

苦木碱 B 的抗肿瘤活性及其作用靶点*

李德平¹ 刘文武² 虞林玉¹ 杨人泽¹

(1. 赣南医科大学第一附属医院药学部, 江西 赣州 341000; 2. 清华大学药学院, 北京 110084)

【摘要】 目的 探讨苦木碱 B 的抗肿瘤活性, 并对其作用靶点进行分析, 初步阐明其作用机制。方法 采用 MTT 法检测苦木碱 B 对多种肿瘤细胞活力的影响; 采用 ADP-Glo 激酶检测法检测苦木碱 B 对 217 种激酶活力的影响; 采用分子对接实验初步阐释苦木碱 B 与蛋白激酶混合连接激酶(MLK3)的作用方式。结果 苦木碱 B 对 A549、HepG2、HCT11b、MCF-7 等多种肿瘤细胞具有一定的抗肿瘤增殖活性; 在 10 μ M 浓度下, 苦木碱 B 对 22 种激酶的抑制率大于 50%, 其中, 对 MLK3 的抑制率最高(88.41%); 分子对接实验显示, 苦木碱 B 能占据 MLK3 的 ATP 活性空腔, 并与其铰链区的关键氨基酸残基 ALA-196 形成氢键作用。结论 苦木碱 B 可能通过抑制 MLK3 等靶点, 从而发挥抗肿瘤的药理活性。

【关键词】 苦木碱 B; 抗肿瘤活性; 作用靶点; 混合连接激酶 3

【中图分类号】 R285.5 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2025.02.005

Study on antitumor activity and its targets of 1-methoxycarbonyl- β -carboline

LI Deping¹, LIU Wenwu², YU Linyu¹, YANG Renze¹

(1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou 341000, Jiangxi, China;

2. School of Pharmacy, Tsinghua University, Beijing 110084, China)

【Abstract】 **Objective** 1-methoxycarbonyl- β -carboline, an active ingredient exists in a number of Chinese herbs, has anti-tumor, anti-inflammation and other biological activities, but its target and mechanism are unclear. In this paper, the action target of 1-methoxycarbonyl- β -carboline was studied in order to elucidate its action mechanism. **Methods** MTT assay was used to detect the effects of 1-methoxycarbonyl- β -carboline on the viability of various tumor cells. ADP-Glo kinase assay was used to detect the effects of 1-methoxycarbonyl- β -carboline on 217 kinases. The interaction between 1-methoxycarbonyl- β -carboline and protein kinase MLK3 was elucidated by molecular docking experiment. **Results** 1-methoxycarbonyl- β -carboline had certain anti-tumor proliferation activity against various tumor cells. At the concentration of 10 μ M, the inhibition rate of 1-methoxycarbonyl- β -carboline on 22 kinases was more than 50%. Among them, MLK3 showed the highest inhibition rate of (88.41%). Molecular docking experiments showed that 1-methoxycarbonyl- β -carboline could occupy the ATP-active cavity of MLK3 and form hydrogen bond with the key amino acid residue ALA-196 in its hinge region. **Conclusion** 1-methoxycarbonyl- β -carboline may exert anti-tumor pharmacological activity by inhibiting MLK3 and other kinase targets.

【Key words】 1-methoxycarbonyl- β -carboline; Anti-tumor pharmacological activity; Targets; MLK3

苦木是为苦木科植物苦木 *Picrasma quassioides* (D. Don) Benn 的干燥枝及叶, 收载于 2015 年版《中国药典》一部, 具有清热、祛湿、解毒之功效, 用于风热

感冒、咽喉肿痛、腹泻下痢、湿疹、疮疖、毒蛇咬伤等^[1]。化学成分研究表明, 其至少包含生物碱类、三萜类、苦木苦味素、醌类、甾醇、皂苷等在内的几十种成分^[2-5], 其中, 苦木碱 B(1-methoxycarbonyl- β -carboline) 是其重要的有效成分之一。苦木碱 B 作为一种中药活性成分, 不仅存在于苦木中, 还存在远志^[6]、枸杞^[7]、洋金花^[8]等中药中, 具有抗肿瘤^[9-11]、抗炎^[12]以及抗菌^[13]等生物活性。但其作用靶点不清, 作用机制不明。

基金项目: 江西省中医药管理局科技计划项目(2023B1380); 赣州市科技计划项目(GZ2023ZSF122)

