

# 银翘散中抗流感病毒成分与神经氨酸酶的分子对接研究<sup>△</sup>

郭小华<sup>1\*</sup>,朱燕亮<sup>2</sup>,程齐来<sup>1#</sup>(1.赣南医学院药学院,江西赣州 341000;2.江西省上犹县中医院药剂科,江西赣州 341200)

中图分类号 R287;R914.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)17-2351-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.17.11

**摘要** 目的:研究银翘散中17个主要抗流感病毒成分与神经氨酸酶(NA)的结合模式和相互作用。方法:采用CORINA、UCSF Chimera 1.3、AutoDock Tools 1.5.4等分子对接软件,将银翘散中的甘草素、甘草苷、绿原酸、3,3',4-三甲氧基鞣花酸等17个活性成分及阳性对照扎那米韦的二维结构转化成三维结构,确立其空间坐标,再设置受体蛋白NA的网格,并运行对接程序进行对接运算。以估计抑制常数( $K_i$ )和结合自由能( $\Delta G_{\text{bind}}$ )为参考指标,比较对接分子的虚拟活性差异,并从对接构象上分析产生活性差异的原因。结果:在17个活性成分中,绿原酸对接的 $K_i$ 值为1.20  $\mu\text{mol/L}$ , $\Delta G_{\text{bind}}$ 值为-8.08 kcal/mol(1 kcal=4.184 kJ),优于扎那米韦( $K_i$ 值为2.26  $\mu\text{mol/L}$ , $\Delta G_{\text{bind}}$ 值为-7.70 kcal/mol);3,3',4-三甲氧基鞣花酸对接数据最差, $K_i$ 值和 $\Delta G_{\text{bind}}$ 值分别为149.41  $\mu\text{mol/L}$ 、-5.22 kcal/mol。在对接构象上,绿原酸与扎那米韦相似,在空间上更加匹配NA活性腔的活性位点,占据了除S5以外的所有活性位点,呈现出与NA较强的结合作用。3,3',4-三甲氧基鞣花酸的平面分子结构限制了其与NA多个活性位点结合,对接构象不牢固。结论:绿原酸可能是银翘散中最强的抗流感病毒活性成分,其虚拟活性强于扎那米韦;3,3',4-三甲氧基鞣花酸空间上与NA活性腔不匹配,虚拟活性最弱。本研究可为NA抑制剂的开发提供一定的理论指导。

**关键词** 银翘散;活性成分;抗病毒;神经氨酸酶;分子对接

## Study on the Molecular Docking of Anti-influenza Virus Components in Yinqiao Powder and Neuraminidase

GUO Xiaohua<sup>1</sup>, ZHU Yanliang<sup>2</sup>, CHENG Qilai<sup>1</sup> (1.College of Pharmacy, Gannan Medical College, Jiangxi Ganzhou 341000, China; 2.Dept. of Pharmacy, Jiangxi Province Shangyou Hospital of TCM, Jiangxi Ganzhou 341200, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the binding mode and interaction of 17 main antiviral components in Yinqiao powder with neuraminidase (NA). METHODS: The two-dimensional structure of 17 active components as glycyrrhizin, liquiritin, chlorogenic acid, 3,3',4-trimethoxy ellagic acid in Yinqiao powder and positive control zanamivir were transformed into three-dimensional structure by using CORINA, UCSF Chimera 1.3 and AutoDock Tools 1.5.4 molecular docking software. Then the grids of acceptor protein NA were set up, and the docking program was run to perform the docking operation. Using estimation inhibit constant ( $K_i$ ) and binding energy ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) as reference indexes, the difference of virtual activity of the docking moleculars were compared, and its reasons were analyzed from the docking conformation. RESULTS: In the 17 active components,  $K_i$  value for molecule docking of chlorogenic acid was 1.20  $\mu\text{mol/L}$ , and  $\Delta G_{\text{bind}}$  was -8.08 kcal/mol (1 kcal=4.184 kJ), which was better than zanamivir ( $K_i$  2.26  $\mu\text{mol/L}$ ,  $\Delta G_{\text{bind}}$  -7.70 kcal/mol).  $K_i$  and  $\Delta G_{\text{bind}}$  of 3,3',4-trimethoxy ellagic acid were 149.41  $\mu\text{mol/L}$  and -5.22 kcal/mol, which were the worst among 17 compounds. Chlorogenic acid and zanamivir were more closely matched to the active sites of NA active cavity in space from the docking conformation, and occupied all the active chambers except S5, which presented a strong binding effect with NA. The docking conformation of 3,3',4-trimethoxy ellagic acid was not strong as its plane structure restricted the combination with NA active sites. CONCLUSIONS: Chlorogenic acid is the strongest antiviral activity component in the Yinqiao powder, whose virtual activity is even stronger than zanamivir. The virtual activity of 3,3',4-trimethoxy ellagic acid may be the weakest as its mismatching with the NA active cavity. This study may provide some theoretical guidance for the development of NA inhibitors.

