

鄂产党参抗炎活性成分研究

袁桥玉¹, 刘新桥²

(1. 武汉职业技术学院 生物工程学院, 湖北 武汉 430074;

2. 中南民族大学 药学院, 湖北 武汉 430074)

摘要: 利用分子对接技术对鄂产党参中抗炎活性成分进行筛选。在 TCMSP 数据库中搜索其主要化学成分, 应用 Sybyl 软件将化学成分与炎症相关的 5 个靶点进行分子对接, 通过对接打分函数筛选出活性成分。采用 Discovery Studio、Pymol 软件分析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 10 个, 且具有多靶标活性。检测化合物党参二炔苷 L 和党参乙醇提取物对细胞中一氧化氮的影响, 进一步验证抗炎活性。

关键词: 鄂产党参; 抗炎活性; 分子对接; 多靶点; 一氧化氮

中图分类号: G712

文献标识码: A

文章编号: 1671-931X (2024) 04-0059-06

DOI: 10.19899/j.cnki.42-1669/Z.2024.04.009

59

武汉职业技术学院学报二〇二四年第二十三卷第四期(总第一百三十二期)

党参为桔梗科植物川党参 *Codonopsis tangshen* Oliv.、党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. 和素花党参 *Codonopsis pilosula* Nannf. var. *modesta* (Nannf.) L.T.Shen. 的干燥根^[1]。湖北省党参种植历史悠久, 为“板桥党参”重要的道地产区, 其基原植物为川党参, 具有健脾益肺, 养血生津之功效。现代药理研究表明, 鄂产党参中的化学成分具有抗炎活性^[2-4], 但确切的抗炎作用机制尚未深入研究。

目前, 分子对接技术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^[5-6]。本研究基于该技术, 从鄂产党参中筛选抗炎活性的天然化学成分和可能的作用靶点, 同时通过 RAW264.7 细胞的 NO 试验进一步证实机制筛选的准确性和可靠性, 为鄂产党参抗炎作用机制研究提供理论基础和参考。

一、材料和方法

(一) 研究工具

蛋白数据库(PDB, 网址: <http://www.Rcsb.org/pdb>); 小分子数据库(PubChem, 网址: <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); Discovery Studio2017 R2 Client(DS, 美国, 网址: <https://www.3dsbiovia.com>); PyMOL 软件。

(二) 小分子配体准备

在 TCMSP 数据库中搜索其主要化学成分, 从 Pubchem 数据库中下载相应化合物结构, 转化成 3D 结构的 mol2 格式, 构建小分子配体数据库。导入 SYBYL 软件后采用分子力学程序 Minimize 进行结构优化, 赋予 Tripos 力场及加载 Gasteiger-Huckel 电荷, 得到的稳定构象保存 mol2 格式, 化合物见表 1。

收稿日期: 2024-03-06

基金项目: 2023 年武汉职业技术学院校级项目“鄂产党参调控 MIF/ERK 信号通路的抗炎活性成分及作用机制研究”(项目编号: 2023YK003)。

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; 刘新桥(1978—), 男, 湖北武汉人, 中南民族大学药学院教授, 研究方向: 天然药物化学。

(三)靶点准备

查阅文献^[7-9],选取5个与炎症相关的靶点,靶点信息如表2所示。从PDB蛋白数据库中下载目标蛋白的晶体结构,将下载的靶蛋白导入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其对接的活性位点,最后将处理好的靶蛋白保存。

(四)分子对接

将优化后的结构导出并保存至Database中。

再导入蛋白晶体并去除配体、水分子和硫酸根等,再进行加氢和修复残基,产生结合口袋后用surflex-dock模块与小分子进行对接,根据打分函数(total-score)评估化合物的活性,打分函数越高说明蛋白质与分子之间的相互作用能量就越强,化合物能很好地适应蛋白质内的结合位点。Total Score ≥ 7认为两者之间具有较强的结合活性。将结合活性强的复合物采用DS和Pymol软件绘制成2D和3D图进行作用力分析。