通信作者: 杨人泽, 副教授, E-mail: yrz626@163.com

引用本文: 李德平, 刘文武, 虞林玉, 等. 苦木碱 B 的抗肿瘤活性及其作用靶点[J]. 西部医学, 2025, 37(2): 180-183, 190. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3511.2025.02.005

基于化学结构,苦木碱 B 含有 β -咔波啉母核。前期研究^[14]发现,一些 β -咔波啉衍生物具有激酶抑制活性。因此,本研究主要探讨苦木碱 B 对激酶的影响,初步探讨其作用机制。本研究对于阐明中药作用的科学内涵具有重要意义,也能为后续基于靶点的结构修饰奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、仪器及细胞系

苦木碱 B,采用课题组前期报道的一锅法全合成获得^[11];DMEM 培养液(美国 Hyclone 公司);胎牛血清(美国 Clark 公司);青霉素/链霉素双抗(北京索莱宝生物公司);MTT(美国 Sigma 公司);胰蛋白酶(美国 Sigma 公司)。旋转蒸发仪(日本东京理化公司);电子分析天平(AUWI 20D,日本岛津公司);酶标仪(ELX 800,美国伯乐公司);倒置显微镜(CKX41SF, Olympus Life Science);二氧化碳恒温培养箱(MCO-18AC-PK,美国 Thermo 公司);水平层流洁净工作台(SA-1800-1,上海上净净化设备有限公司);立式压力蒸汽灭菌器(Y×Q-LS-50A,上海申安医疗器械厂)。人源肺癌细胞系 A549、人源肝癌细胞系 HepG2、人源结肠癌细胞系 HTC116 以及人源乳腺癌细胞系 MCF-7 均购自于美国模式菌种收藏中心(ATCC)。

1.2 方法

1.2.1 细胞复苏及培养

从液氮罐中取出冷冻管,迅速放入 37 °C 水浴中,并不时摇动,使其快速融化。然后在无菌下取出细胞,用移液枪将细胞悬液注入含有培养液(约 10 倍细胞悬液体积)的离心管中,再滴加 10 mL 培养液。800 r/min 离心 5 min,弃去上层液,加入适量培养基(含 10% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基),接种于培养皿中,置湿度饱和,37 °C,5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,当细

胞指数生长至密度 70%~80% 时,加入胰酶消化贴壁细胞,传代至新的细胞培养皿中。

1.2.2 MTT 实验检测苦木碱 B 对肿瘤细胞活力的影响

将肿瘤细胞接种至 96 孔板中(3×10^3 /孔),培养过夜。然后分别加入不同浓度的苦木碱 B,孵育 24 h、48 h 或 72 h,然后每孔加入 10% MTT(5 mg/mL, PBS)试剂 20 μ L,继续孵育 4 h。弃去上清液后,每孔加入 DMSO 100 μ L,摇床上震荡 8 min。用酶标仪在 490 nm 波长下测定 OD 值。生长抑制率(%) = $100 - 100 \times (\text{OD 样品孔} - \text{OD 空白孔}) / (\text{OD 对照孔} - \text{OD 空白孔})$ 。采用非线性回归分析(增长率与浓度之间的关系)计算 IC₅₀ 值。

1.2.3 ADP-Glo 激酶检测法检测苦木碱 B 对激酶活力的影响

采用 ADP-Glo 法对苦木碱 B 进行 217 种激酶抑制实验(北京爱思益普有限公司),每种激酶使用复孔。

1.2.4 分子对接实验

混合连接激酶 3(Mixed lineage kinase, MLK3)的 3D 结构采用 UNIPROT(<https://www.uniprot.org/>)中的 Alphafold 进行同源模建。采用 Schrödinger 软件中 Protein Preparation Wizard 模块准备蛋白,LigPrep 模块准备配体,格点文件根据 ALA196 等关键氨基酸残基定义^[15],Glide 模块进行分子对接。对接结果采用 Pymol 软件进行可视化。

2 结果

2.1 苦木碱 B 对肿瘤细胞活力的影响

苦木碱 B 对 A549、HepG2、HCT116、MCF-7 等多种肿瘤细胞具有一定的抑制活性;其中对 HCT116 的抑制活性最强,作用 72 h 的 IC₅₀ 值为 43 μ M。从作用时间来看,苦木碱 B 对肿瘤细胞活力的影响随着时间的增长而增强,呈现出一定的时间依赖性。见表 1。

