

# 表皮生长因子受体酪氨酸激酶结构域与其抑制剂染料木素的模拟对接

袁江兰<sup>1</sup>, 刘晖<sup>2</sup>, 康旭<sup>1</sup>, 邹国林<sup>2</sup>

1 湖北工业大学生物工程学院, 武汉 430064

2 武汉大学生命科学院 病毒学国家重点实验室, 武汉 430072

**摘 要:** 染料木素是表皮生长因子受体酪氨酸激酶结构域(EGFR-TK)高度特异的非竞争性抑制剂。本研究采用 AUTODOCK3.05 分子对接软件包对 EGFR-TK 与染料木素进行了模拟对接研究, 探究了二者的相互作用机制, 为染料木素的抗肿瘤机制提供理论依据。对接结果表明, 染料木素结合在 EGFR-TK 的活性腔中, 与 EGFR-TK 发生了强烈的相互作用, 结合自由能 $\Delta G$ 为-31.2 kJ/mol; 染料木素通过干扰 TK 催化活性结构中 Lys<sup>721</sup>/Glu<sup>738</sup> 离子对的形成而抑制了 EGFR-TK 的活性, 属于非竞争性结合和抑制作用; 在结合中, 疏水力和氢键发挥了重要作用。

**关键词:** 表皮生长因子受体, 酪氨酸激酶结构域, 染料木素, 抗肿瘤, 分子对接

## Molecular Docking of Epidermal Growth Factor Receptor Tyramine Kinase Domain and Its Inhibitor Genistein

Jianglan Yuan<sup>1</sup>, Hui Liu<sup>2</sup>, Xu Kang<sup>1</sup>, and Guolin Zou<sup>2</sup>

1 College of Biological Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430064, China

2 National Key Laboratory of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

**Abstract:** Genistein is a high specific and noncompetitive inhibitor of epidermal growth factor receptor tyramine kinase domain (EGFR-TK). In the paper, a molecular docking between genistein and EGFR-TK was studied to explore the mechanism of their interaction and antitumor mechanism of genistein by AUTODOCK 3.05 program. The results indicated that genistein located in the active cavity of EGFR-TK by high affinity ( $\Delta G=-31.2$  kJ/mol), and genistein inhibited EGFR-TK by interfering with forming of Lys<sup>721</sup>/Glu<sup>738</sup> ion pair. The inhibition belonged to noncompetitive interaction, in which hydrophobic force and hydrogen bond played key roles.

**Keywords:** epidermal growth factor receptor (EGFR), tyramine kinase domain, genistein, antitumor, molecular docking

表皮生长因子受体(EGFR)与肿瘤的发生、发展有密切关系。大量研究表明, 在许多人类肿瘤中, EGFR 过表达或异常活化。EGFR 介导的信号转导途

径参与了肿瘤的形成、增殖、凋亡抑制、血管生成和转移等许多过程, 并发挥重要作用, 因此 EGFR 成为抗癌治疗中最令人关注的靶点<sup>[1]</sup>, 阻断 EGFR

Received: January 11, 2008; Accepted: May 21, 2008

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No. 30670464).

Corresponding author: Jianglan Yuan. Tel: +86-27-62496177; E-mail: jlyuan1229@163.com

国家自然科学基金项目(No. 30670464)资助。

可抑制肿瘤生长<sup>[2]</sup>。已有若干种针对 EGFR 的靶向治疗药物进入临床, 这些药物主要分为 2 种: 一种为酪氨酸激酶(TK)的小分子抑制剂, 主要针对 EGFR 的胞内 TK 活性区, 通过抑制 ATP 与受体 TK 结构域的结合而抑制 TK 活性, 从而阻断 EGFR 信号传导途径<sup>[3]</sup>。另一种为单克隆抗体, 针对 EGFR 胞外配体连接区, 可阻止配体与受体结合, 从而抑制 EGFR 的激活。

染料木素是一种常见的大豆异黄酮, 在大豆中含量丰富。染料木素具有多种生物学活性, 主要包括抗肿瘤<sup>[4-8]</sup>、降血脂、雌激素样作用、抗骨质疏松等。染料木素是 EGFR-TK 的高度特异的非竞争性抑制剂, 可有效地抑制 EGFR 信号传导途径, 因此抑制了多种肿瘤的发生<sup>[9-13]</sup>。在培养的 A431 细胞中发现染料木素抑制了表皮生长因子刺激的磷酸化<sup>[9]</sup>。虽然研究已经证明染料木素是 EGFR-TK 的高度特异的非竞争性抑制剂, 但迄今为止尚无染料木素和 EGFR-TK 结合复合物的晶体结构报道, 在分子水平上的抑制作用机制并不十分明确。本研究通过对染料木素与 EGFR-TK 的模拟对接, 有助于从分子水平上探究染料木素对 EGFR 的抑制机制, 从而阐明染料木素的抗肿瘤机制。

