

基于分子对接的合欢皂苷 J₈ 抑制血管内皮细胞增殖作用靶点及其凋亡相关细胞信号通路研究

花 慧*, 沙秀秀, 姜雨辰, 钱旭武, 刘 姝

浙江药科职业大学, 宁波 315100

摘要:为探讨合欢皂苷 J₈(julibroside J₈, J8)抑制肿瘤血管内皮细胞增殖作用靶点及其相关细胞凋亡的信号通路。本文采用 HPLC 法检测内皮细胞经 J8 作用后, J8 的在细胞内外含量变化; Vina 软件将 J8 与 VEGF、FAS、DR3、DR4、DR5、TFR-1 进行分子对接分析; Western blot 法检测在加药前后, 内皮细胞中 VEGF、p-JNK、Bax、EndOG、Caspase-3、Caspase-8 以及 Caspase-9 蛋白表达水平的变化。分子对接结果表明 VEGF、FAS 对应的靶点蛋白与 J8 结合性能较好且多位点结合。HUVEC 细胞在加入 J8 作用 24 h 后, VEGF、p-JNK 等蛋白表达明显下调, 并可显著上调诱导凋亡相关蛋白 Bax 和 EndOG 的表达, 而且对 Caspase-3、Caspase-8 以及 Caspase-9 的表达水平无显著的影响。J8 可能是通过与血管内皮细胞膜表面的 VEGF 结合, 抑制血管内皮细胞增殖, 通过削弱 VEGF/JNK 通路活性而引起内皮细胞凋亡。

关键词:合欢皂苷 J₈; 分子对接; 血管内皮细胞; VEGF; JNK 通路

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)7-1206-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.7.012

Study on the target of julibroside J₈ inhibiting the proliferation of vascular endothelial cells and its apoptosis related cell signal pathways based on molecular docking technology

HUA Hui*, SHA Xiu-xiu, JIANG Yu-chen, QIAN Xu-wu, LIU Shu

Zhejiang Pharmaceutical University, Ningbo 315100, China

Abstract: To investigate the target of julibroside J₈ (J8) inhibiting the proliferation of tumor vascular endothelial cells and its related signal pathway of apoptosis. In this paper, HPLC method was used to detect the content change of J8 in and out of endothelial cells after being treated with J8; Vina software docked J8 with VEGF, FAS, DR3, DR4, DR5, TFR-1 for analysis; Western blot method was used to detect the changes in the expression levels of VEGF, p-JNK, Bax, EndOG, Caspase-3, Caspase-8, and Caspase-9 proteins in endothelial cells before and after drug addition. The results of molecular docking showed that the target proteins corresponding to VEGF and FAS had good binding ability to J8 and could bind to multiple sites. After HUVEC cells were treated with J8 for 24 h, the expressions of VEGF, p-JNK and other proteins were significantly decreased, and the expressions of apoptosis inducing proteins Bax and EndOG were significantly up-regulated, and there was no significant effect on the expression levels of Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9. J8 may inhibit the proliferation of vascular endothelial cells by binding with VEGF on the surface of vascular endothelial cell membrane, and cause endothelial cell apoptosis by weakening the activity of VEGF/JNK pathway.

Key words: julibroside J₈; molecular docking; vascular endothelial cells; VEGF; JNK pathway

合欢皮为豆科植物合欢 *Albizia julibrissin* Durazz 的干燥树皮, 其性味甘、平, 药典记载有解郁安神、活

血消肿的功效, 主治心神不安、忧郁失眠、肺病、疮肿、跌扑伤痛等症。现代药理研究表明合欢皮粗提取物、总皂苷都具有体内、体外抑制肿瘤细胞增殖的活性^[1,2]。名医朱良春等采用合欢皮等药治疗肺癌, 取得了很好的临床治疗效果^[3]。本项目前期工

收稿日期: 2023-03-31 接受日期: 2023-05-05

基金项目: 宁波市自然科学基金(2018A610427)