表 1 苦木碱 B 对多种肿瘤细胞活力的影响 [$\bar{x} \pm s$, (μM)^a]

Table 1 Effect of 1-methoxycarbonyl- β -carboline on the viability of various tumor cells

项目	A549			HepG2			HCT116			MCF-7		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
IC ₅₀	>100	92.85 \pm 8.72	82 \pm 8.36	86 \pm 8.24	65 \pm 6.35	56 \pm 5.88	72 \pm 6.59	48 \pm 4.29	43 \pm 4.26	87 \pm 8.66	76 \pm 3.56	64 \pm 5.21

2.2 苦木碱 B 对激酶活力的影响

检测了苦木碱 B 对 217 种激酶活力的影响,在 10 μ M 浓度下,苦木碱 B 对 22 种激酶的抑制率大于 50%;其中,苦木碱 B 在 10 μ M 浓度下对 MLK3 的抑制率最高,为 88.41% (见表 2)。苦木碱 B 对 217 种激酶的抑制活性选择性图谱,见图 1。

2.3 苦木碱 B 对 MLK3 的分子对接研究

苦木碱 B 能占据 MLK3 的活性空腔,并与 MLK3 铰链区的关

键氨基酸残基 ALA-196 形成 2 个关键的氢键作用,见图 2。

3 讨论

多项研究^[9-11]发现苦木碱 B 具有一定的抗肿瘤活性,本研究首先对其抗肿瘤活性进行验证,结果表明,苦木碱 B 确实对多种肿瘤细胞具有一定的抗增殖活性,且呈现出浓度和时间依赖性,这与前期报道的结果基本一致。可能由于苦木碱 B 的抗肿瘤活性较弱,

表 2 苦木碱 B 在 10 μM 浓度下对各种激酶活力的影响 (> 50% 抑制率)

Table 2 Effect of 1-methoxycarbonyl-β-carboline on the activity of various kinases at 10 μM concentration

排名	激酶	抑制率 (%)	排名	激酶	抑制率 (%)
1	MLK3	88.41	12	CLK1	71.13
2	PIM1	85.32	13	PIM3	70.64
3	DYRK1A	83.33	14	DYRK2	68.20
4	HIPK3	82.47	15	CK2α1/β	67.13
5	HIPK2	82.33	16	RET	64.71
6	CK2α2/β	79.61	17	SYK	57.84
7	CLK4	79.21	18	DYRK1B	57.07
8	MLK1	76.26	19	CDK13/CycK	56.69
9	HIPK1	73.49	20	CDK9/CycT1	56.19
10	TGFβR2	73.32	21	AurB	55.52
11	CHK2	72.45	22	HGK	50.54

以往的研究没有对其作用靶点及机制进行深入地研究,本研究进一步探讨其抗肿瘤作用靶点,初步阐明其作用机制。

本研究探讨苦木碱 B 的抗肿瘤作用靶点,结果发现苦木碱 B 对 MLK3、PIM1、DYRK1A、HIPK3 和 HIPK2 具有较强的抑制活性,IC₅₀ 值都小于 10 μM。MLK3 能磷酸化并活化丝裂原活化蛋白激酶激酶 (MAP2Ks),导致 JNK、P38 及 ERK 介导的信号通路活化,参与调节细胞增殖,细胞周期进展等过程^[16]。本研究分子对接实验提示苦木碱 B 能占据 MLK3 的 ATP 活性空腔,与其铰链区的关键氨基酸残基形成氢键作用,从而抑制 MLK3 的催化活性。莫罗尼鼠白血病病毒前病毒整合激酶 1 (Proviral integration of

