

柴胡-黄芩药对主要成分与环氧氧化酶-2 的相互作用

仝艳, 李晓飞, 王宪龄*
(河南中医学院药学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的:用分子对接、分子动力学模拟和结合自由能计算结合的方法探讨柴胡-黄芩配伍治疗酒精性肝损伤的作用靶点。方法:以环氧氧化酶-2(COX-2)为作用靶点,以柴胡和黄芩中主要活性成分柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D、黄芩苷、黄芩素为研究对象,采用分子对接、分子动力学模拟和结合自由能计算结合的方法研究柴胡与黄芩配伍抗酒精性肝损伤的作用机制。结果:柴胡与黄芩起作用的靶点不同,在以 COX-2 为酒精性肝损伤的治疗靶点时,柴胡-黄芩配伍中的黄芩起主要作用。结论:黄芩素与 COX-2 的结合能力最强,是起主要作用的中药活性成分。

[关键词] 柴胡-黄芩配伍; 分子对接; 酒精性肝损伤; 分子模拟; 结合自由能

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0099-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014150099

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140609.1543.014.html>

[网络出版时间] 2014-06-09 15:43

Interaction Between Cyclooxygenase-2 and Main Active Chemical Components of Bupleuri Radix and Scutellariae Radix

TONG Yan, LI Xiao-fei, WANG Xian-ling*

(School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antihepatitis activity of Bupleuri Radix and Scutellariae Radix in compatibility by the combination of docking and molecular dynamics simulation. **Method:** The cyclooxygenase-2 (COX-2) plays an important role in alcoholic liver injury. In this study, four active chemical components of Bupleuri Radix and Scutellariae Radix, including baicalin, baicalein, saikosaponin A and saikosaponin D were docked with COX-2, respectively. Then structures of baicalin and baicalein complexed with COX-2 were used as the initial structure of molecular dynamics simulation and molecular mechanics-poisson boltzmann surface area (MM-PBSA) calculation research. **Result:** It has been found that saikosaponin A and saikosaponin D in Bupleuri Radix have no binding capability with COX-2 and baicalein in Scutellariae Radix has the strongest binding capacity with COX-2. **Conclusion:** The results have shown that Scutellariae Radix plays a key role when Bupleuri Radix and Scutellariae Radix interact with COX-2 in compatibility.

[Key words] Bupleuri Radix and Scutellariae Radix in compatibility; molecular docking; alcoholic liver injury; molecular simulation; binding free energy

环氧氧化酶(COX)又称前列腺素合成酶,是催化花生四烯酸(AA)合成前列腺素(PGs)和血栓素_{A2}

(TXA₂)的限速酶。环氧氧化酶-2(COX-2)为一种诱导酶,当细胞受到炎症等刺激时可高表达,是炎症介

[收稿日期] 20130727(013)

[基金项目] 河南省自然科学基金项目(994021900);郑州市科技攻关项目(10PTGS486-5);河南省教育厅自然科学基金项目(2011B180036);河南中医学院博士科研基金项目(BSJJ2009-12);河南中医学院科技创新支持计划项目(2012PYTD03)

[第一作者] 仝艳,博士,副教授,从事理论与计算化学研究, Tel:18539903603, E-mail: tongyan1974@126.com

[通讯作者] *王宪龄,教授,博导,从事中药基础理论和配伍研究及开发研究, Tel:13598090193, E-mail: wxl_zz@126.com

导细胞毒性重要的决定因素之一。在正常情况下, COX-2 在肝组织中不表达, 酒精急性损伤后其表达明显增高。有研究表明, COX-2 在酒精性肝损伤的发生、发展中具有重要作用^[1-2]。COX-2 作为酒精性肝损伤的治疗靶点受到越来越多的关注。

酒精性肝损伤, 包括脂肪肝变及炎症损伤, 严重者可发展为肝纤维化, 甚至导致难以逆转的肝硬化。目前, 中药防治酒精性肝损伤的研究很多, 其中柴胡-黄芩配伍治疗酒精性肝损伤是比较有代表性的。柴胡皂苷是柴胡发挥疏肝解郁功效的主要物质基础^[3], 主要成分柴胡皂苷 A 和 D 具有明显的抗炎、降低血清胆固醇和甘油三酯等作用。黄芩清热燥湿解毒, 主要成分黄芩苷和黄芩素具有抗菌、消炎作用。柴胡黄芩配伍是仲景《伤寒论》中的一大类方剂, 柴胡剂的核心配伍。近年来王宪龄课题组的实验研究表明, 柴胡黄芩配伍可抗酒性肝损伤, 其作用机制可能与调节肝组织中 COX-2 的表达有一定的关系, 抑制 COX-2 的过度表达可能是柴胡黄芩活性成分保肝作用的机制之一^[4]。