**KEYWORDS** Yinqiao powder; Active component; Antivirus; Neuraminidase; Molecular docking

流感是由流感病毒引起一种常见的疾病,而流感病毒易发生变异的生物学特性和传播速度快的特点,决定

<sup>△</sup>基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81360627);江西省教育厅科学技术研究项目(No.GJJ161002);赣南医学院科研课题(No.YB201426)

\*讲师,硕士。研究方向:中草药活性成分开发。电话:0797-8169775。E-mail:xhguo20041@163.com

#通信作者:教授,博士。研究方向:中药资源开发与利用。电话:0797-8169775。E-mail:cql\_57@126.com

了抗流感病毒药物研发的必要性。研究发现,流感病毒增殖后要从位于宿主细胞的唾液酸残基中释放出来并且感染其他宿主细胞,这一过程中需要神经氨酸酶(Neuraminidase, NA)的参与<sup>[1]</sup>。

NA又称唾液酸酶,是一种流感病毒表面糖蛋白,在流感病毒复制和感染过程中起关键作用<sup>[2]</sup>。NA的晶体结构是一个四聚体结构,由4个相同的亚基以二硫键形式连接而成<sup>[3]</sup>。这4个部分分别被称为尾、跨膜域、茎和

球状头。Stoll V等<sup>[4]</sup>研究发现,NA的活性位点具有高极性,其活性区域有5个活性位点。在A型和B型流感病毒每个糖蛋白亚单位表面的口袋中都存在NA的活性位点,并且这些活性位点周围存在的氨基酸序列均是高度保守的,这有利于NA抑制剂的设计和开发<sup>[5]</sup>。

银翘散是由金银花、连翘、牛蒡子等9味中药组成的复方制剂,在临床上被广泛应用于抗流感治疗<sup>[6]</sup>。其中的金银花、连翘、牛蒡子和生甘草是主要的抗病毒组分。金银花中的黄酮类、有机酸类、三萜皂苷类成分有明显的抗病毒作用<sup>[7]</sup>,尤其是有机酸类的绿原酸对呼吸道病毒的抑制作用明显<sup>[8]</sup>;连翘中的连翘苷、连翘酯苷,甘草中的甘草素、甘草苷,牛蒡子中的牛蒡子苷等成分均有抗病毒活性<sup>[9]</sup>。

研究表明,银翘散中的活性成分,如甘草中的甘草素、甘草苷、异甘草素、异甘草苷、芒柄花素,连翘中的连翘苷、连翘酯苷,金银花中的绿原酸、金丝桃苷,薄荷中的醉鱼草苷、金合欢素,牛蒡子中的牛蒡子苷、染料木素,淡豆豉中的大豆素、6-甲氧基大豆素及荆芥中的橙皮苷和3,3',4-三甲氧基鞣花酸等<sup>[9-14]</sup>,均有较好的抗流感病毒作用,作用机制可能与其抑制NA活性有关<sup>[15]</sup>。因此,本文采用分子对接的方法模拟了银翘散中甘草素、甘草苷等17个主要的抗病毒成分与NA的结合模式,并探讨其与NA的作用差异,推测可能的构效关系,为NA抑制剂的开发提供一定理论指导和实验依据。