* 通信作者 E-mail: Huahzjpc@163.com

作在抗肿瘤新生血管的活性指导下,从合欢皮中分离纯化得到了抑制肿瘤血管生成的有效部位和有效成分,并且鉴定其有效成分为合欢皂苷 J₈ (julibroside J₈, J8)^[4]。研究结果显示:J8 具有显著抑制内皮细胞增殖的活性。且可以引起细胞的凋亡。但其如何调控信号传导从细胞外并经细胞膜、细胞浆至细胞核而发挥效应尚不清楚,国内外也未有研究报道。本研究采用分子对接结合体外细胞实验分析了 J8 抑制血管内皮细胞增殖作用靶点及其凋亡相关细胞信号通路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞

人脐静脉内皮细胞(HUVECs)购于宁波如耀生物科技有限公司;人微血管内皮细胞(HMEC-1)由江南大学细胞与分子实验室提供。

1.1.2 药物

J8 实验室自制,纯度为 92.1%,经 UV、MS、IR、¹H NMR、¹³C NMR 图谱的数据与文献^[5]逐一比对,化合物确定为 J8。将 J8 溶解于细胞培养基中过滤灭菌备用。

1.1.3 试剂

DMEM 培养基(Sigma 有限公司,货号 SIB7314);胎牛血清(依科赛生物科技有限公司,11F133);RPMI 1640 培养基(Sigma 有限公司,货号 SIB7314);0.25% 胰蛋白酶、青霉素-链霉素混合液(宁波如耀生物科技有限公司);MTT(北京索莱宝(Solarbio)科技有限公司,货号 M8180);细胞裂解液(泽叶生物科技有限公司,货号 3221);Western(上海碧云天生物技术有限公司,货号 P0023B);外源性血管生长因子 A(南京金斯瑞生物科技有限公司,货号 Z02689-10);蛋白定量试剂盒(Solarbi 公司);VEGF、p-JNK、Bax、EnDOG、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9(Proteintech 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞株培养

HMEC-1 细胞采用 MCDB-131 培养基(含 10 ng/mL 表皮生长因子,1 μg/mL 氢化可的松、10% 小牛血清),37 °C,5% CO₂ 细胞培养箱中常规培养。约 48 h 后,倾去培养液,加入总量约 5 mL 0.25% 胰酶溶液后放置至培养箱 37 °C 保温,显微镜下观察到细胞开始从瓶壁脱落前,立刻倾去胰酶溶液,加入适

量培养基,用玻璃吸管吹打,至细胞全部从瓶壁脱落;用血球计数板对细胞进行计数,计算浓度,继续加培养基稀释细胞浓度至 $0.7 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^5$ 个/mL;用移液枪(100 mL)将细胞均匀铺于 96 孔细胞培养板中,将培养板至 37 °C,5% CO₂ 培养箱中常规培养 24 h 后备用。HUVECs 细胞则采用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基培养,培养方法同 HMEC-1 细胞。

1.2.2 J8 样品的制备

参考 Hua 等^[4]的方法将 2 kg 合欢皮分别用 40 L 65% 乙醇热回流提取 2 次,每次 2 h,去渣过滤得滤液,合并,减压回收乙醇,得粘稠状浸膏 A217 g。将浸膏 A 加水溶解,采用 D101 型大孔树脂吸附分离去除杂质,分别用水、20%、40%、60%、80% 乙醇各洗脱 3 个柱体积,收集各流动相,取其中 60% 乙醇相回收乙醇,得浸膏 B,将浸膏 B 采用硅胶(100~200 目)进行常压分离,用体积比氯仿:甲醇:水(9:1:0.1)→(6.5:3.5:1)梯度洗脱,50 mL 等体积收集,共收集到 32 瓶,将第 12~17 瓶合并,减压回收溶剂得浸膏 C。将浸膏 C 经 HPLC 进行反复分离,收集样品进行活性检测,等到 J8 约 7.1 mg。

1.2.3 MTT 法检测分析细胞活力

取对数生长期的 HUVEC 细胞加入胰酶消化处理,细胞计数后以 1×10^5 个/mL 的浓度铺于 96 孔培养板中,24 h 后,吸弃原培养液,细胞分成对照组和实验组,每组设置 8 个复孔,对照组加入正常完全培养基 100 μL/孔,实验组加入 100 μL/孔含不同浓度 J8(1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 μg/mL)培养液,继续培养 24 h,弃去原培养基后加入 MTT 溶液(0.5 mg/mL)100 μL/孔,继续至培养箱中培养 4 h,然后吸弃液体,并加入 DMSO 100 μL/孔,室温避光放置 10 min 后置于酶标仪(波长 570 nm)测光密度(OD)值。细胞活力计算公式如下:细胞活力 = 实验组 OD 值/对照组 OD 值 × 100%。HMEC-1 细胞活性检测步骤同上。

