

基于反向分子对接技术的异鼠李素靶标的预测[△]

崔明超^{1,2*}, 陈少军¹, 崔文³, 董珂¹, 江海龙⁴, 周海滨⁴, 凌庆枝^{1#}(1.浙江医药高等专科学校中药学院, 浙江宁波 315100; 2.南京中医药大学药学院, 南京 210046; 3.青岛大学附属医院崂山区, 山东青岛 266003; 4.宁波立华制药有限公司, 浙江宁波 315174)

中图分类号 R962 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)28-3921-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.28.10

摘要 目的:利用反向分子对接技术对异鼠李素的潜在靶标进行预测。方法:采用 idTarget 软件对蛋白质数据库中异鼠李素的潜在靶标进行筛选,利用 PyRx 0.8 软件中的 autodock vina 模块对筛选的结果进行分子对接验证。结果:异鼠李素与硫氧还蛋白还原酶 1、凝血酶、二氢叶酸还原酶、核受体 ROR- α 等 4 种靶蛋白的结合较好,其结合能(ΔG_{pred})分别为 -11.7、-10.34、-10.11、-10.07 kcal/mol;分子对接验证结果显示,异鼠李素与 4 种靶蛋白核心氨基酸具有静电作用力、氢键、范德华力等相互作用。结论:硫氧还蛋白还原酶 1、凝血酶、二氢叶酸还原酶、核受体 ROR- α 可能是异鼠李素的潜在靶标。

关键词 异鼠李素;反向分子对接;靶蛋白;硫氧还蛋白还原酶 1;凝血酶;二氢叶酸还原酶;核受体 ROR- α ;相互作用

Prediction of Isorhamnetin Targets via Reverse Molecular Docking

CUI Mingchao^{1,2}, CHEN Shaojun¹, CUI Wen³, DONG Ke¹, JIANG Hailong⁴, ZHOU Haibin⁴, LING Qingzhi¹(1. School of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang Pharmaceutical College, Zhejiang Ningbo 315100, China; 2. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 3. Laoshan Branch, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Shandong Qingdao 266003, China; 4. Ningbo Liwah Pharmaceutical Co., Ltd., Zhejiang Ningbo 315174, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To predict potential isorhamnetin targets via reverse molecular docking. METHOD: idTarget was used to screen potential targets in the database of isorhamnetin and proteins. The autodock vina in PyRx 0.8 was utilized to verify the results after screening via molecular docking. RESULTS: Isorhamnetin was well combined with 4 kinds of target proteins including thioredoxin reductase 1, thrombin, dihydrofolate reductase and nuclear receptor ROR- α , respectively with ΔG_{pred} of -11.7, -10.34, -10.11 and -10.07 kcal/mol. The results of the verification via molecular docking demonstrated electrostatic interaction, hydrogen bonding interaction and van der Waals force between isorhamnetin and the core amino acids of the 4 kinds of target proteins. CONCLUSIONS: Thioredoxin reductase 1, thrombin, dihydrofolate reductase and nuclear receptor ROR- α may be potential isorhamnetin targets.

KEYWORDS Isorhamnetin; Reverse molecular docking; Target protein; Thioredoxin reductase 1; Thrombin; Dihydrofolate reductase; Nuclear receptor ROR- α ; Interaction

异鼠李素(Isorhamnetin, C₁₂H₁₆O₇)是一种黄酮类成分,广泛存在于白果、车桑仔叶、柽柳、醋柳果、红车轴草、槐角、黄花蒿、喙果绞股蓝、宽叶香蒲、蒲黄、水芹、狭叶香蒲、茵陈蒿等多种药用植物之中,研究证实它具有抗肝毒、抗氧化、抑制脂类过氧化、抑制血小板聚集等多种作用^[1]。浙贝母(*Fritillaria thunbergii* Miq.)传统习用其鳞茎,而浙贝母花为浙贝母植物的干燥带茎梢的花,在临床上已用于治疗咳嗽痰多、支气管炎等症^[2]。目前研究发现浙贝母花含有生物碱、黄酮、挥发油等成分,而异鼠李素是其中一个重要的资源性成分^[3]。

反向分子对接技术是新药研究开发中的一种重要手段。其工作原理是以小分子化合物为探针,在已知结构的靶标数据库中检索可能与之相结合的生物大分子,并通过能量匹配

[△]基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(No.LY15H280009); 2015年度宁波市第二批科技项目(No.2015A610290); 鄞州区 2015 年度第一批农社类科技项目(No.鄞科[2015]69号)