表1 小分子配体信息

序号	中文名	英文名
1	党参炔苷	lobetyolin
2	党参炔醇	lobetyol
3	十四醇-反式,反式-6,12-二烯-8,10-二炔-1,5,14-三醇	Tetradeca-trans,trans-6,12-diene-8,10-diyne-1,5,14-triol
4	(4E,12E)-十四碳-4,12-二烯-8,10-二炔-1,6-二醇	(4E,12E)-tetradeca-4,12-dien-8,10-diyne-1,6-diol
5	党参二炔苷A	codonopilodiynoside A
6	党参二炔苷B	codonopilodiynoside B
7	党参二炔苷C	codonopilodiynoside C
8	党参二炔苷H	codonopilodiynoside H
9	党参二炔苷L	codonopilodiynoside L
10	党参二炔苷M	codonopilodiynoside M
11	(+)-(2R,7S)-1,7-二羟基-2,7-环十四碳-4,8,12-三烯-10-炔-6-酮	(+)-(2R,7S)-1,7-dihydroxy-2,7-cyclotetradeca-4,8,12-trien-10-yn-6-one
12	(E)-八碳-6-烯-4-炔酸	(E)-oct-6-en-4-ynoic acid
13	(+)-(6R,7R,12E)-十四碳-12-烯-10-炔-1,6,7-三醇	(+)-(6R,7R,12E)-tetradeca-12-en-10-yne-1,6,7-triol
14	(2E,6E)-八碳-2,6-二烯-4-炔酸	(2E,6E)-octa-2,6-dien-4-ynoic acid
15	党参炔苷宁	lobetyolinin
16	党参烯炔苷A	codonopiloenynenoside A
17	党参烯炔苷B	codonopiloenynenoside B
18	9-(四氢吡喃-2-基)-九碳-反式-2,8-二烯-4,6-二炔-1-醇	9-(tetrahydropyran-2-yl)-non-trans-2,8-diene-4,6-diyn-1-ol
19	9-(四氢吡喃-2-基)-九碳-反式-8-烯-4,6-二炔-1-醇	9-(tetrahydropyran-2-yl)-non-trans-8-ene-4,6-yn-1-ol
20	(5E,7S,8R,13E)-7,8-二羟基十五碳-5,13-二烯-9,11-二炔酸	(5E,7S,8R,13E)-7,8-dihydroxypentadeca-5,13-dien-9,11-diynoic acid
21	(4E,12E)-6,7-二羟基十四碳-4,12-二烯-8,10-二炔-1-乙酸酯	(4E,12E)-6,7-dihydroxytetradeca-4,12-dien-8,10-diyn-1-yl acetate
22	(2E,4E,12E)-2-亚乙基-6,7-二羟基十四碳-4,12-二烯-8,10-二炔	(2E,4E,12E)-2-ethylidene-6,7-dihydroxytetradeca-4,12-dien-8,10-diynal
23	(E)-十四碳-12-烯-8,10-二炔-1,6,14-三醇	(E)-tetradeca-12-en-8,10-diyn e-1,6,14-triol

表 2 靶点信息

序号	PDB ID	名称	缩写
1	1nme	胱天蛋白酶 3	CASP3
2	2w96	细胞周期蛋白 D1	CCND1
3	2xkn	表皮生长因子受体	EGFR
4	2ofv	淋巴细胞特异蛋白酪氨酸激酶	LCK
5	4u5j	SRC 原癌基因非受体酪氨酸激酶	SRC

(五) 材料与试剂

DMEM 培养基、PBS 磷酸盐缓冲液购于美国 Gibco 公司, DMSO、LPS(脂多糖)购于美国 sigma 公司, 一氧化氮试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司, 胎牛血清购于浙江天杭生物科技股份有限公司, RAW264.7 细胞购自武汉大学细胞典藏中心, 党参乙醇提取物及党参二炔苷 L(实验室自制)。

(六) 化合物对 LPS 诱导的 R AW264. 7 释放 NO 水平的影响

将 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板中(每孔 1×10^4 个细胞), 每孔 100 μ L。试验设置对照组(仅含培养基), LPS 组(添加浓度为 0.2 μ g \cdot mL - 1LPS 的培养基), 样品组和阳性对照组(SMT),

