



## 基于表面等离子体共振技术筛选STAT3小分子抑制剂的研究

苏晓薇, 张华林, 张宁, 杨森, 许维恒, 张俊平

### Screening small molecular inhibitors of STAT3 based on surface plasmon resonance technology

SU Xiaowei, ZHANG Hualin, ZHANG Ning, YANG Ben, XU Weiheng, ZHANG Junping

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.1006-0111.202105137>

### 您可能感兴趣的其他文章

#### Articles you may be interested in

信号转导及转录激活因子3抑制剂研究进展

Research progress of STAT3 inhibitors

药学实践杂志. 2021, 39(1): 4-8 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202006024

表面等离子共振技术在定量分析中的应用和研究

Application of surface plasmon resonance biosensor in quantitative analysis research

药学实践杂志. 2018, 36(1): 18-23 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.01.004

(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖合成酶小分子抑制剂药效团模型的构建

The construction of pharmacophore model for (1,3)- $\beta$ -D-glucan synthase small molecule inhibitors

药学实践杂志. 2018, 36(2): 116-120 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.02.005

冠状病毒小分子抑制剂研究进展

Research progress on small molecule inhibitors of coronaviruses

药学实践杂志. 2020, 38(5): 385-397 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202005020

微波消解-电感耦合等离子体原子发射光谱法测定全血中的镧

Determination of lanthanum in whole blood by microwave digestion-inductively coupled plasma optical emission spectrometry

药学实践杂志. 2021, 39(2): 118-120, 125 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202012019

小分子p53-MDM2抑制剂先导化合物苾普地尔的研究

Discovery of bepridil as a valuable lead compound with potent p53-MDM2 inhibitory activity

药学实践杂志. 2021, 39(2): 126-129 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202009031



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

## 基于表面等离子体共振技术筛选 STAT3 小分子抑制剂的研究

苏晓薇<sup>1</sup>, 张华林<sup>2</sup>, 张 宁<sup>3</sup>, 杨 霖<sup>3</sup>, 许维恒<sup>3</sup>, 张俊平<sup>1</sup> (1. 福建中医药大学药学院 福建 福州 350108; 2. 陆军第八十一集团军医院 河北 张家口 075001; 3. 海军军医大学药学院 上海 200433)

**[摘要]** **目的** 基于表面等离子体共振(SPR)技术, 筛选能与信号转导和转录激活因子 3(STAT3)特异性结合并抑制其活性的小分子化合物。**方法** 使用基于 SPR 技术的 Biacore T200 生物分子互作分析系统, 在最优 pH 富集条件下将纯化蛋白 STAT3 偶联到 SPR 系统的 CM5 芯片上, 从 50 个中药单体中筛选出能够与 STAT3 结合且响应值较高的化合物, 并对其结合特异性进行确认, 然后运用生物学相关实验验证筛选所得化合物对 STAT3 的抑制作用, 最后采用分子对接技术拟合化合物与 STAT3 的结合模式, 明确其可能的作用位点。**结果** 初步筛选获得 10 多个高响应的候选分子, 通过动力学测定发现其中仅有 1 个分子芹菜素显示特异性结合。Western-blot 实验结果表明, 芹菜素能够剂量依赖地抑制 STAT3 的磷酸化; 双荧光素酶报告基因结果显示, 芹菜素能够剂量依赖地抑制 IL-6 诱导的 STAT3 的转录活性。分子对接结果表明, 芹菜素与 STAT3 蛋白的 SH2 结构域结合, 与关键残基 Glu638、Gln644、Gly656、Lys658 形成氢键相互作用, 与 Tyr657 残基形成  $\pi$ - $\pi$  相互作用。**结论** 基于 SPR 技术筛选, 发现芹菜素是 STAT3 的抑制剂。

