



红毛七中生物碱类成分抗炎活性的虚拟筛选

袁桥玉

(武汉职业技术学院 生物工程学院,湖北 武汉 430074)

摘要:运用计算机辅助药物设计寻找红毛七抗炎生物碱类活性成分。以“红毛七”为关键词,在TCMSP数据库中搜索生物碱类化学成分,从Pubchem数据库下载相应化合物结构;再从蛋白质数据库中下载与抗炎作用明确的7个靶点蛋白,采用Sybyl软件中蛋白质预处理工具确定活性区域,应用Surflex-dock模块对小分子与靶蛋白进行分子对接,通过Total Score打分函数筛选出活性成分,采用Discovery Studio、Pymol软件分析结合最好的蛋白复合体的相互作用力。筛选出具有较好结合活性的化合物9个,其中Caulophyllumine A、(+)-reticuline、Magnolamide、caulophylline A、caulophylline B具有多靶标活性;蛋白复合体的分析结果显示氢键、疏水作用力在对接中发挥着重要作用。为中药红毛七抗炎活性成分的研究提供了参考,也为中药多靶点作用的研究提供了理论依据。

关键词:红毛七;生物碱;抗炎;分子对接;多靶点

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1671-931X (2021) 06-0096-06

DOI: 10.19899/j.cnki.42-1669/Z.2021.06.019

红毛七为小檗科植物红毛七 *Caulophyllum robustum* Maxim. 的根及其根茎,又名类叶牡丹、葳严仙、红毛三七、海椒七、金丝七、鸡骨升麻、红毛细辛等,主要分布于黑龙江、山西、辽宁、甘肃、河北等地,生于海拔高达950—3500米的山沟阴湿处、林下或竹林下,为“太白七药”之一。《全国中草药汇编》《民间常用草药汇编》《陕西中草药》《贵州草药》中均记载红毛七具有祛风除湿、活血化瘀、行气止痛之功效。现代药理研究表明,红毛七具有抗炎镇痛活性^[1-4],但是确切的抗炎活性靶点和作用机制尚未报道。

计算机辅助药物分子设计(computer-aided drug design, CADD)是利用计算机化学基本原理,通过模拟药物与受体生物大分子的相互作用,合理设计新型先导化合物的药物设计方法,它的使用极大地减

少了新药创制的盲目性和偶然性。在药物设计中,分子对接技术处于关键性地位。根据配体与受体作用的“锁匙原理”,分子对接可以有效地确定与靶受体活性部位空间和电性特征相匹配的小分子化合物;目前,计算机辅助药物设计已广泛运用于中药及其复方药效的物质基础和分子机制的研究。本研究基于分子对接技术,从红毛七中生物碱类化合物中筛选抗炎活性的天然配体和可能的作用靶点,为红毛七抗炎作用机制研究提供理论基础和参考。

一、材料与方法

(一)材料来源

蛋白质数据库(PDB, 网址: <http://www.rcsb.org/pdb>);小分子化合物结构(PubChem, 下载网址:

收稿日期: 2021-06-17

基金项目: 2020年武汉职业技术学院校级重点项目“基于P38MAPK信号通路的红毛七抗炎活性成分研究”(项目编号: 2020YK041)。

作者简介: 袁桥玉(1981-),女,湖北宜都人,武汉职业技术学院生物工程学院副教授,研究方向:天然药物物质基础及作用机制。

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/); 中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP, 网址: http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php); Sybyl 1.0 软件(美国 Tripos 公司); Discovery Studio 2017 R2 Client(DS, 美国 Accelrys 公司开发, https://www.3dsbiovia.com/); Pymol 1.8 软件。

(二) 方法

1. 配体的准备

以“红毛七”作为关键词,从 TCMSP 数据库中搜索生物碱类化学成分,从 Pubchem 数据库下载相应化合物结构,用 Chem3D 转为 mol2 格式,建立配体小分子化合物库,见表 1。所有配体小分子均采用分子力学程序 Minimize 进行结构优化,赋予 Tripos 力场及加载 Gasteiger-Huckel 电荷,优化后得到的稳定构象保存为 mol2 格式,为分子对接做准备。

