

基于靶细胞捕集与分子对接的藏族药短管兔耳草 调控 URAT1 活性成分筛选

任玲玲, 毛竹, 曾金祥*, 张迟, 黄戎婕, 张丽, 周芳芳, 朱玉野, 李敏, 梁健,
朱继孝, 钟国跃

(江西中医药大学中药资源与民族药研究中心, 南昌 330004)

[摘要] 目的:集成靶细胞捕集、液-质联用及分子对接技术研究藏族药短管兔耳草调控尿酸转运体1(URAT1)成分及其与URAT1的结合机制,为基于藏族药短管兔耳草的降尿酸新药开发奠定物质与理论基础。方法:以可表达URAT1的HK-2细胞为靶细胞捕集藏族药短管兔耳草成分,运用超高压液相色谱飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)技术对捕集成分进行鉴定,基于分子对接技术研究捕集成分与URAT1的结合机制。结果:HK-2细胞共捕集了短管兔耳草8个成分,经UPLC-Q-TOF-MS鉴定,分别为金丝桃苷、大车前苷、山柰酚-3-O-葡萄糖苷、黄大花洋地黄苷、假荆芥属苷、异黄大花洋地黄苷、高车前苷和木犀草素。分子对接结果显示这些成分可与URAT1通过氢键、范德华力、 π - π 作用和疏水作用等方式进行结合,但化合物与URAT1的结合机制和强弱,与化合物结构和类型密切相关。结论:靶细胞捕集,UPLC-Q-TOF-MS与分子对接集成技术可成功阐明藏族药短管兔耳草调控URAT1成分及成分与URAT1的结合机制,研究结果为基于藏族药短管兔耳草的降尿酸新药开发奠定一定的物质与理论基础。

[关键词] 短管兔耳草;靶细胞捕集;超高压液相色谱飞行时间质谱;尿酸转运体1;分子对接

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)17-0119-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201813

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200622.1611.005.html>

[网络出版日期] 2020-6-23 09:15

Screening of Components with Potential Regulation Effect in *Lagotis breviflora* Based on Target Cell and Molecular Docking

REN Ling-ling, MAO Zhu, ZENG Jin-xiang*, ZHANG Chi, HUANG Rong-jie, ZHANG Li,
ZHOU Fang-fang, ZHU Yu-ye, LI Min, LIANG Jian, ZHU Ji-xiao, ZHONG Guo-yue
(Research Center of Traditional Chinese Medicine (TCM) Resourcing and Minority Medicine,
Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the components with urate anion transporter 1 (URAT1) regulation effect and their combination mechanisms of *Lagotis breviflora* by integrating techniques of HK-2 cell capture, UPLC-Q-TOF-MS and molecular docking, so as to provide material and theory bases for the development of new hypouricemic medicines based on *L. breviflora*. **Method:** The HK-2 cells were applied to capture the components of *L. breviflora*. UPLC-Q-TOF-MS was used to identify those components. The molecular docking technique was adopted to study the interaction mechanism between the compounds and URAT1. **Result:** Eight components were successfully screened and identified as hyperoside, plantamajoside, kaempferol-3-O-glucoside,

[收稿日期] 20200318(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81660648);江西省自然科学基金项目(20171BAB205090);江西中医药大学民族药协同创新项目(JXXT2018001);江西中医药大学研究生创新基金项目(JZYC18S11)

[第一作者] 任玲玲,在读硕士,从事中药药效物质基础与质量标准研究,Tel:0791-87119065,E-mail:971641696@qq.com

[通信作者] *曾金祥,教授,从事中药药效物质基础与质量标准研究,Tel:0791-87119065,E-mail:zjx@jxutcm.edu.cn

lugrandoside, nepitrin, isolugrandoside, homoplantagin, luteolin, respectively. Those components could combine with URAT1 mainly through hydrogen bond, van der Waals force and hydrophobic action, which were closely related to structure and compound types. Furthermore, the LibDock score of phenylethanoids was higher than that of flavonoids. **Conclusion:** The integration of target cell capture, UPLC-Q-TOF-MS and molecular docking techniques could be successfully used to identify captured compounds of *L. brevituba* with URAT1 regulation effects and illustrate their potential combination mechanisms as well as the structure-activity relationships. The findings may provide material and theory bases for the development of new hypouricemic medicines based on *L. brevituba*.

