

天然木脂素苷类成分 eleutheroside E 对膝骨性关节炎的治疗作用及其与 MMPs 相互作用方式的分析

闫兆威^{1,2 *}, 张敏^{1,2}, 魏明刚¹, 姚鑫¹, 刘江云²

¹苏州大学附属第一医院, 苏州 215006; ²苏州大学药学院, 苏州 215123

摘要:本文旨在探讨天然木脂素苷类成分 eleutheroside E(EE)对膝骨性关节炎模型的治疗作用并对 EE 的作用机制进行分析, 明确 EE 与 MMPs 相互作用的位点及结合方式。实验采用 ACLT 方法建立兔膝骨关节炎模型, 通过关节腔注射方式给予 EE 进行治疗干预, 从动物整体水平对 EE 在实验性兔膝骨性关节炎的治疗作用进行综合评价。进一步运用分子对接技术和分子动力学方法, 对 EE 与 MMPs 相互作用位点和结合方式进行分析。结果显示: EE 能明显改善骨关节炎部位炎细胞浸润、纤维组织增生及软骨表层破坏等情况, 并降低关节液中炎症介质($\text{IL-1}\beta$ 和 PGE_2)以及 MMP-3 和 MMP-9 的水平。分子对接和分子动力学实验发现, EE 配体可结合于 MMP-3 和 MMP-9 催化位点的凹槽中, EE 糖环上的多个羟基可与 MMP-3 和 MMP-9 受体中的多个氨基酸形成氢键, 这些氢键对于配体的结合起到了重要作用。本研究为开发木脂素苷类母核结构新型 MMPs 抑制剂以及天然来源的骨性关节炎候选治疗药物奠定了一定基础。

关键词:天然木脂素苷; eleutheroside E; 基质金属蛋白酶; 膝骨性关节炎; 治疗作用

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)8-1339-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.8.010

Therapeutic effect of natural lignan glycoside constituents eleutheroside E on models of knee osteoarthritis and analysis of its interaction modes with MMPs

YAN Zhao-wei^{1,2*}, ZHANG Min^{1,2}, WEI Ming-gang¹, YAO Xin¹, LIU Jiang-yun²

¹The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China;

²College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China

Abstract: The paper aimed to investigate the therapeutic effect of eleutheroside E (EE) on knee osteoarthritis and analyze the mechanisms of EE, to clarify the interaction sites and binding modes of EE and MMPs. The ACLT method was adopted to establish a rabbit model of knee osteoarthritis, and EE was given by injection into the joint cavity for therapeutic intervention. Further using molecular docking technology and molecular dynamics methods to analyze the interaction sites and binding modes of EE with MMPs. These results indicated that EE could significantly improve inflammatory cell infiltration, fibrous tissue hyperplasia and cartilage surface destruction in osteoarthritis, and reduce the content levels of inflammatory factors ($\text{IL-1}\beta$ and PGE_2) and MMP-3 and MMP-9 in joint fluid. In addition, molecular docking and molecular dynamics experiments found that EE ligands could bind to the grooves of the catalytic sites of MMP-3 and MMP-9, and the multiple hydroxyl groups on the sugar ring of EE could form hydrogen bonds with multiple amino acids in the MMP-3 and MMP-9 receptors, which play an important role in the binding of ligands. The study lays a foundation for the development of novel MMPs inhibitors with the mother nucleus of lignan glycosides and candidate therapeutic drugs for osteoarthritis from natural sources.

Key words: natural lignan glycoside; eleutheroside E; matrix metalloproteinases (MMPs); knee osteoarthritis; treatment

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)是一种退行性疾病

收稿日期: 2021-01-20 接受日期: 2021-05-10

基金项目: 江苏省中医药科技发展计划(YB201989); 江苏省青年医学人才资助项目(QNRC2016715); 苏州市科技发展计划(SYSD2020095)

*通信作者 Tel: 86-512-67780477; E-mail: yanzwsuzhou@163.com

病, 主要表现为关节软骨代谢异常和关节骨结构破坏, 严重时会导致关节功能丧失, 已成为 50 岁以上人群丧失劳动力和致残的重要病因。其中膝骨性关节发生率最高, 据世界卫生组织统计, 目前全世界约有 1.9 亿骨性关节炎患者, 随着老龄化社会的进程,

OA 患者逐年增多,给患者家庭带来了极大的经济负担和精神压力^[1,2]。目前对 OA 的治疗是以一些非特异性药物减轻临床症状为主,通过口服非阿片类止痛药(对乙酰氨基酚、中枢镇痛药)及非甾体类抗炎药来缓解关节炎患者的症状,但并不能从根本上治愈 OA,同时该类药物在心血管系统及胃肠道系统的不良反应较多,限制了其应用的范围^[3,4]。因此,临幊上亟待开发一种具有新作用机制、强效的 OA 治疗创新药物。Eleutheroside E(EE)是刺五加中特有的木脂素苷类成分(图 1),课题组在前期研究发现 EE 具有较好的抗炎作用^[5,6],但目前为止,国际尚未见有关 EE 在 OA 治疗应用的研究报道。故本研究基于前期工作基础,采用前交叉韧带切断法(ACLT)建立兔膝骨关节炎模型,首次选用 EE 作为治疗药物,通过关节腔注射的方式给药进行治疗干预,从动物整体水平对 EE 在实验性兔膝骨性关节炎的治疗及保护作用进行评价。并进一步运用分子对接技术和分子动力学模拟手段对 EE 与 MMPs 相互作用的位点及结合方式进行分析,明确 EE 与 MMPs 复合物结合的模式,从而为研发一种天然来源新型的骨性关节炎候选治疗药物奠定基础。