表 1 小分子配体信息

配体分子编号	中文名	CAS 号
1	Magnoflorine	2141-09-5
2	Caulophyllumine A	1009318-60-8
3	Caulophyllumine B	1009318-61-9
4	acetophenone	23837-54-9
5	Caulophylline E	1359978-59-8
6	epimedipine	1395046-62-4
7	(+)-reticuline	485-19-8
8	Magnolamide	212703-85-0
9	4-4'-Diphenylmethane-bis(methyl) Carbamate	7450-63-7
10	(-)-magnocurarine	6801-40-7
11	columbamine	3621-36-1
12	Anagryne	486-89-5
13	2-4'-Diphenylmethane-bis(methyl) Carbamate	78948-89-7
14	obtucarbamate A	6935-99-5
15	caulophine	1159989-19-1
16	caulophylline A	1359978-54-3
17	caulophylline B	1359978-55-4
18	caulophylline C	1359978-57-6
19	caulophylline D	1359978-58-7
20	Baptifoline	732-50-3
21	Taspine	602-07-3
22	N-Methylcytisine	486-86-2
23	Thalictroidine	248259-06-5
24	Boldine	476-70-0
25	Cytisine	485-35-8
26	O-acetylaptifolin	77077-09-9

2. 靶点的准备

根据文献报道^[5-11]选取了 7 个与炎症相关的靶点蛋白作为受体,从 PDB 数据库中搜索目标靶蛋白并下载晶体结构,具体蛋白靶点见表 2。对下载的靶蛋白在 Sybyl 软件中用 Application 中的 Docking 模块进行修饰、加氢,加电荷;并根据靶蛋白复合物中的配体确定对接的活性位点,并将处理好的蛋白保存,为后续分子对接研究做准备。

表 2 对接研究使用的受体蛋白

序号	PDB ID	名称	缩写
	4EM9	过氧化物酶体增殖物激活受体 γ	PPAR γ
	1A9U	p38 丝裂原活化蛋白激酶	P38
	1CX2	环氧化酶-2	COX-2
	3L5S	巨噬细胞迁移抑制因子	MIF
	1M9T	诱导性一氧化氮合酶	iNOS
	3RZF	I κ B 激酶 β	IKK β
	2AZ5	肿瘤坏死因子	TNF α

3. 分子对接

以 26 个生物碱类化合物为配体,以 7 个抗炎作用的靶点为受体,利用 sybyl1.0 软件 Surflex-dock 模块进行分子对接,对接的结果以打分函数 Total Score 给出。Total Score 用来反应配体与受体的亲和力大小,它综合考虑到了极性作用、疏水作用、焓和溶剂化等因素,该值越大,对接复合物越稳定,说明小分子配体与大分子蛋白质结合的越好。Total Score ≥ 7 认为小分子配体与靶点蛋白结合活性较好^[12]。

4. 数据分析与图像处理

采用 Discovery Studio 软件中 Receptor-Ligand Interactions 模块及 Pymol1.8 软件对分子对接结果进行分析,并制作靶点蛋白与配体复合物作用的二维和三维效果图。

二、结果

(一) 分子对接结果

从 26 个红毛七生物碱小分子配体与靶蛋白对接结果分析筛选出具有较好结合活性的化合物 9 个,分别为: Caulophyllumine A、acetophenone、(+)-reticuline、Magnolamide、4-4'-Diphenylmethane-bis(methyl) Carbamate、caulophine、caulophylline A、caulophylline B、caulophylline D。其中 Caulophyllumine A、(+)-reticuline、Magnolamide、caulophylline A、caulophylline B 与多个靶蛋白有结合活性。Caulophyllumine A、4-4'-Diphenylmethane-bis(methyl) Carbamate、caulophine、caulophylline B、caulophylline D 与巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)结合最好,acetophenone、(+)-reticuline、Magnolamide 与环