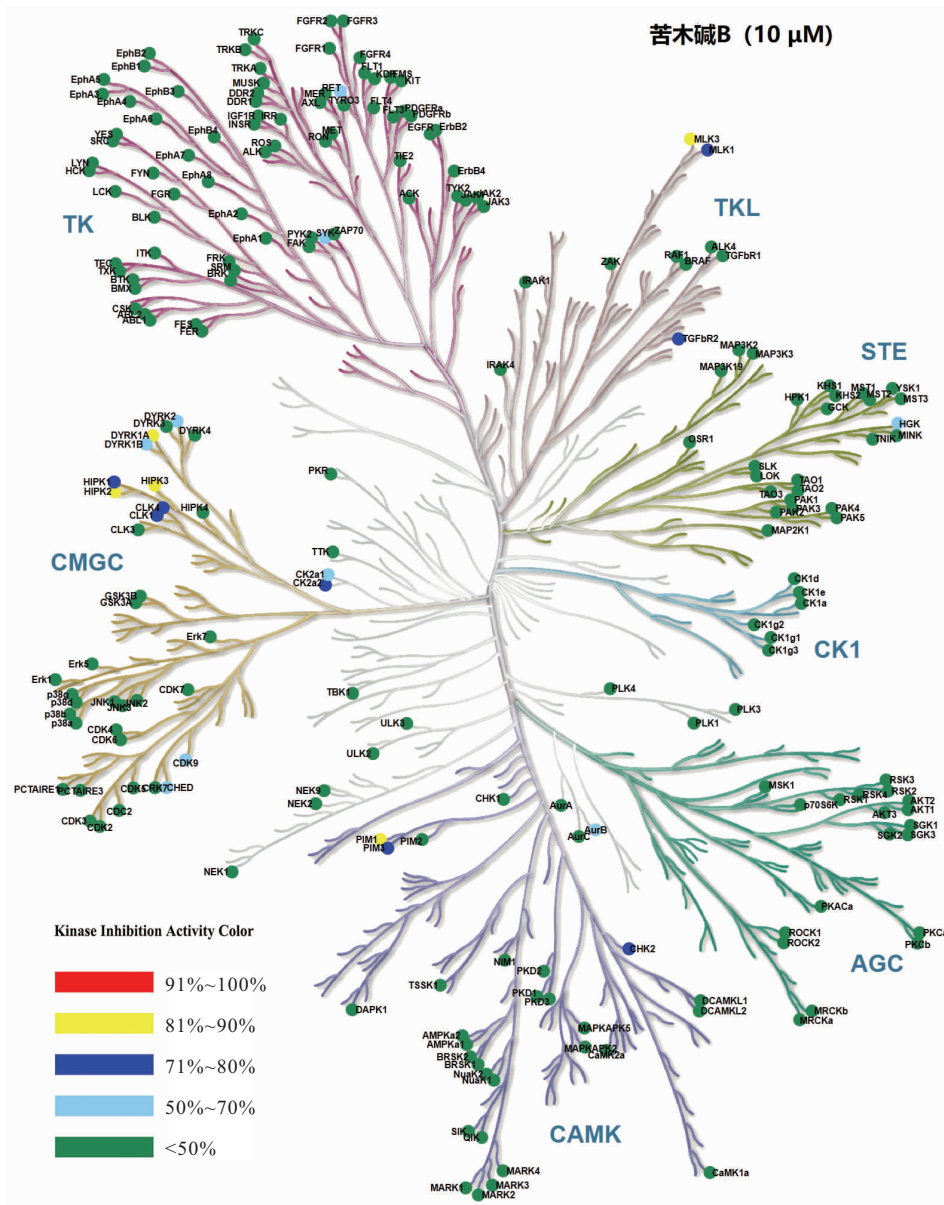


图 1 苦木碱 B 对 217 种激酶活力影响的选择性图谱

Figure 1 Selective map of the effect of 1-methoxycarbonyl-β-carboline on the activity of 217 kinases



图 2 苦木碱 B 对 MLK3 的分子对接示意图

Figure 2 Molecular docking diagram of 1-methoxycarbonyl- β -carboline to MLK3

moloney murine leukemia virus kinase 1, PIM1) 的转录由 IL-2、IL-3 和 IL-6 等几种白细胞介素激活,而后通过酪氨酸激酶/信号传导及转录激活因子(Janus kinase /signal transducer and activator of transcription 3, JAK /STAT) 通路向细胞核进行信号转导, PIM-1 通过磷酸化下游靶蛋白,调控着肿瘤细胞的生长、增殖、凋亡及分化^[17]。研究^[18]发现双底物特异性酪氨酸磷酸化调节激酶 A(dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A, DYRK1A) 在神经系统疾病和肿瘤中起着重要的作用。同源结构域相互作用蛋白激酶 2 和 3(Homeodomain interacting protein kinase 2 和 3, HIPK2 和 HIPK3), HIPK-2 激活或过表达使抑癌基因 p53 磷酸化,并激活 p53 的细胞凋亡活性,通过 p53 依赖性和非依赖性途径促进细胞凋亡,从而抑制肿瘤生长^[19-20]。这些激酶与肿瘤和炎症密切相关,与前期报道^[9-12]苦木碱 B 具有抗肿瘤和抗炎的药理作用一致。