每组设置 3 个重复孔。在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的环

境下孵育 24 h 后, 收集上清液用 Griess 法测定 NO 含量, 用酶标仪检测 540 nm 下的吸光度。

二、结果

(一) 分子对接结果

将 23 个小分子配体化合物与 5 个靶蛋白进行分子对接, 筛选出具有较好结合活性的化合物 10 个, 且具有多靶标活性, 其中(5E,7S,8R,13E)-7,8-二羟基十五碳-5,13-二烯-9,11-二炔酸与 CASP3 结合最好; 党参烯炔苷 A 与 CCND1 结合最好; 党参二炔苷 H 与 EGFR 结合最好; 党参二炔苷 L 与 LCK 结合最好; 党参烯炔苷 A 与 SRC 结合最好。该结果表现出的多成分对靶标点的共同作用的特点, 为阐述鄂产党参抗炎作用机制研究提供了理论基础, 各成分也可作为靶蛋白抑制剂先导化合物加以研究。鄂产党参化学成分与靶蛋白具体对接结果见表 3 所示; 相互作用力分析见图 1-3。

(二) 分子对接分析

化合物 20(5E,7S,8R,13E)-7,8-二羟基十五碳-5,13-二烯-9,11-二炔酸与 CASP3 结合最好, 对接得分为 7.8371, 其对接效果, 如图 1 所示。从图 1a 可以看出, 化合物 20 与 ALA162、TYR204、ASN208、SER251、ASP253、PHE256 形成了氢键, 与残基 ARG64、SER120、HIS121、GLN161、CYS163 之间有疏水相互作用力。