氧化酶 2(COX2) 结合最好, caulophylline A 与 p38 丝裂原活化蛋白激酶结合最好,该结果表现出的多成分对多靶点共同作用的特点,为阐述红毛七抗炎作用机制研究提供了理论基础,各成分也可作为相应靶蛋白抑制剂的先导化合物加以研究。红毛七生物碱类成分与靶蛋白具体对接结果见表 3。

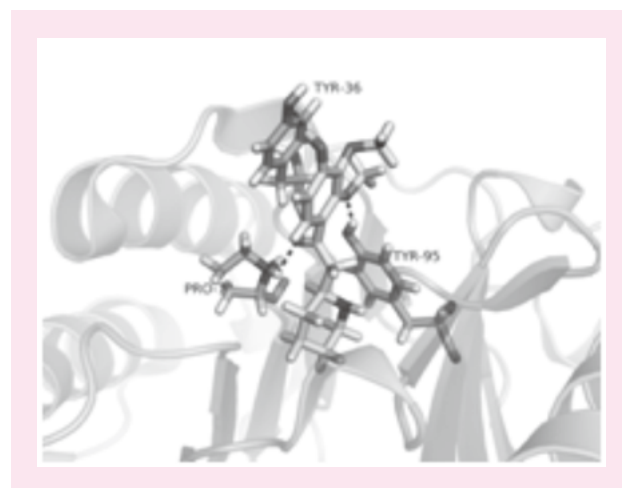
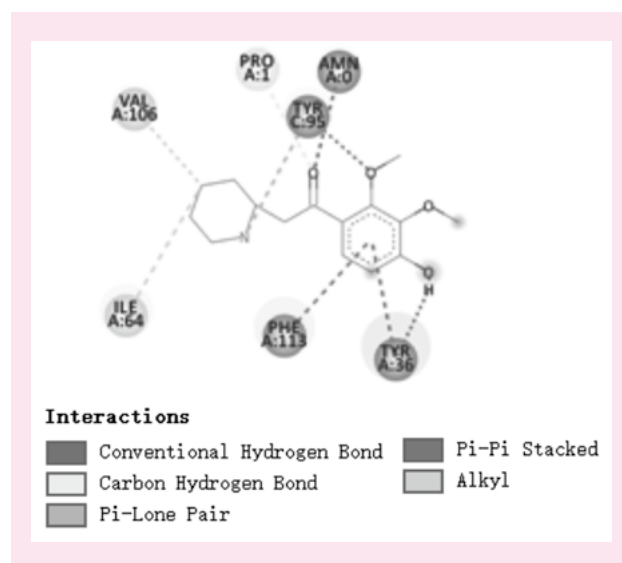
表 3 红毛七生物碱成分与靶蛋白对接结果