## 1 材料

M4500-N000台式电子计算机[联想(北京)有限公司];ChemBioDraw Ultra 11.0软件(CambridgeSoft公司,用于绘制各成分的化学结构式);UCSF Chimera 1.3软件(美国加州大学);AutoDock Tools 1.5.4、AutoGrid 4.2、AutoDock 4.2软件(美国斯克利普斯研究所);Discovery Studio 2.5 Visualizer、Python 2.5软件(美国Accelrys公司,用于分子对接);CORINA工具(<http://www.molecular-networks.com>)(美国Molecular Networks GmbH公司,用于配体分子三维结构的转化);Brookhaven蛋白质数据库(<http://www.rcsb.org/pdb.com>,用于下载靶蛋白的晶体结构)。

## 2 方法

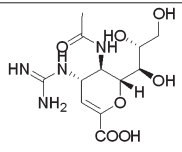
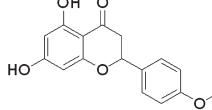
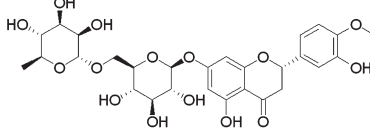
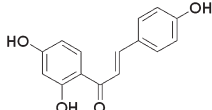
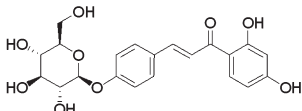
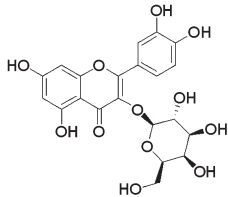
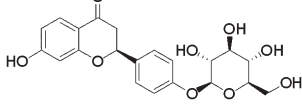
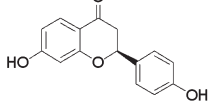
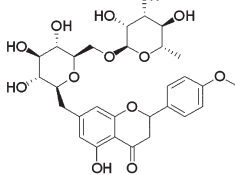
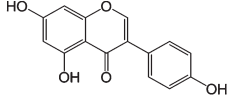
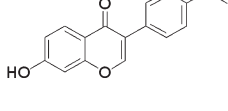
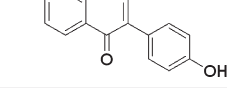
### 2.1 分子对接计算前处理

2.1.1 配体分子的选取及对接前处理 银翘散中成分复杂,其中黄酮类等被认为是具有抗流感病毒的活性成分<sup>[7]</sup>。笔者选取了银翘散中甘草素、甘草苷等17个抗流感病毒成分作为分子对接的配体分子,且以NA蛋白原始配体分子(扎那米韦)为阳性对照。各配体分子名称及结构详见表1。

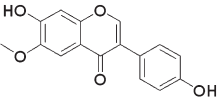
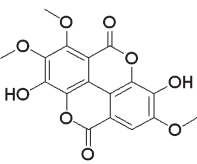
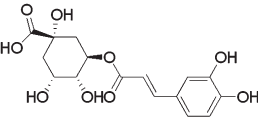
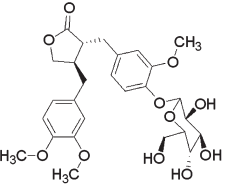
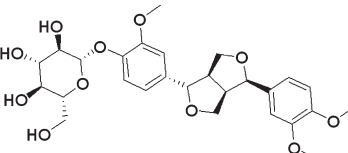
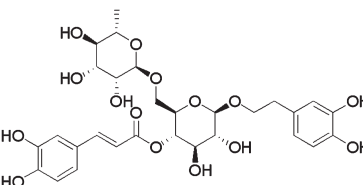
将表1中18个配体分子的平面结构用CORINA工

表1 配体分子的名称及化学结构

Tab 1 Name and chemical structure of ligands molecule

配体分子编号	名称	化学结构
1	扎那米韦	
2	金合欢素	
3	橙皮苷	
4	异甘草素	
5	异甘草苷	
6	金丝桃苷	
7	甘草苷	
8	甘草素	
9	醉鱼草苷	
10	染料木素	
11	芒柄花素	
12	大豆素	