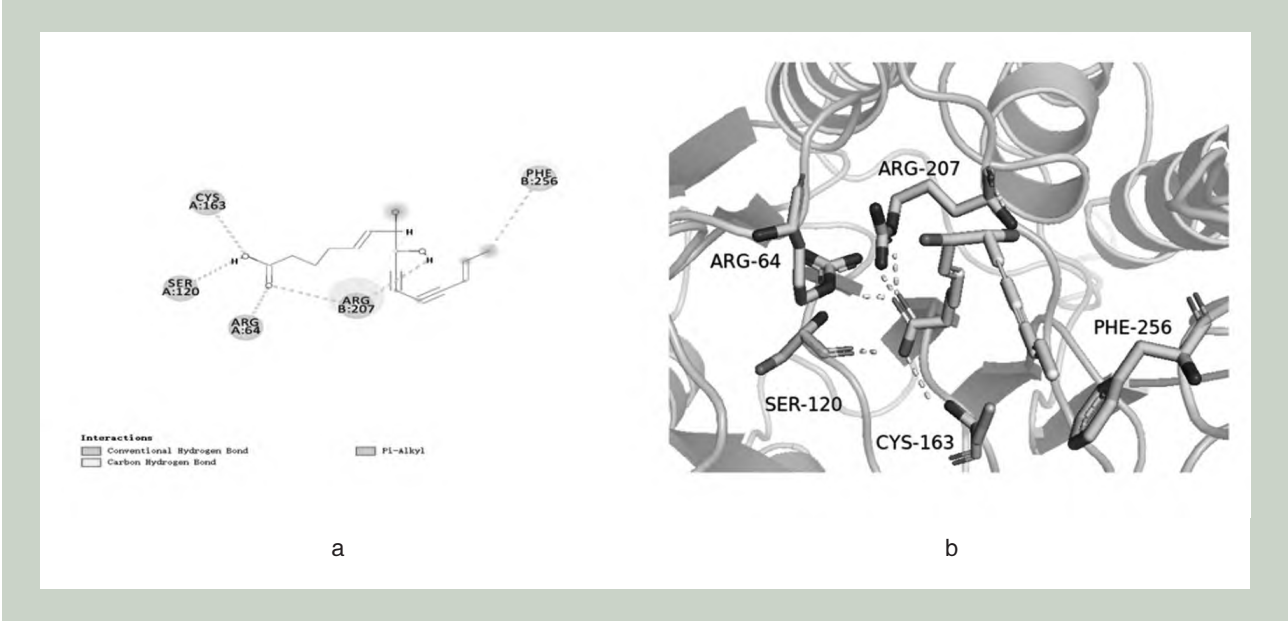


图 1 化合物 20 与 CASP3 分子对接效果图

化合物 16 党参烯炔苷 A 与 CCND1 结合最好, 对接得分为 8.1745, 其对接效果, 如图 2 所示。从图

2a 可以看出, 化合物 16 与 THR37、PRO40、SER41、ARG61、ALA65 形成了氢键, 与残基 ARG87、

袁桥玉, 刘新桥: 鄂产党参抗炎活性成分研究

PHE88、SER90、LEU148、LYS149 之间有疏水相互作用力。

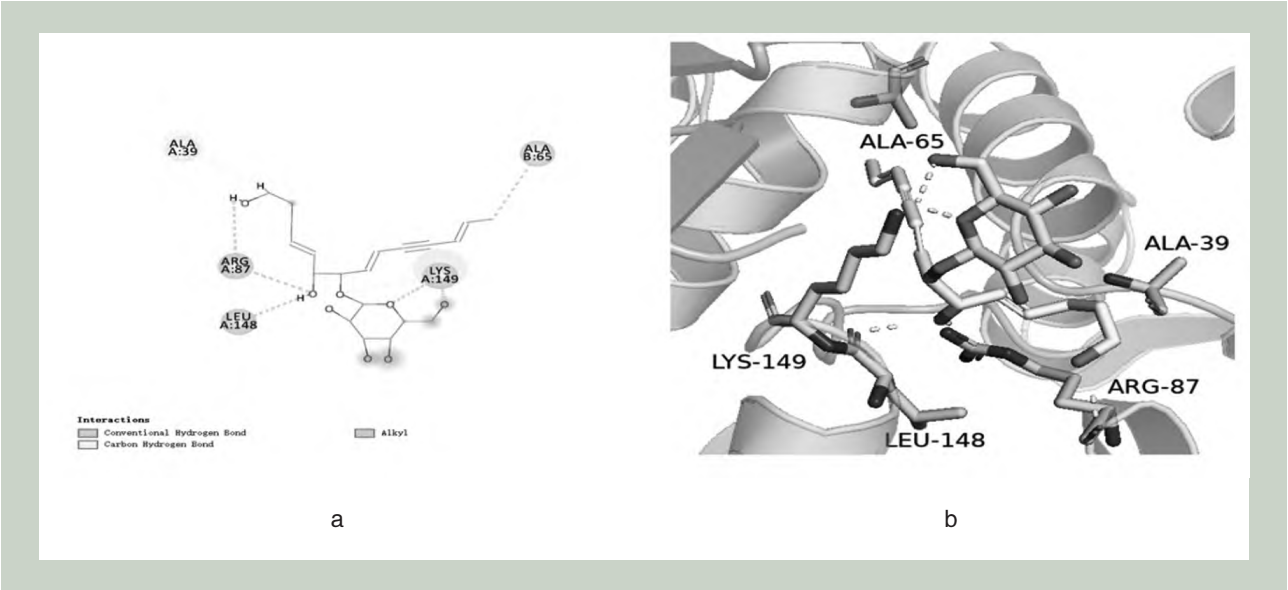


图 2 化合物 16 与 CCND1 分子对接效果图

化合物 9 党参二炔苷 L 与 LCK 结合最好,对接得分为 8.273,其对接效果,如图 3 所示。从图 4a 可以看出,化合物 9 与 LEU251、ALA271、VAL272、ILE314、THR316、ASP382、PHE383 形 成 了 氢键,与 残 基 LYS273、GLU288、MET292、GLU317、TYR318、GLY322、SER323 之间有疏水相互作用力。