**[关键词]** 表面等离子体共振技术; 信号转导和转录激活因子 3; 小分子抑制剂; 芹菜素

**[中图分类号]** R96 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2021)06-0515-05

**[DOI]** 10.12206/j.issn.1006-0111.202105137

## Screening small molecular inhibitors of STAT3 based on surface plasmon resonance technology

SU Xiaowei<sup>1</sup>, ZHANG Hualin<sup>2</sup>, ZHANG Ning<sup>3</sup>, YANG Ben<sup>3</sup>, XU Weiheng<sup>3</sup>, ZHANG Junping<sup>1</sup> (1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China; 2. The 81st Army Hospital, Zhangjiakou 075001, China; 3. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To find small molecules binding specifically to signal transducer and activator of transcription3 (STAT3) based on surface plasmon resonance (SPR) technology and confirm their inhibitory activities to STAT3. **Methods** The biomolecular interaction analysis T200 system based on SPR technology was used to couple the purified protein STAT3 to CM5 chip under the optimal pH conditions. The compounds with high binding response value were screened out from 50 candidate compounds derived from traditional Chinese medicines and the binding specificity was then confirmed. Biological experiments were performed to confirm the inhibitory effects of the screened compounds on STAT3. The binding pattern of STAT3 and the compound was fitted by molecular docking technique. **Results** More than 10 candidate molecules exhibited binding activities to STAT3 and kinetics assays revealed that only one candidate molecule, apigenin, showed specific binding. Western-blot analysis exhibited that apigenin inhibited the phosphorylation of STAT3 dose-dependently. Luciferase reporter gene assays demonstrated that apigenin also inhibited IL-6-induced STAT3 transcriptional activity in a dose-dependent manner. Molecular docking results showed that apigenin binds to the SH2 domain of STAT3, and interacts with key residues Glu638, Gln644, Gly656 and Lys658 by hydrogen bonds and with Tyr657 through  $\pi$ - $\pi$  interactions. **Conclusion** Apigenin was a direct inhibitor of STAT3.

**[Key words]** surface plasmon resonance; STAT3; small molecular inhibitors; apigenin

STAT3 是一种重要的转录因子, 参与众多细胞因子和生长因子受体的信号转导, 在细胞生长和

细胞凋亡等多种细胞过程中发挥着关键作用<sup>[1-2]</sup>。STAT3 的活化可以通过刺激白介素-6 受体 (IL-6R)、Janus 酪氨酸激酶、BCR-ABL 和 SRC 家族激酶等来启动<sup>[3]</sup>。STAT3 经磷酸化活化后形成同源和异源二聚体, 并易位至细胞核, 发挥转录激活因子的作用<sup>[4-6]</sup>。目前, 越来越多的证据显示, 多种恶性肿瘤存在 STAT3 的过度激活, 包括前列腺癌、肺

**[基金项目]** 国家自然科学基金-面上项目(81770604)

**[作者简介]** 苏晓薇, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理与毒理, Email: 1451749304@qq.com

**[通信作者]** 张俊平, 博士生导师, 研究方向: 中药药理与毒理, Email: jpzhang08@163.com

癌、乳腺癌、皮肤癌和宫颈癌等,抑制 STAT3 的磷酸化成为一种很有前景的治疗策略。此外,STAT3 还与肝损伤、纤维化、风湿性关节炎、心肌缺血等疾病有关<sup>[7]</sup>。尽管一些 STAT3 抑制剂正在进行临床试验,但迄今为止尚未批准 STAT3 抑制剂用于癌症的治疗。因此,仍然迫切需要发现潜在的 STAT3 抑制剂<sup>[8]</sup>。

SPR 是一种光学生物传感技术,该技术利用光学测量的折射率变化,分析样品与固定在 SPR 传感器上的分子的结合情况。因其无需标记样品,具有高灵敏度,能实时检测生物分子间的相互作用而被广泛运用于医疗检测、药物筛选、环境监测和食品检测等领域<sup>[9]</sup>。

本课题采用 SPR 技术从中药单体中筛选能与 STAT3 特异性结合的小分子化合物,通过蛋白免疫印迹技术和双荧光素酶报告基因考察小分子对 STAT3 的抑制作用,采用分子对接技术拟合化合物与 STAT3 的结合模式,明确其可能的作用位点,从而为 STAT3 抑制剂的发现提供理论指导和实践经验。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验试剂

