

参麦散中JAK1抑制剂的虚拟筛选研究

邢小燕¹, 董舒^{2*}, 张建荣³

(1.咸阳职业技术学院, 陕西 西咸新区 712046;

2*.咸阳市中心医院 陕西 咸阳 712000; 3.陕西中医药大学 陕西 西安 712046)

摘要: 目的基于参麦散中的化学成分寻找具有JAK1抑制活性的化合物。方法: 通过ARACNe方法构建心血管特异的转录调控网络。通过VIPER方法预测参麦散处理2h后, 大鼠心肌组织蛋白活性改变。通过TCMSP数据库构建参麦散化合物数据库, 并进行ADME评估。通过基于结构的虚拟筛选方法, 挖掘参麦散化合物数据库中的JAK1活性化合物。并通过JAK1试剂盒以及细胞热迁移方法对化合物的JAK1抑制能力进行评估。结果: 通过虚拟筛选的方法筛选出4个与JAK1蛋白结合良好的化合物, 其中化合物B1的JAK1抑制活性最为显著。结论: 我们的工作不仅挖掘了新的JAK1苗头化合物, 并且有助于更近一步解析参麦散治疗心血管疾病的作用机制。

关键词: 参麦散; JAK1; 虚拟筛选研究

中图分类号: O657.72

文献标识码: A

文章编号: 94047-(2020)02-006

心血管疾病(CVDs)是一类涉及心脏和血管的疾病, 在全世界范围内仍是导致人类死亡的“头号杀手”^[1]。CVDs不但具有较高的发病率以及死亡率, 而且它们严重影响了个人的日常生活质量, 而且对医疗保健系统的造成了巨大的成本^[2]。因此, 降低这些疾病的预防和治疗成本, 而且尽量减少相应的替代药物的副作用的新治疗策略的发展对公共卫生健康具有重要意义。在过去的几十年中, 亚洲和西方国家使用中药治疗心血管疾病则越来越普遍。对二甲医院以及三甲医院中患有冠心病的2712位门诊病人的国家调查结果显示, 三分之一的病人接受中药治疗, 其中3.1%的病人接受纯中药治疗, 30%的病人接受中西医结合治疗, 66.9%的病人接受纯西药治疗^[3]。此外在长期患有冠心病和中风的病人中, 中药治疗相对于西药治疗更加常见。调查还指出在使用过中药的病人中, 使用西药的频率减少, 而使用中药的频率增多^[4]。在美国超过1500万人接受中药疗法治疗心血管疾病。此外在德国和日本, 中药复方已经被批准用于治疗心血管疾病^[5]。

参麦散是一种传统的中药处方, 最初由中国古代医生高力发明。最近的研究表明其治疗中暑

和心血管疾病方面的有效性。参麦散含有三种草药: 人参, 五味子和麦冬。最近, 包含人参和麦冬的酒精提取物的植物药物产品参麦注射液已被用于治疗慢性肺心病。然而, 在参麦散的研究不足在于, 参麦散中主要活性成分不明, 直接作用靶不清, 这些困难为参麦散的作用机制研究造成了很大的阻碍、因此, 在本次研究中, 我们利用基于理论计算的系统生物学方法, 挖掘参麦散的可能直接作用靶点, 并用虚拟筛选方法挖掘生脉散中的可能可能直接作用于该靶点的活性化合物, 并进行实验验证。

1 材料与方法

1.1 材料

PC12细胞(购自美国ATCC细胞库)、10%马血清(购自美国Invitrogen公司, 批号: 444262) 5%胎牛血清(美国Invitrogen公司, 批号: 16000-044)、RPMI-1640培养基购自(美国Invitrogen公司, 批号: 12491015)。参麦注射液(大理药业股份有限公司, 国药准字Z20093649)。Trizol试剂盒(美国Invitrogen公司, 货号: 15596026), NanoDrop(美国赛墨飞公司), Bioanalyzer 2100(美国安捷伦),

收稿日期: 2020-03-01

基金项目: 咸阳职业技术学院科研项目(2017KYB04)