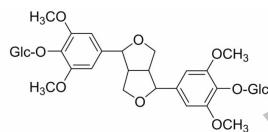


图 1 Eleutheroside E 的化学结构式

Fig. 1 The chemical structure of eleutheroside E

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

Eleutheroside E(EE, 含量 ≥ 98%, 批号: 20130811)购于成都瑞芬思生物科技有限公司,塞来昔布(celecoxib, 含量 ≥ 98%, 批号: 20131019)购于 Sigma-Aldrich 公司,放于 4 ℃ 冰箱保存,现用现配。MMP-3(批号: 20140212), MMP-9(批号: 20140417)和 IL-1 β (批号: 20140130)的 ELISA 试剂盒购于 TSZ Scientific LLC 公司; PGE₂(批号: 20140625)的 ELISA 试剂盒购于 R&D Systems 公司。

1.2 仪器

EL104 型电子天平(上海越平科学仪器有限公司);3K15 型台式高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司);Sunrise 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司);BX41 型光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司)。

1.3 实验动物

新西兰大白兔,30 只,雄性,体重 3.0~3.5 kg,清洁级,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,实验动物生产许可证号(SCXK(沪)2012-0002)。试验期间饲养室温度 20~24 ℃,相对湿度为 65~75%,自由摄食和饮水,实验动物处理遵守实验动物伦理原则。

1.4 实验方法

1.4.1 OA 动物模型建立及药物处理

取 30 只雄性的健康新西兰大白兔,体重 3.0~3.5 kg,清洁级,随机分为 5 组,每组 6 只,分为假手术组(sham operation, SO)、模型组(model)、EE 低剂量(20 mg/kg, EE-20)、EE 高剂量(60 mg/kg, EE-60)治疗药物组、阳性对照药 celecoxib(15 mg/kg, Cel-15)组。所有动物造模前一天右膝备皮,术前称重,用 10% 水合氯醛按 300 mg/kg 经腹腔注射麻醉,将动物仰卧位固定于手术台上,消毒铺单。假手术组仅做皮肤切口,不切断前交叉韧带。模型组和各治疗组的动物均采用文献报道的前交叉韧带切断法(ACLT)建立骨性关节炎动物模型^[7]。具体操作步骤如下,取髌骨内侧切口,显露关节腔,切断前交叉韧带,并切除断端 1~2 mm,防止术后粘连,术中注意保护关节软骨,逐层缝合切口,术后 3 天肌肉注射青霉素,40 万 U/d。各组实验动物四周后观察切口愈合良好后,再进行关节腔注射给药,每次注射药物体积为 0.5 mL,每周给药 1 次,连续进行 5 周。治疗药物 EE 组,关节腔注射给予 EE-20 和 EE-60 两种剂量;阳性药物组,关节腔注射给予 Cel-15;模型组仅注射给予空白溶媒生理盐水 0.5 mL;药物在注射前用生理盐水溶解,现用现配,假手术组不予任何处理正常饲养。

1.4.2 大体观察

处死动物取材时,观察右膝关节的关节面是否光泽,有无软化灶、糜烂、溃疡和缺损,有无软骨剥脱,软骨下骨质暴露,关节局部有无骨赘形成。并用大体评分规则进行评估^[8]:0 分:关节面光滑,色泽正常;1 分:关节面粗糙,有小的裂隙,色泽灰暗;2 分:关节面糜烂,软骨缺损达软骨表层或中层;3 分:关节面溃疡形成,缺损达软骨深层;4 分:软骨剥脱,软骨下骨质暴露。

1.4.3 组织病理学观察

采用空气栓塞法处死各组实验动物后,矢状位切取右膝关节,股骨内侧负重部分标本,厚约 0.5

cm, 包括关节软骨和软骨下骨, 置于 10% 中性甲醛溶液中固定 24 h, 10% EDTA 脱钙, 酒精脱水, 透明、浸蜡, 5 μm 层厚连续切片, 烤片 1 h, 脱蜡、水化, HE 染色, 脱水、透明, 中性塑胶封片。光学显微镜下观察关节软骨结构是否清晰, 软骨细胞排列是否整齐, 有无软骨细胞增生、缺失, 有无软骨裂隙、溃疡及缺损、软骨层纤维成分是否增多等病理改变情况。观察滑膜组织有无肥厚及增生, 有无血管侵入, 有无炎细胞浸润等情况^[9]。根据骨关节病组织分类方法中关节软骨与滑膜的病变计分标准^[10], 对各组动物膝关节标本的病变程度进行计分和组间比较。

1.4.4 关节液中 IL-1β、PGE₂、MMP-3 和 MMP-9 的水平测定

实验结束后, 处死兔子取关节液, 测定关节液中 IL-1β、PGE₂、MMP-3 和 MMP-9 的水平, 所有检测实验均按照 ELISA 试剂盒的使用说明书进行操作。