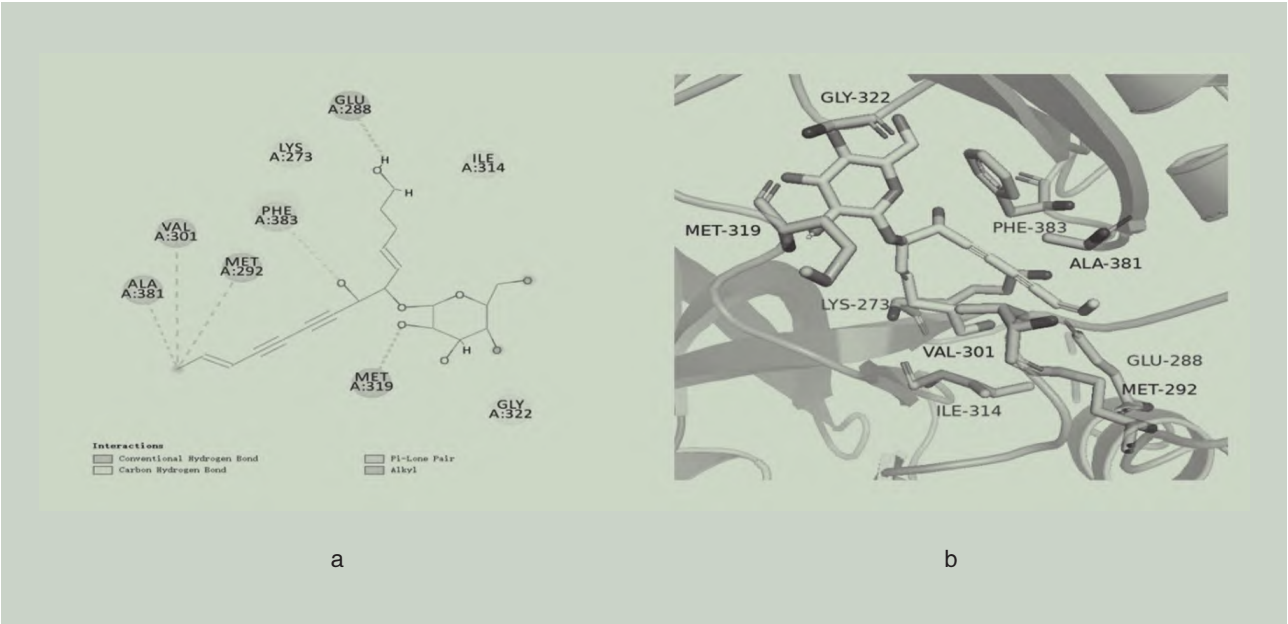


图 3 化合物 9 与 LCK 分子对接效果图

表 3 小分子配体与靶点对接结果

序号	CASP3(1nme)	CCND1(2w96)	EGFR(2xkn)	LCK(2ofv)	SRC(4u5j)
1	7.5316	5.3559	6.1268	6.5859	7.3232
2	7.6726	5.5587	5.2449	5.4792	4.7213
3	4.8733	7.1435	7.4177	8.0984	6.5131

续表

序号	CASP3(1nme)	CCND1(2w96)	EGFR(2xkn)	LCK(2ofv)	SRC(4u5j)
4	5.3577	4.8806	4.8561	5.6322	5.1729
5	7.1029	7.5517	7.0368	8.0467	6.0652
6	3.6917	4.8849	6.1015	4.9932	5.7876
7	5.4206	7.3601	6.1785	6.0454	7.4205
8	4.6919	7.3757	7.5227	6.0475	6.3981
9	4.9763	5.5965	6.5494	8.2730	7.2888
10	5.2903	6.8191	6.8268	6.1236	6.6338
11	7.5235	5.4866	4.2911	5.0444	4.6506
12	5.1662	2.8276	3.8164	4.2024	4.4346
13	7.0559	6.5327	7.4891	7.4922	6.4445
14	4.6154	2.6554	2.4326	3.6396	3.7745
15	5.7716	3.8103	3.6265	4.3055	4.5306
16	4.6665	8.1745	5.7702	6.4414	7.4676
17	4.6192	4.1731	6.6148	7.9519	5.4278
18	3.6835	4.5311	3.0353	6.6038	4.1398
19	5.5505	3.8171	3.9793	7.2999	4.9084
20	7.8371	5.9346	7.4854	6.1783	7.4197
21	7.4388	7.1803	5.809	7.1016	7.0584
22	4.9168	3.7125	4.6303	6.6264	5.9196
23	3.4203	5.4043	3.5135	7.8841	4.4569