作者简介: 邢小燕(1981—), 女, 硕士, 副教授、主治医师, 研究方向: 医学临床与教学。

中药系统药理学数据库 (TCMSP, <http://sp.nwsuaf.edu.cn/tcmsp.php>), binding-database (<http://www.bindingdb.org/bind/index.jsp>), RCSB数据库 (<https://www.rcsb.org/>), DOCK 6.7软件 (<http://dock.compbio.ucsf.edu/>), 化合物 7- α -L-Rhamnosyl-6-methoxylutcolin、Quercitrin、以及 (2S,3S,4R,5S)-2-(6-aminopurin-9-yl)-5-(hydroxymethyl)oxolane-3,4-diol和 5,7-dihydroxy-3-[[4-methoxyphenyl)methyl]-6-methyl-4-oxochromene-8-carbaldehyde均于上海陶素生化科技有限公司订购。JAK1结合试剂盒购自美国Life Technologies公司。JAK1抗体 (abcam, ab47435), p-STAT1 (abcam, ab30645), p-STAT3 (abcam, ab76315)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 在本次研究中使用的细胞系为大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞PC12细胞。PC12细胞细胞培养所使用的培养基为包含10%马血清以及5%胎牛血清的RPMI-1640培养基。PC12细胞的培养在温度恒定为37℃含有5% CO₂的细胞培养箱。

1.2.2 表达谱芯片研究 在本次研究中,我们使用高通量的表达谱芯片的方法,探究参麦注射液腹腔注射大鼠6h后时所诱导的基因表达差异。参麦注射液腹腔注射大鼠2h后,使用Trizol试剂盒提取大鼠提取组织中的总RNA。使用NanoDrop对总RNA进行定量。使用Bioanalyzer 2100对RNA的完整性进行评估。在本次研究中,使用Affymetrix 3' IVT Express试剂盒以及100ng的总RNA制备cRNA。根据GeneChip 3'Array (Affymetrix) 用户手册,将cRNA在Affymetrix Primeview Human阵列上于45℃杂交16小时。此外,在Affymetrix FS-450流体站上处理阵列以进行洗涤和染色,并根据制造商的方案在Affymetrix GeneChip扫描仪上扫描。将.CEL文件的原始数据导入Partek Genomics Suite 6.6软件中,并使用Robust Multiarray Average方法对探针集进行标准化。使用单因素方差分析的方法确定差异表达基因的显著性,使用FDR对P值进行校正。在本阶段研究中,对照组正常大鼠心肌组织,实验组为参麦注射液注射后2h的大鼠大鼠心肌组织,每个样本重复三次^[6]。

1.2.3 viper算法预测蛋白活性变化 基于从GEO数据库获得的231个RNA-seq表达谱数据,应用

ARACNe构建心肌特异转录调节网络模型。ARACNe网络的参数设置为以bootstrap=100, p值<10⁻⁸和DPI=0耐受性运行,最终生成了包含1,623个TF与15432个靶基因以及432,231个相互作用产生相关的转录调控网络。随后,基于以上生成的转录调控网络,使用在Bioconductor提供的VIPER算法 (<https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/viper.html>) 预测参麦注射液影响的蛋白活性变化。通过随机均匀地打乱样品1,000次来估计统计学显著性^[7]。

1.2.4 参麦散化合物数据库的构建 参麦注射液中含有草药的化学成分以及相关药代动力学参数(口服生物利用度,OB), (类药性,DL)均来自中药系统药理学数据库^[8]。

1.2.5 分子对接筛选方法可靠性验证 我们从binding-database数据库收集到了60个能够直接抑制JAK1活性的化合物(IC₅₀≤40 μM)。随后收到了1800个CDK2无活性化合物(decoy化合物),这是因为就序列同源性而言,CDK2是最接近JAK1的激酶。将两组化合物混合比率1:30,用于测试本工作中所应用的虚拟筛选方案^[9]。