## 1 计算原理和方法

分子对接计算就是将配体分子与受体分子相结合, 然后按照几何互补、能量互补以及化学环境互补的原则来实时评价配体与受体相互作用的好坏, 并找到 2 个分子之间最佳的结合模式。通过分子对接可以确定对接复合物中 2 个分子的相对位置和取向。

AUTODOCK 是 Scripps 的 Olson 科研小组开发的分子对接软件包, 是一种半柔性的分子对接方法。AUTODOCK 3.05<sup>[14-16]</sup>采用了一种改良的遗传算法, 即拉马克遗传算法(LGA)来寻找受体和配体最佳的结合位置, 用半经验的自由能计算方法来评价受体和配体之间的匹配情况<sup>[17,18]</sup>。LGA 比传统的遗传算法(GA)和模拟退火具有更高的效率, 它将遗传算法和局部搜索结合在一起, 用包含两点杂交和随机突变的遗传算法用于全局搜索, 用 Solis and Wets 优化算法来完成局部搜索。

## 2 对接方法

### 2.1 计算基础

根据 Sybyl 6.9.2 中 Kollman-united-atom 电荷规则, 计算 EGFR-TK 的点电荷, 并在 Amber 4.0 力场中对其结构进行能量优化。利用 AUTODOCK 的 Addsol 模块给 EGFR-TK 加上溶剂化参数。染料木素采用柔性处理方式, 分子对接起始位置和方向随机, 每个计算包括 100 个循环。遵循能量及几何匹配原则来选择结果。所有的结合模式图均使用 DeepView 3.7 软件进行显示。

### 2.2 结构预处理

用于分子对接计算的 EGFR-TK 蛋白结构和染料木素立体结构取自蛋白质 PDB 晶体结构数据库(<http://www.rcsb.org/pdb>), 提取代码分别为 2GS6 和 1X7R, 2GS6 为 EGFR-TK 与其抑制剂 ATP Analog-Peptide(ATP 类似物肽)的复合物结构, 对接前, 将配体 ATP Analog-Peptide 从复合物中去除后, 得到 EGFR-TK 的空间结构(如图 1), 再加上极性氢原子及 Kollman 电荷, 然后与染料木素进行对接。1X7R 为染料木素与雌激素受体 $\alpha$ 的复合物结构, 从中提取染料木素结构, 用于分子对接。染料木素立体结构如图 2 所示。

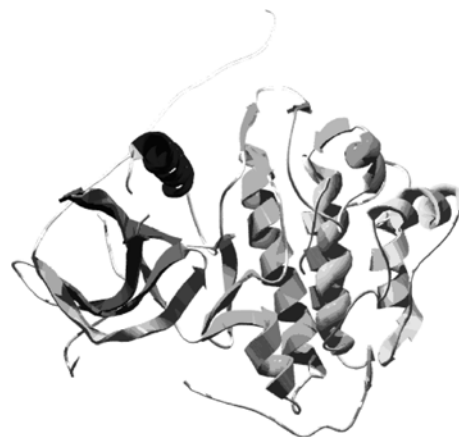


图 1 EGFR-TK 的立体结构

Fig. 1 Three-dimensional structure of EGFR-TK

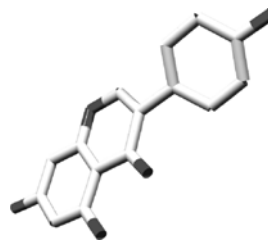


图 2 染料木素的立体结构

Fig. 2 Three-dimensional structure of genistein

### 2.3 参数设置

使用 AUTODOCK 3.05 软件, 对接计算中采用 LGA 算法, 为了提高底物分子在对接过程中的柔性, 使每次计算更为充分, 从而得到更精确的结果, 采用了较大的运算参数, 将该算法中的种群数  $ga\_pop\_size$  从默认值 100 增大为 150, 能量评估最大值  $ga\_num\_evals$  由默认值 2 500 000 增大为 10 000 000, 运算循环数从默认值 10 增大为 100, 其余参数使用默认值<sup>[18,19]</sup>。对接计算在  $3.75\text{ nm} \times 3.75\text{ nm} \times 3.75\text{ nm}$  的矩形框中进行。