* 讲师,博士研究生。研究方向:中药资源开发。电话:0574-88223287。E-mail:cuime@mail.zjpc.net.cn

通信作者:教授,博士。研究方向:生物技术制药。E-mail:lingqingzhi@sina.com

和空间的调整形成分子复合物,进而预测药物发挥作用的靶标^[4]。因此,一方面,反向分子对接技术可以用于研究某些已经上市销售多年的药物,通过对其分子靶标进一步深入认识,可发现其新的不良反应或者新的临床应用。比如通过此技术,近年来发现传统用来降胆固醇的他汀类药物具有抗肿瘤的作用^[5]。另一方面,由于从中药中分离得到的天然产物的作用机制通常难以阐明,而通过反向分子对接,可以发现其所具有的药效作用并以此阐明中药的作用机制。

笔者以异鼠李素为研究对象,利用反向分子对接技术,以 idTarget 软件作为靶标的筛选工具,对异鼠李素与蛋白质数据库中的潜在靶标进行筛选、预测,并采用 PyRx 0.8 软件中的 autodock vina 模块进行验证。

异鼠李素的化学结构见图 1。

1 材料与方法

1.1 材料

idTarget 软件(<http://idtarget.rcas.sinica.edu.tw/index.php>, 国立台湾大学开发); PyRx 0.8 软件(美国 Scripps 研究所开发); 分子模拟图形界面软件 Discovery Studio Visualizer(DSV) 3.5

(美国 Accelrys 公司)。

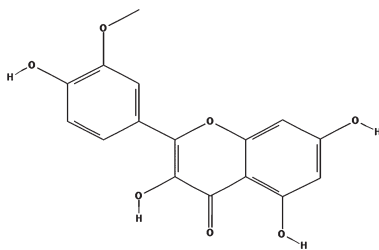


图1 异鼠李素的化学结构

Fig 1 The chemical structure of isorhamnetin

1.2 方法

1.2.1 idTarget 对靶标的预测 将异鼠李素以 Mol2 格式 (Mol2 为一种较为通用的分子结构记录格式,可以直接从 NCBI 下载, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/>) 提交给 id-Target 服务器,通过对异鼠李素进行进一步优化,产生多种构象。选择全部的 7 235 种靶蛋白[美国蛋白质数据库 (Protein Data Bank, PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) 中包括的靶蛋白种类]进行对接,结果按照结合能 [ΔG_{pred} (kcal/mol)] 的大小进行排序。

1.2.2 分子对接验证 对从结合能角度分析的结果,另外从结合构象、亲水疏水作用、静电作用力等多方法进行分析验证。因此,在上述筛选结果的基础上,利用 PyRx 0.8 软件中的 autodock vina 模块,对潜在的靶标分子与异鼠李素进行分子对接验证,并对复合物进行分析。从靶蛋白数据库 PDB 中下载靶蛋白的三维结构,然后采用蛋白质预处理工具 (<http://dock.cmu.edu.tw/ligand.php>) 对靶蛋白进行预处理,得到配体的坐标、结合位置、半径信息及质子化的靶蛋白文件等。在对接过程中,以靶蛋白自带的配体位置为参照,其坐标参考蛋白质预处理工具 Protein Preparing Tool 提供的活性结合点。完成分子对接后,用 DSV3.5 分析靶蛋白与配体形成的复合物之间的相互作用情况。

2 结果

2.1 基于 idTarget 的虚拟筛选

利用 idTarget 对蛋白质数据库的 7 235 种靶蛋白进行对接,对接结果按照 ΔG_{pred} 的大小从小到大进行排序,数值越低,表明结合越容易;再通过检索治疗靶蛋白的专业数据库 (TTD, <http://bidd.nus.edu.sg/group/tid/>)^[6] 中的数据,得到与其相关的疾病数据,结果见表 1 (表中略去与疾病无关的靶蛋白)。