[Key words] *Lagotis brevituba*; target cell capture; UPLC-Q-TOF-MS; urate anion transporter 1; molecular docking

高尿酸血症是因嘌呤代谢紊乱或尿酸排泄障碍引起血清尿酸增高的代谢性疾病,长期高尿酸血症可导致痛风并诱发心脑血管疾病、慢性肾功能不全、糖尿病等多种并发症^[1],严重影响人们的身体健康与生活质量。人体70%以上的尿酸经由肾脏排泄,这其中约90%由尿酸盐阴离子转运体1(Urate anion transporter 1, URAT1)负责调控^[2]。因此,URAT1一直是高尿酸血症及痛风防治药物开发的重要靶点,但目前已有苯溴马隆、丙磺舒及Lesinurad等药物具有严重的毒副作用^[3-4],故继续开发以URAT1为靶点的安全有效的促尿酸排泄新药仍是高尿酸血症及痛风防治的迫切需求。

从中草药中筛选安全有效的降尿酸药物一直是研究热点。短管兔耳草是一种著名的藏族药材,本课题组前期研究发现其提取物可通过调控肾脏URAT1促进高尿酸血症小鼠血清尿酸的排泄并具有较高的安全性^[5],但其药效物质有待于进一步研究阐明。另一方面,靶细胞或靶酶捕集联用液-质技术常用于快速筛选中草药潜在的活性成分,但这些成分与靶酶或靶细胞的结合机制难以阐明^[6-7]。分子对接技术通过虚拟筛选可预测化合物与靶标的结合机制,具有目标明确、成本低、筛选效率高等优势^[8-9]。本研究集成靶细胞捕集,UPLC-Q-TOF-MS与分子对接技术同时研究藏族药短管兔耳草调控URAT1成分及成分与URAT1的结合机制,以期为基于藏族药短管兔耳草的降尿酸新药开发奠定物质与理论基础。

1 材料

UPLC-Q-TOF/MS仪器:Triple-TOFTM5600型高分辨质谱仪,配备ESI离子源及Analyst 1.6数据处理软件(美国ABSCIEX公司),联用岛津LC-30A型超高效液相色谱仪。SW-CJ-VS2型超净工作台(江苏无锡锡净化设备有限公司),CCL-170B-8型

二氧化碳培养箱(厦门精艺兴业科技有限公司),DSZ2000X型倒置相差显微镜(重庆澳浦光电技术有限公司),Discovery Studio 4.5(美国Accelrys)。

HK-2细胞株(南京科佰生物科技有限公司),HyClone RPMI培养基(上海源培生物科技股份有限公司,批号L220KJ);1×磷酸盐缓冲液(PBS),0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液(1 mmol·L⁻¹),双抗青霉素与链霉素(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为P1020-500,20180915,20181017);胎牛血清(FBS,浙江天杭生物科技有限公司,批号11011-8611)。乙腈(色谱纯,美国Tedia公司);甲酸(色谱纯,美国Sigma公司);大车前苷(上海源叶有限公司,批号P01N9F74010,纯度>98%)。其他试剂均为分析纯。短管兔耳草购于成都荷花池药材市场,经江西中医药大学钟国跃教授鉴定为短管兔耳草*Lagotis brevituba*的干燥全草。

2 方法

2.1 短管兔耳草样品制备 短管兔耳草全草粉碎,过40目筛,加入4倍体积的65%乙醇水溶液浸泡放置过夜,超声30 min,滤过。残渣重复提取2次,合并滤液,减压回收溶剂,真空干燥,置于-20℃冰箱保存,备用。

称取提取物25 mg溶解于0.5 mL DMSO中,再加生理盐水4.5 mL,得质量浓度为5 g·L⁻¹的供试品溶液。

2.2 HK-2细胞的培养 HK-2细胞于37℃水浴中复苏,加入HyClone RPMI培养基(含10%FBS,1%PS)8 mL,于37℃,饱和湿度、5% CO₂环境下用T-25细胞培养瓶培养。隔天更换培养基,生长3~4 d后细胞达到融合。用0.25%的胰蛋白酶-EDTA的消化液传代。在倒置相差显微镜下观察,选均匀铺满瓶底、生长状态良好的细胞供实验用。

2.3 HK-2细胞捕集短管兔耳草成分 选择处于对

数生长期的 HK-2 细胞,加入无血清的 HyClone RPMI 培养基,在 37 °C,饱和湿度,5% CO₂ 条件下孵育 0.5 h,弃去培养基,加入用无血清的 HyClone RPMI 培养基溶解的短管兔耳草冻干粉配制质量浓度 0.75 g·L⁻¹ 的供试品溶液,孵育 2 h。弃去含药物培养基,每次用 1×PBS 1 mL 冲洗细胞,共 4 次,取第 4 次 PBS 洗脱液备用。收集细胞,并将其置于 -80 °C 急速冷冻 10 min,随后取出立即置于 37 °C 水浴中融化,反复冻融 3 次,使细胞破碎,并将其冷冻干燥成粉末。取冻干样品,加入 75% 乙醇水溶液 200 μL 溶解,涡旋混匀 1 min,以 4 °C,转速 13 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,移取上清液备用。将第 4 次洗脱液和细胞破碎液进行检测。