## 3 分子对接结果

### 3.1 结合位点

将染料木素与 EGFR-TK 进行分子对接, 在 100 次独立计算完成后, 获得了最适宜的复合物结构(见图 3), 其结合自由能为  $-31.2\text{ kJ/mol}$ 。如图 3 所示, 染料木素结合在 TK 区域的活性腔中。由于该活性腔是 TK 的底物 ATP 的结合腔, 同时也是 TK 中结合和催化活性残基所在区域, 因此染料木素的结合可能对 TK 底物 ATP 的结合或 EGFR-TK 的催化活性产生影响, 从而抑制了 EGFR-TK 的活性。



图 3 分子对接的最适结构  
Fig. 3 The optimum structure from molecular docking

### 3.2 结合和抑制机制

由染料木素结合位点的微环境(图 4)可知, 染料木素分子的苯环平面处于 Phe<sup>699</sup>、Val<sup>702</sup>、Ile<sup>720</sup>、Ala<sup>719</sup>、Leu<sup>764</sup>、Ile<sup>765</sup>、Met<sup>742</sup> 等疏水氨基酸形成的

疏水腔中, 可产生较强的疏水作用; 另一方面, 染料木素的 3 个酚羟基分别与周围氨基酸残基形成了 3 个氢键, Arg<sup>817</sup>、Lys<sup>721</sup> 等带正电的极性氨基酸分处两侧, 可与带微弱负电荷的染料木素分子的酚羟基氧相互作用。综合分析, 染料木素与 EGFR-TK 结合的主要驱动力是疏水作用力和氢键, 静电作用力比较弱。

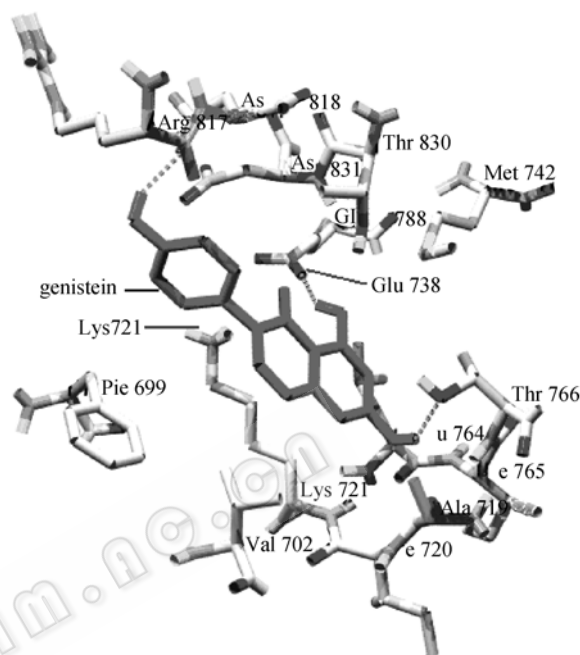


图 4 染料木素与 EGFR-TK 结合位点的微环境  
Fig. 4 Microenvironment around binding site of genistein and EGFR-TK

根据文献报道<sup>[20]</sup>, EGFR-TK 活性构象的催化位点中 Lys<sup>721</sup> 和 Glu<sup>738</sup> 形成了离子对, 而失活状态时, Lys<sup>721</sup> 和 Glu<sup>738</sup> 离子对形成受阻, 可见 Lys<sup>721</sup> 和 Glu<sup>738</sup> 离子对的形成对于 EGFR-TK 的催化活性起着至关重要的作用。由图 4 所示, 染料木素结合在活性腔中, 并且与 Glu<sup>738</sup> 形成了较强作用的氢键, 抵消了 Glu<sup>738</sup> 的部分电荷, 并且染料木素结合于 Lys<sup>721</sup> 和 Glu<sup>738</sup> 之间, 对该离子对的形成产生了空间位阻效应, 因此染料木素的结合使 EGFR-TK 活性受到抑制。

### 3.3 染料木素对 EGFR-TK 的非竞争性抑制机制

为了进一步分析染料木素对 EGFR-TK 的抑制机制, 将图 3 中染料木素与 EGFR-TK 的复合结构和 ATP Analog-Peptide 与 EGFR-TK 的复合物结构<sup>[20]</sup>进行比较, 结果见图 5。ATP Analog-Peptide 结合在 EGFR-TK 上时, EGFR-TK 处于催化活性状态, TK 中所有参与催化的残基均处于正确的位点上<sup>[20]</sup>。如图 5 所示, ATP