1.2.6 分子对接 在本次研究中,首先我们从RCSB数据库中下载到6个分辨率小于2埃的JAK1蛋白晶体结构包括:4e4n、4e5w、4ivd、5wo4、6aah、6elr,虚拟筛选方案拟采用基于蛋白结构的系综对接方法(DOCK 6.7)对参麦注射液化合物数据库进行虚拟筛选,最终通过人工分析确定筛选结果。

1.2.7 western blot方法检测蛋白表达含量变化 配置细胞裂解液,取适量RIPA,并加入蛋白酶抑制剂PMSF混匀,RIPA:PMSF的比例为100:1。胰酶消化收集细胞,加入细胞裂解液,收集细胞裂解液产物,转入EP管中,在低温高速离心机下4℃、14000rpm离心30min,吸取蛋白上清液。随后95℃热浴10min,对蛋白进行变性。将制备好的蛋白样品置于-80℃冰箱备用。使用BCA试剂盒对蛋白进行定量。定量后,配置SDS-PAGE凝胶,将蛋白样品上样到SDS-PAGE凝胶加样孔内,进行电泳,电泳条件为恒压(80V)电泳2.5h。随后使用半干转的方法,应用PVDF膜进行转膜。转膜完毕后,将PVDF膜浸入含有5%脱脂奶粉的TBST缓冲液,缓慢

摇床1h, 进行封闭。封闭完毕后, 用5%脱脂奶粉稀释抗体, 孵育一抗。一抗孵育完毕后, 使用TBST溶液漂洗3次, 每次10min。室温下孵育二抗2h, 二抗孵育完毕后, 使用TBST漂洗2遍, TBS漂洗1遍, 每次10min。使用ECL试剂来检测蛋白, 在暗室进行曝光。使用Image-Pro Plus v6软件分析蛋白的相对表达量^[10]。

1.2.8 JAK1试剂盒测定化合物亲和力 Z'-LYTE激酶抑制测定中测试命中化合物的JAK1抑制能力。有关该过程的详细描述, 如文献所示^[11]。

1.2.9 热迁移方法验证命中化合物与JAK1蛋白结合

使用细胞热转移方法测定 (CETSA) 进一步验证命中化合物与JAK1蛋白的结合。首先, 为了确定JAK1的溶解曲线, 将约 2×10^7 个PC12细胞与1% DMSO或100 μ M的待测化合物预孵育1小时。然后收集每个样品中的细胞。随后, 将每组细胞细胞悬浮液 (DMSO对照组, 甲基麦冬黄酮A组), 均匀分配10个不同的0.2-mL PCR管中。然后将每个管在指定温度 (48 $^{\circ}$ C-75 $^{\circ}$ C) 下加热3分钟。加热后, 立即将管在室温下孵育3分钟, 然后在液氮中快速冷冻。最后, 将样品冻融两次, 并在4 $^{\circ}$ C下以20,000 \times g离心20分钟, 并将上清液使用Western blot 方法检测, 并通过Image-Pro Plus v6定量条带的密度^[12]。

2 结果与分析

2.1 参麦散处理2h后大鼠心肌组织蛋白活性改变

为了发现参麦注射液处理2h后大鼠心肌组织中活性显著改变的蛋白, 我们从GEO数据库中下载了231个大鼠心肌组织基因表达谱数据。随后使用ARACNe算法构建心肌组织特异的转录调节网络。ARACNe算法是一个基于大规模基因表达谱数据预测转录调节因子与信号蛋白下游基因互做关系的理论预测方法, 该方法已被证实是一种强有力的方法用于viper分析。基于viper分析方法, 我们获得了6个活性显著上调的蛋白 (TBLIX、PIK3CA、ZFP36L1、PIK3D、CISH、FOXJ2), 4个活性显著下调的蛋白 (JAK1、TOP2A、STAT5、ILF2), 其中通过western blot的实验验证可以得知JAK1蛋白表达含量没有显著改变, 而其下游磷酸化蛋白p-STAT1以及p-STAT3蛋白表达水平发生显著改变。如图1所示。