1.2.4 HPLC 法检测 J8 在细胞内外的分布情况

取对数生长期的细胞 HUVEC 加入胰酶消化处理,以 1×10^5 个/mL 的浓度于 6 孔培养板中,24 h 后,细胞分成对照组和实验组,吸弃原培养液,对照组加入正常完全培养基 2 mL/孔,实验组加入 2 mL/孔含 2.5 μg/mL 浓度 J8 培养液,继续培养 48 h(每组设置 8 个复孔),分别收集对照组合实验组培养

液以及细胞。上层培养液加入等量正丁醇溶液萃取,收集正丁醇液,蒸干,加入 2 mL 甲醇溶液得样品 A、B,有机膜过滤收集滤液约 2 mL 待用。细胞层加入胰酶,消化,再加入细胞裂解液(NP-40)加入等量正丁醇溶液同上方方法萃取,收集正丁醇液,蒸干,加入 2 mL 甲醇溶液得样品 C、D。以上样品经 HPLC Agilent11 分析采用 XDBC-18 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相采用 65% 甲醇(V/V, 甲醇:水 = 65:35)。流速为 1 mL/min,柱温 25 °C,215 nm 检测,进样量 5 μL。Agilent Chemstation 软件采集、分析数据。

1.2.5 J8 与 VEGF、FAS、DR3、DR4、DR5、TFR-1 对接验证

将核心 VEGF、FAS、DR3、DR4、DR5、TFR-1 基因分别与 J8 进行分子对接,分析 J8 与蛋白之间的结合能力。首先通过 Pubchem 数据库(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载 J8 的 2D 结构,再经 ChemOffice 软件将其转换成 3D 结构,并优化其结构使其处于最小自由能,以 mol2 格式保存。蛋白靶点的立体结构使用 uniprot 数据库(<http://www.uniprot.org>)查询基因对应的蛋白 ID,将得到的 ID 导入 PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/>),下载核心靶标的 PDB 格式文件。再使用 PYMOL 软件对蛋白配体进行修饰处理(删除水分子、小分子配体)。通过 AutoDock Tools 将配体、受体文件转换成 PDBQT 格式,绘制受体的活性口袋。采用 vina 软件对上述蛋白受体和配体进行常规对接,得到结合能(affinity)。对接结果以结合能 ≤ -5.0 kJ/mol 为分子与靶点结合性较好。

1.2.6 Western blot 检测细胞蛋白表达

HUVEC 经 J8 作用后,检测细胞中 VEGF、p-JNK、JNK、Bax、EnDOG、GAPDH、Caspase-3、Caspase-8 以及 Caspase-9 的蛋白表达水平。以恒定的密度 1.0×10^5 个/mL 接种培养,汇合度达到 50% ~ 60% 时用浓度为 2.5 μg/mL 的 J8 干预 24 h。细胞都是通过细胞裂解缓冲并提取总蛋白,吸除 5 μL 上清用于 BCA 法蛋白定量。等量的蛋白质(50 μg)电泳样品分离目标蛋白质在 10% SDS PAGE 凝胶,然后转移到硝化纤维过滤膜。在室温使用 Western 封闭液封闭 2 h,然后用兔抗 cleaved Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Bax 和 GAPDH,浓度根据一抗说明书进行调整 4 °C 孵育 14 ~ 18 h。TBST 洗膜 3 次,每次 5 ~ 10 min,然后用对应的二抗抗体(1:3 000)按孵育

一抗的方法于室温平缓摇动温育 40 ~ 60 min。再用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。随后进行蛋白条带显影及灰度值分析。

1.2.7 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行处理,数据结果使用平均值 ± 标注差($\bar{x} \pm s$)表示,多组数据的比较采用单因素方差分析进行处理,并使用 LSD-*t* 法进行多重比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 J8 对 HUVEC、HMEC-1 活力的影响