DMSO(美国 Sigma 公司);EDC/NHS(GE 公司);胰酶(美国 Gibco 公司);DMEM 培养基(美国 Corning 公司);胎牛血清(美国 Gibco 公司);细胞裂解液、PMSF、30% 丙烯酰胺溶液、1.5 mol/L Tris(pH=8.8)、1.0 mol/L Tris(pH=6.8)、10%SDS、TEMED、BCA 试剂盒、双荧光素酶报告基因检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);硝酸纤维素膜(德国 Sartorius Stedim 公司);转染试剂(美国 Life Technology 公司)

#### 1.1.2 实验仪器

Biacore T2000(GE 医疗生命科学公司);电子天平(上海天平仪器厂);电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);制冰机(德国 Eppendorf 公司);-80℃ 低温冰箱(美国 Thermo 公司);CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(美国 Thermo 公司);离心管(美国 Corning 公司);低温高速台式离心机(美国 Thermo 公司);移液枪(德国 Eppendorf 公司);超纯水仪(美国 Millipore 公司);多功能酶标仪(美国 Thermo 公司)。

#### 1.1.3 实验细胞

HeLa 细胞(购自上海碧云天生物科技有限公司,由本实验室冻存、培养);HeLa-STAT3-Luc 细胞(由本实验室构建、培养、冻存)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 Biacore 鉴定 STAT3 特异性结合小分子

#### (1) STAT3 预富集

将 STAT3 纯化蛋白用去离子水溶解并配成 1 g/L 的蛋白母液,用 4 种不同 pH 的醋酸盐缓冲液(pH4.0、pH4.5、pH5.0、pH5.5)稀释蛋白母液至 50 mg/L,进样,于 Biacore 预富集系统检测不同 pH 条件下蛋白 STAT3 的响应值,确定最佳蛋白偶联条件。

#### (2) STAT3 偶联

在预富集实验中所获得最佳 pH 条件下,将 STAT3 稀释至 50 mg/L,通过 EDC/NHS 活化 CM5 芯片表面羧基,然后通过羧基氨基缩合反应将 STAT3 键合到 CM5 芯片上,乙醇胺封闭未结合的羧基,从而实现 STAT3 偶联到 CM5 芯片上的目的。

#### (3) 亲和力分子

将中药小分子单体化合物用 DMSO 溶解,然后用 PBS 稀释成 32 μmol/L (DMSO 终浓度为 5%)的样品后进样,流动相为 5%DMSO 的 PBS 溶液,通过 Biacore 系统分析其流过 STAT3 蛋白表面的响应值,筛选出对 STAT3 响应值较高(高于阳性对照或与其相当)的单体化合物作为候选化合物。

#### (4) 动力学分析

将候选化合物浓度以二倍比进行梯度稀释,浓度范围为 0.0625 ~ 64 μmol/L (DMSO 终浓度均为 5%),通过 Biacore 系统分析获得结合响应值,根据响应值与候选化合物浓度之间的量效关系绘制动力学曲线,根据曲线拟合情况判断候选化合物与 STAT3 的结合特异性,从而找到能与 STAT3 蛋白特异性结合的小分子单体。

### 1.2.2 蛋白免疫印迹(Western-blot)检测化合物对 STAT3 磷酸化的抑制情况

HeLa 细胞以  $5 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板,于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养过夜。次日,加入不同浓度的化合物,作用 24 h 后,加入 100 μl Western 及 IP 细胞裂解液(含 1 mmol/L PMSF),冰上裂解 25 min,收集蛋白于 1.5 ml 离心管,12 000 r/min,4℃ 离心 10 min,吸取上清液,使用 BCA 蛋白定量试剂盒进行总蛋白定量。蛋白样品中加入 5×蛋白上样缓冲液,煮沸 5 min,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。电泳结束后,在 250 mA 恒流电下将蛋白从凝胶转移到 NC 膜上,5% 脱脂牛奶封闭,进行一抗(p-STAT3/STAT3)、二抗孵育,结束后在红外双色激光成像系统(Odyssey)上扫描检测 700 和 800 通道激发的荧光信号,观察各泳道中蛋白表达情况。