2.4 捕集成分分离鉴定

2.4.1 色谱条件 采用 YMC-Triart C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.9 μm)。流动相 A 相 0.2% 甲酸水溶液, B 相 乙腈溶液,梯度洗脱 (0~5 min, 7%~19%B; 5~21 min, 19%~23%B; 21~24 min, 23%~52%B)。流速 0.4 mL·min⁻¹; 柱温 40 °C,进样量 4 μL。

2.4.2 质谱条件 超高效液相色谱法耦合 Q-TOF-MS, 配备电喷雾电离源 (ESI), 正、负离子模式进行扫描分析。负离子模式扫描条件: 离子喷雾电压 -4.5 kV, 离子源温度 550 °C, 去簇电压 (DP) -100 eV, 碰撞能量 (CE) 40 eV, 碰撞能量叠加 (CES) 为 10 eV, 气帘气压力为 207 kPa, 辅助气压力为 345 kPa。正离子模式条件: 离子喷雾电压 5.5 kV, 离子源温度 500 °C, 去簇电压 (DP) 100 eV, 其余参数同负离子模式。采用 AB analyst TF 软件采集数据, MS 一级预扫描和触发的二级扫描离子累积时间分别为 250, 150 ms, 质量扫描范围为 *m/z* 50~1 200。应用 AB Sciex 公司 Peakview 1.6 数据处理软件鉴定 HK-2 细胞捕集成分。

2.4.3 数据处理 将 HK-2 细胞捕集样品 UHPLC-Q-TOF/MS 总离子流图丰度与第四次 PBS 洗涤样品 UHPLC-Q-TOF-MS 总离子流图丰度对比, 信号相差 10 倍以上的成分作为靶细胞捕集成分。

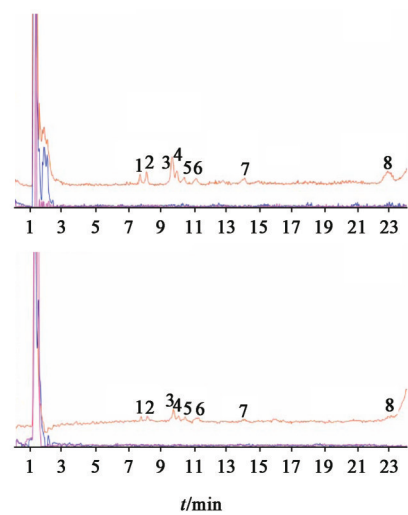
2.5 捕集成分与 URAT1 的分子对接 hURAT1 一级序列 (ID: BAB96750) 获取自 NCBI 数据库, 4JA3, 4LDS, 4GBY 和 4PYP 晶体结构从 PDB 蛋白质晶体数据库 (RSCB Protein Data Bank, PDB) 中获得。8 个配体分子结构从 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中下载。

参照 YONG 等^[10] 同源建模方法进行 URAT1 同源建模。简言之, 以 4JA3, 4LDS, 4GBY 和 4PYP 蛋

白分子为模板蛋白分子, 利用 DS4.5 中 MODELLER 程序对 URAT1 进行同源建模。以模型中 PDF Total Energy 及 DOPE Score 最低的模型为最优模型, 采用拉氏图 (Ramachandran Plot) 对模型进行评估, 对模型 Loop 环区进行优化, 每次优化后均对蛋白模型进行评估, 并保存为所需的文件类型。将优化得到的蛋白大分子加氢和电荷后, 用 Clean Protein 进行蛋白预处理, 以蛋白的每个活性位点为基准, 后应用 DS4.5 中 LibDock 模块将配体小分子与靶蛋白进行分子对接。

3 结果

3.1 HK-2 细胞捕集 对 HK-2 细胞捕集的短管兔耳草成分进行 UHPLC-Q-TOF-MS 分析, 得正、负离子模式下的质谱总离子流图, 结果见图 1。HK-2 细胞与短管兔耳草孵育后, 应用 PBS 洗涤 4 次, 其质谱正、负离子模式下总离子流图均未见有明显质谱响应信号 (图中蓝色线条)。而在与短管兔耳草孵育的细胞破碎液中, 在负离子模式下出现了 8 个较强的质谱响应信号峰; 而在正离子模式下, 虽然响应信号相对较弱, 但仍然可以检测对应位置下的质谱响应信号。因此, 这些正负离子模式下的信号峰被选择用于结构解析。



A. 负离子模式; B. 正离子模式; 蓝线. 与 HK-2 细胞孵育的第四次洗涤液; 红线. 提取物

图 1 短管兔耳草中 HK-2 细胞捕集成分的总离子色谱

Fig. 1 Total ion chromatography of HK-2 cell extractions of *Lagotis brevifolia* obtained by UPLC-Q-TOF-MS

