

# 丹参作用于内皮素转换酶的活性成分虚拟筛选

陈少军\*, 崔明超, 陈宏降

(浙江医药高等专科学校中药系, 浙江宁波 315000)

**[摘要]** 目的:采用虚拟筛选技术对丹参作用于内皮素转换酶(ECE-1)的活性成分进行筛选。方法:选用台湾中医药资料库收集的丹参化学成分为配体,选取ECE-1作为受体,通过Iscreen在线服务器虚拟筛选与ECE-1对接较好的丹参小分子成分,探讨丹参小分子与ECE-1的结合模式,采用Pymol对其复合体进行分子对接分析。结果:丹参酮II<sub>A</sub>作用ECE-1的文献1篇。在150个丹参小分子成分中,丹酚酸D、迷迭香酸、丹参酸丙匹配打分较高,得分分别为-85.233, -84.195, -82.445。丹酚酸D与ECE-1蛋白的Val565, Asn566, Ala567, His607, Glu667, Arg738形成氢键连接;迷迭香酸与Arg145, Val565, Glu608, Asp730, Arg738形成氢键连接;丹参酸丙与Val565, Asn566, Ala567, His607, Glu667, Arg738形成氢键连接。结论:丹参中的丹酚酸D、迷迭香酸、丹参酸丙可能是丹参作用于ECE-1的活性成分。

**[关键词]** 丹参; 内皮素转化酶; 虚拟筛选; 丹酚酸D; 迷迭香酸; 丹参酸丙

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0048-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140048

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140528.1344.022.html>

**[网络出版时间]** 2014-05-28 13:44

## Virtual Screening of Active Components from *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* for Endothelin Converting Enzyme

CHEN Shao-jun\*, CUI Ming-chao, CHEN Hong-jiang

(Department of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To screen active components from *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* which acted on endothelin converting enzyme (ECE-1) by virtual technology. **Method:** Taking active ingredients in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* from traditional Chinese medicine database@ Taiwan as ligands, ECE-1 was chosen as protein receptor for calculation. Iscreen web server was used as virtual screening tool to select small molecule components in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, which was docked well with ECE-1, binding mode between ECE-1 and small molecule components in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* was discussed, molecular docking analysis of its complex was disposed of Pymol. **Result:** There was one literature about tanshinone II<sub>A</sub> acted on ECE-1. In total 150 small molecule ingredients, there was high score between salvianolic acid D, rosmarinic acid and salvianic acid C matching ECE-1, scores were -85.233, -84.195 and -82.445, respectively. Salvianolic acid D docked with Val565, Asn566, Ala567, His607, Glu667 and Arg738 in ECE-1 protein by hydrogen bond; rosmarinic acid connected with Arg145, Val565, Glu608, Asp730 and Arg738 by hydrogen bond; salvianic acid C docked with Val565, Asn566, Ala567, His607, Glu667 and Arg738 by hydrogen bond. **Conclusion:** Salvianolic acid D, rosmarinic acid and salvianic acid C in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* may be active components to ECE-1.

**[Key words]** *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; endothelin converting enzyme; virtual screening; salvianolic acid D; rosmarinic acid; salvianic acid C