### 1.3 双荧光素酶报告基因鉴定化合物抑制 STAT3 磷酸化的作用

HeLa-STAT3-Luc 细胞计数后按  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 24 孔板,置于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 24 h,加入不同浓度化合物孵育 4 h,然后加入 IL-6(100 ng/ml)和 IL-6R(100 ng/ml)共同刺激 24 h,弃上清液,每孔加入 120  $\mu$ l 细胞裂解液,离心后取 5  $\mu$ l 上清液转移至新的 384 孔板,每孔加入 25  $\mu$ l 荧光素酶 1 液,使用多功能酶标仪检测荧光值,然后加入 25  $\mu$ l 荧光素酶 2 液,再次测荧光值,定内参。

### 1.4 分子对接技术

分子对接以 Protein Preparation Wizard 模块处理蛋白,选择 STAT3 蛋白与小分子抑制剂的晶体复合物 6NUQ,依次去水、加氢,以 LigPrep 模块处理配体,力场优化均采用 OPLS2005 模式,其余参

数均使用默认;以 Grid 模块建立蛋白对接坐标,范德华力半径设置为 1.0;采用精确对接模式(XP)的方法进行对接,对接结果用 PyMol 软件作图。

### 1.5 统计学分析

数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用统计学软件 SPSS19.0 对数据进行单因素方差分析,进行组间差异比较。 $P < 0.05$  认为差异具有统计学意义。

## 2 实验结果

### 2.1 Biacore 系统预富集 STAT3 蛋白

为了研究 STAT3 蛋白的最佳偶联条件,采用不同 pH 的醋酸盐缓冲液稀释蛋白,进行预富集分析,结果显示 STAT3 在 pH4.0 的条件下响应值最高(图 1)。因此,后续实验选择 pH4.0 的缓冲液进行偶联。

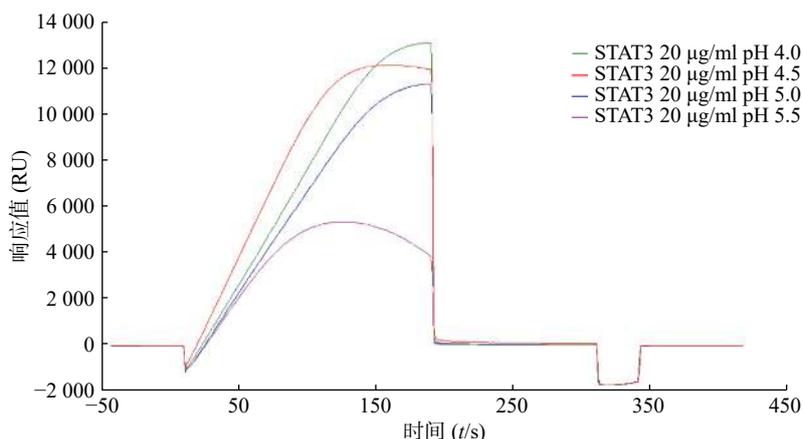


图 1 不同 pH 条件下 STAT3 芯片富集情况

### 2.2 Biacore 系统偶联 STAT3 蛋白

取市售的 STAT3 蛋白用 pH4.0 醋酸盐缓冲液稀释至 50 mg/L,通过 Biacore 系统的内置程序偶联到 CM5 芯片上,结果显示 STAT3 偶联量为 8 000 RU,达到预计偶联水平(图 2)。

### 2.3 筛选中药单体小分子化合物

为了筛选能够结合 STAT3 蛋白的小分子化合物,我们将 50 种中药单体统一稀释到 32  $\mu$ mol/L,利用 Biacore 系统检测结合情况,通过响应值观察小分子与 STAT3 蛋白的结合强度。结果发现,不同小分子化合物与 STAT3 蛋白的结合存在差异(图 3),我们以阳性对照(C188-9)为标准,筛选响应值不低于阳性对照响应值的化合物,得到了梓醇(catalpol)、黄芩素(baicalin)、芹菜素(apigenin)、槲皮素(quercitrin)、人参皂苷(ginsenoside)、京尼平苷酸(geniposidic acid)、桑辛素(morusin)等 10 多种小