通过 Peak view 软件提取 HK-2 细胞捕集成分在正负离子扫描模式下的二级裂解碎片, 结合文献、对照品及各数据库, 对成分进行了鉴定, 见表 1。由表 1 可知, 化合物 1, 3, 5, 7, 8 属于黄酮类化合物, 化合物 2, 4 和 6 属于苯乙醇苷类化合物且互为同分异

构体。黄酮类化合物中化合物1,3则为黄酮醇苷类化合物,化合物5,7,8为黄酮及其苷类化合物。

表1 HK-2细胞捕集的短管兔耳草成分各正负离子扫描模式下的离子碎片及LibDock打分

Table 1 Total ion current chromatography of HK-2 cells captured components from *Lagotis breviflora* in negative and positive ion mode and LibDock score

化合物	t_R /min	分子式	扫描模式	m/z	二级碎片离子(m/z)	推断结果	对接打分
1	7.71	$C_{21}H_{20}O_{12}$	负	463.082 7	301.032 9	金丝桃苷 ^[11]	103.59
			正	465.101 4	303.049 3, 285.058 9, 257.041 8, 169.013 0		
2	8.81	$C_{29}H_{36}O_{16}$	负	639.191 4	477.128 9, 315.109 8, 161.023 2	大车前苷 ¹⁾	199.586
			正	641.207 8	663.189 8, 325.089 2, 163.038 7		
3	9.67	$C_{21}H_{20}O_{11}$	负	447.092 9	285.038 4, 256.033 3	山柰酚-3-O-葡萄糖苷 ^[7]	111.577
			正	449.107 9	287.055 1, 269.055 1, 153.018 3		
4	9.97	$C_{29}H_{36}O_{26}$	负	639.187 6	477.154 0, 315.104 8, 161.023 9	黄大花洋地黄苷 ^[7]	150.087
			正	641.207 1	479.157 4, 325.089 2, 163.038 7		
5	10.46	$C_{22}H_{22}O_{12}$	负	477.094 7	462.072 8, 315.048 3, 300.026 9, 271.022 6	假荆芥属苷 ^[12]	148.445
			正	479.117 7	317.065 5, 302.041 8, 274.038 9, 169.011 7		
6	11.27	$C_{29}H_{36}O_{26}$	负	639.184 2	477.155 9, 161.023 2	异黄大花洋地黄苷 ^[10]	145.487
			正	641.207 9	479.159 0, 325.092 5, 163.038 1		
7	14.09	$C_{22}H_{22}O_{11}$	负	461.103 6	446.083 4, 297.034 7, 283.022 2, 255.029 2	高车前苷 ^[11]	109.604
			正	463.123 7	301.071 0, 286.048 6, 283.022 2, 258.052 6		
8	22.08	$C_{15}H_{10}O_6$	负	285.037 5	151.003 2, 133.028 1	木犀草素 ^[7]	110.749
			正	287.054 3	269.041 6, 241.049 6, 153.017 7		

注:1)与对照品比对。

3.2 靶细胞捕集成分各离子碎片的归属分析 峰1负离子模式[M-H]⁻ m/z 为463,与正离子模式[M+H]⁺的 m/z 465相对应。[M-H]⁻失去Glu-(162 Da),得到 m/z 301的离子碎片,与正离子模式下的 m/z 303相对应。正离子模式下, m/z 303经中性丢失脱去1个分子H₂O(18 Da),得到 m/z 285的离子碎片,该离子碎片继续经中性丢失脱去CO(28 Da),得到 m/z 285的离子碎片。然后进一步脱去C₆O-(88 Da),最终得到 m/z 169的离子碎片。其主要离子碎片与文献[7]基本一致,故推断其为金丝桃苷($C_{21}H_{20}O_{12}$, hyperoside)。

峰2负离子模式[M-H]⁻ m/z 为639,与正离子模式下[M+H]⁺ m/z 641对应。在正、负离子模式下该成分分别存在[M+Cl]⁻ (m/z 675), [M+NH₄]⁺ (m/z 658), [M+Na]⁺ (m/z 663)的加和离子峰(未列出)。负离子模式下 m/z 477和315为[M-H]⁻连续脱去Glu-(162 Da)和caffeoyl-(162 Da)所致。负离子模式下 m/z 161和正离子模式下 m/z 163来源于准分子离子连续脱去Glu-(162 Da), caffeoyl-(162 Da)和phenethylol-(154 Da)所致。其结构与正离子模式下准分子离子连续脱去Glu-(162 Da)和

phenethylol-(154 Da)得到 m/z 325的离子碎片方式相同,因其保留时间及离子碎片与对照品一致,故推断其为大车前苷($C_{29}H_{36}O_{16}$, plantamajoside)。