**[收稿日期]** 20131002(001)

**[基金项目]** 浙江省教育厅高校科研项目(Y201330180)

**[通讯作者]** \* 陈少军, 博士, 讲师, 从事中药信息学研究, Tel:0574-88223006, E-mail: chenshaojun2004@126.com

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎,具有扩张冠状动脉、增加冠脉血流量、防止心肌缺血、改善微循环、降血脂、保护脑组织等药理作用,临床广泛用于治疗心脑血管疾病<sup>[1]</sup>,但作用机制尚未十分明确。内皮素(ET)是一种作用很强的收缩因子,参与多种人体生理、病理过程,已成为丹参活血化瘀作用机制的研究热点之一。ET通常以极低浓度存在于机体中,当刺激作用于内皮细胞(或其他细胞)时,促进胞内的内皮素前肽原合成,并裂解成无活性的多肽,再在ET转化酶(ECE-1)剪切作用下转化成活性多肽<sup>[2]</sup>。在这生物合成过程中,ECE-1是关键限速酶<sup>[2]</sup>,但相关研究较少,采用传统药理学研究费事费力。本实验利用计算机手段将丹参分子与ECE-1进行筛选对接,分析丹参作用于ECE-1的活性成分,为丹参的临床推广提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 文本挖掘** 采用TCMGenDIT数据库系统,该系统数据是从Medline数据库,应用自动文本挖掘方式获得中药、基因和疾病相互关联的信息<sup>[3]</sup>。以丹参作为检索词,查询丹参与ET系统相关的信息。采用人工文本挖掘方式,以丹参和ECE-1为检索词,在中国期刊网全文数据库检索与之相关的所有文献,检索范围2013年6月1日前,剔除重复或不含信息的文献,提取丹参作用于ET系统的文献信息。

**1.2 虚拟筛选与分子对接** 台湾中医药资料库是目前全世界最大中医药小分子数据库(<http://tcm.cmu.edu.tw/>),包含来源于453种不同中药超过20000多种化学成分,可提供中药小分子活性成分虚拟筛选、分子对接和分子动力学模拟工具<sup>[4-5]</sup>。文献报道从该数据库中筛选出(S)-tryptophan-betaxanthin、小檗红碱与PPAR蛋白结合较好<sup>[6]</sup>,筛选出单咖啡酰酒石酸、2-O-feruloyl tartaric acid及梅素作为潜在 $\gamma$ -氨基丁酸的激动剂,对治疗失眠药物的开发有益<sup>[7]</sup>。

丹参作用于ECE-1的活性成分虚拟筛选和分子对接工具均采用台湾中医药资料库提供Iscreen在线服务器(<http://iscreen.cmu.edu.tw/>)<sup>[8]</sup>。丹参活性成分由台湾中医药资料库提供,包括脂溶性成分(丹参新酮、二氢丹参酮I、二氢异丹参酮I、去氢丹参新酮)和水溶性成分(丹参素、丹参酸B等)。数据库中丹参共收集了150个化学成分可用于下一步活性筛选。该数据库的化合物均通过类药五原则,化合物3D结构采用NM2力场优化<sup>[8]</sup>。蛋白质

结构准备是虚拟筛选和分子对接的重要一步,从蛋白质数据库PDB(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)下载ECE-1晶体结构,相对应的PDB文件为3DWB。采用台湾中医药资料库自带的蛋白准备工具(<http://dock.cmu.edu.tw/ligand.php>)处理ECE-1靶蛋白,包括加氢、自带配体结合区域分析、删除自带配体、删除溶剂分子等。虚拟筛选与分子对接中,ECE-1结合区域中心坐标以晶体结构自带抑制剂phosphoramidon所在空间坐标作为参考,经分析 $X = 84.003, Y = 31.105, Z = 41.840$ ,以这个中心坐标作为分子对接中心,活性区域半径9 nm,其他参数采用默认值<sup>[9]</sup>,实验结果按对接打分排序。

**1.3 分子模拟图像处理** 丹参与活性成分分子对接采用分子图形开源软件Pymol分析处理作图。

## 2 结果

**2.1 数据挖掘** 查询TCMGenDIT数据库,丹参与内皮素基因(END1)相关,文献数为2篇,但无丹参作用于ECE-1基因的数据记录。以丹参、内皮素作为关键词,在期刊网全文数据库查询,可检索到18239篇文献(含重复文献或不相关文献,检索时间2013年6月3日)。以丹参、内皮素转化酶作为关键词,在中国期刊网全文数据库精确查询,去除重复或不相关的文献,可查到丹参酮II<sub>A</sub>作用ECE-1的文献1篇<sup>[10]</sup>。