续表 1  
Continued tab 1

配体分子编号	名称	化学结构
13	6-甲氧基大豆素	
14	3,3',4-三甲氧基鞣花酸	
15	绿原酸	
16	牛蒡子苷	
17	连翘苷	
18	连翘酯苷	

具在线转化成三维结构,并在 UCSF Chimera 程序中将其置于对接靶蛋白的活性位点处,保存为 pdb 格式文件。再将此 pdb 格式文件的配体分子置于 AutoDock-Tools(ADT)软件中加上电荷和非极性氢,保存为 pdbqt 格式文件。

2.1.2 受体分子的选取及对接前处理 从 Brookheaven 蛋白数据库中获得受体 NA 的晶体结构, pdb 代码为 1A4G<sup>[16]</sup>。在 UCSF Chimera 程序中将 NA 蛋白晶体结构中的水分子、原始配体等剔除,保存为 pdb 格式文件。再将此 pdb 格式文件的受体分子置于 ADT 软件中加上电荷和非极性氢,保存为 pdbqt 格式文件。

## 2.2 分子对接运算

在 ADT 软件中,设置 pdbqt 格式文件的配体分子和受体分子的网格,并运行 AutoGrid 生成必要的图像文件,最后运行 AutoDock 进行分子对接运算。以估计抑制常数(Inhibit constant,  $K_i$ )和结合自由能(Binding energy,  $\Delta G_{\text{bind}}$ )为参考指标,获取 18 个配体分子与 NA 蛋白对接的  $\Delta G_{\text{bind}}$  和  $K_i$  值,并将银翘散中 17 个活性成分的  $\Delta G_{\text{bind}}$  和  $K_i$  值与扎那米韦的  $\Delta G_{\text{bind}}$  和  $K_i$  值进行比较。最后从最

优构象上分析配体分子与 NA 的结合模式,从分子水平探讨两者的结合作用。

## 3 结果

### 3.1 分子对接运算结果

扎那米韦、甘草素等 18 个配体分子与 NA 受体对接的  $K_i$  值和  $\Delta G_{\text{bind}}$  值见表 2。

表 2 配体分子与 NA 受体的对接数据

Tab 2 Docking data of ligands molecular and NA receptor

配体分子编号	$K_i, \mu\text{mol/L}$	$\Delta G_{\text{bind}}, \text{kcal/mol}$
1	2.26	-7.70
2	5.86	-7.14
3	6.18	-7.11
4	24.41	-6.29
5	22.31	-6.35
6	7.73	-6.97
7	14.79	-6.59
8	43.27	-5.95
9	14.30	-6.61
10	23.89	-6.31
11	68.61	-5.68
12	39.61	-6.01
13	54.15	-5.82
14	149.41	-5.22
15	1.20	-8.08
16	2.39	-7.67
17	6.76	-7.05
18	14.30	-6.61

注: $\Delta G_{\text{bind}}$ 、 $K_i$  值越小,配体分子与 NA 受体的结合能力越强

Note: The smaller  $\Delta G_{\text{bind}}$  and  $K_i$ , the stronger binding ability between ligands molecular and NA receptor

如表 2 所示,扎那米韦(配体分子 1)的  $K_i$  值和  $\Delta G_{\text{bind}}$  值分别为  $2.26 \mu\text{mol/L}$  和  $-7.70 \text{kcal/mol}$ ,对接的配体分子中数据与之接近的为配体分子 2(金合欢素)、3(橙皮苷)和 6(金丝桃苷),有机酸类的配体分子 15(绿原酸),多酚类的配体分子 16(牛蒡子苷)、17(连翘苷)。对接数据与扎那米韦相差最大的是配体分子 14(3,3',4-三甲氧基鞣花酸), $K_i$  值和  $\Delta G_{\text{bind}}$  值分别为  $149.41 \mu\text{mol/L}$  和  $-5.22 \text{kcal/mol}$ 。

### 3.2 分子对接数据分析

扎那米韦与 NA 受体对接的  $K_i$  值和  $\Delta G_{\text{bind}}$  值均较小,说明扎那米韦在与 NA 受体进行分子对接时,空间上相互匹配,结合比较牢固,构象比较稳定,对 NA 蛋白表现出很强的虚拟抑制活性。