表 1 idTarget 筛选出的异鼠李素与疾病相关的潜在靶标

Tab 1 Disease-related potential isorhamnetin targets selected by idTarget

序号	蛋白库编号	靶标名称	ΔG_{pred} , kcal/mol	相关疾病
3	3EAN	硫氧还蛋白还原酶 (TrxR)1	-11.7	癫痫, 疟疾, 阿米巴病, 恶性肿瘤
10	2Z03	凝血酶	-10.34	神经胶质瘤, 血栓, 凝血功能异常
17	1S3U	二氢叶酸还原酶	-10.11	疟疾, 南美洲锥虫病, 自身免疫性疾病
19	1S0X	核受体 ROR- α	-10.07	胆固醇相关疾病

2.2 基于 PyRx 0.8 的分子对接验证

异鼠李素与 4 种蛋白质靶标结合情况的二维图见图 2 (图中,异鼠李素分子即图中含有苯环的分子,蛋白质靶标即各氨基酸以英文缩写代替;LYS A: 100 表示赖氨酸 A 链的第 100 位,ASN B: 85 表示天冬酰胺 B 链第 85 位,GLU A: 103 表示谷氨酸 A 链第 103 位;剩余略);结合位点坐标见表 2。

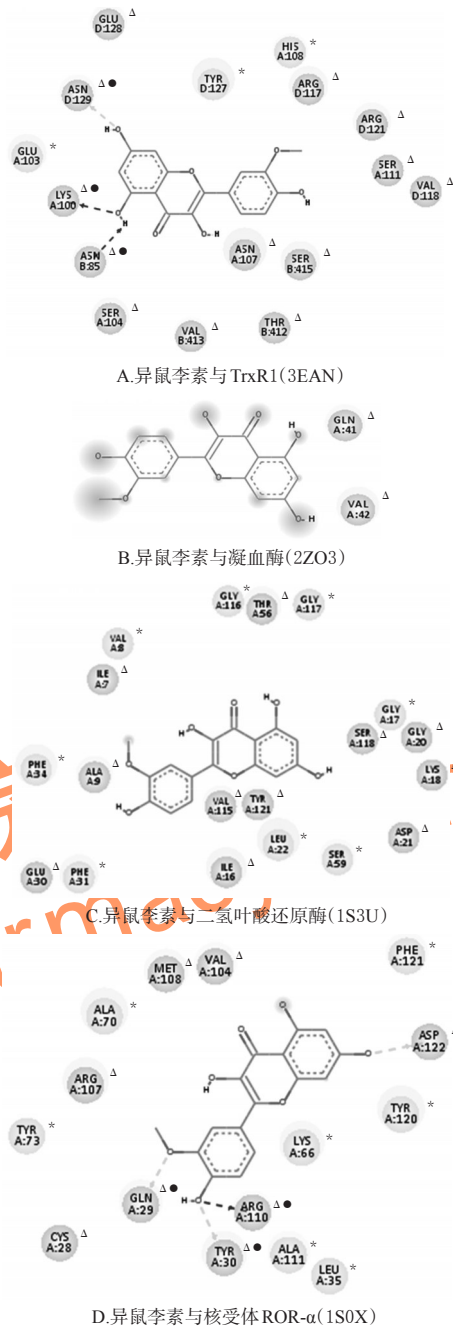


图 2 异鼠李素与 4 种蛋白质靶标结合的二维图
注: Δ , 静电作用力; *, 范德华力; \bullet , 氢键

Fig 2 2D figure for the combination of isorhamnetin and 4 kinds of target proteins

Note: Δ , electrostatic; *, van der Waals; \bullet , hydrogen bond

表 2 异鼠李素与 4 种靶蛋白结合位点坐标

Tab 2 The coordinates of binding sites of isorhamnetin and 4 kinds of target proteins

蛋白库编号	靶标名称	结合位点坐标 (X × Y × Z)
3EAN	TrxR1	15.465 6 × 0.125 1 × 78.948 3
2Z03	凝血酶	16.962 7 × (-13.431 1) × 23.220 7
1S3U	二氢叶酸还原酶	25.706 8 × 8.611 0 × 8.783 8
1S0X	核受体 ROR- α	20.501 1 × 25.247 9 × 17.745 6

如图 2A 所示,异鼠李素与 TrxR1 (3EAN) 存在着氢键作用 (LYS A: 100, ASN B: 85, ASN D: 129)、范德华力作用 (GLU A: 103, 色氨酸 TRY D: 127, 组氨酸 HIS A: 108)、静电作用力