MMT 法检测结果发现,J8(0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 μg/mL)干预后,HUVEC 细胞的活力值依次为(100 ± 4.61)%、(81.22 ± 4.89)%、(65.76 ± 4.24)%、(40.56 ± 6.72)%、(36.81 ± 4.79)%和(25.21 ± 5.91)% ,HMEC-1 细胞的活力值依次为(100 ± 4.16)%、(88.26 ± 5.81)%、(69.66 ± 4.14)%、(44.54 ± 5.72)%、(41.81 ± 4.89)%和(28.91 ± 5.51)% ,与对照组相比较,两株细胞的活力均受到不同程度的抑制(* $P < 0.05$,** $P < 0.01$);结果显示 J8 能够抑制内皮细胞的增殖(见图 1)。

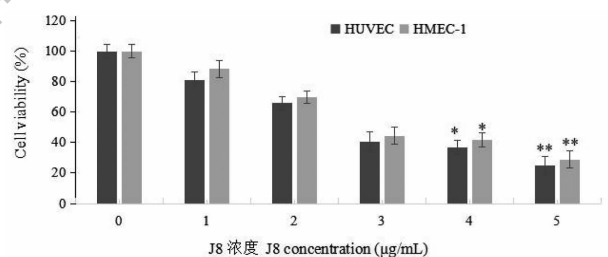


图 1 J8 对 HUVEC、HMEC-1 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effect of J8 on the proliferation of HUVEC and HMEC-1($\bar{x} \pm s, n = 8$)

注:与未处理组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。Note:Compared with untreated group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$.

2.2 HPLC 法检测 J8 在细胞内外的分布情况

J8(2.5 μg/mL)对 HMEC-1 细胞的作用部位分析,细胞经 J8 作用 12 h、24 h 后,收集细胞培养上清液和并培养基洗涤细胞液,细胞经胰酶消化后,破碎后待用。采用正丁醇分别萃取,转移 J8,再经 HPLC 检测分析,结果显示,上清培养基中检测出 J8,而细胞中未检出。结果如图 2 所示。