中药及其复方中的化学成分很多, 可能存在多成分的多靶点作用, 也可能存在单个分子的多靶点作用, 因此研究中药的治病机制是一个非常复杂的工作。采用计算机辅助的方法来研究中药是非常必要的。其中的分子对接方法和分子动力学模拟在计算机辅助药物设计中发挥了很重要的作用。

目前, 分子对接方法是研究配体和受体之间相互作用及虚拟筛选的有效工具, 据报道, 分子对接软件 AutoDock 由于精度高, 目前应用极为广泛^[5]。分子动力学模拟(MD)和结合自由能计算已经成为研究生物大分子, 以及大分子与小分子间相互作用的重要工具。该方法不仅能给出生物大分子在原子水平上的运动细节, 而且能够在原子层次上理解和解释实验数据。迄今, 人们提出了多种自由能计算方法, 如自由能微扰(FEP)^[6], 热力学积分(TI)^[7]、线性相互作用能方法(LIE)^[8]以及分子力学/泊松-玻尔兹曼表面积方法(MM-PBSA)^[9]等。FEP 和 TI 能得到精确的结果, 但计算非常耗时, 对于大体系的研究受到限制。LIE 是一种计算快速的半经验方法, 但是在处理不同的体系时, 计算结果并不可靠。MM-PBSA 是目前广泛应用的一种基于经验方程的自由能计算方法, 结合了分子力学与连续溶剂模型计算结合自由能, 计算快速、准确, 已经成功应用于很多生物体系^[10-14]。虽然在某些体系中, 计算结果与实验数据有一些偏差^[15-18], 但是对于预测药物分子与靶点蛋白是

否有相互作用, 还是很有价值的。

本工作通过 Autodock4.2^[19]进行了柴胡-黄芩配伍的主要成分(黄芩苷、黄芩素、柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D)与 COX-2 的分子对接, 之后进行分子动力学模拟并进行结合自由能计算, 通过分析分子模拟的轨迹以及计算得到的相互作用能和结合自由能, 预测了它们与 COX-2 的可能结合位点以及之间的相互作用, 提出了两者配伍用于酒精性肝损伤的作用机制。

1 计算方法

1.1 准备初始结构 从蛋白晶体数据库得到的 COX-2 与抑制剂氟比洛芬(flurbiprofen)的晶体结构(PDB ID 3pgh, Resolution 2.50 Å), 除去氟比洛芬和晶体水, 使用 MOPAC2009 程序 PM3 方法优化得到黄芩苷、黄芩素、柴胡皂苷 A 和柴胡皂苷 D 的分子结构并分别与 COX-2 进行分子对接。其中柴胡的主要成分柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D 的分子结构与 COX-2 的结合自由能为正值, 表明它们与 COX-2 的活性口袋不匹配。因此下面只讨论黄芩的主要成分(黄芩苷、黄芩素)与 COX-2 的分子对接结果。

1.2 分子动力学模拟 将分子对接得到的黄芩苷和黄芩素与 COX-2 的复合物结构(分别用 hqg/COX-2 和 hqs/COX-2 表示)用做分子动力学模拟(MD)的初始构象。COX-2 的参数采用 Amber99SB 力场^[20], 黄芩苷和黄芩素的参数采用 GAFF 力场^[21]。使用 Gaussian09 程序, 在 HF/6-31G** 上优化这 4 个中药活性分子, 在 B3LYP/cc-PVTZ 水平上使用 RESP^[22]拟合得到它们的原子电荷。使用 Amber 11 中的 Leap 模块给 COX-2 加氢, 在复合物的 4 周包上一层 8 Å 的八面体水层, 所采用的周期性水盒子是截断八面体, 水溶液采用显性的 TIP3P 模型, 并加入 3 个钠离子使整个系统呈中性(图 1)。