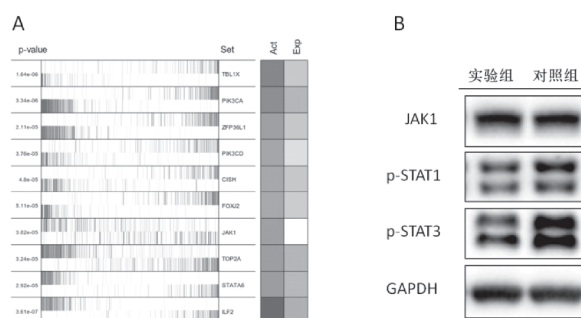


图1参麦注射液处理2h后大鼠心肌组织蛋白活性改变

2.2 基于结构的虚拟筛选方法可靠性验证

在本次研究中, 首先我们从RCSB数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中下载到6个分辨率小于2埃的JAK1蛋白晶体结构包括: 4e4n、4e5w、4ivd、5wo4、6aah、6elr, 根据蛋白活性口袋氨基酸残基的坐标, 我们对6个JAK1蛋白晶体结构进行了聚类, 聚类结果发现蛋白晶体结构4ivd、5wo4以及6elr与其他蛋白的相似程度过高。因此在本次研究中选择4e4n、4e5w、6aah晶体结构进行随后的系综对接。通过对JAK1阳性化合物以及CDK2 decoy化合物的对接结果进行ROC曲线分析, AUC为0.86, EF1%为43.2, 分析结果指出我们的系综对接筛选方案能够显著地从decoy化合物中筛选出JAK1阳性化合物, 因此该方法可以应用于更进一步的筛选研究。结果如图2所示。

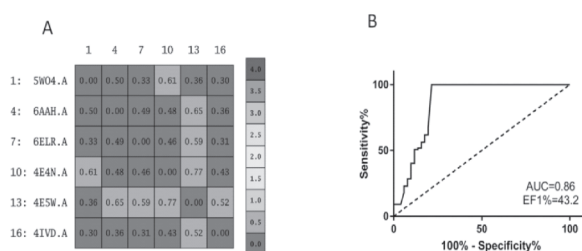


图2基于结构的虚拟筛选方法可靠性验证

2.3 参麦散化合物数据库的建立

参麦散由人参、麦门冬、北五味子三味中草药构成, 我们通过TCMSP数据库总共收集到423种化合物, 其中北五味子130种, 人参190种, 麦冬103种化合物。

2.4 分子对接结果

按照三个蛋白晶体结构的打分结果的平均值, 按打分由高到低的顺序将排名前30的化合物列出, 结果如表1所示。

通过对在蛋白结构中的小分子构象进行人工分

析发现,化合物 7- α -L-Rhamnosyl-6-methoxylutcolin、Quercitrin、以及 (2S,3S,4R,5S)-2-(6-aminopurin-9-yl)-5-(hydroxymethyl)oxolane-3,4-diol 和 5,7-dihydroxy-3-[(4-methoxyphenyl)methyl]-6-methyl-4-oxochromene-8-carbaldehyde, 这四个化合

物分子形状与JAK1蛋白晶体结构的活性口袋结构大致相仿,此外能与JAK1的关键氨基酸残基 LEU959、LEU957、ASP1021、GLY1020以及 ARG879形成氢键,如图3所示。因此选择这四个化合物进行更进一步的生物活性验证研究。