1.4.5 分子对接实验

采用 Chemdraw 15.0 绘制小分子 EE 的 2D 结构, 保存为 cdx 格式。载入 Chem3D 15.0, 用 MM2 力场进行能量最小化, 保存为 pdb 格式。载入 Autodocktool 1.5.6 程序, 添加电荷, 分配原子类型, 所有可旋转键均设置为柔性, 保存为 pdbqt 格式, 用于分子对接。以 MMP-3 (PDB ID: 1B8Y) 和 MMP-9 (PDB ID: 1GKC) 晶体结构作为蛋白受体, 进行分子对接。在 Pymol 1.7 程序中删除晶体结构中的结晶水和其他小分子, 添加氢原子后保存。载入 Autodocktool 1.5.6 程序, 添加电荷, 分配原子类型, 保存为 pdbqt 格式, 作为分子对接受体。采用 Vina 1.1.2 软件进行分子对接, 获取配体-受体复合物初始坐标, 选取 affinity 最佳构象作为分子对接结果。

1.4.6 分子动力学模拟

采用 Amber 18 软件包对蛋白-小分子复合物进行分子动力学模拟。蛋白使用 ff14SB 力场参数, 小分子配体则使用 gaff 通用力场参数, 并使用 ANTECHAMBER 模块计算其 AM1-BCC 原子电荷。将蛋白-小分子复合物载入 tleap 模块, 自动添加氢原子和拮抗离子以中和电荷。选择 TIP3P 显性水模型, 设置周期性边界条件。分子动力学模拟工作流程共包括能量最小化、加热、平衡、生产动力学模拟等 4 步。首先, 约束蛋白(和小分子)重原子, 对水分子进行 10 000 步(含 5 000 步最速下降法和 5 000 步共轭梯度法)能量最小化; 随后, 在 50 ps 时间内, 将

体系缓慢加热至 300 K; 加热完成后, 在 npt 系综下对体系进行 50 ps 的平衡。最后, 将体系在 npt 系综下进行 50 ns 的分子动力学模拟。每隔 10 ps 保存一次轨迹数据, 并用 CPPTRAJ 模块进行相关分析。配体和蛋白的结合自由能计算则采用 MMPBSA.py 模块进行。

1.4.7 数据分析

采用 SPSS 16.0 统计软件处理系统, 实验数据以平均值 ± 标准误差表示, 统计分析采用 Mann-Whitney U 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 EE 对兔子大体观察的影响

假手术组显示: 软骨面完整光滑, 色泽正常, 无关节积液及滑膜增生。模型组显示: 软骨剥脱, 软骨下骨暴露, 股骨外踝有明显骨赘及溃疡生成。EE-20、EE-60 和 Cel-15 治疗组中显示: 关节软骨表面欠光滑, 有散在溃疡点, 软骨边缘无骨赘形成, 未见裂纹及软化灶, 大体破坏程度明显降低, 其中 EE-60 和 Cel-15 治疗组与模型组比较, 治疗效果明显 ($P < 0.001$)。EE 治疗后代表性股骨外踝图及各组的大体评分见图 2 所示。

2.2 EE 对兔子膝关节病理观察的影响

关节软骨 HE 染色结果: 假手术组中显示: 动物软骨表层完整, 软骨结构清晰可辨, 细胞排列整齐, 潮线结构完整; 模型组中显示: 软骨表层剥脱, 细胞明显增生, 排列严重紊乱, 潮线结构破坏。Cel-15 治疗组显示: 软骨病变程度较轻, 表面光滑, 但仍可见软骨表层细胞的染色加深及细胞排列紊乱; EE-20 和 EE-60 治疗组显示: 软骨表层轻微破损, 可见一定程度的表层细胞增生, 部分细胞的染色加深等软骨病变, 但与模型组比较有明显的改善。EE 治疗后代表性关节软骨病理图片及各组关节软骨的病理评分见图 3 所示。

滑膜 HE 染色结果: 假手术组中显示: 滑膜组织无肥厚及增生, 无血管侵入, 无炎细胞浸润; 模型组中显示: 滑膜内衬细胞增生, 排列杂乱, 毛细血管及纤维组织增生, 大量炎症细胞浸润。EE-20 和 EE-60 治疗组中显示: 滑膜细胞数量较模型组减少, 轻度纤维组织增生, 少量炎证细胞浸润。EE 和 Cel-15 治疗组与模型组比较, 治疗效果明显 ($P < 0.001$)。EE 治疗后代表性滑膜组织病理图片及各组滑膜的病理评分见图 4 所示。