(三)NO 实验结果

检测化合物党参二炔苷 L(给药浓度为 15 μ M),党参乙醇提取物(给药浓度为 200 μ g· mL⁻¹)对细胞中一氧化氮的影响,进一步验证化合物的抗炎活性。对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞 NO 释放量具有抑制活性,结果见表 4。

表 4 化合物对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞产生 NO 的抑制作用

序号	化合物名称	抑制率(%)
1	党参提取物	72.5
2	党参二炔苷 L	75.6
3	SMT	83.7

三、结论

本研究运用 SYBYL 软件中的 Surflexdock 模块对鄂产党参中的 23 个化学成分与 5 个炎症靶点进行分子对接,应用 Discovery Studio 软件对对接结果最好的蛋白复合物进行了相互作用力分析,说明形成氢键和疏水作用在分子对接中起着重要的作用,并通过 Griess 法检测党参乙醇提取物及化合物党参二炔苷 L 对细胞中一氧化氮(nitricoxide,NO)的影响,进一步验证了鄂产党参的抗炎活性。

参考文献:

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:中国医药科技出版社,2020.
[2] 杨鹏飞,楚世峰,陈乃宏.党参的药理学研究进展及其

袁桥玉,刘新桥:鄂产党参抗炎活性成分研究

抗脑缺血再灌注损伤的机制[J].湖南中医药大学学报,2015(12):5-10.

[3] 李力恒,陈昌瑾,胡晓阳,等.党参的化学成分及药理作用研究进展[J].中医药学报,2023(3):112-115.

[4] 黄圆圆,张元,康利平,等.党参属植物化学成分及药理活性研究进展[J].中草药,2018(1):239-250.

[5] 吴坚,薛晓燕,王丽芳,等.分子对接方法应用与发展[J].亚太传统医药,2013(12):80-81.

[6] 王文军,丁一,窦芳,等.分子对接在中药药效物质筛选及作用机制研究中的应用进展[J].中国药师,2018(6):76-79.

[7] 陈迪路,姚思凡,孙伍慧,等.GC-MS、UPLC-Q-TOF-MS/MS结合网络药理学探讨地锦草药效物质基础及其抗炎作用机制[J].湖南中医药大学学报,2023(12):2238-2248.

[8] 王玥琛,曹桂云,孟兆青,等.基于UPLC-Q-TOF-MS与网络药理学的锦灯笼配方颗粒抗炎、抗肿瘤有效成分的研究[J].扬州大学学报(农业与生命科学版),2023(6):91-102.

[9] 董雯雯,张玉霞,袁小远,等.基于网络药理学与分子对接技术探究辣木叶治疗肠炎的作用机制[J].动物营养学报,2023(12):8053-8073.

[责任编辑:鞠守勇]

Study on Anti-inflammatory Active Components of Codonopsis pilosula produced in Hubei Province

Yuan Qiaoyu¹, Liu Xinqiao²

(1. Wuhan Polytechnic, School of Bioengineering, Wuhan, Hubei, 430074, China;
2. South-Central Minzu University, School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan, Hubei, 430074, China)

Abstract: Screening of anti-inflammatory active components in Codonopsis pilosula produced in Hubei Province by using molecular docking technology. The main chemical components were searched in the TCMSP databases, and molecularly docked with 5 tumor related protein using SYBYL software. The active ingredients were screened based on the docking scoring function. The interaction force of protein complexes were analyzed by Discovery studio and Pymol software, and ten active compounds with good binding activity and multi-target activity were screened out. The effects of compound codonopilodioside L and ethanol extract on nitric oxide(NO) in cells were detected to further verify the anti-inflammatory activity.

Key words: Codonopsis tangshen Oliv; anti-inflammation; molecular docking; multi-target; Nitric oxide