,且能维持其遗传物质染色体的稳定性^[7],但红芪对 BMSCs 的调控机制及其发挥药效的具体物质基础还未见报道。

分子对接是针对某一个或多个与目标疾病相关的靶标蛋白,对中药化学成分和天然产物数据库进行虚拟筛选,根据对接后的得分结果,寻找与靶标蛋白具有特异作用的候选化合物,然后进行生物活性检测,最终筛选出具有活性的小分子化合物。本研究以 IL-6R 为靶点蛋白,利用分子对接从红芪中筛选出对接打分绝对值大于 5 kcal/mol 的槲皮素、龙胆山酮酚及维系体素 3 个小分子化合物,说明红芪活性成分与 IL-6R 的核心氨基酸存在相互的作用力。有研究发现,槲皮素^[19]、龙胆山酮酚^[20]、维系

体素^[21]均有抗炎、抗癌、抗增殖、促凋亡等特性,这与本实验的预期不谋而和。从对接结果图(图 2)可以了解到,这 3 个小分子化合物的基本骨架以及其与 IL-6R 对接的作用力和空间位置结合情况,有助于阐述红芪发挥维持 IL-6 诱导后的 BMSCs 生物学特性稳定的机制。

综上所述,本研究通过分子对接技术,从红芪中筛选出与 IL-6R 结合活性较好的小分子化合物,因此推测,槲皮素、龙胆山酮酚,维斯体素通过竞争性抑制减少 IL-6R 的激活可以防护由 IL-6 诱导后的 BMSCs 生物学特性的改变,后续可通过细胞实验进一步验证,为更好地了解红芪发挥维持 IL-6 诱导后的 BMSCs 生物学特性稳定的物质基础奠定基础。

本实验在兰州大学应用有机化学国家重点实验室老师及其团队成员的指导下完成,在此特向兰州大学应用有机化学国家重点实验室人员以最衷心的感谢。

参 考 文 献

- [1] 范丽梅,柳昀熠,潘 钰,等. 炎症与肿瘤的关系研究进展[J]. 江汉大学学报(自然科学版),2016,44(5):432-437.
- [2] 沈政洁,程海波,沈卫星,等. 肿瘤炎症微环境与“癌毒”病机相关性探讨[J]. 北京中医药大学学报,2015,38(1):14-17.
- [3] Caetano MS, Zhang H, Cumpian AM, et al. IL6 blockade reprograms the lung tumor microenvironment to limit the development and progression of K-ras-mutant lung cancer[J]. Cancer Res, 2016, 76(11):31890-3199.
- [4] Li S, Tian J, Zhang H, et al. Down-regulating IL-6/GP130 targets improved the anti-tumor effects of 5-fluorouracil in colon cancer[J]. Apoptosis, 2018, 23(5-6):356-374.
- [5] 崔向荣. 肿瘤微环境中 IL-6/STAT3 信号通路对骨髓间充质干细胞恶性转变的作用[D]. 重庆:重庆医科大学,2013.
- [6] 崔向荣,朱 静,田 杰,等. C6 胶质瘤微环境中 SIL-6R/GP130 与 MSCs 瘤向转化的相关性[J]. 基础医学与临床,2013,33(5):525-530.
- [7] 王 倩,贾旭东,刘永琦. 黄芪、红芪小分子提取物对间充质干细胞体外增殖与遗传稳定性的考察[J]. 中国医院药学杂志,2015,35(19):1724-1728.
- [8] 梁子亮,张旭毅,欧阳璞心,等. 抗高原反应中药红景天化学成分在靶标研究[J]. 中华灾害救援医学,2017,5(4):186-190.
- [9] Boulanger MJ, Chow DC, Brevnova EE, et al. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex[J]. Science, 2003, 300(5628):2101-2104.
- [10] Ullah I, Subbarao R, Rho G. Human mesenchymal stem cells—current trends and future prospective[J]. Bioscience Rep, 2015, 35(2):1-18.
- [11] Li C, Wei G J, Xu L, et al. The involvement of senescence induced by the telomere shortness in the decline of osteogenic differentiation in BMSCs[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(5):1117-1124.
- [12] Janq YO, Kim YJ, Baik SK, et al. Histological improvement following administration of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: a pilot study[J]. Liver Int, 2014, 34(1):33-41.
- [13] Nakatsu H, Ueno T, Oga A, et al. Influence of mesenchymal stem cells on stomach tissue engineering using small intestinal submucosa[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2015, 9(3):296-304.
- [14] Zhang TY, Huang B, Yuan ZY, et al. Gene recombinant bone marrow mesenchymal stem cells as a tumor-targeted suicide gene delivery vehicle in pulmonary metastasis therapy using non-viral transfection[J]. Nanomedicine Nanotechnology Biology & Medicine, 2014, 10(1):257-267.
- [15] Zhao Y, Chen J, Dai X, et al. Human glioma stem-like cells induce malignant transformation of bone marrow mesenchymal stem cells by activating TERT expression[J]. Oncotarget, 2017, 8(61):104418-104429.
- [16] Waldner MJ, Sebastian F, Neurath MF. Interleukin-6—a key regulator of colorectal cancer development[J]. International Journal of Biological Sciences, 2012, 8(9):1248-1253.
- [17] 宋小莉,任泽香,李欣芮. 中药促骨髓间充质干细胞增殖的研究概况[J]. 山东中医杂志,2016,35(10):921-923.
- [18] 李利清,张新光,虞坚尔. 中医藏象精气与干细胞关系研究[J]. 环球中医药,2010,3(1):39-41.
- [19] Haleagrahara N, Hodgson K, Miranda-Hernandez S, et al. Flavonoid quercetin-methotrexate combination inhibits inflammatory mediators and matrix metalloproteinase expression, providing protection to joints in collagen-induced arthritis[J]. Inflammopharmacology, 2018, 26(4):1219-1232.
- [20] Isakovic A, Jankovic T, Harhaji L, et al. Antiglioma action of xanthones from Gentiana kochiana: Mechanistic and structure-activity requirements[J]. Bioorg Med Chem, 2008, 16(10):5683-5694.
- [21] Nani BD, Franchin M, Goldoni JL, et al. Isoflavonoids from Brazilian red propolis down-regulate the expression of cancer-related target proteins: a pharmacogenomic analysis[J]. Phytother Res, 2018, 32(4):750-754.

(责任编辑:唐秋姗)