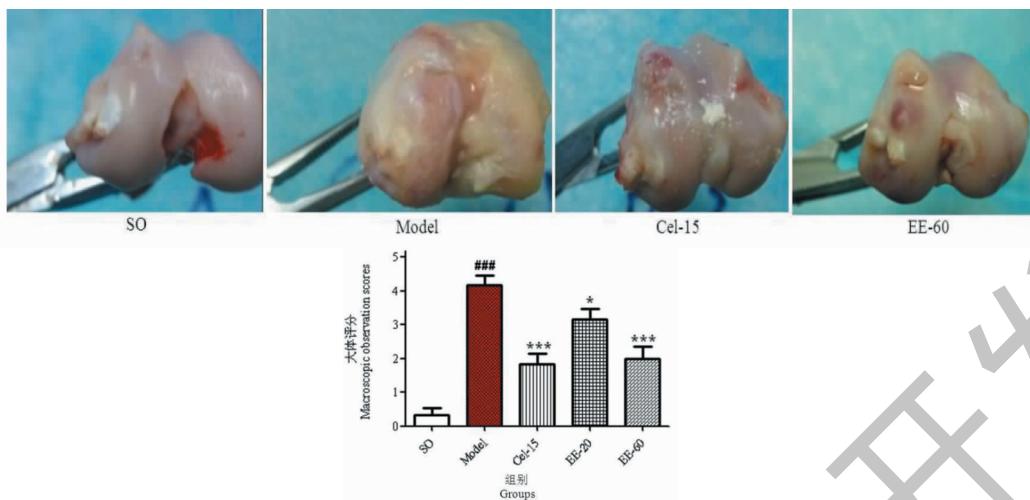
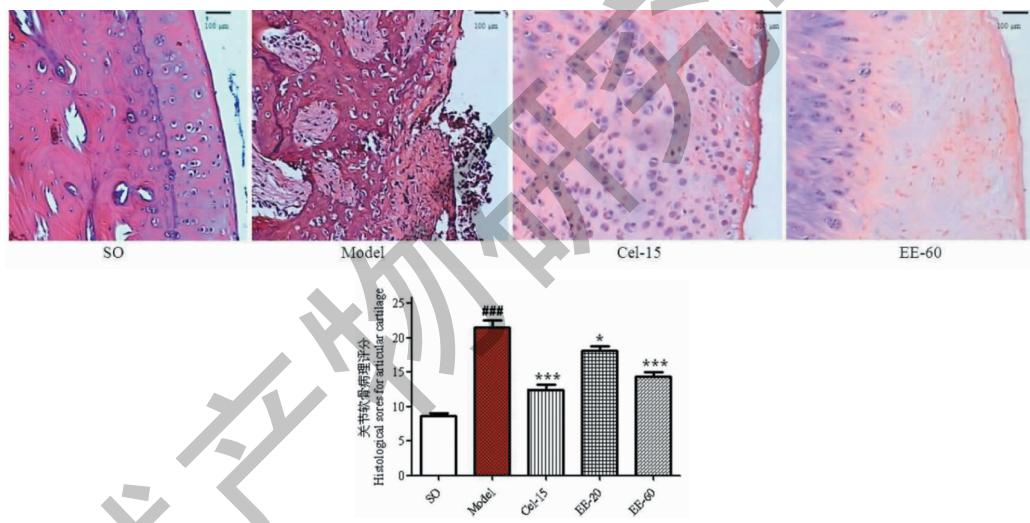


图 2 EE 对兔子大体观察的影响

Fig. 2 Effect of EE on macroscopic observations of rabbits

注:与假手术组比较, *** $P < 0.001$;与模型组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。Note: *** $P < 0.001$ vs SO group; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs model group.

图 3 EE 对兔子关节软骨组织病理学的影响(HE, $\times 100$)Fig. 3 Effect of EE on histopathology of articular cartilage of rabbits (HE, $\times 100$)

注:与假手术组比较, *** $P < 0.001$;与模型组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。Note: *** $P < 0.001$ vs SO group; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs model group.

2.3 ELISA 法测定 EE 对关节液中 IL-1 β 、PGE₂、MMP-3 和 MMP-9 水平的影响

取兔子的关节液,采用 ELISA 检测方法,对关节液中 IL-1 β 、PGE₂、MMP-3 和 MMP-9 的水平进行测定。检测结果分析显示:模型组动物关节液中 IL-1 β 、PGE₂、MMP-3 和 MMP-9 的含量水平明显高于假手术组($P < 0.001$);EE-20、EE-60 mg/kg 和 Cel-15 治疗组与模型组比较,均能明显降低关节液中 IL-1 β 、PGE₂、MMP-3 和 MMP-9 的水平,其中 EE-60 和 Cel-15 治疗组与模型组比较,抑制作用显著($P <$

0.001),见图 5A ~ D。

2.4 分子对接结果分析

分子对接实验显示,EE 配体可结合于 MMPs 催化位点的凹槽中,并获得了对接的最佳构象,其中 EE 与 MMP-3 对接的最低自由能值为-8.2 kcal/mol;EE 与 MMP-9 对接的最低自由能值为-7.5 kcal/mol,见图 6 所示(中心位置显示的紫色圆球为催化必须的 Zn 离子)。

同时,EE 配体糖环上的多个羟基可与 MMP-3 和 MMP-9 受体中的多个氨基酸(如 His201 侧链 N、

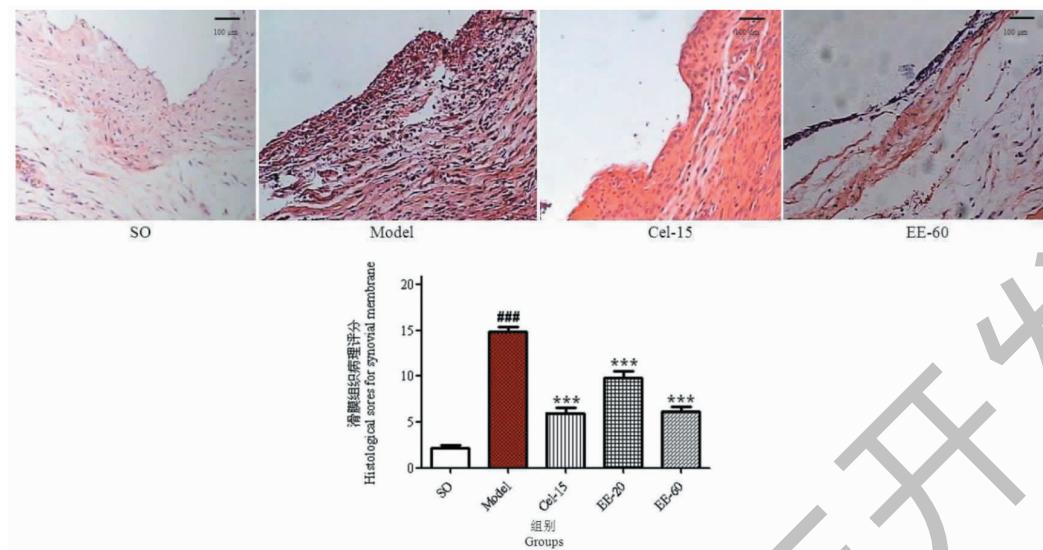


图 4 EE 对兔子滑膜组织病理学的影响(HE, $\times 100$)

Fig. 4 Effect of EE on histopathology of synovial membrane of rabbits(HE, $\times 100$)

注:与假手术组比较, *** $P < 0.001$;与模型组比较, *** $P < 0.001$ 。Note: *** $P < 0.001$ vs SO group; *** $P < 0.001$ vs model group.