化合物编号	靶蛋白						
	4EMA	1A9U	1CX2	3L5S	1M9T	3RZF	2AZ5
1	4.8119	5.9236	4.0322	5.3272	4.3734	3.7937	4.4157
2	5.9623	7.9517	7.0731	8.2871	6.3960	4.5627	5.0492
3	3.3265	4.7737	5.8405	6.1204	3.6702	3.5807	4.7750
4	5.6881	6.2375	8.2109	6.8725	5.0380	5.0103	5.7651
5	5.2506	5.0133	4.0825	5.8727	4.2034	4.3387	5.1567
6	4.2575	4.3594	3.4176	7.2392	4.0613	5.1616	6.1615
7	6.1473	5.7183	8.8176	5.4265	7.2746	6.4036	4.2408
8	7.5939	7.6598	8.1374	7.3970	7.1661	7.2479	6.4299
9	7.2558	5.3362	4.6394	7.5806	4.2108	6.4751	5.5039
10	3.5238	4.8427	4.2485	5.5814	4.5275	4.1956	4.0457
11	4.9118	5.1324	3.5674	5.3190	4.4537	5.0419	5.1861
12	3.1370	3.8589	-0.0612	3.3045	3.4484	4.1523	3.9761
13	5.6727	4.8405	6.2337	5.1993	4.5457	4.7158	5.2112
14	4.5233	5.3573	5.9872	5.9292	2.8922	3.7868	4.7839
15	6.5228	6.8983	5.7146	9.2361	6.2461	4.6253	6.8423
16	5.0699	8.2443	6.2709	7.7389	5.6277	6.2728	7.3266
17	5.3428	6.1733	7.8317	9.3582	5.7138	5.7304	7.0621
18	6.3719	5.5061	2.9077	3.6898	4.8476	5.4876	6.3579
19	5.4113	6.2071	2.9898	7.9763	4.4877	5.3217	5.0319
20	3.0546	4.7561	2.3036	2.7734	3.0277	3.8265	3.5013
21	3.6041	6.1156	5.5361	4.0447	4.1012	5.8267	5.5987
22	3.5574	2.9658	3.6645	2.8337	2.7711	2.6921	3.2148
23	5.2917	5.4981	6.7686	5.8146	3.9778	4.0129	4.8530
24	5.8102	4.4887	5.4758	5.1818	4.6361	4.8260	5.1176
25	3.8768	3.3982	3.2546	3.2139	2.9734	3.0560	3.2416
26	3.8768	3.3982	3.2546	3.2139	2.9734	3.0560	3.2416

(二) 对接结果分析

1.Caulophyllumine A 与巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)相互作用

Caulophyllumine A 与 7 个靶蛋白进行分子对接后,与巨噬细胞迁移抑制因子结合最好, Total score 为 8.2871,其对接效果如图 1。



A. Caulophyllumine A 与巨噬细胞迁移抑制因子作用的二维图

B. Caulophyllumine A 与巨噬细胞迁移抑制因子的蛋白复合体三维作用图

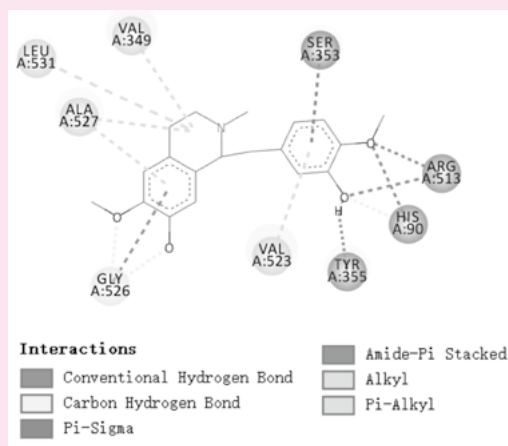
图 1 Caulophyllumine A 与巨噬细胞迁移抑制因子分子对接作用图

从图 1 可以看出, Caulophyllumine A 与 TYR36、TYR95、AMN0 形成了氢键,同时 Caulophyllumine A 与 VAL106、ILE64、PHE113、TYR36 具有疏水作用力。

2.(+)-reticuline 与环氧合酶-2 相互作用

(+)-reticuline 与 7 个靶蛋白进行分子对接后,与环氧合酶-2 结合最好, Total score 为 8.8176,其对接效果如图 2。

从图 2 可以看出,疏水相互作用在此对接中起重要作用,同时 (+)-reticuline 与 ARG513、HIS90、TYR355 形成了氢键,与 GLY526 形成了 C-H 键。