峰3负离子模式[M-H]⁻ m/z 为447,与正离子模式下[M+H]⁺ m/z 449的相对应。同时在正、负离子模式下分别存在[M+Cl]⁻ (m/z 483), [M-H+FA]⁻ (m/z 493)的和[2M-H]⁻ (m/z 895), [M+Na]⁺ (m/z 471), [2M+H]⁺ (m/z 897)的加和离子峰(未列出)。负离子模式下 m/z 285和256为准分子离子连续脱去Glu-(162 Da)和HCO-(29 Da)所致。正离子模式下碎片离子 m/z 287, 269和241则为准分子离子连续脱去Glu-(162 Da), 1个分子H₂O(18 Da)和1个分子CO(28 Da)所致。正离子模式下的 m/z 153碎片离子则是因为该成分在C环发生RAD裂解所致。其主要离子碎片与文献[7]一致,故推断其为山柰酚-3-O-葡萄糖苷($C_{21}H_{20}O_{11}$, kaempferol-3-O-glucoside)。

峰4负离子模式[M-H]⁻ m/z 639,与正离子模式下[M+H]⁺ m/z 641相对应。同时在正、负离子模式下分别存在[M+Cl]⁻ (m/z 675), [M+NH₄]⁺ (m/z 658), [M+Na]⁺ (m/z 663)的加和离子峰(未列出)。

负离子模式下 m/z 447 和 315 为准分子离子连续脱去 Glu-(162 Da) 和 caffeoyl-(162 Da) 所致, 而 m/z 161 则来源于准分子离子连续脱去 Glu-(162 Da), phenethylol-(154 Da) 和 Glu-(162 Da) 所致。正离子模式下碎片离子 m/z 479, 325 和 163 则为准分子离子连续脱去 Glu-(162 Da), phenethylol-(154 Da) 和 1 个分子 H_2O (18 Da) 所致。其主要离子碎片与文献 [7] 一致, 故推断其为黄大花洋地黄苷 ($C_{29}H_{36}O_{26}$, lugrandoside)。

峰 5 负模式 $[M-H]^-$ m/z 为 447, 与正离子模式下的 $[M+H]^+$ m/z 479 相对应。同时在正、负离子模式下分别存在 $[M+Cl]^-$ (m/z 513), $[M+Na]^+$ (m/z 501), $[2M+H]^+$ (m/z 957) 的加和离子峰 (未列出)。根据离子碎片特征, 该成分在负离子模式下可能存在两种裂解途径: 一是准分子离子连续脱去 Glu-(162 Da), CH_3 -(15 Da) 和 HCO -(29 Da) 产生 m/z 315, 300 和 271 的离子碎片。二是准分子离子连续脱去 CH_3 -(15 Da), Glu-(162 Da) 和 HCO -(29 Da), 分别产生 m/z 462, 300 和 271 的离子碎片。正离子模式下的 m/z 317, 302, 274 和 169 则分别为准分子离子连续失去 CH_3 -(15 Da), Glu-(162 Da), 1 个分子 CO (28 Da), 并在 C 环开环发生 RDA 位键裂解所致。其主要离子碎片与文献 [8] 一致, 该结构鉴定为假荆芥属苷 ($C_{22}H_{22}O_{12}$, Nepitrin)。

峰 6 负离子模式 $[M-H]^-$ m/z 为 639, 与正离子模式 $[M+H]^+$ m/z 641 的对应。同时在正、负离子模式下分别存在 $[M+Cl]^-$ (m/z 675), $[M+NH_4]^+$ (m/z 658), $[M+Na]^+$ (m/z 663) 的加和离子峰 (未列出)。在负离子模式下 m/z 447, 315 和 161 的离子碎片分别为准分子离子连续失去 Glu-(162 Da), phenethylol-(154 Da) 和 Glu-(162 Da)。其正离子模式下的 m/z 479, 325, 307 和 163 则分别为准分子离子连续失去 Glu-(162 Da), phenethylol-(154 Da), 1 个分子 H_2O (18 Da) 和脱水 Glu-(144 Da) 所致。这个成分的碎片及裂解途径与峰 4 基本一致, 由于 caffeoyl- 处于葡萄糖 3' 位时较 2' 位时保留时间要长 [13], 基于文献 [14] 该成分鉴定为异黄大花洋地黄苷 ($C_{29}H_{36}O_{26}$, isolugrandoside)。