在进行分子动力学模拟之前, 首先要进行两步优化, 使整个体系松弛。第一步, 用最陡下降法和共轭梯度法优化水分子。第二步, 整个体系优化至收敛。两步优化后, 整个体系从 0 K 升温至 300 K, 之后进行 1ns 的 NPT 模拟, 时间步长为 2 fs。在动力学模拟过程中, 应用 Langevin 动力学^[23]控制温度, 碰撞频率为 1.0 ps⁻¹。采用 SHAKE 方法^[24]来限制所有含氢的键的伸缩, PME (particle mesh Ewald) 方法^[25]用来计算长程静电相互作用, 范德华相互作用的截断值为 12 Å。分析动力学模拟得到轨迹, 取出平衡后的复合物结构用做 MM-PBSA/Nmode 分析, 由 Amber11 中的 MM-PBSA 和 Nmode^[26]模块完成。

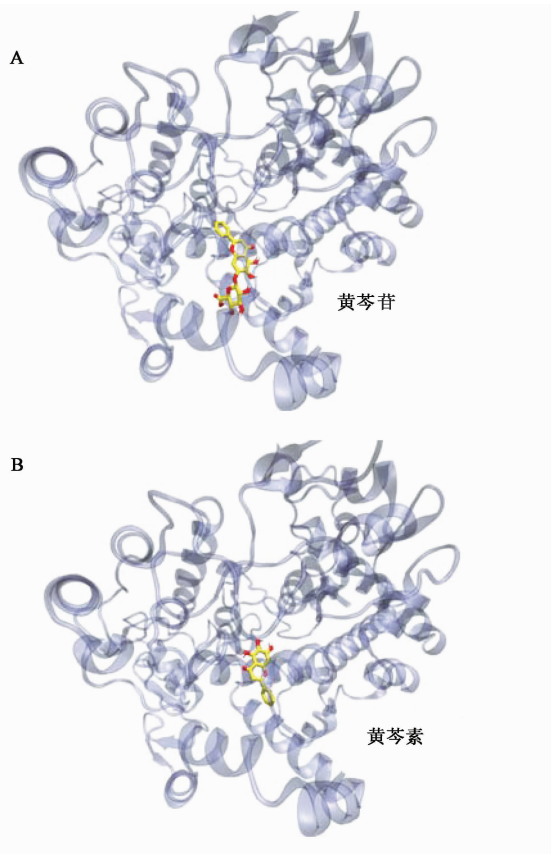


图1 黄芩苷和黄芩素与 COX-2 的复合物结构 (Visual Molecular Dynamics 画图)

1.3 计算结合自由能 笔者使用 MM-PBSA/Nmode 方法计算黄芩苷和黄芩素与 COX-2 的结合自由能,计算公式:

$$\Delta G_{\text{binding}} = \Delta E_{\text{ele}} + \Delta E_{\text{vdw}} + \Delta G_{\text{PB}} + \Delta G_{\text{np}} - T\Delta S$$

其中 ΔE_{ele} 和 ΔE_{vdw} 分别是气相中的静电相互作用和范德华作用,由分子力学方法计算得到; ΔG_{PB} 和 ΔG_{np} 分别是极性溶剂化能和非极性溶剂化能,其中 ΔG_{PB} 通过有限差分法求解 Poisson-Boltzmann 方程获得, ΔG_{np} 由 mosulf^[27] 程序 [$G_{\text{np}} = \gamma \times SA + \beta$, 其中 SA 为溶剂可及表面积, γ 和 β 分别为 $0.00542 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$ 和 $0.92 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$] 计算得到。 $T\Delta S$ 是熵变对结合自由能的贡献,采用正则方法和统计力学来计算。

在本工作中,分别取出黄芩苷和黄芩素与 COX-2 复合物的最后 400 ps 分子动力学模拟轨迹,每隔 4 ps 取一个构象,共计 100 个来进行 MM-PBSA 计算。为了满足 Nmode 程序的最大原子数限制,笔者将 COX-2 的 N 端和 C 端超出 10 \AA 的残基除去,每隔 80 ps 取一个构象,共计 5 个来进行 Nmode 计算。

2 结果与讨论

将黄芩苷和黄芩素与 COX-2 的对接结构用作初始构象,进行了 1 ns 的分子动力学模拟。如图 2 所示,在最后的 400 ps 时,这两个体系的骨架原子的 RMSD 趋于稳定(图 2),体系达到平衡结构。