A. (+)-reticuline 与环氧合酶-2 作用的二维图

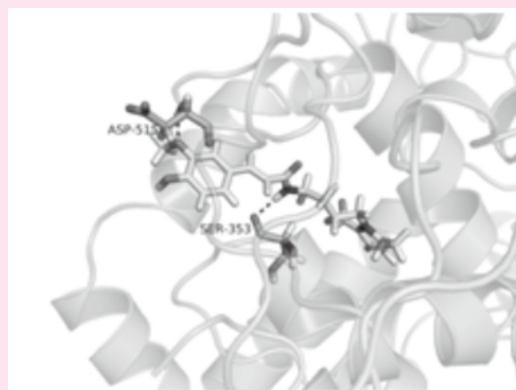
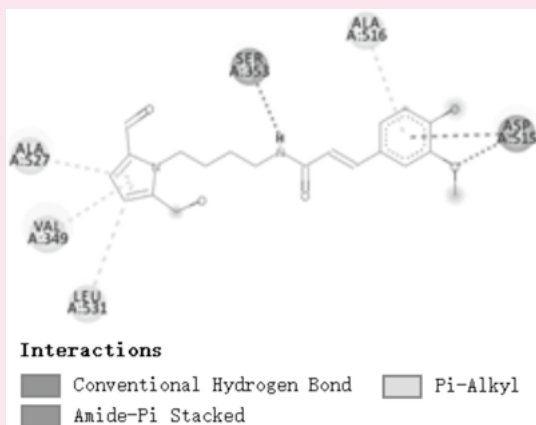
B. (+)-reticuline 与环氧合酶-2 的蛋白复合体三维作用图

图2 (+)-reticuline 与环氧合酶-2 分子对接作用图

3. Magnolamide 与环氧合酶-2 相互作用

Magnolamide 与 7 个靶蛋白进行分子对接后,与环氧合酶-2 结合最好, Total score 为 8.1374,其对接效果如图 3。

从图 3 可以看出,疏水相互作用力在此对接中起重要作用,同时 Magnolamide 与 SER353、ASP515 形成了氢键。



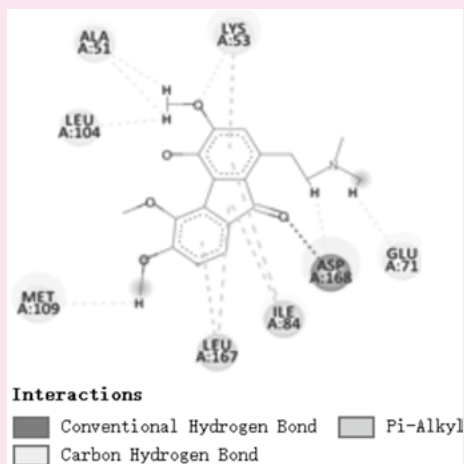
A. Magnolamide 与环氧合酶-2 作用的二维图

B. Magnolamide 与环氧合酶-2 作用的蛋白复合体三维作用图

图3 Magnolamide 与环氧合酶-2 分子对接作用图

4. caulophylline A 与 p38 丝裂原活化蛋白激酶相互作用

caulophylline A 与 7 个靶蛋白进行分子对接后,与 p38 丝裂原活化蛋白激酶结合最好, Total score 为 8.2443,其对接效果如图 4。



