

## 青蒿素类化合物抗肿瘤机制研究— 青蒿素类化合物/转铁蛋白对接研究

柳乃方<sup>1</sup>, 屈凌波<sup>1,2\*</sup>, 相秉仁<sup>3</sup>, 杨冉<sup>1</sup>

(1. 郑州大学化学系, 河南省化学生物与有机化学重点实验室, 河南 郑州 450052; 2. 河南工业大学, 河南 郑州 450052;  
3. 中国药科大学分析测试中心, 江苏 南京 200008)

**摘要:** 本文采用柔性分子对接技术, 将 11 个青蒿素类化合物对接到在不同分离度下测出转铁蛋白结构的活性腔内, 研究其抗肿瘤机制, 运用多种打分函数对结果进行打分。从对接结果可看出, 转铁蛋白结构中键合铁的 Asp-63、Tyr-188 和 His-249 残基以及稳定键合位点的 Arg-124 和 Lys-296 残基与青蒿素小分子的距离小于 0.5 nm, 活性大的化合物得分较高。对接后的模型解释了转铁蛋白的存在促使 Fe<sup>2+</sup> 与青蒿素作用、青蒿素不参与其他的代谢、增加青蒿素细胞毒性的机制, 为设计、合成全新青蒿素类化合物打下了良好的基础。

**关键词:** 青蒿素; 抗肿瘤机制; 转铁蛋白; 分子对接

中图分类号: R916.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 02-0140-05

## Antitumor mechanism of Qinghaosu derivatives — molecular docking studies of Qinghaosu derivatives with transferrin

LIU Nai-fang<sup>1</sup>, QU Ling-bo<sup>1,2\*</sup>, XIANG Bing-ren<sup>3</sup>, YANG Ran<sup>1</sup>

(1. Department of Chemistry, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Henan University of Technology, Zhengzhou 450052, China; 3. Center for Instrumental Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 200008, China)

**Abstract:** To investigate the antitumor mechanism of artemisinin, a flexible docking analysis was used to score all kinds of functions of 11 Qinghaosu derivatives and transferrin with different resolutions. The distances of Asp-63, Tyr-188, His-249, Arg-124 and Lys-296 with Qinghaosu were less than 0.5 nm, separately. Meanwhile, the higher is the activity of Qinghaosu derivatives the higher is the score. Our model explains that Fe<sup>2+</sup> is more feasible to react with Qinghaosu, and not involved in other metabolism in presence of transferrin. Docking results unveil that Iron(II)-transferrin increased the cytotoxicity of Qinghaosu derivatives and provide a rational basis for further design and synthesis of novel Qinghaosu derivatives.

**Key words:** Qinghaosu; antitumor mechanism; transferrin; molecular docking

青蒿素(Qinghaosu, QHS)是我国药学工作者从菊科植物黄花蒿中分离获得的一种倍半萜内酯过氧化物, 它作为高效低毒的抗疟药已经得到了全世界的公认。近些年来, 其抗肿瘤活性受到了广泛的关注。Henry L.通过药理学研究证明口服青蒿素能够阻

止或延缓肿瘤的扩大, 在与转铁蛋白键合后, 其抗癌活性及对癌细胞的选择性增强<sup>[1,2]</sup>。Thomas E.研究了青蒿素类化合物在癌细胞中的分子药理学, 通过实验证明了在转铁蛋白的存在下, 青蒿素对癌细胞的毒性增加<sup>[3]</sup>。目前, 多数观点认为: 与正常细胞相比, 大部分癌细胞有较高的铁吸收率。青蒿素分子内的过氧桥键能够与亚铁离子结合, 使癌细胞因缺少亚铁离子而不能进行分裂, 最终导致细胞死亡<sup>[4-6]</sup>。

收稿日期: 2008-09-03.

基金项目: 河南省高等学校创新人才基金资助项目 (2004-21).