银翘散中 17 个成分与 NA 受体对接的  $K_i$  值和  $\Delta G_{\text{bind}}$  值较小的主要有金合欢素、橙皮苷、金丝桃苷、绿原酸、牛蒡子苷、连翘苷等。与扎那米韦对接数据接近的是绿原酸、牛蒡子苷,其中绿原酸对接的  $K_i$  值和  $\Delta G_{\text{bind}}$  值甚至低于扎那米韦,分别为  $1.20 \mu\text{mol/L}$  和  $-8.08 \text{kcal/mol}$ ,表现出与 NA 蛋白很强的结合能力,结合构象也比较稳定,可能对 NA 存在很强的虚拟抑制活性。对接数据最不理

想的是3,3',4-三甲氧基鞣花酸,  $K_i$ 值和 $\Delta G_{\text{bind}}$ 值分别为149.41  $\mu\text{mol/L}$ 和 $-5.22 \text{ kcal/mol}$ ,表现出与NA蛋白较弱的结合能力,结合构象不稳定,对NA的虚拟抑制活性较差。

### 3.3 分子对接构象分析

Stoll V等<sup>[4]</sup>的研究表明,NA活性腔由5个活性位点(S1~S5)构成。NA活性位点S1主要是静电区域,易与配体分子形成盐桥;S2为带负电区域,主要与配体分子的极性基团形成氢键相互作用力,是配体分子产生活性的关键区域之一;S3中的TRP178是一个关键氨基酸,与配体分子中的疏水基团形成疏水作用;S4属于一个大的疏水口袋,很难被配体分子占据;S5中的极性氨基酸GLU274和GLU276也主要与配体分子形成氢键相互作用力<sup>[4]</sup>。利用UCSF Chimera程序分析NA晶体结构,其活性位点分布图详见图1(以棒状图和溶剂化图两种不同形式体现)。

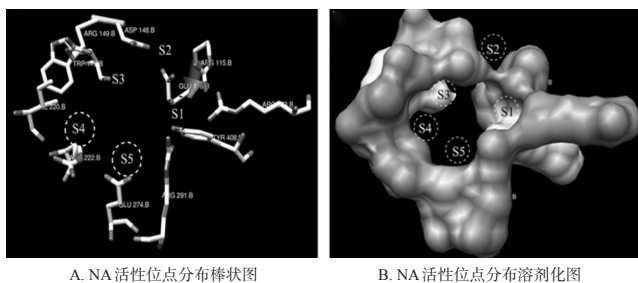


图1 NA活性位点分布图

Fig 1 Distribution of NA active sites

为了更直观地反映各成分与NA蛋白的结合作用,笔者从分子对接构象上进行分析。将绿原酸和3,3',4-三甲氧基鞣花酸与NA的对接构象同扎那米韦与NA对接构象进行比较,分析该3种配体分子与NA各活性位点的结合作用。

3.3.1 扎那米韦与NA对接构象分析 扎那米韦与NA对接的构象详见图2。

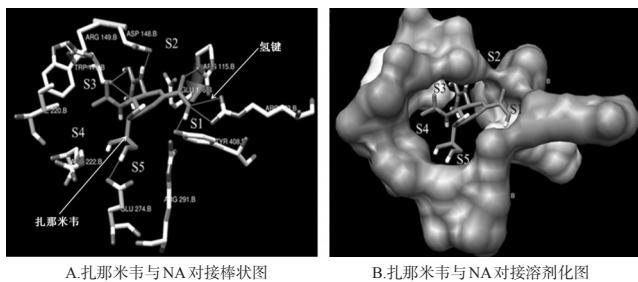


图2 扎那米韦与NA对接的构象图

Fig 2 Conformation for zanamivir and NA

由图2B可见,扎那米韦的整个分子结构基本能占据NA的活性腔;由图2A可见,其与活性位点S1、S3、S5结合紧密。扎那米韦结构中的羧基部分伸入到S1活性位点,羧基上的羟基和羰基分别与周围的氨基酸TYR408、ARG153、ARG115形成了4个氢键;胍基结构

靠近S2活性位点,与氨基酸ASP148形成了氢键,但在空间上并未完全占据该活性位点;乙酰氨基结构与S3活性位点形成疏水作用的同时,还与该位点的关键氨基酸TRP176形成了氢键;醇羟基结构则深入S5活性位点,并与该位点的极性氨基酸GLU274形成了氢键。S4活性位点类似于一个大的疏水口袋,很难被配体分子占据,故扎那米韦没能与之形成相互作用。