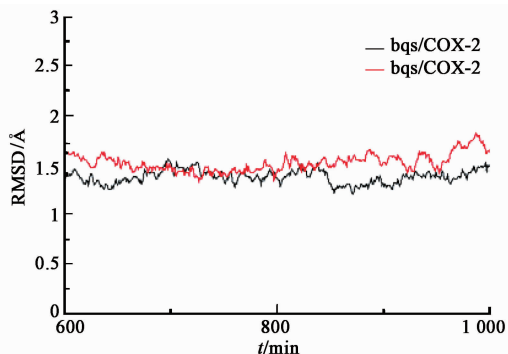


图2 最后 400 psMD 模拟期间骨架原子的均方根偏差

2.1 气相中的相互作用能 首先从最后的 400 ps 轨迹中,取出最低能量结构进行相互作用分析。使用软件 Ligplot^[28] 计算得到了黄芩苷和黄芩素与 COX-2 的结合位点和相互作用网络。由于蛋白质和药物分子之间形成的氢键有利于它们的结合,笔者首先分析黄芩苷和黄芩素与 COX-2 是否形成了氢键。如图 3 所示,黄芩苷与残基 Ser530 形成了一个氢键,而黄芩素与 COX-2 没有形成氢键。除了氢键作用之外,疏水相互作用在蛋白质和药物的结合中也起着很重要的作用。图 3 清楚地显示了黄芩苷和黄芩素与 COX-2 的哪些残基有疏水相互作用。黄芩苷分别与残基 Val116, Val349, Leu352, Tyr355, Leu384, Trp387, Phe518, Met522, Val523, Gly526, Ala527 等 11 个残基有疏水相互作用;黄芩素分别与残基 Val116, Val349, Leu352, Ser353, Val523, Ala527, Leu531 等 7 个残基有疏水作用。结合氢键

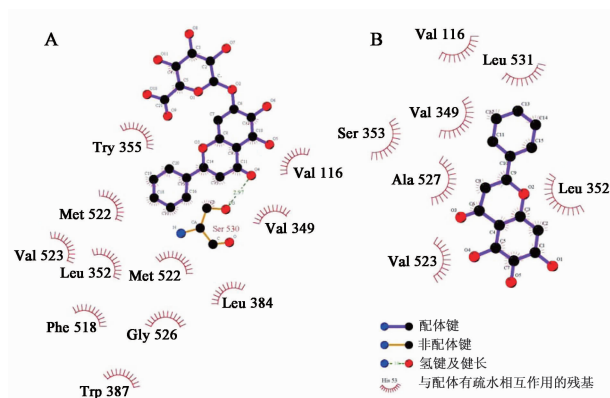


图3 黄芩苷(A)和黄芩素(B)与 COX-2 的相互作用网络(ligplot 画图)

和疏水相互作用的分析结果,可以看出在气相中,黄芩苷比黄芩素的结合能力强。

为了深入分析黄芩苷和黄芩素与 COX-2 的作用机制,使用 Amberff03 力场进行气相中的相互作用能计算。图 4 中给出 COX-2 中的每个残基与黄芩苷和黄芩素的相互作用能以及静电相互作用能和范德华相互作用能。由该图可以看到,黄芩苷和黄芩素与每个残基之间的范德华相互作用都是有利于结合 COX-2 的,而静电相互作用并不全是有利因素。如图 4 所示,黄芩素与 COX-2 各个残基的静电相互作用不明显,而黄芩苷与残基 Arg513, Glu524

和 Ser530 的静电相互作用能很强,分别为 -8.49 , 5.66 , $-4.63 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,其中残基 Ser530 与黄芩苷形成了一个氢键。总之,范德华作用是黄芩苷和黄芩素与 COX-2 结合的主要驱动力,下面的结合自由能计算可以进一步验证这个结论并给出详细的能量分解分析。

2.2 结合自由能 按照 1.3 项计算结合自由能的步骤,得到了黄芩苷和黄芩素与 COX-2 的结合自由能。如表 1 所示,分别为 3.05 , $-2.75 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。表明黄芩素与 COX-2 有较强的相互作用,黄芩苷与 COX-2 结合自由能为正,不能结合。