A. caulophylline A 与 p38 丝裂原活化蛋白激酶作用的二维图

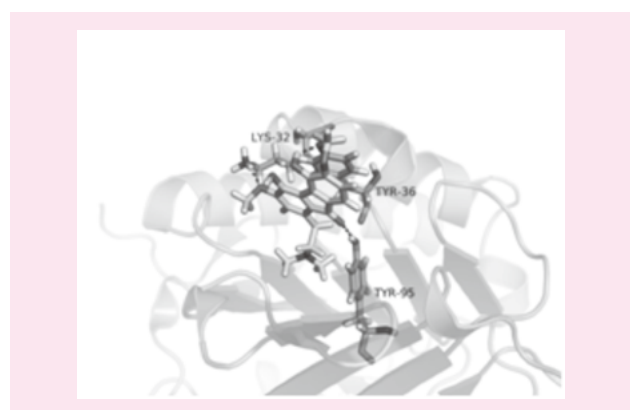
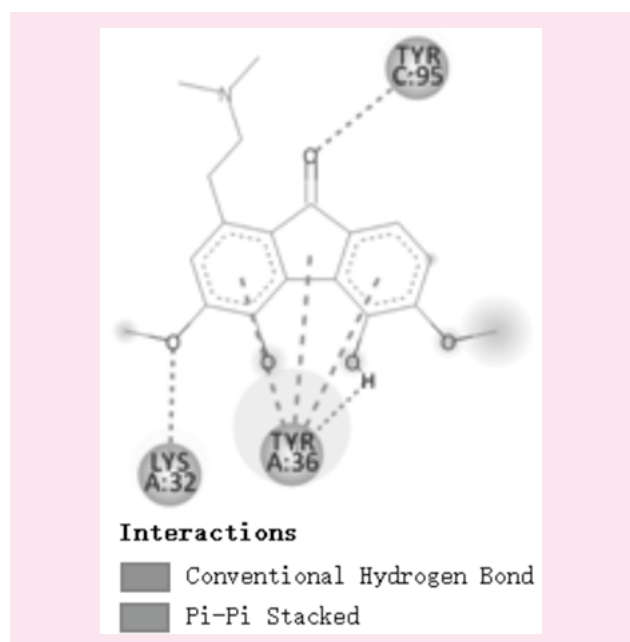
B. caulophylline A 与 p38 丝裂原活化蛋白激酶的蛋白复合体三维作用图

图4 caulophylline A 与 p38 丝裂原活化蛋白激酶分子对接作用图

从图4可以看出,疏水相互作用力在此对接中起重要作用,同时caulophylline A与ASP168形成了氢键,与ALA51、LYS53、LEU164、MET109、GLU71、ASP168形成了C-H键。

5.caulophylline B与巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)相互作用

caulophylline B与7个靶蛋白进行分子对接后,与巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)结合最好,Total score为9.3582,其对接效果如图5。



A.caulophylline B与巨噬细胞迁移抑制因子作用的二维图

B.caulophylline B与巨噬细胞迁移抑制因子的蛋白复合物三维作用图

图5 caulophylline B与巨噬细胞迁移抑制因子分子对接作用图

从图5可以看出,疏水相互作用力在此对接中起重要作用,caulophylline B与TYR36形成了 $\pi-\pi$ 堆积;同时与LYS32、TYR36、TYR95形成了氢键。

三、结论

中药具有多组分、多途径、多靶点、多效应的作

用特点,通过作用于体内相关的多通路多靶点,产生比单靶点更好的治疗效果,而传统的方法难以阐释多组分作用机制。分子对接是一项广泛应用的计算机虚拟筛选技术。利用分子对接技术有利于预测中药及其有效成分的作用靶点,在分子层面阐明其具体作用机制。与传统药物研究方法相比,计算机虚拟筛选技术在药效成分作用机制方面表现出其独特的优越性,不仅提高了研究效率,还减少了新药创新所需要的人力物力,提高了先导化合物的发现率和成药的可能性。

本研究以炎症信号通路的关键靶点PPAR γ 、P38、COX-2、MIF、iNOS、IKK β 、TNF α 为靶蛋白,对红毛七中生物碱类成分进行分子对接筛选。结果发现9个潜在的活性化合物,其中Caulophyllumine A、(+)-reticuline、Magnolamide、caulophylline A、caulophylline B 5个化合物具有多靶点抗炎作用,验证了红毛七在抗炎作用中,表现出多成分对多靶点共同作用的特点。通过对蛋白复合物相互作用力的分析,证实氢键和疏水作用力在对接中起着重要的作用。同时,通过分析发现,Caulophyllumine A、Caulophylline B与巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)对接中,均与TYR36、TYR95氨基酸残基形成了氢键,同时都与TYR36氨基酸残基具有疏水作用力。说明TYR36、TYR95氨基酸残基为关键作用位点。(+)-reticuline、Magnolamide在与环氧合酶-2对接中,均与ALA527、VAL349、LEU531氨基酸残基具有疏水作用力,说明ALA527、VAL349、LEU531氨基酸残基为关键作用位点。