3.3.2 绿原酸与NA对接构象分析 绿原酸与NA对接的构象详见图3。

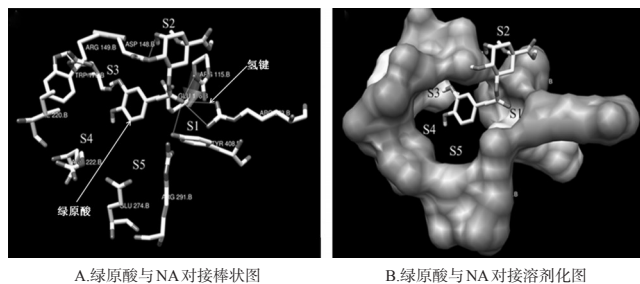


图3 绿原酸与NA对接的构象图

Fig 3 Conformation for chlorogenic acid and NA

由图3B可见,绿原酸与NA的对接构象与扎那米韦相似,占据了NA活性腔的主要活性位点,其中绿原酸结构中的酯链部分落在NA活性腔的S1活性位点,酯链的羰基氧分别与周围的氨基酸TYR408、ARG153、ARG115形成了4个氢键,酚羟基结构落入S3活性位点,并与关键氨基酸TRP176形成了氢键。

与扎那米韦不同的是,绿原酸结构中的环己醇部分与S2活性位点的结合,除了醇羟基与氨基酸ASP148形成氢键外,整个环己醇结构也嵌入S2活性位点,空间上与之相匹配,结合较牢固。由此推测,该作用方式可能是绿原酸对接数据优于扎那米韦的原因之一。另外,绿原酸结构并未伸入到由极性氨基酸构成的S5活性位点,提示在对其进行结构修饰时,可以考虑在酚羟基结构上引入部分极性基团,使之延伸靠近S5活性位点,并与周围氨基酸形成相互作用,有助于增强绿原酸与NA的结合作用,提高其活性。

3.3.3 3,3',4-三甲氧基鞣花酸与NA对接构象分析 3,3',4-三甲氧基鞣花酸与NA对接的构象详见图4。

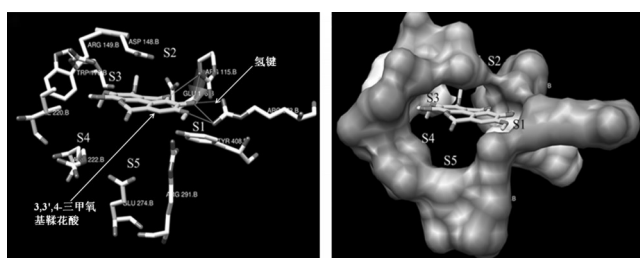


图4 3,3',4-三甲氧基鞣花酸与NA对接的构象图

Fig 4 Conformation for 3,3',4-trimethoxy ellagic acid and NA

由图4可见,3,3',4-三甲氧基鞣花酸虽然能够靠近S1和S3活性位点,可与S1活性位点的多个氨基酸形成了氢键,但整个平面分子在空间上却很难与其他活性位点结合,尤其是S2和S5活性位点,导致其与NA结合不牢固,虚拟抑制活性较差。3,3',4-三甲氧基鞣花酸抗病毒活性的对接数据最不理想,主要原因可能是其平面结构限制了其与NA活性腔的结合。

银翘散中其他抗病毒活性成分与NA对接的空间构象基本相似,因结构存在差异,在与NA结合时,结合位点和相互作用力会有差别,使得虚拟活性也不尽相同。

#### 4 讨论

本研究以上市的NA抑制剂扎那米韦为阳性对照,利用分子对接的方法模拟了银翘散中主要的17个抗流感病毒活性成分与NA的相互作用。通过分析各成分与NA的对接数据( $K_i$ 值、 $\Delta G_{\text{bind}}$ 值)发现,绿原酸、牛蒡子苷、连翘苷、金合欢素、橙皮苷、金丝桃苷与扎那米韦的对接数据接近,其中绿原酸的对接数据最接近扎那米韦。故笔者推测这6种成分对NA的虚拟抑制活性较强,是银翘散中主要的抗病毒成分。