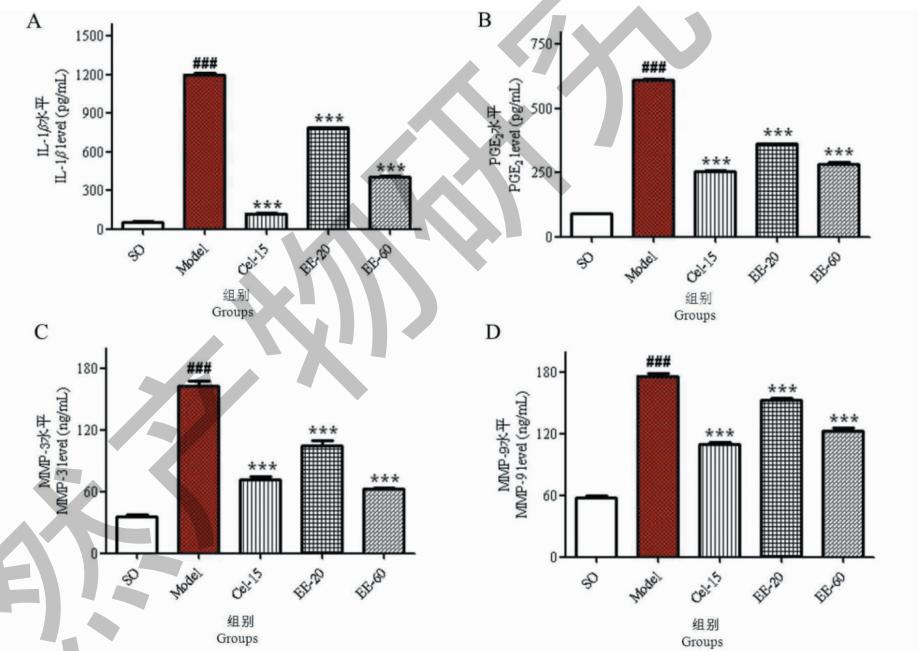


图 5 EE 对关节液中 IL-1 β (A)、PGE₂ (B)、MMP-3 (C) 和 MMP-9 (D) 水平的影响

Fig. 5 Effect of EE on the levels of IL-1 β (A)、PGE₂ (B)、MMP-3 (C) and MMP-9 (D) in synovial fluid

注:与假手术组比较, *** $P < 0.001$;与模型组比较, *** $P < 0.001$ 。Note: *** $P < 0.001$ vs SO group; *** $P < 0.001$ vs model group.

Ala189 骨架 N、Ser412 骨架 O、His411 骨架 O 等)形成氢键,这些氢键对于配体的结合起到重要作用。此外,EE 配体苯环可与 MMP-3 中 (Tyr155、Phe86、Tyr168、Phe210、Val163) 和 MMP-9 中 (Leu188、Val398、Tyr423、Tyr420、Leu187) 等疏水残基形成疏水堆积作用,亦可稳定其结合,见图 7 所示。

2.5 分子动力学模拟结果分析

进一步应用 AmberTools 18.0 软件进行分子动力学模拟实验,采取 rmsd 平衡之后的轨迹,基于 MMGBSA 方程计算配体 EE 与 MMP-3 和 MMP-9 的结合自由能。实验结果显示(见表 1):EE 与 MMP-3 的总结合自由能为 -19.8 kcal/mol,EE 与 MMP-9 的

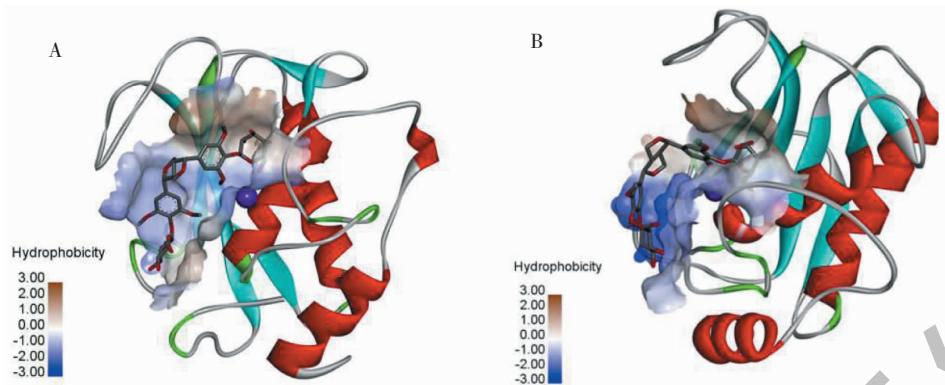


图 6 分子对接最佳构象示意图

Fig. 6 Optimal conformation of molecular docking

注:Zn 离子由紫色圆球表示。A. EE 与 MMP-3 对接的最佳构象;B. EE 与 MMP-9 对接的最佳构象。Note: Zn ions are represented by purple spheres. A. Optimal conformation of molecular docking between EE with MMP-3; B. Optimal conformation of molecular docking between EE with MMP-9.