峰 7 负离子模式 $[M-H]^-$ m/z 为 461, 与正离子模式 $[M+H]^+$ m/z 463 相对应。在负离子模式下 m/z 297, 283 和 255 的离子碎片分别为准分子离子连续脱去 Glu-(164 Da) 并在 B 环 6, 7 位形成亚甲基, 然后经中性丢失连续脱去 CH_2 -(14 Da) 和 CO (28 Da) 所致。其正离子模式下的 m/z 301, 286 和 258 分别

为准分子离子连续脱去 Glu-(162 Da), CH_3 -(15 Da) 和 1 个分子 CO (28 Da) 所致。该成分的碎片及裂解途径与文献 [15] 报导的结果基本一致, 故鉴定为高车前苷 ($C_{22}H_{22}O_{11}$, homoplantaginin)。

峰 8 负离子模式 $[M-H]^-$ m/z 为 285, 与正离子模式 $[M+H]^+$ m/z 为 287 相对应。负离子模式下 m/z 151 和 133 的离子碎片分别为准分子离子在 C 环发生 RDA 裂解所致。其正离子模式下的 m/z 269, 241 和 153 分别为准分子离子连续脱去 1 个分子 H_2O (18 Da), 1 个分子 CO (28 Da) 并于 C 环产生 RDA 裂解所致。该成分的裂解途径与文献 [7] 基本一致, 故该成分鉴定为木犀草素 ($C_{15}H_{10}O_6$, luteolin)。

3.3 捕集成分与 URAT1 的分子对接

3.3.1 同源建模

URAT1 的晶体结构尚未完全阐述清楚, 但已知晶体结构的蛋白 4JA3, 4LDS, 4GBY 和 4PYP 可以做为 URAT1 同源建模的模板蛋白分子 [6]。因此, 这些蛋白分子的结构用于来构建 URAT1 的三维分子结构, 该模型经 Ramachandran 图验证, 结果见图 2。由结果可知, 88.9% 的氨基酸位于允许区, 8.2% 的氨基酸残基位于最大允许区域。结果与文献 [6] 接近, 表明所建立的模型有效, 可用于与捕集的 8 个化学成分的分子对接。

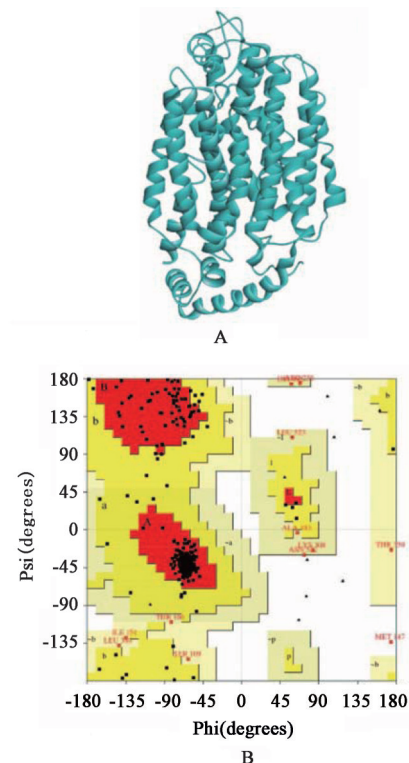
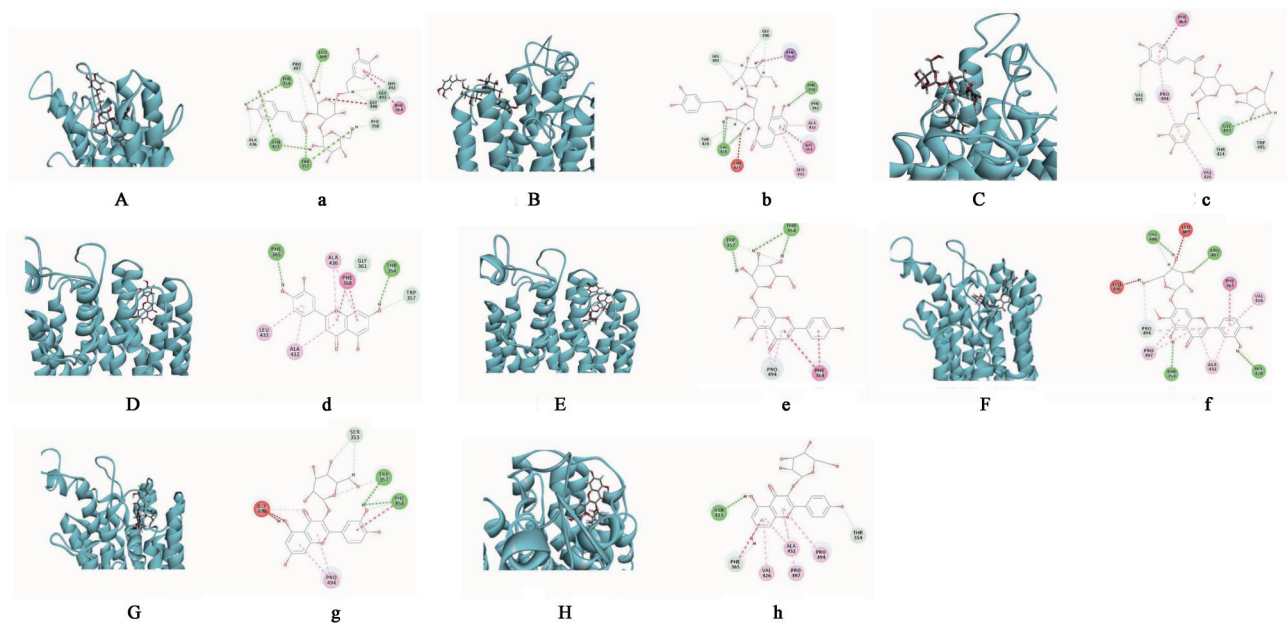