**2.2 虚拟筛选** 虚拟筛选得分前40个小分子见表1。结果显示在丹参150个小分子中,与ECE-1对接较好的有丹酚酸D、迷迭香酸、丹参酸丙,这些化合物可作为ECE-1抑制剂的先导化合物深入考察。

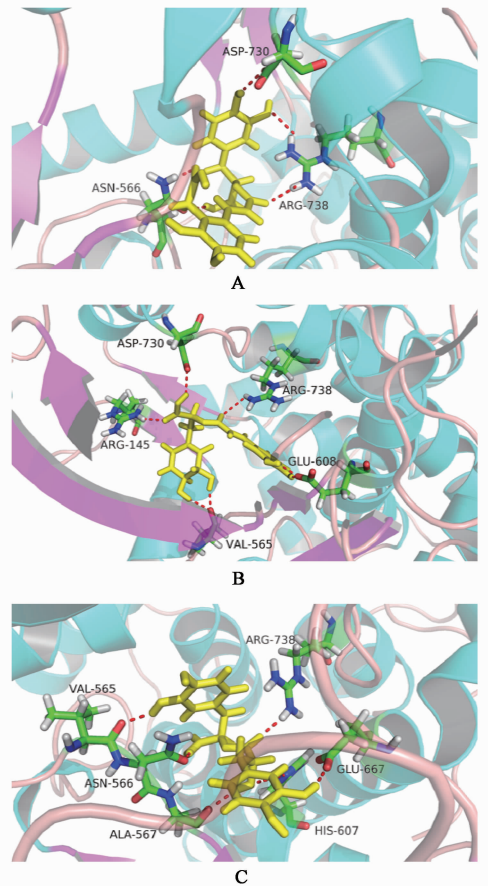
**2.3 分子对接** 为验证并探讨丹参小分子与ECE-1的结合模式,采用Pymol对其复合体进行分析。丹酚酸D与ECE-1蛋白的Val565,Asn566,Ala567,His607,Glu667,Arg738形成氢键连接(图1A)。迷迭香酸与Arg145,Val565,Glu608,Asp730,Arg738形成氢键连接(图1B)。丹参酸丙与Val565,Asn566,Ala567,His607,Glu667,Arg738形成氢键连接(图1C)。

采用ligplot软件分析并演示蛋白复合体的作用力,见图2。结果显示丹酚酸D与ECE-1的Arg738形成了2个N...O-H氢键,与Asn566形成1个N...O-H氢键,键长依次为0.30,0.31,0.30 nm(图2a);迷迭香酸与ECE-1蛋白Arg145形成1个N...O-H氢键,键长0.31 nm(图2b);丹参酸丙与ECE-1蛋白Ala567,Glu608分别形成1个O...O-H氢键,键长分别为0.28,0.30 nm,与His607,Arg738

表 1 Iscreen 虚拟筛选的高匹配打分的丹参活性成分

No.	配体小分子	得分
1	丹酚酸 D	-85.233
2	迷迭香酸	-84.195
3	丹参酸丙	-82.445
4	丹参酮 VI	-80.089
5	新隐丹参酮	-79.690
6	17-羟基隐丹参酮	-79.294
7	1-羰基丹参新酮	-78.796
8	17-hydroxytanshindiol B	-78.663
9	迷迭香酸甲酯	-78.650
10	丹酚酸 A	-78.435
11	丹参新醌甲	-78.172
12	原紫草酸	-78.136
13	salviadione	-78.128
14	1-ketoisocryptotanshinone	-77.654
15	palmitoyl arucadiol	-77.554
16	油酰丹参新醌 A	-76.865
17	丹参酚醌 II	-76.735
18	丹参酮 II <sub>B</sub>	-76.457
19	氟西汀	-76.381
20	salvianan	-76.090
21	salvianen	-75.830
22	3-羟基隐丹参酮	-75.422
23	丹参新酮	-75.237
24	neosalvianen	-75.204
25	紫丹参醌 A	-75.143
26	异丹参醌 II <sub>B</sub>	-75.068
27	丹参醇 B	-74.986
28	紫丹参素 C	-74.946
29	丹酚酸 C	-74.462
30	去氢丹参新酮	-74.347
31	3-羟基丹参酮 II <sub>A</sub>	-74.311
32	3,4-菲二酮	-74.301
33	丹参醇 A	-74.298
34	次丹参酮 I	-74.294
35	3-羟基丹参酮 II <sub>B</sub>	-74.261
36	4-亚甲基丹参新酮	-74.224
37	小红参醌 B	-74.212
38	丹参酮 II <sub>A</sub>	-74.162
39	丹参酮 II <sub>B</sub>	-74.131
40	Δ1-去氢丹参酮	-73.900