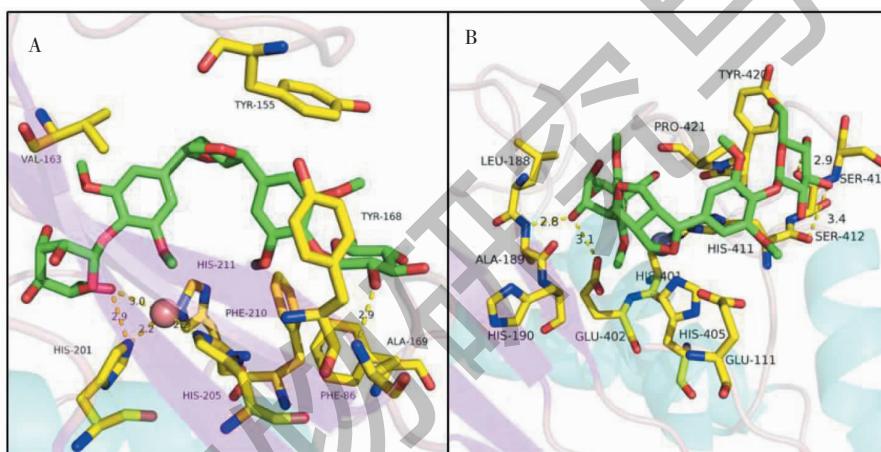


图 7 EE 与 MMP-3(A) 和 MMP-9(B) 残基间的相互作用图

Fig. 7 Interaction of EE with the active site residue of MMP-3 (A) and MMP-9 (B)

结合总自由能为-15.2 kcal/mol,相比较而言,EE 与 MMP-3 的总结合能更低,表明 EE 与 MMP-3 结合能力更强,此结果与上述 ELISA 检测实验结果趋势基本一致。其中,在 EE 与 MMP-3 和 MMP-9 复合物结合的过程中,主要的贡献来源于范德华势能和静电作用,且两个体系具有相似的结合模式。此外,在整个分子动力学过程中,蛋白回旋半径曲线均较为平稳,稳定在 15 Å 附近,蛋白整体结构紧凑,不存在松散、去折叠等情况。

3 讨论与结论

关节软骨的基本组成成分为软骨基质、软骨细胞和水。软骨基质主要由蛋白多糖和胶原组成,软骨细胞是软骨基质分解代谢反应的主要来源,在正常的生理条件下,软骨成分的降解与合成之间保持动态平衡。骨性关节炎(OA)病变的发生主要是由

于一些相关介质或因子引起了关节组织的骨、软骨、甚至关节内韧带和肌腱的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)进行性破坏,导致关节软骨局部软化、磨损及结构损坏^[11]。近年来有学者发现基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)与 OA 患者的骨关节损伤及病情活动密切相关,在关节软骨基质及软骨细胞破坏的病理过程中起着非常关键的作用^[12]。MMPs 是一种能够降解细胞外基质(ECM)的锌蛋白水解酶,几乎能降解 ECM 的所有成分,在骨性关节炎发生过程中,软骨细胞及滑膜细胞分泌过量的基质金属蛋白酶(MMP-3 和 MMP-9)^[13],打破了基质金属蛋白酶-基质金属蛋白酶组织抑制因子(MMP-TIMP)的平衡,使 ECM 发生了不可逆的降解,导致关节软骨的肿胀、抗外力作用下降、关节内炎症反应加重,最终致使关节功能的丧失^[14]。

表 1 EE 与 MMP-3 和 MMP-9 结合自由能分析

Table 1 Binding free energy analysis of EE binding to MMP-3 and MMP-9

能量组分 Energy component	结合自由能 Binding free energy (kcal/mol)	
	MMP-3	MMP-9
VDWAALS	-41.7	-29.9
EEL	-31.4	-96.2
EGB	58.8	115.6
ESURF	-5.56	-4.69
DELTA G gas	-73.1	-126.1
DELTA G solv	53.3	110.9
DELTA TOTAL	-19.8	-15.2

MMPs 过量表达导致的软骨破坏已经成为研究 OA 发病机理的热点之一,因此通过寻找 MMPs 抑制剂成为治疗 OA 药物研发的新策略。

中药是祖国医药宝库中的重要组成部分,由于其来源广泛、化学成分丰富、不良反应少,开发成新药易于人体接受的特点,越来越受到国内外研究学者的关注,目前尝试从中药筛选发掘针对疾病靶标的新型小分子治疗药物已经成为研究热点^[15,16]。刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 又名五加参、刺拐棒,是一种名贵的药用植物,主产于中国的黑龙江、吉林、辽宁、河北、俄罗斯远东地区及日本北海道等地,在我国有着悠久的药用历史^[17]。课题组前期研究发现 eleutheroside E (EE) 是刺五加中主要活性成分之一^[18],目前关于 EE 的药理作用报道不多,主要为降低血糖、改善绝经后骨质疏松、抗中枢疲劳及记忆缺损、降低脑缺血再灌注损伤等方面^[19-22]。我们前期研究发现 EE 可以明显抑制炎症因子和关节软骨破坏的情况,经文献检索调研,截至目前国际尚未见有关 EE 在 OA 治疗应用的研究报道。