综上所述,本研究支持“苦木碱 B 可作用多靶点而发挥抗肿瘤作用”的结论,这也与中药及其活性成分往往能通过多靶点、多通路而发挥药效的观点一致。

由于前期研究发现一些 β -咔波啉衍生物具有激酶抑制活性,因此本研究仅探讨了苦木碱 B 对 217 种激酶活力的影响,对其他非激酶靶点的影响有待进一步研究。张琳等^[21]发现苦木碱 F 可通过 miR-331-3p 调控宫颈癌 HeLa 细胞的增殖及凋亡。因此,对其他非激酶靶点影响的研究是今后的一个研究方向。本研究仅基于 ADP-Glo 法在细胞外发现苦木碱 B 的作

用靶点可能为 MLK3、PIM1、DYRK1A、HIPK3 和 HIPK2 等激酶,其在细胞内以及体内的作用靶点有待进一步确证。最后,苦木碱 B 的抗肿瘤活性较弱,其对 MLK3 等激酶的抑制活力也不强,因此,基于苦木碱 B 进行结构修饰以发现具有更强抗肿瘤活性的衍生物也是今后研究的一个方向。

4 结论

多种中药含有的中药活性成分苦木碱 B 具有一定的抗肿瘤细胞增殖活性,作用靶点可能为包括 MLK3 在内的多种蛋白激酶,但确切的作用机制还有待进一步深入研究。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会.《中华人民共和国药典》一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [2] 赵文娜,张新新,谢人明,等.苦木化学成分和药理作用研究进展[J].中药材,2011,34(7):1149-1152.
- [3] 邓延秋,赵立春,唐红珍,等.苦木化学成分及生物活性研究进展[J].中成药,2020,42(5):1291-1296.
- [4] 张秋裕,林朝展,袁月,等.苦木化学成分研究[J].中草药,2020,51(19):4884-4890.
- [5] 吴冲,邓贵华,林朝展,等.苦木成分分析及质量评价初步研究[J].中国中药杂志,2014,39(9):1656-1659.
- [6] HAN B H, PARK J H, PARK M H, *et al.* β -Carboline alkaloids of *Polygala tenuifolia*[J]. Arch Pharmacol Res, 1985, 8(4): 243-247.
- [7] HAN B H, PARK J H, PARK M H, *et al.* Studies on the alkaloidal components of the fruits of *Lycium chinense*[J]. Arch Pharmacol Res, 1985, 8(4): 249-252.
- [8] 刘艳,荣晓惠,谭金燕,等.洋金花叶中黄酮类和生物碱类化学成分研究[J].中草药,2021,52(14):4141-4152.

- larity and Disease Control[J]. *Int J Mol Sci*, 2021,23(1):144.
- [14] WEINSTOCK A, RAHMAN K, YAACOV O, *et al.* Wnt signaling enhances macrophage responses to IL-4 and promotes resolution of atherosclerosis[J]. *Elife*, 2021,10:e67932.
- [15] 张清,蔡露,陈波,等. 白芨多糖对 LPS 诱导的巨噬细胞炎症模型中促炎因子的影响及机制研究[J]. *临床消化病杂志*, 2023, 35(6):447-452.
- [16] MEHLA K, SINGH P K. Metabolic Regulation of Macrophage Polarization in Cancer[J]. *Trends Cancer*, 2019,5(12):822-834.
- [17] CHEN D, ZHANG X, LI Z, *et al.* Metabolic regulatory crosstalk between tumor microenvironment and tumor-associated macrophages[J]. *Theranostics*, 2021,11(3):1016-1030.
- [18] 郭冰洁. 解毒方在缺氧微环境下通过 Wnt/ β -catenin 信号通路降低肝癌“干性”以及 Cripto-1 在该作用中的调控机制[D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2023.
- [19] 高正坤. Cripto-1 调控口腔鳞癌细胞辐射敏感性的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2023.
- [20] YANG L Y, LUO Q, LU L, *et al.* Increased neutrophil extracellular traps promote metastasis potential of hepatocellular carcinoma via provoking tumorous inflammatory response[J]. *J Hematol Oncol*, 2020,13(1):3.
- [21] 彭瑾. 基于 NF- κ B/Nrf-2 信号通路探究饮用富氢水缓解大鼠慢性肠道炎症的作用机制[D]. 黑龙江: 东北农业大学, 2023.
- [22] SAXTON R A, TSUTSUMI N, SU L L, *et al.* Structure-based decoupling of the pro- and anti-inflammatory functions of interleukin-10[J]. *Science*, 2021,371(6535):eabc8433.
- [23] 李东杰,薛永平,刘丽媛,等. IL-10 表达对小鼠脾脏 CD4⁺T 细胞亚群相关细胞因子的影响[J]. *宁夏医学杂志*, 2023, 45(10):878-882.
- [24] ZHANG A, XIONG Y, XU F, *et al.* IL-1 β enhances human placenta-derived mesenchymal stromal cells ability to mediate Th1/Th2 and Th1/CD4⁺IL-10⁺ T cell balance and regulates its adhesion, proliferation and migration via PD-L1[J]. *Cell Immunol*, 2020,352:104113.
- [25] LIU L, GUO H, SONG A, *et al.* Progranulin inhibits LPS-induced macrophage M1 polarization via NF- κ B and MAPK pathways[J]. *BMC Immunol*, 2020,21(1):32.
- [26] GAPTULBAROVA K A, TSYGANOV M M, PEVZNER A M, *et al.* NF- κ B as a potential prognostic marker and a candidate for targeted therapy of cancer[J]. *Exp Oncol*, 2020,42(4):263-26.