图 2 建模的 URAT1(A) 与建模 URAT1 的 Ramachandran plot(B)
Fig. 2 Modelled structure of URAT1(A) and Ramachandran plot of URAT1 model(B)

3.3.2 LibDock分子对接 各化合物的LibDock打分结果见表1,与URAT1的LibDock对接机制见图3。大车前苷、黄花洋地黄苷和异黄花洋地黄苷的LibDock打分结果分别为199.586, 150.869和145.487。大车前苷与URAT1的THR354, LEU489, ASN423和TRP357等多个氨基酸残基形成氢键,与URAT1蛋白的ALA436和PHE364存在疏水作用(pi-Alkyl共轭)与范德华力,并与PHE364存在pi-pi共轭作用。黄大花洋地黄苷与URAT1上的VAL426和PHE358形成氢键,其分子中的1个苯环可以同时与ALA432, GLY361和LEU433发生pi-Alkyl疏水作用与pi-pi共轭作用,并与PHE362存在范德华力。异黄大花洋地黄苷则与URAT1上的PRO494和VAL426形成pi-Alkyl共轭产生疏水作用,与GLY493和PHE364分别产生氢键作用和pi-pi共轭作用木犀草素及高车前苷、假荆芥素苷的LibDock打分结果分别为110.749, 109.604和148.445。木犀草素与URAT1的PHE365, THR354形成氢键,与ALA436, ALA432和LEU433通过pi-Alkyl共轭产生疏水作用。木犀草素中的A和C环则与URAT1

的PHE358存在pi-pi共轭作用。高车前苷分子结构中的B和C环与URAT1上的PHE364产生pi-pi共轭作用,且A和C环与PRO494通过pi-Alkyl共轭产生疏水作用,该化合物中的糖基部分与URAT1的TRP357, THR354形成氢键。假荆芥属苷与URAT1的HIS428, THR354, ARG487和VAL486形成氢键,分子中的B环与URAT1的PHE365存在pi-pi共轭作用,同时该化合物还与URAT1的VAL426, ALA432, PRO497和PRO494通过pi-Alkyl共轭产生疏水作用。金丝桃苷和山柰酚-3-O-葡萄糖苷的LibDock打分结果分别为103.059与111.577。金丝桃苷与URAT1的TRP357, PHE358形成氢键,其分子的B环则与URAT1的PHE358产生pi-pi共轭作用, A环和C环与URAT1的PRO494存在pi-Alkyl共轭疏水作用。山柰酚-3-O-葡萄糖苷与URAT1上的VAL426, ALA432, PRO497和PRO494氨基酸残基同时产生疏水作用(pi-Alkyl共轭),分子中的A环与URAT1的PHE365产生pi-pi共轭作用,与PHE365, THR354发生氢键相互作用。



Aa.URAT1-大车前苷;Bb.URAT1-黄大花洋地黄苷;Cc.URAT1-异黄大花洋地黄苷;Dd.URAT1-木犀草素;Ee.URAT1-高车前苷;Ff.URAT1-假荆芥属苷;Gg.URAT1-金丝桃苷;Hh.URAT1-山柰酚-3-O-葡萄糖苷

图3 HK-2细胞捕集的8个成分与URAT1对接的3D和2D模式

Fig. 3 Docked complex of URAT1 with 8 components by HK-2 cell captured from *Lagotis brevitiba*

4 讨论

本文应用HK-2细胞与UPLC-Q-TOF-MS技术成功捕集并鉴定了藏族药短管兔耳中8个成分。由分子对接结果可知,各化合物可与URAT1通过氢

键,疏水作用,范德华力,pi-pi共轭作用与静电作用等方式与URAT1相结合。这说明集成靶细胞捕集,液-质联用与分子对接技术不仅可成功筛选藏药短管兔耳草潜在的调控URA1活性成分,还可成功阐