\*通讯作者 Tel: 86-0371-67756886, E-mail: qulingbo@zzu.edu.cn

转铁蛋白(transferrin, Tf)是人体内铁运输的主要载体, 癌细胞表面分布的转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)比正常细胞多, Tf在遇到 TfR 时就会与之结合, 进入细胞, 自动释放铁离子, 被还原成亚铁离子后参与细胞代谢。青蒿素在细胞内遇到亚铁离子时, 就会与之结合, 形成复合物<sup>[7]</sup>。然而, 青蒿素是如何与铁结合才能使铁直接与其作用而不参与其他的代谢, 这方面的研究尚未见报道。本文在本实验室前期研究的基础上, 对 Tf 的结构和功能进行了分析<sup>[8]</sup>。由于对接结果取决于蛋白的精确结构, 故采用多蛋白与多配体进行对接<sup>[9]</sup>, 即选取不同分辨率下测出的三个 Tf 晶体结构, 对其活性腔进行分析, 然后将 11 个青蒿素类化合物与 Tf 进行柔性分子对接, 研究它们的作用模式。发现这类化合物可以进入活性腔, 与铁离子距离缩小, 在铁被释放时, 可以很快地与铁作用, 发挥抗癌活性。本研究为更好地理解青蒿素类化合物的抗肿瘤机制及设计合成具有高活性的化合物奠定了基础。

## 材料与方法

### 1 模型结构的搭建

本研究采用 Accelrys 公司 Cerius2 药物设计软件包, 在 Silicon Graphics O2 图形工作站上完成。计算中选取的蛋白质晶体结构 1D4N<sup>[10]</sup>、1A8F<sup>[11]</sup>、1N7W<sup>[12]</sup> 和 1SUUV<sup>[13]</sup> 从 PDB 数据库(www.rcsb.org/pdb)中获取。在 Cerius2 软件中的 3D-Skecher 中搭建 QHS 的三维结构, 化合物模板见图 1, 对其进行能量优化, 相关参数设置如下: 加载 Dreiding 力场, QHS 采用 Gasteiger-Huckel 电荷, 对分子进行 500 次的能量优化, 最终优化至收敛。

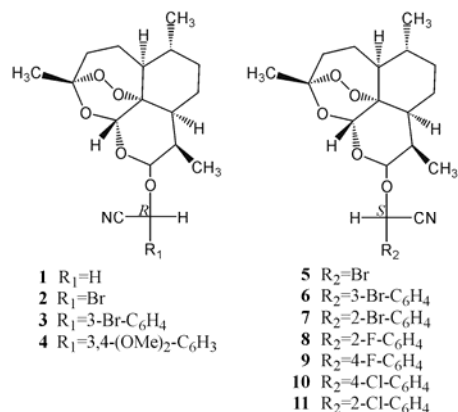


Figure 1 Structures of Qinghaosu derivative

### 2 柔性对接研究

利用 Cerius2 的 STR BASED DESIGN 模块搜寻

活性腔, 将 11 个青蒿素类化合物对接到 Tf 的活性腔中。对接时计算配体和活性腔形状矩阵 3 个本征值的平方根(RMS), 计算公式如下:

$$RMS = \sqrt{(L_1 - S_1)^2 + (L_2 - S_2)^2 + (L_3 - S_3)^2}$$

其中  $L_1$ 、 $L_2$  和  $L_3$  为配体的本征值;  $S_1$ 、 $S_2$  和  $S_3$  为活性腔内位点的本征值。为选出配体以较好的位置与位点进行匹配, 将其 RMS 设定为 0.2 nm。

对接采用 Monte Carlo 方法搜寻配体在活性腔内的取向空间, 根据配体的可变扭曲个数来决定试验次数。计算对接后产生的配体新构型内部非键作用能, 包括: 非键范德华能和 非键静电作用能。为更好地评价配体和蛋白的相互作用, 采用多种函数对其进行打分, 其中 DockScore 计算如下:

DockScore (力场) = -(蛋白和配体相互作用能 + 配体内部能量)

DockScore (PLP) = -(PLP 势能函数)

LIGSCORE1 包括三个描述符:  $E_{vdw}$ 、 $C + pol$  (蛋白和配体相互作用时淹没的极性表面积) 和 TotpolA2 (蛋白和配体相互吸引及排斥时淹没的极性表面积)。

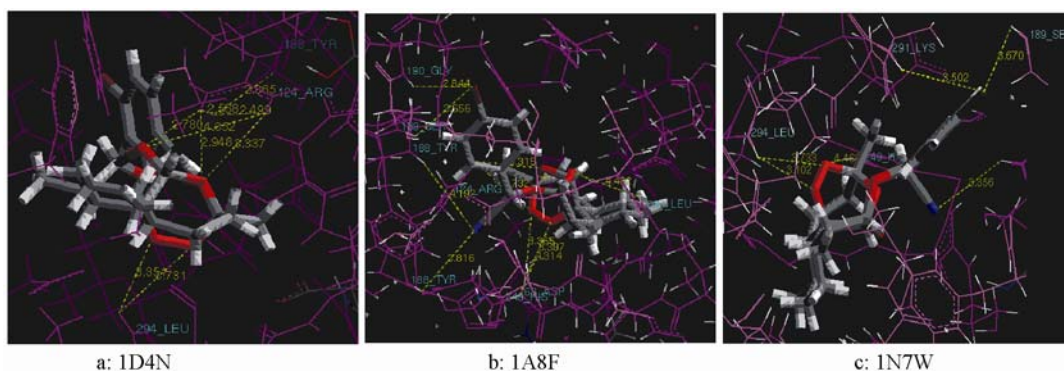
LIGSCORE2 也包括三个描述符:  $E_{vdw}$ 、 $C + pol$  (与 LIGSCORE1 相似) 和 BuryPolA2 (蛋白和配体淹没的极性表面积和)。

LIGSCORE 计算表达式:  $LIGSCORE = A - B \cdot E_{vdw} + C \cdot C + pol - D \cdot Totpol^2$ , 其中 A、B、C、D 为通过回归分析得到的常数。

## 结果与讨论

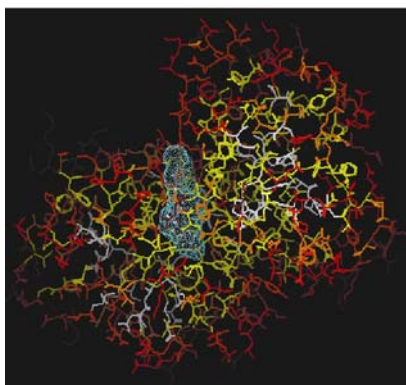
### 1 Tf 活性腔的选择及腔内的关键残基

分别对 1D4N、1A8F 和 1N7W 进行活性位点搜索, 选取前 10 个位点数较多的活性腔, 将 QHS 对接到腔内。然后选出得分较高的几个活性腔, 对接到 Tf-TfR (1SUUV) 复合物中, 除去占有 Tf 和 TfR 结合位点的活性腔, 最后得到本文所采用的活性腔。从图 2(a) 可看到, 化合物 3 中过氧桥的 O 可以与 Leu-294 的 NH 形成氢键, Tyr-188 的 NH 与分子中的 N 形成氢键。从图 2(b) 和 2(c) 可看出, 分子中的 N、过氧桥中的两个 O 与 Gly190 的 NH、Tyr-188 的 NH、Asp-63 的 NH 和 Leu-294 的 NH 有氢键作用。图 2 中标出的两原子距离在 0.35~0.45 nm 之间, 存在静电作用。电负性较强的原子与腔内残基形成氢键或有静电作用后, 稳定了复合物的结构。