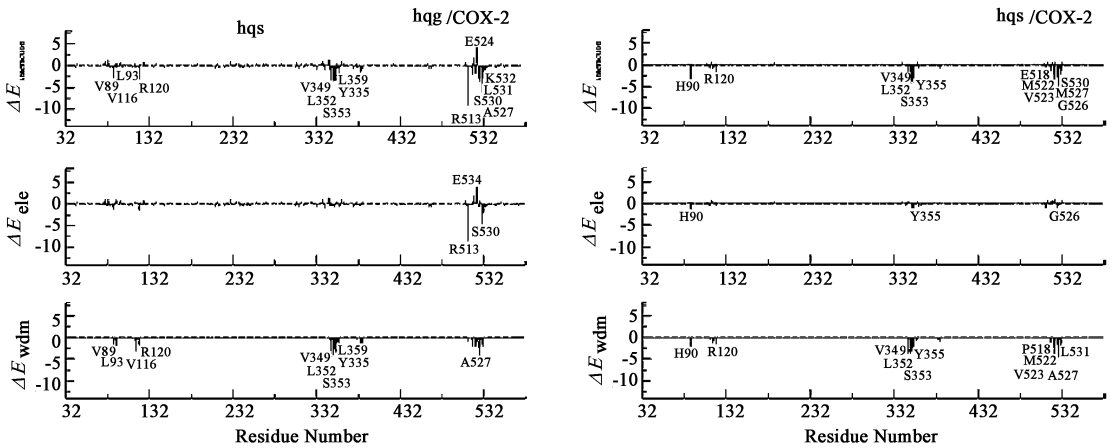


图 4 黄芩苷和黄芩素与 COX-2 各残基的相互作用谱 ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)

表 1 各能量项对结合自由能的贡献

复合物	ΔE_{ele}	ΔG_{PB}	ΔE_{vdw}	ΔG_{np}	$-T\Delta S$	$\Delta G_{\text{binding}}$
COX-2/hqs	-4.48	49.62	-55.45	-5.59	18.95	3.05
COX-2/hqs	-3.21	31.11	-41.84	-3.73	14.92	-2.75

将结合自由能分解,笔者发现黄芩苷和黄芩素与 COX-2 结合时, $\Delta E_{\text{ele}} + \Delta G_{\text{PB}} > 0$, $\Delta E_{\text{vdw}} + \Delta G_{\text{np}} < 0$,说明静电作用是不利因素,而非静电作用是有利因素,特别是范德华相互作用在结合中起着关键的作用。尽管黄芩苷和黄芩素与 COX-2 结合时,气相中的范德华作用都很强,有利于它们的结合,但很强的极性溶剂化能在很大程度上抵消了这种趋势。与黄芩苷相比,黄芩素与 COX-2 结合时熵和静电溶剂化能的损失都较小,这也是黄芩素与 COX-2 的结合自由能比黄芩苷与 COX-2 的结合自由能低的主要原因。

3 结论

本文主要通过黄芩苷、黄芩素、柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D 与 COX-2 的相互作用,研究柴胡黄芩配伍与酒精性肝损伤的治疗靶点 COX-2 的作用机制。柴胡皂苷 A 和柴胡皂苷 D 与 COX-2 没有对接成功,

结合自由能计算表明在黄芩苷和黄芩素与 COX-2 的结合中,范德华作用都是有利的,静电作用是不利的。黄芩素与 COX-2 的结合能力强,黄芩苷与 COX-2 没有相互作用。这说明柴胡黄芩药对的活性成分黄芩苷、黄芩素、柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D 在以 COX-2 为靶点治疗酒精性肝损伤时,黄芩中的黄芩素起了主要的作用。基于中药配伍治病的多靶点机制以及结合实验研究结果,酒精性肝损伤的治疗靶点不是唯一的。除了黄芩素外,柴胡黄芩药对中的黄芩苷、柴胡皂苷 A 和柴胡皂苷 D 可能与酒精性肝损伤有关的其他靶点有相互作用,这还需要做进一步的研究。

[参考文献]