分子作为候选化合物,接着进行动力学分析以确定它们与 STAT3 蛋白的结合特异性。

### 2.4 候选化合物的动力学分析

为了验证候选化合物与 STAT3 蛋白的结合是否为特异性结合,我们将候选化合物进行梯度稀释,通过 Biacore 系统分析获得结合响应值,绘制动力学结合曲线。对 10 多种化合物均进行动力学分析,发现只有芹菜素与 STAT3 的结合具有特异性。芹菜素与 STAT3 的结合响应值随着药物浓度的增大而升高,当浓度增大到一定值时响应值呈水平趋势不再变化,说明高浓度芹菜素同 STAT3 的结合存在饱和现象,即芹菜素与 STAT3 的结合为特异性结合(图 4)。因此,选择芹菜素作为可能的 STAT3 抑制剂进行生物学验证。

### 2.5 Western-blot 检测结果

动力学分析结果证实芹菜素可以特异性结合

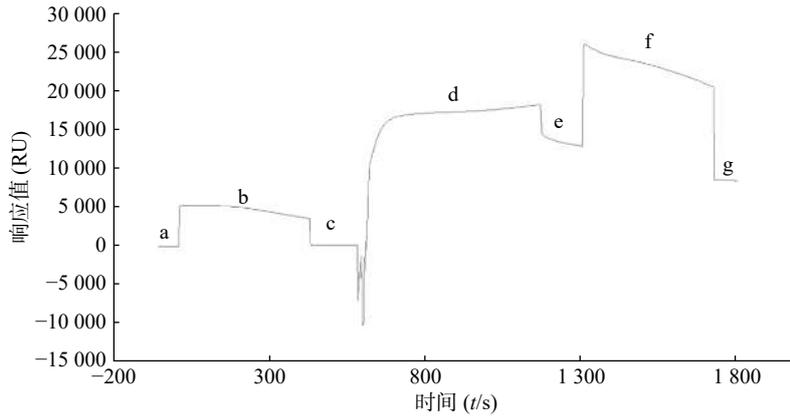


图2 Biacore 系统 STAT3 蛋白偶联情况

注: a 段表示流动相基线水平稳定; b 段表示 EDC/NHS 活化 CM5 芯片表面的过程; c 段为流动相清洗活化试剂; d 段为 STAT3 蛋白固定到芯片表面的过程; e 段代表流动相清洗未结合到芯片表面而残留的 STAT3 蛋白; f 段代表乙醇胺封闭芯片表面多余羧基过程; g 段为流动相清洗剩余乙醇胺的过程。