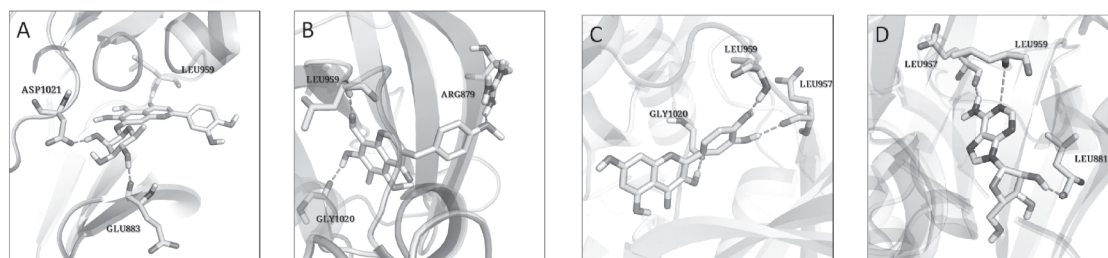


图3参麦散中化合物与JAK1结合模式。

图 (A) 7- α -L-Rhamnosyl-6-methoxylutcolin, 图 (B) 5,7-dihydroxy-3-[(4-methoxyphenyl)methyl]-6-methyl-4-oxochromene-8-carbaldehyde, 图 (C) Quercitrin, 图 (D) (2S,3S,4R,5S)-2-(6-aminopurin-9-yl)-5-(hydroxymethyl)oxolane-3,4-diol

表1 排名前30名的配体与JAK1受体对接结果

分子编号	分子对接 打分排序	化合物名称	口服生物 利用度	类药性
B1	1	7- α -L-Rhamnosyl-6-methoxylutcolin	15.02	0.78
B2	2	(+)-beta-Phellandrene	40.30	0.02
B3	3	()-Cuparene	38.26	0.07
B4	4	5,7-dihydroxy-3-[(4-methoxyphenyl)methyl]-6-methyl-4-oxochromene-8-carbaldehyde	43.21	0.45
B5	5	Hemo-sol	39.84	0.02
B6	6	delta-Terpineol	55.11	0.03
B7	7	beta-Gurjunene	51.36	0.10
B8	8	Quercitrin	31.23	0.79
B9	9	alpha-humulene	22.98	0.06
B10	10	(-)-Comphene	34.98	0.04
B11	11	2S,3S,4R,5S)-2-(6-aminopurin-9-yl)-5-(hydroxymethyl)oxolane-3,4-diol	43.27	0.57
B12	12	[(3S)-3,7-dimethyloct-6-enyl] acetate	22.68	0.04
B13	13	zingerone	25.23	0.05
B14	14	Tereben	29.62	0.02
B15	15	beta-Citronellol	38.89	0.02
B16	16	Elemicin	21.94	0.06
B17	17	[(1S)-endo]-(-)-Borneol	83.54	0.05
B18	18	quinic acid	55.92	0.06
B19	19	Gomphrenin I	5.93	0.80
B20	20	(E)-oct-2-en-4-one	64.62	0.01
B21	21	T-Muurolol	30.41	0.09
B22	22	()-alpha-Longipinene	57.47	0.12
B23	23	Aristolone	45.31	0.13

B24	24	beta-caryophyllene	29.70	0.09
B25	25	3-Furaldehyde	50.96	0.01
B26	26	epsilon-Cadinene	16.41	0.08
B27	27	(5S)-5-butylloxolan-2-one	65.08	0.02
B28	28	2,4-Dimethyl-6(3-methyl-isobuten-5-isopropyl)-phenyl-3,5 hexanedione	6.06	0.19
B29	29	Angeloylgomisin Q	7.50	0.81
B30	30	Limetin	36.63	0.09

2.5 JAK1试剂盒测定化合物亲和力

应用Life Technologies的Z'-LYTE激酶抑制测定中测试命中化合物的JAK1抑制能力,发现化合物B1抑制JAK1蛋白的IC₅₀为28.5umol, B4的IC₅₀为36.5umol, B11的IC₅₀为44.4umol, B8的IC₅₀为38.7umol。如图4所示。