明其与URAT1的结合机制。

另一方面,各化合物的LibDock打分结果各不相同则进一步说明不同成分因化合物类型与结构不同,与URAT1的结合存在构效关系。由大车前苷、黄大花洋地黄苷和异黄大花洋地黄苷等苯乙醇苷类成分与URAT1结合LibDock打分可知,葡萄糖分子在C1位与苯乙醇基相连,C4位与苯丙酸基相连,再在C3位与另一葡萄糖分子在C1'位结合形成大车前苷分子更有利于化合物与URAT1发生作用。但两葡萄糖分子如通过C6-C1'位结合和葡萄糖分子在C4位或C3位与苯丙酸基相连,则显著降低分子与URAT1的结合作用力。由木犀草素、高车前苷与假荆芥素等黄酮类化合物与URAT1的打分结果可知,木犀草素A环在C7位连接葡萄糖基与C环在C3位连接甲氧基对木犀草素与URAT1结合作用的贡献并不明显。但如在B环C3'位进一步结合羟基形成假荆芥素,则可显著增强其与URAT1的作用。另外,由黄酮醇苷类化合物金丝桃苷和山柰酚-3-O-葡萄糖苷的LibDock打分结果相近可知,金丝桃苷分子B环C3'的羟基对其与URAT1的结合作用贡献不大。这些结果说明,将靶细胞捕集结合液-质联用与分子对接技术,不仅可预测捕集成分与URAT1的结合机制,还可以分析成分与URAT1的构效关系,从而为捕集成分的进一步开发提供了重要依据。

总之,本研究集成靶细胞捕集,UHPLC-Q-TOF-MS及分子对接技术,成功地阐明了藏药短管兔耳草调控URAT1成分及其与URAT1的结合机制和构效关系,为基于藏族药短管兔耳草调控URAT1的降尿酸新药开发提供了较好的物质与理论基础。

[参考文献]

[1] DALBETH N, MERRIMAN T R, STAMP L K. Gout [J]. *Lancet*, 2016, 388(10055): 2039-2052.
[2] NAKANISHI T, OHYA K, SHIMADA S, et al. Functional cooperation of URAT1 (SLC22A12) and URATv1 (SLC2A9) in renal reabsorption of urate [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2013, 28(3): 603-611.
[3] 林佳俊,王进,任耀坤,等. 痛风药物研究进展[J]. *药学与临床研究*, 2019, 27(3): 216-220.

[4] FIELDS T R. The challenges of approaching and managing gout [J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2019, 45(1): 145-157.
[5] 曾金祥,许兵兵,李敏,等. 藏药短管兔耳草醇提物降低急性高尿酸血症小鼠血尿酸水平及机制研究[J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(21): 2489-2493.
[6] SONG H P, ZHANG H, FU Y, et al. Screening for selective inhibitors of xanthine oxidase from *Flos Chrysanthemum* using ultrafiltration LC-MS combined with enzyme channel blocking [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 961: 56-61.
[7] QU F N, QI L W, WEI Y J, et al. Multiple target cell extraction and lc-ms analysis for predicting bioactive components in *Radix Salviae Miltiorrhizae* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(3): 501-506.
[8] 王琰,吴杰,向净匀,等. 基于网络药理学和分子对接法探寻黄连解毒汤治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)活性化合物的研究[J]. *中药药理与临床*, 2020, 36(2): 73-79.
[9] 谢晶,张晨辉,曾金祥,等. 基于液质联用及分子对接技术的短管兔耳草中XOD捕集成分研究[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(17): 3595-3603.
[10] YONG T H, ZHANG M L, CHEN D L, et al. Actions of water extract from *Cordyceps militaris* in hyperuricemic mice induced by potassium oxonate combined with hypoxanthine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 194: 403-411.
[11] 谢晶,张丽,曾金祥,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术的短管兔耳草化学成分快速识别研究[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(11): 2123-2130.
[12] 党立志,张翼鹏,张健,等. LC-MS技术快速识别迷迭香中黄酮苷类化合物[J]. *云南农业大学学报:自然科学*, 2017, 32(2): 358-365.
[13] 许兵兵,黄碧涛,曾金祥,等. 车前子及车前草中毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷的含量比较[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(18): 64-67.
[14] 林生,刘明韬,王素娟,等. 小蜡树的酚苷及苯乙醇苷类成分[J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(8): 992-996.
[15] 肖超妮,刘红兵,戴惠,等. 基于HPLC-DAD-SPE-CryoNMR-MS技术的代谢物快速定性和结构确定(英文)[J]. *波谱学杂志*, 2009, 26(1): 1-16.

[责任编辑 顾雪竹]