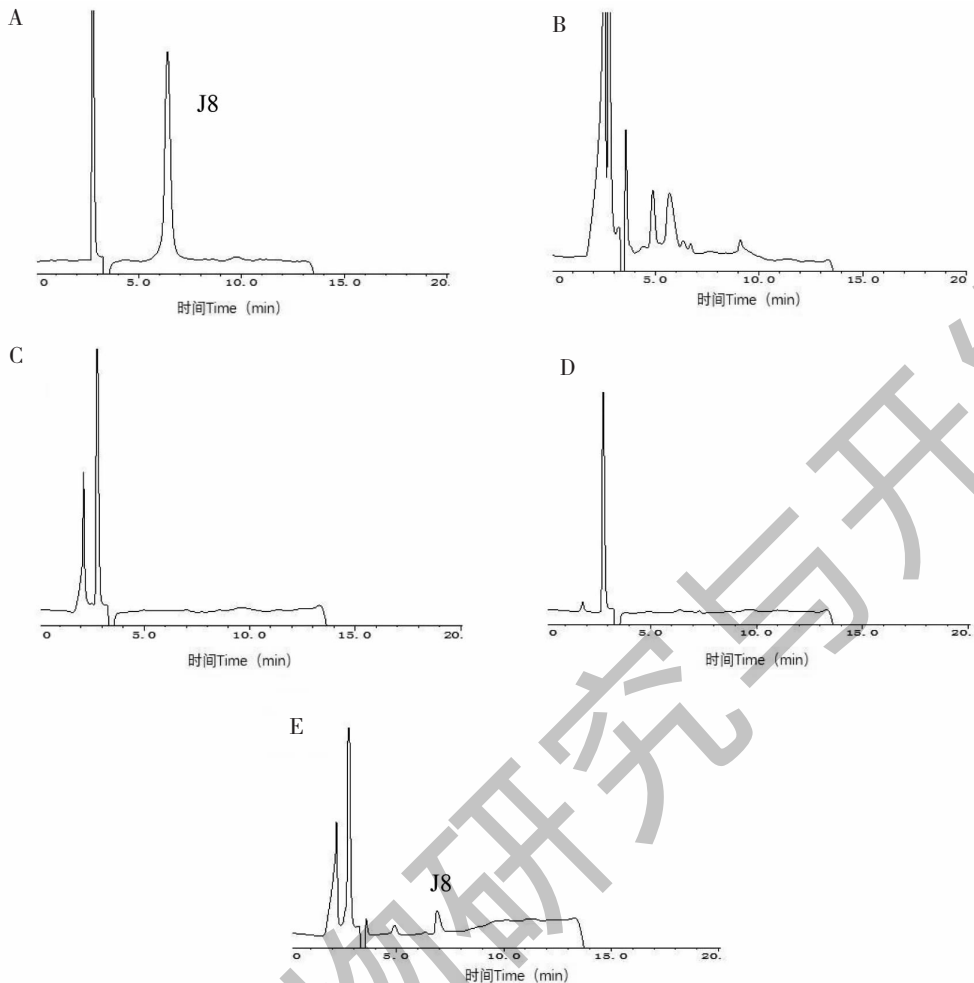


图2 HPLC分析J8在HMEC-1细胞内和细胞外的分布

Fig. 2 Distribution of J8 intracellular and extracellular in HMEC-1 by HPLC analysis

注:A:J8的HPLC分析图;B:未加入J8时,细胞上清液HPLC分析图;C:未加入J8时,细胞HPLC分析图;D:加入J8后,细胞HPLC分析图;E:加入J8时,细胞上清液HPLC分析图。Note:A is HPLC chromatogram of the J8;B is HPLC chromatogram of the cell culture supernatant without J8;C is HPLC chromatogram of the cell without J8;D is HPLC chromatogram of the cell with J8;E is HPLC chromatogram of the cell culture supernatant with J8.

2.3 J8与VEGF、FAS、DR3、DR4、DR5、TFR-1分子对接验证

将核心基因VEGF、FAS、DR3、DR4、DR5、TFR-1对应的靶点蛋白与J8进行对接,分析二者之间的结合能力,若结合能 <0 ,表明配体分子均能和受体蛋白自发地结合,结合能 < -5.0 kJ/mol,表明其结合性好,结合能越小对接越好。将获得的ID输入Pubchem数据库(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行查找,下载活性成分的2D结构(pdb格式),通过ChemOffice软件将其转换成3D结构,同时对结构加以优化使其处于最小自由能,以mol2格式保存。使用uniprot数据库(<http://www.uniprot.org/>)

查询基因对应的蛋白ID,通过蛋白ID从PDB数据库(<http://www.rcsb.org/>)下载核心靶标的PDB格式文件。使用PYMOL软件删除水分子、小分子配体,对蛋白配体进行修饰处理。通过AutoDock Tools将配体、受体文件转换成PDBQT格式,绘制受体的活性口袋。采用vina对上述蛋白受体和配体进行常规对接,得到结合能(affinity)。本研究以结合能 ≤ -5.0 kJ/mol为分子与靶点结合性较好。

对接结果表明VEGF、FAS对应的靶点蛋白与J8结合性能较好且多位点结合,二者结合能分别为 -8.0 、 -7.7 kJ/mol。对接结果见图3。

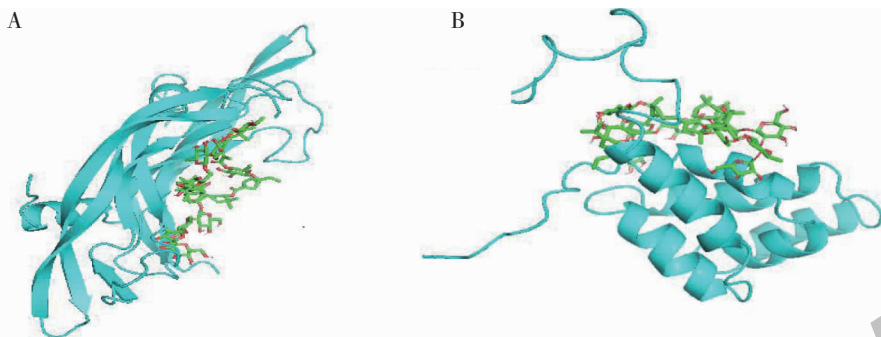


图3 核心基因 VEGF、FAS 对应的靶点蛋白与 J8 进行对接结果

Fig. 3 Docking results of target proteins corresponding to core genes VEGF and FAS with J8

注:A:J8 与 VEGF;B:J8 与 FAS。Note:A:J8 and AKT;B:J8 and FAS.