**Figure 2** Binding mode of transferrin and compound **3**. Transferrin active site is shown as sticks and the molecules docked into the active site are shown as cylinder

在 Tf 晶体结构中, Fe 被 4 个保守氨基酸键合, 7 个环境中的氨基酸进一步稳定金属键合位点。图 3 显示了化合物 **3** 在 Tf 结构中的位置。从 33 个分子对接结果可看出: 铁周围的 3 个保守氨基酸 (Asp-63、Tyr-188 和 His-249) 及 2 个环境中的氨基酸 (Arg-124 和 Lys-296) 与青蒿素小分子的距离小于 0.5 nm, 与 Asp-63、Tyr-188 形成氢键作用, 与 His-249 有静电作用。Henry L. 将 QHS 与 Tf 进行键合, 得到的复合物比 QHS 的抗肿瘤活性强<sup>[2]</sup>, Thomas E. 通过实验证明了在 Tr 的存在下, 青蒿素对癌细胞的毒性增强<sup>[4]</sup>。有文献报道, Tf 在与 TfR 结合进入细胞后, 自动释放 Fe<sup>3+</sup>, 其结构发生了改变, 区域 1 和区域 2 从中间裂开, Fe<sup>3+</sup> 从 Tf 分子中心游离出来<sup>[15]</sup>。而 Tf 活性腔的位置正好处于区域 1, 2 的连接处, 为 Fe<sup>2+</sup> 与 QHS 相遇提供了必要条件。本实验室前期工作证明了 QHS 分子结构中的过氧桥键与 Fe<sup>2+</sup> 有很强的相互作用, 能够形成稳定的复合物<sup>[8]</sup>。因此, Fe<sup>3+</sup> 在被迅速地还原为 Fe<sup>2+</sup> 后, 可以很快与 QHS 结合。最终, 肿瘤细胞因缺少 Fe<sup>2+</sup> 而不能继续分裂。



**Figure 3** Complex structure of compound **3** bound to 1A8F. 1A8F is shown as residue accessibility and cyan domain is compound **3** surface based connolly algorithm on the active site

## 2 得分数据分析

对接后产生的得分数据列于表 1, 由于 Tf 的晶体结构的差异, 在相同位置搜索出活性腔大小是不同的, 相应的 DockScore 也不相同。与 1D4N 及 1N7W 相比, 1A8F 的活性位点数较少, 使得青蒿素分子与其对接后 E<sub>vdw</sub>、DockScore、PLP 及 LIGSCORE 值均比与 1D4N 和 1N7W 对接的值低。然而, 在比较此类化合物与同一蛋白结构得分时可看出, 活性大的化合物 DockScore 较高, 3 个蛋白结构均符合这一趋势, 与文献<sup>[16]</sup>报道一致。得分函数最重要的功能之一是从理论上预计实验中受体/配体结合的构型, 根据文献<sup>[17]</sup>报道, 在 RMSD ≤ 0.2 nm, PLP 和 LIGSCORE 预计的准确率在 74% 以上。因此, 本文将两个函数得分列于表 1, 用于评价对接后构型的准确率。LIGSCORE 还可以预计蛋白和 QHS 亲和力大小, 作者发现活性腔较大的 1D4N、LIGSCORE 较高。PLP1、PLP2 分别根据蛋白与 QHS 原子类型和原子半径来判断它们的氢键作用, 反映其相互作用力。

## 结论

本文采用分子对接方法讨论了青蒿素类化合物的抗肿瘤机制。与常见的对某一蛋白进行抑制进而达到抗肿瘤目的所不同的是: 青蒿素与 Fe<sup>2+</sup> 有较强的结合能力, 在与 Fe<sup>2+</sup> 结合后, 肿瘤细胞因缺少 Fe<sup>2+</sup> 不能继续进行分裂。Tf 是 Fe<sup>2+</sup> 在体内传递的主要形式, 将青蒿素与其对接后, 发现它可以进入 Tf 分子内离铁键合位点较近的活性腔, 从对接结果可看出, 键合铁的 Asp-63、Tyr-188 和 His-249 以及稳定键合位点的 Arg-124 和 Lys-296 与青蒿素小分子的距离小于 0.5 nm。在铁被释放后, 可以很快遇到青蒿素, 与其结合形成自由基, 加强了细胞毒性, 达到抗肿瘤的