因此,本文首次对 EE 治疗骨性关节炎作用进行了研究,从动物整体水平对 EE 在实验性兔膝骨性关节炎的治疗及保护作用进行评价,从而为 EE 防治骨性关节炎提供实验依据。本研究采用经典的前交叉韧带切断法 (ACLT) 建造兔膝骨性关节炎模型,通过关节腔注射的方法注射给予 EE-20 和 EE-60 进行治疗干预,每周给药 1 次,连续给药 5 周,研究其对兔膝骨关节炎模型的炎症细胞因子等指标以

及关节病理学改变的影响,观察 EE 对兔膝骨关节炎动物模型的防治作用。实验结果显示 EE 能明显改善骨关节炎部位炎细胞浸润、纤维组织增生及软骨表层破坏等情况。有研究表明:MMP-3 和 MMP-9 可以加快 OA 关节软骨结构中细胞外基质的损害,促进软骨破坏的速度,从而推进 OA 的进展过程。此外,IL-1 β 也是导致 OA 产生的关键因素,IL-1 β 可诱导滑膜细胞一氧化氮 (NO)、环氧酶 (COX) 的产生,而环氧酶 2 又能够促进一氧化氮、前列腺素 E₂ (PGE₂) 的分泌,而 PGE₂ 是一种多效性炎症介质,它能够增加 MMPs 和其他分解代谢物质的产生从而影响关节组织结构和功能,进而加速关节结构的破坏^[23,24]。因此,我们进一步采用 ELISA 检测方法,对 EE 干预后 OA 模型动物关节液中炎症介质 (IL-1 β 和 PGE₂) 以及基质金属蛋白酶 MMP-3 和 MMP-9 的水平进行分析测定。结果显示:EE 治疗干预后可以明显降低关节液中炎症介质 (IL-1 β 和 PGE₂) 以及基质金属蛋白酶 MMP-3 和 MMP-9 的水平 ($P < 0.001$),表明 EE 具有明显抗骨性关节炎的作用。

目前,分子对接技术和分子动力学模拟已成为探索蛋白与受体结合方式的重要工具,在新药研究领域中具有的重要应用价值^[25]。本研究进一步运用分子对接技术及分子动力学模拟手段,对 EE 与 MMPs 相互作用位点和结合方式进行了分析和探讨。研究结合于 MMP-3 和 MMP-9 催化位点的凹槽中,EE 糖环上的羟基可与 MMP-3 和 MMP-9 受体中的氨基酸形成氢键,这些氢键对于配体的结合起到

了重要作用。此外,EE 配体苯环亦可与 MMP-3 和 MMP-9 中的疏水残基形成疏水堆积作用,亦可稳定其结合。分子动力学模拟实验表明,EE 与 MMP-3 和 MMP-9 复合物结合过程中,主要贡献来源于范德华势能和静电作用,且两个体系具有相似的结合模式。其中,EE 与 MMP-3 的总结合能更低,相比较而言,EE 与 MMP-3 结合能力更强,此结果与上述 ELISA 检测实验结果的趋势基本一致。以上数据为今后研究 EE 抗 MMPs 的分子作用机制以及开发木脂素苷类母核结构新型 MMPs 抑制剂提供了关键的理论依据。

综上所述,关节腔注射 EE 可以明显改善骨关节炎部位炎细胞浸润、纤维组织增生及软骨表层破坏等情况,并降低关节液中炎症介质(IL-1 β 和 PGE₂)以及基质金属蛋白酶 MMP-3 和 MMP-9 的含量水平,表明 EE 具有明显抗骨性关节炎的作用。此外,进一步的分子对接技术和分子动力学实验发现,EE 配体可结合于 MMP-3 和 MMP-9 催化位点的凹槽中,EE 配体糖环上的多个羟基可与 MMP-3 和 MMP-9 受体中的多个氨基酸形成氢键,这些氢键对于配体的结合起到重要作用。本研究结果将为研发一种天然来源新型的骨性关节炎候选治疗药物奠定了基础。