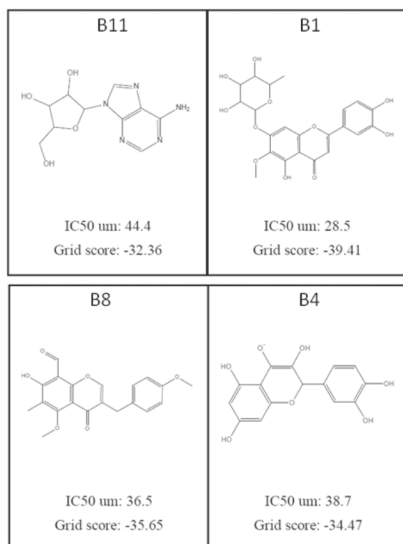


图4 JAK1活性分子结构, 对接打分以及JAK1蛋白抑制能力

2.6 热迁移方法验证命中化合物与JAK1蛋白结合

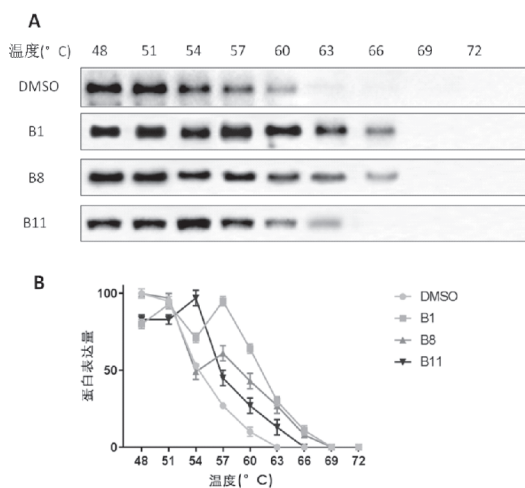


图5 细胞热转移方法验证命中化合物与JAK1蛋白结合

虚拟筛选的命中化合物B1、B8处理PC12细胞后JAK1蛋白的CETSA曲线在60℃~66℃之间发生了漂移,表明这两个化合物进入细胞后与JAK1蛋白结合,使其热稳定性发生了改变。化合物B11处理PC12细胞后JAK1蛋白的CETSA曲线在60℃~63℃之间发生了漂移。CETSA曲线结果显示这三个化合物在细胞内可与JAK1蛋白结合。

3 讨论

在过去的20年中,新药的开发速度逐年下降,在2016年中仅有22个新药被批准上市达到了近20年来的新低。影响药物开发速度的因素有很多,其中重要的一点是,药物开发公司在过去的20-25年中对天然产物的兴趣降低,而主要依赖于化学技术例如组合化学的方法构建化合物数据库^[13]。生脉散出自《医学启源》,在临床上有广泛的应用,主要用于治疗冠心病心绞痛、慢性心力衰竭、扩张型心肌病、缺血性中风、非小细胞肺癌等心血管系统、呼吸系统疾病。然而生脉散其主要活性成分以及其主要活性成分所作用的靶点尚未得到清晰的阐述,这为系统的阐述生脉散的作用机制设置了障碍^[13]。

在本次研究中我们首先通过系统生物学的方法,发现参麦散短期处理处理2h后的大鼠心肌组织JAK1蛋白表达含量几乎不变而蛋白活性发生较大变化。随后我们通过western blot实验方法进行了验证,实验结果指出,与对照组相比,参麦散组处理2h后大鼠心肌组织JAK1蛋白表达含量没有发生改变,而其下游p-STAT1和p-STAT3表达量发生改变,表明JAK1蛋白活性发生改变,指出JAK1蛋白可能是参麦散中活性化合物的直接作用靶点。

JAK1是一种重要的非受体酪氨酸激酶,有研究指出JAK1/STAT信号通路在免疫调控、细胞增殖、细胞凋亡、细胞分化中扮演着重要的角色。JAK1依

赖的细胞因子是免疫病理调节的关键控制者, 例如IL6、IFNs、IL15、IL21等^[14]。目前JAK1被认为是类风湿性关节炎和溃疡性结肠炎和克罗恩病的关键治疗靶点。此外目前心血管系统疾病更多地被视作一种炎症性疾病, JAK1依赖的细胞因子IL6与心血管疾病的发病过程有关^[15], 并且JAK1目前已被提出作为一种冠状动脉粥样硬化的潜在治疗靶点^[16]。