(丝氨酸SER A:104,缬氨酸VAL B:413,苏氨酸THR B:412等若干氨基酸)。

如图2B所示,异鼠李素与凝血酶(2ZO3)存在着静电作用力(谷氨酰胺GLN A:41,VAL A:42)。

如图2C所示,异鼠李素与二氢叶酸还原酶(1S3U)存在着范德华力(亮氨酸LEU A:22,甘氨酸GLY A:116,GLY A:117,GLY A:17等)和静电作用力(VAL A:115,天冬氨酸ASP A:21,GLU A:30等)。

如图2D所示,异鼠李素与核受体ROR- α (1S0X)存在着氢键(GLN A:29,酪氨酸TYR A:30等)、范德华力(TYR A:73,LYS A:66,苯丙氨酸PHE A:31等)和静电作用力(ASP A:21等若干氨基酸)。

从表2可以看出,靶蛋白中存在相应的“口袋”与异鼠李素对接。综合上述验证结果,认为异鼠李素与靶蛋白存在着结合的可能性,且此结果与idTarget筛选的结果相符合。

3 讨论

idTarget软件是目前包含最新开发的打分函数和靶蛋白表面图的一款软件,可在比较精确的格点位置进行分子对接,从而使其预测结果更加可靠^[7]。PyRx 0.8则是美国Scripps研究所开发的一款三维分子药物辅助设计的免费软件。

反向分子对接技术自2001年开始使用以来,为药物靶标的发现提供了有力工具。此技术与蛋白质组学相结合,用以阐明中药的多靶标特性,并已成为一项热点研究技术^[8]。如有研究采用虚拟筛选的方法预测出姜辣素治疗肿瘤的靶标可能为白三烯A4水解酶,并得到了试验验证^[9]。陈少军等^[10-11]采用此技术研究丹参中各成分的作用靶标,也取得了新进展。

3.1 异鼠李素相关靶蛋白研究

虚拟筛选的结果表明,异鼠李素与肿瘤、血栓、炎症、血脂类疾病、自身免疫性疾病等密切相关,TrxR1、凝血酶、二氢叶酸还原酶、核受体ROR- α 均为其潜在靶标。

TrxR分为TrxR1、TrxR2、TrxR3等3种,属于吡啶核苷酸-二硫化物氧化还原酶家族成员,是一种还原型辅酶II(NADPH)依赖的二聚体硫酶^[12]。其主要功能是催化NADPH,将硫氧还蛋白(Thioredoxin, Trx)上的-S₂还原成(-SH)₂,以利于保持Trx的还原态,因此在氧化还原调节、抗氧化防御中具有重要作用^[13]。TrxR的底物专一性不强,可以还原维生素K₃、硫辛酸、二硫代双硝基苯甲酸(DTNB)和四氧嘧啶、磷脂氢过氧化物等内源性和外源性的物质。TrxR1作为3种同工酶之一,主要存在于细胞浆中,研究认为其具有催化氧化还原活性、抗氧化应激、调节细胞的生长等作用^[12]。TrxR在肿瘤细胞中的表达量是在正常组织中的10倍,可以作为抗肿瘤治疗的靶标^[14]。TrxR与中枢神经系统疾病也有关,如Trx系统可以通过清除自由基而发挥保护脑组织的作用^[14]。另外,TrxR与自身免疫性疾病也有关联^[15],如在类风湿性关节炎患者的关节滑液及组织中均发现Trx和TrxR的含量升高,提示TrxR可能与类风湿性关节炎产生有关^[16]。另外TrxR与心肌损伤、某些地方病、获得性免疫缺陷综合征(AIDS)、寄生虫病及染色体异常性疾病的发生等也有着一定的关系^[12]。

凝血酶主要与各种出血、凝血性的疾病有关^[17],如血友病、血栓症等。

二氢叶酸还原酶是生物体内很重要的一种酶,其抑制剂

有抗癌^[18]、抗疟^[19]和抗细菌感染^[20]的作用,广泛用作癌症药物筛选的靶标分子和抗感染病的靶标分子。对其作进一步研究具有重要的现实意义。

核受体ROR- α 广泛分布在机体各个组织中,属于维甲酸相关的孤核受体亚家族。在胞核中,其在调节靶基因的转录、形态发育、细胞增殖分化、机体稳态维持及高级神经功能控制等方面可发挥重要的作用。ROR- α 也参与生物代谢的调控,在肿瘤治疗^[21-22]、生物节律调节^[23]、骨代谢障碍治疗、免疫功能不全治疗、抗炎^[24]、抗脂类代谢异常^[25]、治疗心血管疾病特别是动脉粥样硬化^[26]等各个方面具有积极作用。