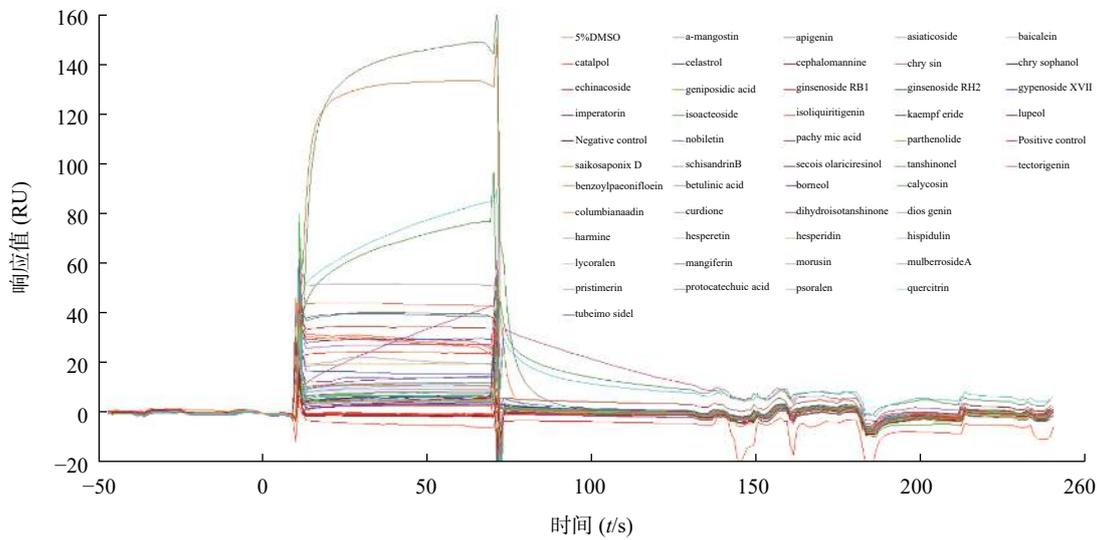


图3 50 种中药单体在 Biacore 系统中与 STAT3 蛋白结合响应的情况

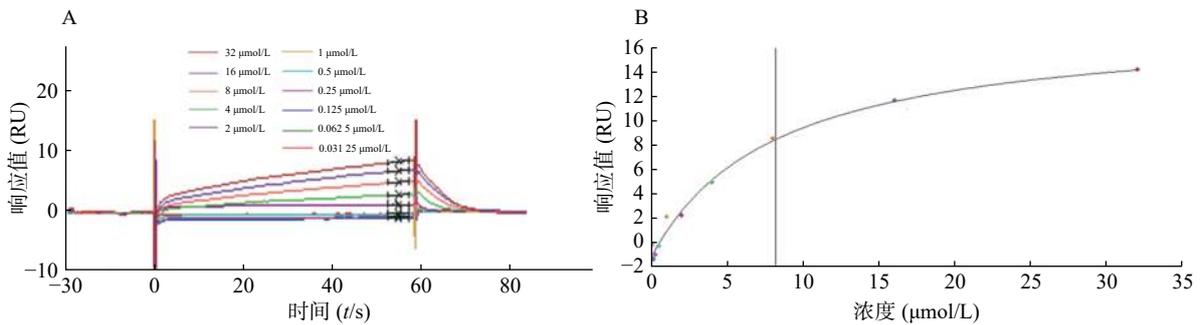


图4 特异性结合动力学曲线

A.不同浓度芹黄素与 STAT3 蛋白结合的传感器图; B.不同浓度芹黄素与 STAT3 蛋白结合的拟合曲线

STAT3, 为了确证芹黄素对 STAT3 磷酸化的抑制作用, 我们利用 IL-6 诱导活化 STAT3, 通过 Western-blot 检测芹黄素对 STAT3 磷酸化的抑制作用。结果发现, IL-6 可以显著刺激 HeLa 细胞 STAT3 的活化, 而芹黄素能剂量依赖地抑制 IL-6 诱导的 STAT3 磷酸化, 表明芹黄素可能是 STAT3

的抑制剂(图5)。

### 2.6 双荧光素酶报告基因检测结果

为了进一步确证芹黄素对 STAT3 的抑制作用, 我们采用双荧光素酶报告基因系统研究芹黄素对 STAT3 转录活性的影响。结果显示, IL-6 刺激可以显著促进 STAT3 的转录活性, 10μmol/L、20μmol/L

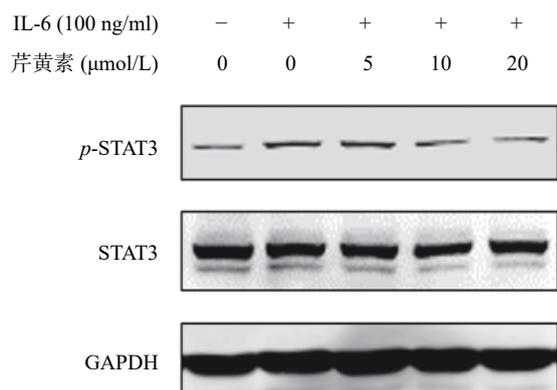


图5 Western-blot 检测芹黄素抑制 STAT3 磷酸化效果

芹黄素能够抑制 IL-6 诱导的 STAT3 转录活性的增加(图6)。以上结果表明芹黄素能够抑制 STAT3 的转录活性,进一步证实芹黄素是 STAT3 的小分子抑制剂。