**Table 1** Scores of 11 Qinghaosu derivatives with transferrin complex and ligand Van der waal's energy

Compd.	PDB	$E_{vdw}/$ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	Dock -Score	PLP1	PLP2	LIGSCORE1	LIGSCORE2	$IC_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$			
								L1210	A549	P388	HT29
1	1D4N	0.340	39.181	62.740	58.130	0.39	0.42	113	1 227	238	4 095
1	1A8F	12.350	17.089	65.400	57.170	-0.07	-0.06	113	1 227	238	4 095
1	1N7W	3.40	19.806	61.570	54.940	-0.52	-0.17	113	1 227	238	4 095
2	1D4N	-6.100	43.900	54.140	48.700	0.75	1.10	15	47	12	179
2	1A8F	11.710	22.027	61.940	56.730	-0.09	-0.24	15	47	12	179
2	1N7W	0.03	23.554	66.010	61.860	-0.38	0.03	15	47	12	179
3	1D4N	-22.020	34.596	70.300	56.850	1.00	1.86	10	39	11	490
3	1A8F	-5.200	17.520	40.900	35.390	0.63	1.15	10	39	11	490
3	1N7W	-14.510	29.056	70.290	58.350	0.97	2.07	10	39	11	490
4	1D4N	-9.050	39.554	83.740	61.630	0.45	0.39	19	85	20	7 788
4	1A8F	-15.730	17.196	62.400	51.310	1.40	1.68	19	85	20	7 788
4	1N7W	-25.480	16.055	75.800	59.280	1.38	2.64	19	85	20	7 788
5	1D4N	-1.960	43.080	64.140	53.540	-0.30	1.20	27	193	28	9 638
5	1A8F	22.500	19.674	55.610	52.930	-1.17	-1.02	27	193	28	9 638
5	1N7W	-13.420	42.476	63.220	55.730	0.05	2.33	27	193	28	9 638
6	1D4N	-19.300	38.301	71.110	59.640	1.06	2.13	151	437	108	748
6	1A8F	4.540	18.458	47.560	56.530	-0.57	0.01	151	437	108	748
6	1N7W	-12.480	43.150	59.010	51.330	0.24	2.14	151	437	108	748
7	1D4N	-11.850	21.742	56.480	49.450	0.62	2.07	38	364	43	447
7	1A8F	-1.750	14.600	66.330	58.470	-0.24	0.68	38	364	43	447
7	1N7W	-10.140	17.976	52.840	39.210	0.25	1.68	38	364	43	447
8	1D4N	-29.300	30.280	56.160	56.060	1.16	3.37	41	306	77	1 471
8	1A8F	-12.680	28.097	58.300	59.430	1.25	1.76	41	306	77	1 471
8	1N7W	-34.770	30.313	75.440	61.790	1.32	3.99	41	306	77	1 471
9	1D4N	-18.710	43.709	66.560	52.100	0.87	2.70	620	8 800	440	7 400
9	1A8F	-21.370	34.164	77.780	63.420	0.78	2.23	620	8 800	440	7 400
9	1N7W	-27.690	42.796	60.320	60.920	0.67	3.21	620	8 800	440	7 400
10	1D4N	-16.030	42.516	79.620	67.700	0.75	2.06	470	10 600	290	16 200
10	1A8F	-24.200	37.088	77.640	67.830	0.93	2.37	470	10 600	290	16 200
10	1N7W	-37.460	44.646	74.230	66.690	1.42	4.19	470	10 600	290	16 200
11	1D4N	-31.040	32.455	67.380	50.850	1.14	3.44	17	221	13	1 923
11	1A8F	-17.860	20.966	68.860	51.900	0.57	2.17	17	221	13	1 923
11	1N7W	-35.750	36.555	73.020	58.230	1.27	3.86	17	221	13	1 923