3.2 异鼠李素的靶标预测

已经有研究表明,异鼠李素具有抗凝血作用,体内实验证明其可以显著延长活化部分凝血活酶时间(APTT)和凝血酶原时间(PT),显著抑制凝血酶和人内皮细胞的激活因子X(FXa)的产生;还能延长出血时间,抑制I型纤溶酶原激活物抑制因子(PAI-1)诱导的肿瘤坏死因子 α (TNF- α)产生,而此结果可以为新的抗凝血剂的开发提供依据^[27-28]。但其作用机制尚不十分清楚,从反向分子对接的结果看,凝血酶极有可能是异鼠李素抗凝血作用的靶标,值得进一步深入研究。

有学者研究了黄酮类化合物的抗炎作用,发现在炎症反应中,微生物的产物和炎性细胞因子诱导型一氧化氮合酶(iNOS)生成大量一氧化氮(NO),因此,可抑制NO产生的天然产物则具有抗炎作用。而异鼠李素可以抑制核因子 κ B(NF- κ B)活性、抑制iNOS的活性,因此具有抗炎作用,但是并未发现其对巨噬细胞有活化作用^[24]。从对接结果分析,核受体ROR- α 可能是其发挥抗炎作用的靶标之一。

异鼠李素的抗肿瘤作用也有很多文献报道。体外试验证明,在沙棘中提取得到的异鼠李素对人肝癌细胞BEL-7402具有抑制作用,且其细胞毒性作用呈剂量和时间依赖性;对Lewis肺癌细胞可通过含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)和P38介导的途径诱导癌细胞凋亡^[29]。根据虚拟筛选结果推测,异鼠李素发挥作用可能是通过多个靶标发挥的,比如TrxR1、二氢叶酸还原酶、核受体ROR- α 均与肿瘤的发生密切相关,故其发挥抗肿瘤作用极有可能是多靶标共同作用的结果。

4 结语

综上所述,笔者利用idTarget对异鼠李素的潜在靶蛋白进行了虚拟筛选,然后利用PyRx 0.8软件中的autodock vina模块进行了分子对接验证。对异鼠李素与TrxR1、凝血酶、二氢叶酸还原酶、核受体ROR- α 的结合模式进行了分析。分子对接试验验证反向药效团筛选和分子对接的结果具有较好的一致性,且筛选出的靶标的作用与异鼠李素的药理作用和临床应用具有相关性,说明了反向分子对接技术对小分子活性物质预测的可靠性。

但是基于反向分子对接技术靶标的预测,各类软件的算法不同,其结果均存在一定比例的假阳性,故需要整合优化预测模型,以提高虚拟对接技术的命中率。另外需要指出的是,计算机虚拟对接的结果仍需要实验的进一步确证。本文为异鼠李素的靶标研究、药理活性与临床应用研究提供了理论支撑。

参考文献

[1] 周家驹,谢桂荣,严新建.中药原植物化学成分手册[M].

北京:化学工业出版社,2004:5 248.