综上所述,Caulophyllumine A、(+)-reticuline、Magnolamide、caulophylline A、caulophylline B可能是红毛七中生物碱抗炎主要活性成分。本研究为阐述红毛七抗炎活性机制奠定了基础,为后期进一步的生物活性实验提供了有价值的线索和方向。同时也为寻找治疗抗炎新型药物及中药现代化研究提供一定的参考和借鉴。

参考文献:

- [1] 宋立人,洪恂.现代中药学大辞典:(上)[M].北京:人民卫生出版社,2001:934-935.
- [2] 李晓春,王莉芳,徐长根.红毛七的抗炎、镇痛作用研究[J].中国医药导报,2017,(25):26-29.
- [3] 江苏新医学院.中药大辞典[M].上海:上海人民出版社,1977.
- [4] 宋小妹,刘海静.太白七药研究与应用[M].北京:人民卫生出版社,2011.
- [5] 张金杰,吕文文,孙迎东,等.野菊花中黄酮类成分抗炎活性的虚拟筛选[J].药学研究,2018,(10):565-571.
- [6] 张浩,管金行,龙伟,等.基于分子对接方法的中药抗炎机制研究[J].医药导报,2012,(12):1542-1546.

- [7] Qing S, Li C, Wen J H, et al. A review of inflammatory signaling pathway regulated acupuncture[J]. World Journal of Acupuncture-Moxibustion, 2016, (2): 63-69.
- [8] 高世超, 殷海波, 刘宏潇, 等. MAPK信号通路在骨关节炎发病机制中的研究进展[J]. 中国骨伤, 2014, (5): 441-444.
- [9] Haoyang Li, Sheng Wang, Zhe Qian, et al. MKK6 from pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* is responsive to bacterial and WSSV infection[J]. Molecular Immunology, 2016.
- [10] 张浩浩, 叶晓川, 胡春玲, 等. 菝葜中抗炎活性成分的虚拟筛选[J]. 湖北中医药大学学报, 2018, (5): 44-47.
- [11] 朱锐灵, 沈悦, 马飞鸿, 等. 分子对接技术在中药抗炎活性成分筛选和作用机制研究中的应用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2018, (6): 497-506.
- [12] 宋小地, 翟西峰, 冯家星, 等. 桑白皮和桑叶中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的虚拟筛选[J]. 中国药房, 2017, (4): 508-511.
- [责任编辑: 鞠守勇]

Virtual Screening of Anti-inflammatory Activity of Alkaloids from *Rhizoma Polygonati*

Yuan Qiaoyu

(Wuhan Polytechnic, Wuhan 430074, China)

Abstract: Computer-aided drug design is used to find the anti-inflammatory alkaloid active ingredients of *Rhizoma Polygonati*. Using “Hongmaoqi” as a keyword, first search for alkaloids in the TCMSP database, and download the corresponding compound structure from the Pubchem database. Then download 7 target proteins with clear anti-inflammatory effects from the protein database, use the protein preprocessing tool in Sybyl software to determine the active area, apply the Surflex-dock module to molecular docking of small molecules and target proteins, and screen by TotalScore scoring function To extract the active ingredients, use Discovery Studio and Pymol software to analyze the interaction force of the protein complex with the best binding. 9 compounds with good binding activity were screened out, among which Caulophyllumine A, (+)-reticuline, Magnolamide, caulophylline A, and caulophylline B have multi-target activity. The analysis results of protein complexes show that hydrogen bonds and hydrophobic forces play an important role in docking. This provides a reference for the research on the anti-inflammatory active ingredients of the traditional Chinese medicine Hongmaoqi, and also provides a theoretical basis for the research on the multi-target effects of traditional Chinese medicine.

Keywords: *Rhododendron morifolium*; alkaloids; anti-inflammatory; molecular docking; multiple targets