基于结构的虚拟筛选方法, 在药物的开发中的苗头化合物筛选中是一种非常有价值工具。在本次研究中, 我们通过基于结构的虚拟筛选方法, 筛选出参麦散中的4个可能与JAK1蛋白结合的化合物, 并且通过JAK1蛋白试剂盒在酶水平对命中化合物进行了验证。为了保证结果的可靠性, 我们随后运用细胞热迁移技术的对四个命中化合物在细胞水平进行了更进一步的验证。目前已有部分的研究结果对我们的筛选结果构成了佐证。在我们的筛选结果中, 化合物B4 (Quertein) 已被实验证实能够通过抑制IL6/STAT3信号通路从而抑制胶质母细胞瘤细胞的增殖与迁移。此外, 大量的研究结果指出黄酮类化合物 (例如myricetin) 能够直接与JAK1蛋白结合^[17-18]。通过对这四种化合物的ADME性质进行预测, 我们发现, 这四种化合物均具有良好的类药性, 并且化合物B11、B8、B4均具有良好的口服生物利用度 (OB > 30%)。

4 结论

在本次研究中, 我们结合系统生物学以及虚拟筛选的方法筛选到了4个能与JAK1蛋白结合的小分子化合物。我们的工作不仅挖掘到了新的JAK1苗头化合物, 并且有助于更近一步解析参麦散治疗心血管疾病的作用机制。

参考文献

- [1] Liu J, Mu J, Zheng C, et al. Systems-pharmacology dissection of traditional chinese medicine compound saffron formula reveals multi-scale treatment strategy for cardiovascular diseases[J]. Scientific reports, 2016, 6: 19809.
- [2] Mozaffarian D, Benjamin E J, Go A S, et al. Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association[J]. Circulation, 2015, 131(4): e29-e322.
- [3] Guo, X. Y. Et al. Use of traditional Chinese medicine in Chinese patients with coronary heart disease. Biomed. Environ. Sci. 26, 303-310 (2013).
- [4] Pan-Pan Hao, Fan Jiang, Yu-Guo Chen, Traditional Chinese medication for cardiovascular disease, Nature Reviews Cardiology, 2014, Vol. 12, 115-120.
- [5] Lakshman Karalliedde, Indika Gawarammana, Editorial advisor Debbie Shaw, (2009) Traditional Herbal Medicines: A Guide To Their Safer Use, Nutrition & Food Science, Vol. 39 Issue: 2, pp. 210-210
- [6] Perez M V, Pavlovic A, Shang C, et al. Systems genomics identifies a key role for hypocretin/orexin receptor-2 in human heart failure[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2015, 66(22): 2522-2533.
- [7] Alvarez M J, Shen Y, Giorgi F M, et al. Functional characterization of somatic mutations in cancer using network-based inference of protein activity[J]. Nature genetics, 2016, 48(8): 838.
- [8] 袁长胜, 陈文. 基于TCMSP对玫瑰花黄芩和挥发油防治心血管疾病的协同作用及其机制研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2016, 34(06): 731-738.
- [9] Bajusz D, Ferenczy G G, Keser G M. Ensemble docking-based virtual screening yields novel spirocyclic JAK1 inhibitors[J]. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2016, 70: 275-283.
- [10] 芮文娟, 何淑芳, 黄先甲, 方政, 杭欣, 李前进, 胡敏, 杨雁. DEN诱导大鼠肝纤维化-肝癌过程中pSmad3L和PAI-1蛋白的表达[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(10): 1393-1397.
- [11] J' -LYTE Kinase Assay Kits (2016). <http://www.Lifetechnologies.com/hu/en/home/life-science/drug-discovery/target-and-lead-identification-and-validation/kinasebiology/kinase-activity-assays/z-lyte.html>
- [12] 白要飞. 茯苓酸对胃癌治疗机制的研究[D]. 西北农林科技大学, 2017.
- [13] The practice of medicinal chemistry[M]. Academic Press, 2011.
- [14] 王瑞敏, 侯懿, 豆艳艳. 桂枝茯苓丸和参麦散加减对宫颈癌患者术后放疗的近期疗效观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(06): 187-191.
- [15] Volpato, S. et al. Cardiovascular disease, interleukin6, and risk of mortality in older women: the women's health and aging study. Circulation 103, 947-953 (2001).

[责任编辑: 徐长青]