各形成 1 个 N...O-H 氢键, 键长分别为 0.33, 0.31 nm(图 2c); 丹酚酸 D 与较多的氨基酸发生了疏水作用, 而迷迭香酸和丹参酸丙的疏水作用相对较少, 这些疏水作用影响着蛋白复合体结构的稳定。



注: 黄色为配体小分子, 红色虚线为氢键。

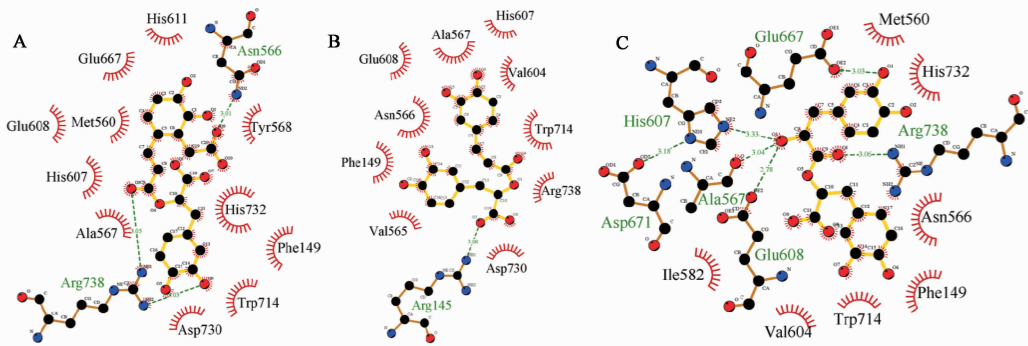
A. 丹酚酸 D; B. 迷迭香酸; C. 丹参酸丙

图 1 丹参成分与 ECE-1 分子的对接模式

### 3 讨论

研究报道迷迭香酸可抑制糖尿病大鼠动脉中 preET-1, ECE-1 等高表达, 对受损的内皮舒张性起保护作用<sup>[12]</sup>。还可通过降低 ET-1 和血管紧张素酶活性, 促进 NO 水平以抑制果糖诱导的大鼠血压升高<sup>[13]</sup>。在体外 TNF-α 诱导的脑血管内皮细胞中, 丹参酮 II<sub>A</sub> 可通过抑制 ECE-1 的生成使 ET 含量降低<sup>[10]</sup>。由表 1 可知, 丹参酮 II<sub>A</sub> 在虚拟筛选排序 38 位, 打分较靠前, 说明 ECE-1 结合位点能较好地与丹参酮 II<sub>A</sub> 发生相互作用, 推测丹参酮 II<sub>A</sub> 可能是作用于 ECE-1 的有效成分之一。

ECE-1 蛋白的 Val565, Asn566, Ala567 构成保守的三肽<sup>565</sup>VNA<sup>567</sup>, 该三肽在 M13 亚家族中均存在<sup>[9]</sup>。由图 1 可知, 丹酚酸 D 或丹参酸丙与<sup>565</sup>VNA<sup>567</sup>中 3 个氨基酸均有氢键连接, 迷迭香酸与