Analog-Peptide 与染料木素均结合在 TK 活性腔中, 但结合位点在空间上并无明显的竞争性, 即二者在与 TK 的结合中并不存在明显的竞争作用。如上所述, 由于染料木素的结合抑制了 TK 活性构象中 Lys<sup>721</sup>/Glu<sup>738</sup> 离子对的形成, 从而抑制了 TK 的催化活性。因此染料木素是通过干扰 TK 催化活性构象的形成, 而不是与底物 ATP 竞争结合位点实现其抑制作用的, 应该属于非竞争性抑制。并且由于染料木素与 TK 之间的高亲和力( $\Delta G = -31.2$  kJ/mol), 因此染料木素是 EGFR-TK 的高度特异的非竞争性抑制剂, 从而有效抑制了肿瘤的发生和发展。另一方面, 计算结果还发现了另外 3 个距活性腔较远的结合位点(结果未显示), 由于结合自由能较低, 也有可能是染料木素的结合位点, 这进一步说明染料木素对 EGFR-TK 的抑制很可能属于非竞争性抑制。

Akiyama 等对染料木素的抑制动力学分析揭示染料木素的结合并未干扰 ATP 与 EGFR-TK 的结合, 但导致了非反应性酶-底物复合物的形成, 因此染料木素是 EGFR-TK 的非竞争性抑制剂。因为染料木素在结构上与 ATP 并无相关性, 那么染料木素的抑制作用并非由于染料木素与 ATP 竞争同一位点而致, 因此很可能染料木素与 EGFR-TK 有多个结合位点<sup>[9]</sup>。本文结果与 Akiyama 的实验结果和推断具有较好的一致性。

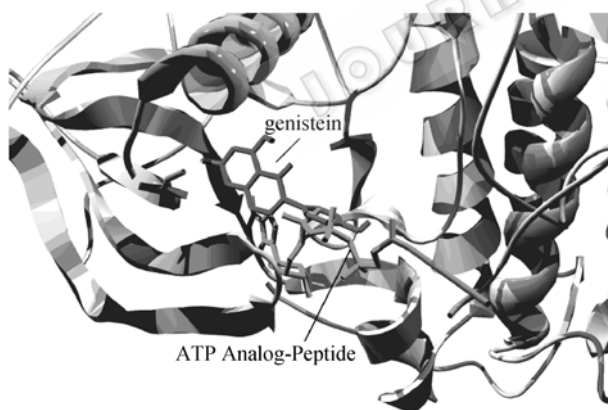


图5 染料木素/EGFR-TK 复合物与 ATP Analog-Peptide/EGFR-TK 复合物的结构比较

Fig. 5 Structural contrast of genistein/EGFR-TK and ATP Analog-Peptide/EGFR-TK compounds

## 4 结论

本研究利用 AUTODOCK 3.05 分子对接软件探究了染料木素与 EGFR-TK 的结合作用, 并进一步就

染料木素对 EGFR-TK 的结合和抑制机制进行了分析, 从分子水平上阐明了染料木素的抗肿瘤机制。研究发现染料木素与 EGFR-TK 发生了强烈的结合作用, 结合自由能达到  $-31.2$  kJ/mol。染料木素结合在 EGFR-TK 的活性腔中, 结合位点与 ATP Analog-Peptide 并无明显竞争性, 但是染料木素的结合抑制了 TK 分子中 Lys<sup>721</sup>/Glu<sup>738</sup> 离子对的形成, 从而抑制了 TK 的催化活性。说明染料木素对 EGFR-TK 的抑制属于高度特异的非竞争性抑制, 与文献的试验研究报道一致。由于结合位点处微环境具有较强的疏水性, 并且形成了 3 个氢键, 因此推断疏水力和氢键在染料木素对 EGFR-TK 的结合与抑制中发挥了重要作用。