从对接构象上看,NA活性腔中的S1、S2、S3、S5活性位点是NA抑制剂发挥作用的主要位点。3,3',4-三甲氧基鞣花酸是一个平面分子,限制了其与NA多个活性位点的结合,导致对接数据不理想、对接构象不稳定、对NA的虚拟抑制活性较弱。绿原酸与扎那米韦的对接构象相似,在空间上能与NA活性腔的多个活性位点结合,并与周围的关键氨基酸形成氢键等,对接构象牢固,表现出对NA较强的虚拟抑制活性。与扎那米韦比较,绿原酸更加嵌入NA活性腔的S2活性位点,表现出更强的结合能力。但其离由极性氨基酸构成的S5活性位点较远,与周围氨基酸形成的相互作用力有限。在后续的研究过程中,可以考虑在酚羟基结构上引入部分极性基团,使之延伸靠近S5活性位点,以增强绿原酸与NA的结合能力,提高其活性。

#### 参考文献

[1] WANG Z, CHENG LP, ZHENG XH, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel oseltamivir derivatives as potent neuraminidase inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27(24): 5429-5435.

[2] ZHENG L, AI HX, LI SM, et al. Virtual screening approach to identifying influenza virus neuraminidase inhibitors using molecular docking combined with machine-

learning-based scoring function[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(47): 83142-83154.

[3] ENKHTAIVAN G, MUTHURAMAN P, KIM DH, et al. Discovery of berberine based derivatives as anti-influenza agent through blocking of neuraminidase[J]. *Bioorg Med Chem*, 2017, 25(20): 5185-5193.

[4] STOLL V, STEWART KD, MARING CJ, et al. Influenza neuraminidase inhibitors: structure-based design of a novel inhibitor series[J]. *Biochem*, 2003, 42(3): 718-727.

[5] 周正任, 潘兴瑜. 病原生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 180-185.

[6] KOTBAYASHI M, DAVIS SM, UTSUNMIYA T, et al. Antiviral effect of gingyo-san, a traditional Chinese herbal medicine, on influenza A2 virus infection in mice[J]. *Am J Chin Med*, 1999, 27(1): 53-62.

[7] 王亚丹, 杨建波, 戴忠, 等. 中药金银花的研究进展[J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(11): 1928-1935.

[8] 刘恩荔, 李青山. 大孔吸附树脂分离纯化金银花中总有机酸的研究[J]. *中草药*, 2006, 37(12): 1792-1796.

[9] 石钺, 石任兵. 银翘散抗流感病毒有效部位群化学成分分离与鉴定[J]. *中国中药杂志*, 2003, 28(1): 43-47.

[10] 石钺, 石任兵, 刘斌, 等. 银翘散抗流感病毒有效部位群中黄酮类成分研究[J]. *中国中药杂志*, 2001, 26(5): 320-322.

[11] 石钺, 石任兵. 银翘散抗流感病毒有效部位各组分变化及归属分析[J]. *药学报*, 2007, 42(2): 192-196.

[12] 玉素甫江·艾力. 欧薄荷化学成分研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2012.

[13] 孙立卿. 藏药蓝花荆芥抗HSV-I功效成分研究[D]. 西宁: 青海民族大学, 2016.

[14] 石钺. 银翘散抗流感病毒作用的物质基础研究及其作用机理初探[D]. 北京: 北京中医药大学, 2001.

[15] 彭勇, 梁少伟, 李文魁, 等. 国外抗流感病毒研究近况[J]. *国外医学植物药分册*, 1999, 14(1): 7-9.

[16] NEIL RT, ANNE C, ONKAR S, et al. Dihydropyran-carboxamides related to zanamivir: a new series of inhibitors of influenza virus sialidases. 2. crystallographic and molecular modeling study of complexes of 4-amino-4H-pyran-6-carboxamides and sialidase from influenza virus types A and B[J]. *J Med Chem*, 1998, 41(6): 798-807.

(收稿日期:2018-01-11 修回日期:2018-04-08)

(编辑:刘萍)