注:金黄色为配体小分子,红色睫毛线表示疏水作用,C,N,O分别为黑色,蓝色,红色小球<sup>[11]</sup>。

A. 丹酚酸 D;B. 迷迭香酸;C. 丹参酸丙

图2 丹参活性成分与 ECE-1 相互作用力示意

三肽中 Val565 有氢键作用。ECE-1 蛋白催化区域是 Zn 依赖性的,锌离子以四面几何形式存在,并与 His607, His611, Glu667 分别形成空间距离 0.22, 0.21, 0.18 nm, 这些氨基酸与锌离子共同构成了催化区域<sup>[9]</sup>。丹酚酸 D, 丹参酸丙与这一区域 His607, Glu667 有氢键连接。Arg738 与区域中 Asp-His-Zn 三联结构有盐桥作用, 认为参与了 Zn 离子空间位置的调节<sup>[9]</sup>。丹酚酸 D、迷迭香酸、丹参酸丙均有氢键连接。说明这 3 种丹参小分子与 ECE-1 核心氨基酸存在着相互作用力。

### [参考文献]

[ 1 ] Zhou L M, Zuo Z, Chow M S S. Danshen: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use [J]. *J Clin Pharmacol*, 2005, 45(12):1345.

[ 2 ] Kirkby N S, Hadoke P W F, Bagnall A J, et al. The endothelin system as a therapeutic target in cardiovascular disease: great expectations or bleak house? [J]. *Brit J Pharmacol*, 2008, 153(6):1105.

[ 3 ] Fang Y C, Huang H C, Chen H H, et al. TCMGeneDIT: a database for associated traditional Chinese medicine, gene and disease information using text mining [J]. *BMC Complem Altern Med*, 2008, 14(8):58.

[ 4 ] Chen C Y C. TCM database@Taiwan: the world's largest traditional Chinese medicine database for drug screening *in silico* [J]. *PLoS One*, 2011, 6(1):e15939.

[ 5 ] Sanderson K. Databases aim to bridge the East-West divide of drug discovery [J]. *Nat Med*, 2011, 17(12):1531.

[ 6 ] Chen K C, Chang S S, Huang H J, et al. Three-in-one agonists for PPAR-alpha, PPAR-gamma, and PPAR-delta

from traditional Chinese medicine [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2012, 30(6):662.

[ 7 ] Chen H Y, Chang S S, Chan Y C, et al. Discovery of novel insomnia leads from screening traditional Chinese medicine database [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2014, 32(5):776.

[ 8 ] Tsai T Y, Chang K W, Chen C Y C. iScreen: world's first cloud-computing web server for virtual screening and de novo drug design based on TCM database@Taiwan [J]. *J Comput Aided Mol Des*, 2011, 25(6):525.

[ 9 ] Schulz H, Dale G E, Karimi-Nejad Y, et al. Structure of human endothelin-converting enzyme I complexed with phosphoramidon [J]. *J Mol Biol*, 2009, 385(1):178.

[ 10 ] Tang C, Wu A H, Xue H L, et al. Tanshinone II<sub>A</sub> inhibits endothelin-1 production in TNF-alpha-induced brain microvascular endothelial cells through suppression of endothelin-converting enzyme-1 synthesis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(8):1116.

[ 11 ] Laskowski R A, Swindells M B. LigPlot +: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery [J]. *J Chem Inf Model*, 2011, 51(10):2778.

[ 12 ] Sotnikova R, Okruhlicova L, Vlkovicova J, et al. Rosmarinic acid administration attenuates diabetes-induced vascular dysfunction of the rat aorta [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2013, 65(5):713.

[ 13 ] Karthik D, Viswanathan P, Anuradha C V. Administration of rosmarinic acid reduces cardiopathology and blood pressure through inhibition of p22phox NADPH oxidase in fructose-fed hypertensive rats [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011, 58(5):514.

[责任编辑 刘德文]