2.4 细胞学验证凋亡蛋白表达

HUVEC 细胞在加入 J8 (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用 24 h 后,经检测,细胞的 VEGF、p-JNK 等蛋白表达明显下调,诱导凋亡相关蛋白 Bax 和 EndOG 的表达显著上调,而且对 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 的表达水平无显著的影响(见图 4),提示 J8 可能通过削弱 VEGF/JNK 通路活性从而引起细胞死亡。

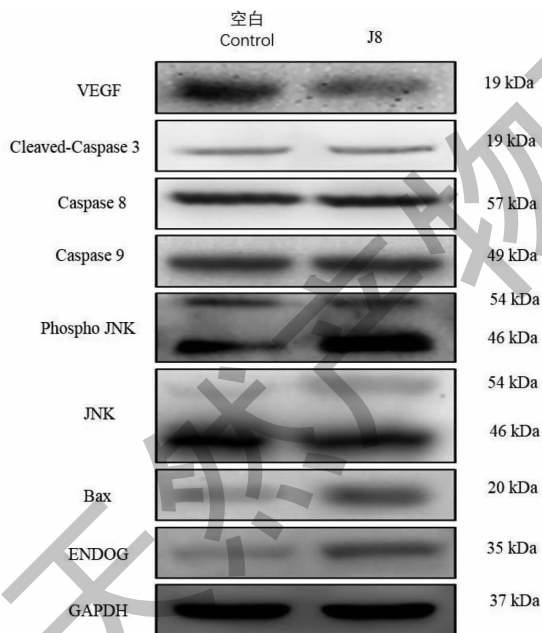


图4 J8 (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对 HUVEC 中 VEGF 及凋亡蛋白的影响

Fig. 4 Effect of J8 (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on VEGF and apoptotic proteins of HUVEC

3 讨论与结论

J8 是从合欢皮中分离出来的一种皂苷,前期研究认为其具有体内外抑制肿瘤血管生成的作用,且

可以诱导内皮细胞凋亡,但其通过何种途径诱导细胞凋亡的路径不是很明确^[6]。为了探究 J8 诱导内皮细胞凋亡的机制,本研究参照文献报道^[4]的提取分离鉴定的方法新制了一批样品,并对其进行了活性检测。为了探明 J8 对细胞作用的机制,J8 是进入细胞内部还是与细胞膜表面蛋白相互作用,实验采用了 HPLC 法进行了 J8 在细胞内外浓度的检测,结果表明 J8 没有进入到内皮细胞内部,仅与细胞膜表面蛋白发生了作用。为了进一步探明其与何种蛋白相互作用,实验首先采用了分子对接法,分别对接了与凋亡相关的膜蛋白 FAS、DR3、DR4、DR5、TFR-1,以及与细胞增殖相关蛋白 VEGF,结果发现 J8 仅与 FAS、VEGF 能很好结合。

血管内皮生长因子 VEGF,是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子,能够促进内皮细胞增殖、迁移、血管通透性增加和血管形成等作用^[7]。抑制 VEGF 的活性可显著抑制肿瘤血管的形成,从而可以达到抗肿瘤的治疗目的。文献报道^[8]合欢皮总皂苷能显著抑制肿瘤的血管的形成,抑制 VEGF 的活性,J8 为其中的一种皂苷,经分子对接和体外的分子检测,结果均表明 J8 能与 VEGF 结合,从而抑制了内皮细胞的增殖。

现代分子与细胞药理学研究认为细胞凋亡的信号传导分为外源性和内源性(线粒体)两条途径^[9]。外源性凋亡途径是由 TNF- α 、TRAIL、FAS-L 等凋亡受体介导。其中 Fas-L 与 FAS 结合通过募集衔接 FADD 启动细胞凋亡。线粒体是内源性细胞凋亡的调控中心,根据信号通路传导方式的不同,分为 Caspase 依赖性和非 Caspase 依赖性细胞凋亡信号通路^[10]。FADD 与 Caspase-8 结合,可导致 Caspase-8 二聚化,即活化。被激活的 Caspase-8 再激活