- [2] 崔明超,程斌,陈宏降,等.贝母花的定性鉴别及含量测定研究[J].*中医药信息*,2014,31(4):20.
- [3] Peng W, Han T, Liu Q, *et al.* Chemical constituents of the flower of *Fritillaria thunbergii*[J]. *Chemistry of Natural Compounds*,2012,48(3):491.
- [4] Chen S, Ren J. Identification of a potential anticancer target of danshensu by inverse docking[J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*,2014,15(1):111.
- [5] Jui-Chih W, Pei-Ying C, Chung-Ming C, *et al.* idTarget: a web server for identifying protein targets of small chemical molecules with robust scoring functions and a divide-and-conquer docking approach[J]. *Nucleic Acids Research*,2012,40(1):393.
- [6] Chen X, Ji ZL, Chen YZ. TTD: therapeutic target database[J]. *Nucleic Acids Research*,2002,30(1):412.
- [7] Florence GJ, Gardner NM, Paterson I. Development of practical syntheses of the marine anticancer agents discodermolide and dictyostatin[J]. *Natural Product Reports*, 2008,25(2):342.
- [8] 范胜军,李学军.反向分子对接-药物靶点发现和确认的新途径[J].*生理科学进展*,2012,43(5):367.
- [9] Jeong CH, Bode AM, Pugliese A, *et al.* [6]-Gingerol suppresses colon cancer growth by targeting leukotriene A₄ hydrolase[J]. *Cancer Res*,2009,69(13):5 584.
- [10] 陈少军,崔明超,陈宏降.丹参作用于内皮素转换酶活性成分虚拟筛选[J].*中国实验方剂学杂志*,2014,20(14):48.
- [11] 陈少军,陈宏降,郭章华.反向分子对接法预测丹参醇A的潜在靶点[J].*中药药理与临床*,2014,30(5):58.
- [12] Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase[J]. *Biochem J*,2000,346(Pt 1):1.
- [13] Arner ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase[J]. *Eur J Biochem*,2000,267(20):6 102.
- [14] Becker K, Gromer S, Schirmer RH, *et al.* Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target [J]. *Eur J Biochem*,2000,267(20):6 118.
- [15] Lemarechal H, Allanore Y, Chenevier-Gobeaux C, *et al.* High redox thioredoxin but low thioredoxin reductase activities in the serum of patients with rheumatoid arthritis [J]. *Clinica Chimica Acta*,2006,367(1/2):156.
- [16] He MF, Gao XP, Li SC, *et al.* Anti-angiogenic effect of auranofin on HUVECs in vitro and zebrafish in vivo[J]. *Eur J Pharmacol*,2014,740(2):240.
- [17] Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all that thrombin for?[J]. *J Thromb Haemost*,2003,1(7):1 504.
- [18] Hughes L, Carton R, Minguzzi S, *et al.* An active second dihydrofolate reductase enzyme is not a feature of rat and mouse, but they do have activity in their mitochondria[J]. *Febs Letters*,2015,589(15):1 855.
- [19] Banerjee D, Mayerkuckuk P, Capioux G. Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*,2002,1 587(2):164.
- [20] Hawser S, Lociuero S, Islam K. Dihydrofolate reductase inhibitors as antibacterial agents[J]. *Biochem Pharmacol*, 2006,71(7):941.
- [21] Qi S, Xia SJ, Xi HZ, *et al.* Upregulation of ROR alpha inhibit proliferation, invasion and migration of human gastric cancer cells induced by diallyl disulfide[J]. *Asia-pacific Journal of Clinical Oncology*,2014,108(S1):136.
- [22] Besnard S, Heymes C, Merval R, *et al.* Expression and regulation of the nuclear receptor ROR alpha in human vascular cells[J]. *Febs Letters*,2002,511(1/3):36.
- [23] Saito T, Hirano M, Ide T, *et al.* A clock gene ROR alpha-mediated regulation of the activity of rho-associated coiled-coil protein kinase 2 (rock2) plays a key role in generating vascular intrinsic circadian rhythm of myofilament Ca²⁺ sensitivity and vascular contractility[J]. *Circulation Research*,2012,111(12):E382.
- [24] Fernandes J, Benderdorff M, Shi Q. SR1078, a synthetic ligand of nuclear receptor ror alpha, modulates osteoblast metabolism with anti-inflammatory effects[J]. *Osteoarthritis & Cartilage*,2012,20(4):S115.
- [25] Jetten AM, Kang HS, Takeda Y. Retinoic acid-related orphan receptors α and γ : key regulators of lipid/glucose metabolism, inflammation, and insulin sensitivity[J]. *Front Endocrinol:Lausanne*,2013,4:1.
- [26] Molendi-Coste O, Fleury S, Bouchaert E, *et al.* Macrophage-specific inactivation of the nuclear receptor ror-alpha leads to increased atherosclerosis in mouse[J]. *Atherosclerosis*,2014,235(2):E20.
- [27] Ku SK, Kim TH, Bae JS. Anticoagulant activities of persicarin and isorhamnetin[J]. *Vascul Pharmacol*, 2013, 58 (4):272.
- [28] Fourie AM. Modulation of inflammatory disease by inhibitors of leukotriene A₄ hydrolase[J]. *Current Opinion in Investigational Drugs*,2009,10(11):1 173.
- [29] Ma G, Yang C, Qu Y. The flavonoid component isorhamnetin in vitro inhibits proliferation and induces apoptosis in Eca-109 cells[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2007,167(2):153.

(收稿日期:2016-01-05 修回日期:2016-04-14)

(编辑:刘 萍)