(收稿日期:2023-11-28;修回日期:2024-09-20;编辑:王小菊)

(上接第 183 页)

- [9] NDONGO J T, MBING J N, MONTEILLIER A, *et al.* Carbazole-, aspidofractinine-, and aspidocarpamine-type alkaloids from *Pleiocarpa pycnantha*[J]. *J Nat Prod*, 2018, 81(5): 1193-1202.
- [10] LEE J J, OH C H, YANG J H, *et al.* Cytotoxic alkaloids from the wood of *Picrasma quassioides*[J]. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 2009, 52(6): 663-667.
- [11] KWON H S, LEE H N, LEE J S, *et al.* Two new β -carboline alkaloids from the stems of *Picrasma quassioides*[J]. *Arch Pharmacol Res*, 2018, 41(5): 513-518.
- [12] KIM K H, PARK E J, JANG H J, *et al.* 1-carbomethoxy- β -carboline, derived from *Portulaca oleracea* L, ameliorates LPS-mediated inflammatory response associated with MAPK signaling and nuclear translocation of NF- κ B[J]. *Molecules*, 2019, 24(22): 4042.
- [13] BAE K, SEO W, KWON T, *et al.* Anticariogenic β -carboline alkaloids from *Commelina communis*[J]. *Arch Pharmacol Res*, 1992, 15(3): 220-223.
- [14] LI D P, LIU W W, HUANG Y G, *et al.* Facile synthesis of C1-substituted β -carbolines as CDK4 inhibitors for the treatment of cancer[J]. *Bioorg Chem*, 2022, 121: 105659.
- [15] YOON H R, BALUPURI A, LEE J, *et al.* Design, synthesis of new 3H-imidazo[4, 5-b]pyridine derivatives and evaluation of their inhibitory properties as mixed lineage kinase 3 inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2024, 101: 129652.
- [16] RAMACHANDRAIAH K, PUTTALINGAIAH R T. The role of mixed lineage kinase 3 (MLK3) in cancers[J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 238: 108269.
- [17] ASATI V, MAHAPATRA D K, BHARTI S K. PIM kinase inhibitors: structural and pharmacological perspectives[J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 172: 95-108.
- [18] LIU T, WANG Y X, WANG J X, *et al.* DYRK1A inhibitors for disease therapy: current status and perspectives[J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 229: 114062.
- [19] CONTE A, VALENTE V, PALADINO S, *et al.* HIPK2 in cancer biology and therapy: recent findings and future perspectives[J]. *Cell Signal*, 2023, 101: 110491.
- [20] XIE Y M, YUAN X F, ZHOU W M, *et al.* The circular RNA HIPK3 (circHIPK3) and its regulation in cancer progression: review[J]. *Life Sci*, 2020, 254: 117252.
- [21] 张琳,邓贵华,杨亮,等. 苦木碱 F 通过 miR-331-3p 调控宫颈癌 HeLa 细胞增殖及凋亡的机制研究[J]. *陕西中医*, 2022, 43(1): 17-22.

(收稿日期:2024-04-14;修回日期:2024-05-24;编辑:王小菊)