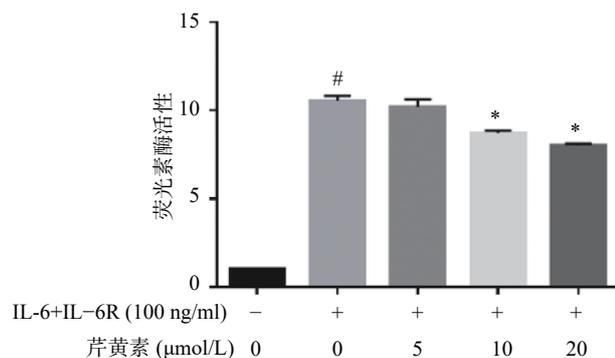


图6 双荧光素酶报告基因检测芹黄素抑制 STAT3 活化的能力

\*  $P < 0.05$ , 与模型组比较; #  $P < 0.05$ , 与空白组比较

## 2.7 分子对接结果

为了明确 STAT3 与芹黄素的相互作用情况,我们采用分子对接技术分析 STAT3 与芹黄素的结合位点。结果显示,芹黄素结合于 STAT3 蛋白的 SH2 结构域,占据了 STAT3 磷酸络氨酸的结合口袋。与关键残基 Glu638、Gln644、Gly656、Lys658 形成氢键相互作用,与 Tyr657 残基形成  $\pi-\pi$  相互作用(图7)。

## 3 讨论

STAT3 在肿瘤中的持续激活和过度表达与肿瘤细胞的多种恶性生物学特征密切相关。STAT3 的活化受多种细胞因子、生长因子,生长因子受体,非受体蛋白酪氨酸激酶等多重信号分子的调控,目前已成为肿瘤治疗领域的研究热点之一<sup>[10]</sup>。STAT3 存在 6 个结构域,包括氨基末端结构域(NTD)、卷

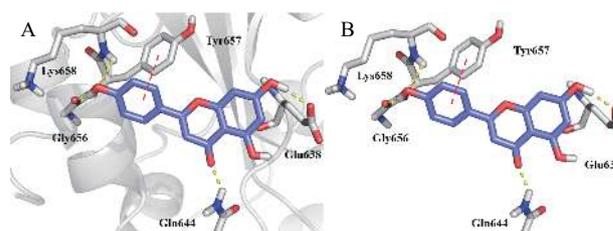


图7 芹黄素与 STAT3 蛋白(PDB: 6NUQ)的结合模式拟合图

A. 芹黄素结合于 STAT3 蛋白的 SH2 结构域;  
B. 芹黄素与 STAT3 蛋白关键残基的作用简图

曲螺旋结构域(CCD)、DNA 结合结构域(DBD)、接头结构域、Src 同源结构域(SH2)和羧基末端反式激活(TAD)结构域。目前,对 STAT3 的直接抑制作用可以通过破坏 SH2、DBD 或 NTD 结构域来阻止功能性 STAT3 二聚体的形成。STAT3 的直接抑制剂主要分为三类:肽,小分子抑制剂和寡核苷酸。间接抑制剂则通过靶向 STAT3 信号通路阻断上游信号通路(如 IL-6 和 JAK 通路)间接抑制 STAT3<sup>[11-12]</sup>。目前,STAT3 抑制剂的研发已成为肿瘤治疗领域的研究热点之一。

芹黄素是一种天然黄酮类化合物,具有抗炎、抗氧化和抗癌作用<sup>[13]</sup>,其在多种癌症中(如乳腺癌、肺癌、肝癌、前列腺癌等)表现出对细胞的生长抑制与促凋亡作用。芹黄素不仅能够通过内源性、外源性凋亡途径促进细胞凋亡,也能通过降低基质金属蛋白酶-2、-9 的表达抑制肿瘤细胞侵袭<sup>[14]</sup>。但是,芹黄素与 STAT3 的关系尚未研究,其对 STAT3 的抑制作用也没有报道。

本研究利用表面等离子体共振技术,从 50 个中药单体中筛选出能与 STAT3 特异性结合的小分子化合物芹黄素,然后运用 Western-blot、双荧光素酶报告基因实验证实了芹黄素对 STAT3 的抑制作用。采用分子对接技术分析 STAT3 与芹黄素的结合位点,结果揭示芹黄素主要通过结合 STAT3 的 SH2 结构域抑制其磷酸化。本研究为芹黄素抗癌作用提供了理论基础,同时,也为发现 STAT3 及其他药物靶点的小分子抑制剂提供了研究经验。

## 【参考文献】

- [1] AKIRA S, NISHIO Y, INOUE M, et al. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway[J]. *Cell*, 1994, 77(1): 63-71.

(下转第 537 页)