参考文献

- Mathiessen A, Conaghan PG. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications [J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19:18.
- Suri S, Walsh DA. Osteochondral alterations in osteoarthritis [J]. Bone, 2012, 51:204-211.
- Nakata K, Hanai T, Take Y, et al. Disease-modifying effects of COX-2 selective inhibitors and non-selective NSAIDs in osteoarthritis: a systematic review [J]. Osteoarthr Cartilage, 2018, 26:1263-1273.
- Baker-Lepain JC, Lane NE. Role of bone architecture and anatomy in osteoarthritis [J]. Bone, 2012, 51:197-203.
- Yan ZW, Liu JP, Lu D, et al. Chemical constituents from pulp of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms (II) [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2013, 2: 338-341.
- He CY, Chen XH, Zhao CY, et al. Eleutheroside E ameliorates arthritis severity in collagen-induced arthritis mice model by suppressing inflammatory cytokine release [J]. Inflammation, 2014, 37:1533-1543.
- Wu H, Du J, Zheng Q. Expression of MMP-1 in cartilage and synovium of experimentally induced rabbit ACLT traumatic osteoarthritis: immunohistochemical study [J]. Rheumatol Int, 2008, 29:31-36.
- Hong ZQ, Gao HJ, He JJ, et al. Effects of Yanghe decoction on IL-1 and TNF- α of papain in rabbit knee osteoarthritis [J]. Rehabilit Med(康复学报), 2020, 30:293-298.
- Cake MA, Smith MM, Young AA, et al. Synovial pathology in an ovine model of osteoarthritis: effect of intraarticular hyaluronan (Hyalgan) [J]. Clin Exp Rheumatol, 2008, 26: 561-567.
- Jiang LX, Yao WW, Zhao HN, et al. Biological marker expression and pathological staging of experimental cartilage injury [J]. J Diagn Concepts Pract (诊断学理论与实践), 2013, 12:80-85.
- Theocharis AD, Manou D, Karamanos NK. The extracellular matrix as a multitasking player in disease [J]. FEBS J, 2019, 286:2830-2869.
- Murphy G, Lee MH. What are the roles of metalloproteinases in cartilage and bone damage [J]. Ann Rheum Dis, 2005, 64:44-47.
- Li H, Li LQ, Min JK, et al. Levels of metalloproteinase (MMP-3, MMP-9), NF- κ B ligand (RANKL), and nitric oxide (NO) in peripheral blood of osteoarthritis (OA) patients [J]. Clin Lab, 2012, 58:755-762.
- Ko JH, Kang YM, Yang JH, et al. Regulation of MMP and TIMP expression in synovial fibroblasts from knee osteoarthritis with flexion contracture using adenovirus-mediated relaxin gene therapy [J]. Knee, 2019, 26:317-329.
- Newman DJ. Modern traditional Chinese medicine: identifying, defining and usage of TCM components [J]. Adv Pharmacol, 2020, 87:113-158.
- Ye WC. Active ingredients of traditional Chinese medicine and natural medicine: an important source of new drug research and development [J]. Prog Pharm Sci (药学进展), 2016, 40:721-722.
- Pan JZ, Jin S, Cui WY, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Acanthopanax senticosus* [J]. Sci Technol Food Ind (食品工业科技), 2019, 40:353-360.
- Yan ZW, Liu JP, Lu D, et al. A new 3,4-seco-lupane-type triterpenoid from the pulp of *Acanthopanax senticosus* (Rupr.).

- et Maxim) Harms[J]. Nat Prod Res, 2010, 24: 1523-1527.
- 19 Ahn J, Um MY, Lee H, et al. Eleutheroside E, an active component of *Eleutherococcus senticosus*, ameliorates insulin resistance in type 2 diabetic db/db mice[J]. Evid-based Compl Alt, 2013(6): 934183.
- 20 Ma YS, Hou ZJ, Li Y, et al. Unveiling the pharmacological mechanisms of eleutheroside E against postmenopausal osteoporosis through UPLC-Q/TOF-MS-based metabolomics[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 1316.
- 21 Xu L, Chai XQ. Eleutheroside E attenuates isoflurane-induced cognitive dysfunction by regulating the α 7-nAChR-NMDAR pathway[J]. Neuroreport, 2019, 30: 188-194.
- 22 Liu MY, Xiong Y, Shan S, et al. Eleutheroside E enhances the long-term memory of radiation-damaged *C. elegans* through G-protein-coupled receptor and neuropeptide signaling pathways[J]. J Nat Prod, 2020, 83: 3315-3323.
- 23 Wang MN, Liu L, Zhao LP, et al. Research of inflammatory factors and signaling pathways in knee osteoarthritis[J]. China J Orthop Trauma(中国骨伤), 2020, 33: 388-392.
- 24 Kawahara K, Hohjoh H, Inazumi T, et al. Prostaglandin E2-induced inflammation: relevance of prostaglandin E receptors[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1851: 414-421.
- 25 Qi L, Xu J, Xu J, et al. Prediction of novel coronavirus pneumonia by *indigo naturals* based on molecular docking and molecular dynamics simulation[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2020, 7: 1799-1803.

天然产物衍生物 a2 抗胃癌活性及机制研究

胃癌是第五大常见癌症,也是癌症死亡的第三大原因。临幊上有限的治疗药物促使必须开发新的抗胃癌药物。中草药冬凌草长期以来被单独或与其他草药一起用于治疗胃肠道疾病。郑州大学药学院/药物研究院刘宏民教授、徐义超博士和中国医学科学院北京协和医学院药物研究所于德泉院士团队首次从冬凌草中分离鉴定出一种二萜类成分—JDA(Jiyuan oridonin A)。JDA 具有良好的抗肿瘤活性,然而,低水溶性和低生物利用度显著限制了 JDA 的临床应用,设计和合成稳定性好且具有良好理化性质的新 JDA 衍生物以提高其生物活性具有重要的意义。

在这项研究中,该团队合成了一种 JDA 衍生物 a2,可以特异性抑制胃癌细胞的生长。从机制上讲,a2 通过降低 GPX4 并升高细胞内铁离子浓度诱导铁死亡,进而抑制胃癌细胞增殖。并且发现,抑制铁死亡有效地促进了被 a2 抑制的细胞生长。重要的是,a2 在胃癌患者来源的肿瘤异种移植模型中差异性地抑制肿瘤生长,即能够选择性地抑制部分人胃癌组织小鼠皮下移植瘤的生长,而 GPX4 的下调可以表征胃癌对 a2 的敏感性,因此,a2 是有希望的胃癌治疗药物,该成果也为冬凌草二萜类化合物的抗肿瘤作用机制提供了一种新的思路,相关研究发表在《Acta Pharmaceutica Sinica B》杂志上。

胡乃华编译自:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8245858/>
原文标题:Identification of ferroptosis as a novel mechanism for antitumor activity of natural product derivative a2 in gastric cancer