Caspase-3/9, 诱导细胞凋亡。而非 Caspase 依赖性细胞凋亡信号通路主要通过 AIF 和 EndoG 的释放来实现, 两种蛋白均可致大量 DNA 片段化, 诱导细胞凋亡。通过实验验证, HUVEC 细胞在加入 J₈ (2.5 μg/mL) 作用后, 经检测, 细胞的 VEGF, JNK 等蛋白表达明显下调, 诱导凋亡相关蛋白 p-JNK、Bax 和 EndoG 的表达显著上调, 而且对 Caspase-3、Caspase-8 及 Caspase-9 的表达水平无显著的影响^[11-13], J₈ 能促进应激活化蛋白激酶 JNK 的磷酸化。活化后的 JNK 通路可调节凋亡相关靶基因的表达, 从而诱导细胞凋亡。Bax、EndoG 为 JNK 通路下游的靶基因, 经 J₈ 作用后, 其表达量也随之增加, 提示 J₈ 可能通过削弱 VEGF/JNK 通路活性而引起细胞死亡。本研究结果提示了 J₈ 能通过对 JNK 信号通路的调控促进血管内皮细胞的凋亡, 为后续其他学者的研究提供思路, 对于抑制肿瘤血管生成疗法提供了新的研究药物, 但本研究也存在一定的不足, 在今后的研究中还需对 JNK 信号通路上下游的蛋白进行全面检测, 体外细胞实验结果可能存在一定的偏差, 该实验结果还需在临床试验中及动物实验中进行验证。

综上所述, J₈ 能通过对 VEGF 的作用抑制细胞的增殖, 同时对 JNK 信号通路的调控促进血管内皮细胞的凋亡, 且随着浓度的增强, 细胞凋亡率显著升高。

参考文献

- Zheng L. Studies on the Structures and activities of the constituents from *Albizia* [D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University (沈阳药科大学), 2004.
- Hua H, Feng L, Jin J, et al. The study on the anti-angiogenic effect of *Albizia julibrissin* extracts [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2010, 22: 215-218.
- Wu J, Jiang X, Jiang D, et al. Zhu Liangchun, a master of traditional Chinese medicine, records and experience of tumor differentiation and treatment [J]. Jiangsu J Tradit Chin Med (江苏中医药), 2014, 46: 2-5.
- Hua H, Feng L, Zhang XP, et al. Anti-angiogenic activity of julibroside J₈, a natural product isolated from *Albizia julibrissin* [J]. Phytomedicine, 2009, 16: 703-711.
- Zou K, Tong WY, Liang H, et al. Diastereoisomeric saponins from *Albizia julibrissin* [J]. Carbohydr Res, 2005, 340: 1329-1334.
- Hua H, Feng L, Jin J, et al. Effect of julibroside J₈ on apoptosis of human microvascular endothelial cell [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2011, 23: 423-435.
- Kabir AK, Roy B. Anti-angiogenic alternatives to VEGF blockade [J]. Clin Exp Metastasis, 2016, 33: 197-210.
- Cai W W, Li Y, Yi QQ, et al. Total saponins from *Albizia julibrissin* inhibit vascular endothelial growth factor-3 [J]. Mol Med Rep, 2015, 11: 3405-3411.
- Rathnasamy G, Murugan M, Ling EA, et al. Hypoxia-induced iron accumulation in oligodendrocytes mediates apoptosis by eliciting endoplasmic reticulum stress [J]. Mol Neurobiol, 2016, 53: 4713-4727.
- Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis [J]. Cell Signal, 2003, 15: 983-992.
- Peter ME, Legembre P, Barnhart BC. Does CD95 have tumor promoting activities [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1755: 25-36.
- Zheng HX, Cai YD, Wang YD, et al. Fas signaling promotes motility and metastasis through epithelial-mesenchymal transition in gastrointestinal cancer [J]. Oncogene, 2013, 32: 1183-1192.
- Kusuyama J, Amir MS, Albertson BG, et al. JNK inactivation suppresses osteogenic differentiation, but robustly induces osteopontin expression in osteoblasts through the induction of inhibitor of DNA binding 4 (Id4) [J]. FASEB J, 2019, 33: 113-125.