## REFERENCES

- [1] Sheng WJ. EGFR for cancer treatment. *Oncol Prog*, 2004, **2**(1): 60–63.  
申文江. 表皮生长因子受体与肿瘤治疗. 癌症进展杂志, 2004, **2**(1): 60–63.
- [2] Zheng YM, Wang ZZ, Wang F, *et al.* Epidermal growth factor receptor targeted molecularly therapies of cancers. *Int J Radiat Med Nucl Med*, 2007, **31**(1): 21–25  
郑玉民, 王自正, 王峰, 等. 以表皮生长因子受体为靶点的肿瘤分子靶向治疗. 国际放射医学核医学杂志, 2007, **31**(1): 21–25.
- [3] Wong WSF, Leong KP. Tyrosine kinase inhibitors: a new approach for asthma. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1697**(1-2): 53–69.
- [4] Peterson G, Stephen B. Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: Independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, **179**(1): 661–667.
- [5] Kniss DA, Zimmerman PD, Su HC, *et al.* Genistein suppresses EGF-induced prostaglandin biosynthesis by a mechanism independent of EGF receptor tyrosine kinase inhibition. *Prostaglandins*, 1996, **51**(2): 87–105.
- [6] Dorai T, Aggarwal BB. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett*, 2004, **215**(2): 129–140.
- [7] Shushan A, Ben-Bassat H, Mishani E, *et al.* Inhibition of leiomyoma cell proliferation in vitro by genistein and the protein tyrosine kinase inhibitor TKS050. *Fert Ster*, 2007, **87**(1): 127–135.
- [8] Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem*, 2007, **18**(7): 427–442.
- [9] Akiyama H, Ishida J, Nakagawa S, *et al.* Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem*, 1987, **262**(12): 5592–5595.
- [10] Linassier C, Pierre M, Pecq JBL, *et al.* Mechanisms of

- action in NIH-3T3 cells of genistein, an inhibitor of EGF receptor tyrosine kinase activity. *Biochem Pharmacol*, 1990, **39** (1): 187–193.
- [11] Hoffman R. Potent inhibition of breast cancer cell lines by the isoflavonoid kievitone: Comparison with genistein. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **211** (2): 600–606.
- [12] Cotroneo MS, Fritz WA, Lamartiniere CA. Dynamic profiling of estrogen receptor and epidermal growth factor signaling in the uteri of genistein- and estrogen-treated rats. *Food Chem Toxicol*, 2005, **43** (5): 637–645.
- [13] Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol*, 2006, **71**(10): 1397–1421.
- [14] Goodsell DS, Morris GM, Olson AJ. Docking of flexible ligands: applications of AUTODOCK. *J Mol Recogn*, 1996, **9**(1): 1–5.
- [15] Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS. Automated docking using a lamarkian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem*, 1998, **19**: 1639–1662.
- [16] Osterberg F, Morris GM, Sanner MF. Automated docking to multiple target structures: Incorporation of protein mobility and structural water heterogeneity in AUTODOCK. *Proteins*, 2002, **46**: 34–40.
- [17] Tang K, Pan NN, Zhang YY, *et al.* Studies of adriamycin binding to histone H1 by resonant mirror biosensor and fluorescence. *Spectr Anal Lett*, 2005, **38**: 2151–5164.
- [18] Zheng ZL, Zuo ZY, Liu ZG, *et al.* Construction of a 3D model of nattokinase, a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus natto* A novel nucleophilic catalytic mechanism for nattokinase. *J Mol Graph Mod*, 2005, **23**: 373–380.
- [19] Buzko OV, Bishopy AC, Shokat KM. Modified AUTODOCK for accurate docking of protein kinase inhibitors. *J Comput Aided Mol Des*, 2002, **16**: 113–127.
- [20] Zhang XW, Gureasko J, Shen K, *et al.* An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*, 2006, **125**: 1137–1149.

## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 中国芳香植物（上、下册）

王羽梅 主编

978-7-03-021847-6 ¥180.00 2008年9月出版

这是一本系统、全面地介绍我国芳香植物资源及其利用现状的书籍。内容分总论和各论两大部分。总论部分除介绍了有关芳香植物的基本知识外，还综述了芳香植物的种类与分布、生产与贸易、利用及研究现状。各论部分，在对我国芳香植物资源进行调查的基础上，分科分属对我国所有的上千种芳香植物一一进行了介绍。内容包括种名、别名、拉丁学名、英文名、原产地与分布、生物学特性、栽培技术要点、主要精油成分、利用状况等。本书是对我国芳香植物资源的全面总结与概括，书中融入了课题组多年来对我国芳香植物进行调查研究的成果，参阅了大量国内外相关文献资料，内容丰富而全面。书中还附上了 632 幅芳香植物的彩色图片，可供调查、识别所用。本书具有很强的本土性和实用性，可作为工具书使用。

本书可供从事芳香植物种植、加工、销售、利用的企业技术人员，从事有关芳香植物研究的单位和个人，大专院校生物学、园艺学等相关专业的教师和学生使用。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书（免邮费）

邮购地址：北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编：100717

联系人：阮芯 联系电话：010-64034622（带传真）

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>