目的。本研究为今后设计合成高活性、全新青蒿素类化合物打下了良好的基础。

## References

- [1] Henry L, Narendra PS. Oral artemisinin prevents and delays the development of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA)-induced breast cancer in the rat [J]. *Cancer Lett*, 2006, 231: 43-48.
- [2] Henry L, Tomikazu S, Narendra PS, et al. Effects of artemisinin-tagged holotransferrin on cancer cells [J]. *Life Sci*, 2005, 76: 1267-1279.
- [3] Thomas E. Molecular pharmacology and pharmacogenomics of artemisinin and its derivatives in cancer cell [J]. *Curr Drug Targets*, 2006, 7: 407-421.
- [4] Narendra PS, Henry L. Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells [J]. *Life Sci*, 2001, 70: 49-56.
- [5] Ikuhiko N, Henry L, Narendra PS, et al. Anticancer properties of artemisinin derivatives and their targeted delivery by transferrin conjugation [J]. *Int J Pharm*, 2007, 9: 3-9.

- [6] Kotamraju S, Chitambar CR, Kalivendi SV, et al. Transferrin receptor-dependent iron uptake is responsible for doxorubicin-mediated apoptosis in endothelial cells: role of oxidant-induced iron signaling in apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 17179–17187.
- [7] Peter TG, Karl BM. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions [J]. *Drug Discov Today*, 2005, 10: 267–273.
- [8] Liang RL, Lu TW, Qu LB, et al. A quantum chemistry investigation on antimalarial mechanism of Qinghaosu based on cleavage of the peroxide bridge [J]. *Acta Pharm Sin (药 学 学 报)*, 2006, 41: 544–547.
- [9] Robert PS, Georgia BM, Wendy DC. Multiple protein structures and multiple ligands: effects on the apparent goodness of virtual screening results [J]. *J Comput Aided Mol Des*, 2008, 22: 257–265.
- [10] Yang HW, MacGillivray RTA, Chen J, et al. Crystal structures of two mutants (K206Q, H207E) of the N-lobe of human transferrin with increased affinity of iron [J]. *Protein Sci*, 2000, 9: 49–52.
- [11] Macgillivray RTA, Moore SA, Chen J, et al. Two high-resolution crystal structures of the recombinant N-lobe of human transferrin reveal a structural change implicated in iron release [J]. *Biochemistry*, 1998, 37: 7919–7928.
- [12] Adams TE, Mason AB, He QY, et al. The position of arginine 124 controls the rate of iron release from the N-lobe of human serum transferrin. A structural study [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 6027–6033.
- [13] Cheng Y, Zak O, Aisen P, et al. Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex [J]. *Cell*, 2004, 116: 565–576.
- [14] Thomas E, Achille B, Marta RR, et al. Enhancement of cytotoxicity of artemisinins toward cancer cells by ferrous iron [J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 37: 998–1009.
- [15] Masaaki H. The structural mechanism for iron uptake and release by transferrins [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64: 1328–1336.
- [16] Li Y, Wu JM, Shan F, et al. Synthesis and cytotoxicity of dihydroartemisinin ethers containing cyanoarylmethyl group [J]. *Bioorg Med Chem*, 2003, 11: 977–984.
- [17] Wang RX, Lu YP, Wang SM. Comparative evaluation of 11 scoring functions for molecular docking [J]. *J Med Chem*, 2003, 46: 2287–2303.

更正:

2008年第43卷第11期中文目录及1116页标题“高链孢霉属真菌YD-01菌丝体中化学成分的研究”更正为“交链孢霉属真菌YD-01菌丝体中化学成分的研究”。