[1] Nanji A A. Role of kupffer cells in alcoholic hepatitis

- [J]. Alcohol,2002,27(1):13.
- [2] Endo K, Yoon B I, Pairojkul C, et al. ERBB-2 overexpression and cyclooxygenase-2 up-regulation in human cholangiocarcinoma and risk conditions [J]. Hepatology,2002, 36(2):439.
- [3] 王宪龄,宋宁.柴胡黄芩配伍不同提取部位对大鼠急性酒精性肝损伤肝组织中环氧合酶2表达的影响[J].中药材,2006,29(9):943.
- [4] 全艳,李晓飞,王宪龄,等.柴胡黄芩药对主要成分与环氧合酶-2的对接研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(11):313.
- [5] Sousa S F, Fernandes P A, Ramos M J. Protein-ligand docking: current status and future challenges [J]. Protein Struct Funct Bioinform, 2006, 65(1):15.
- [6] Zwanzig R W. High-temperature equation of state by a perturbation method [J]. J Chem Phys, 1954, 22(8):1420.
- [7] Kirkwood J G. Statistical mechanics of fluid mixtures [J]. J Chem Phys, 1935, 3(5):300.
- [8] Åqvist J, Medina C, Samuelsson J E. A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design [J]. Protein Eng, 1994, 7(3):385.
- [9] Srinivasan J, Cheatham T E, Cieplak P, et al. Continuum solvent studies of the stability of DNA, RNA, and phosphoramidate-DNA helices [J]. J Am Chem Soc, 1998, 120(37):9401.
- [10] Gouda H, Kuntz I D, Case D A, et al. Free energy calculations for theophylline binding to an RNA aptamer: MM-PBSA and comparison of thermodynamic integration methods [J]. Biopolymers, 2003, 68(1):16.
- [11] Wang W, Lim W A, Jakalian A, et al. An analysis of the interactions between the Sem-5 SH3 domain and its ligands using molecular dynamics, free energy calculations, and sequence analysis [J]. J Am Chem Soc, 2001, 123(17):3986.
- [12] Massova I, Kollman P A. Computational alanine scanning to probe protein-protein interactions: A novel approach to evaluate binding free energies [J]. J Am Chem Soc, 1999, 121(36):8133.
- [13] Reyes C M, Kollman P A. Structure and thermodynamics of RNA-protein binding: using molecular dynamics and free energy analyses to calculate the free energies of binding and conformational change [J]. J Mol Biol, 2000, 297(5):1145.
- [14] Chong L T, Duan Y, Wang L, et al. Molecular dynamics and free-energy calculations applied to affinity maturation in antibody 48G7 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(25):14330.
- [15] Woo H J, Roux, B. Calculation of absolute protein-ligand binding free energy from computer simulations [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(19):6825.
- [16] Pearlman D A. Evaluating the molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area free energy method using a congeneric series of ligands to p38 MAP kinase [J]. J Med Chem, 2005, 48(24):7796.
- [17] Kuhn B, Gerber P, Schulz-Gasch T, et al. Validation and use of the MM-PBSA approach for drug discovery [J]. J Med Chem, 2005, 48(12):4040.
- [18] Tong Y, Mei Y, Li Y L, et al. Electrostatic polarization makes substantial contribution to free energy of avidin-biotin binding [J]. J Am Chem Soc, 2010, 132(14):5137.
- [19] Morris G M, Huey R, Lindstrom W, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility [J]. J Comput Chem, 2009, 30(16):2785.
- [20] Hornak V, Abel R, Okur A, et al. Comparison of multiple amber force fields and development of improved protein backbone parameters [J]. Proteins: Struct Funct Genet, 2006, 65(3):712.
- [21] Wang J, Wolf R M, Caldwell J W, et al. Development and testing of a general amber force field [J]. J Comput Chem, 2004, 25(9):1157.
- [22] Bayly C I, Cieplak P, Cornell W D, et al. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model [J]. J Phys Chem, 1993, 97(40):10269.
- [23] Pastor R W, Brooks B R, Szabo A. An analysis of the accuracy of langevin and molecular dynamics algorithms [J]. Mol Phys, 1988, 65(6):1409.
- [24] Ryckaert J P, Ciccotti G, Berendsen H J C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes [J]. J Comput Phys, 1977, 23(3):327.
- [25] Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh ewald: an nlog(N) method for ewald sums in large systems [J]. J Chem Phys, 1993, 98(12):10089.
- [26] Nguyen D T, Case D A. On finding stationary states on large-molecule potential energy surfaces [J]. J Phys Chem, 1985, 89(19):4020.
- [27] Connolly M L. Analytical molecular surface calculation [J]. J Appl Cryst, 1983, 16(5):548.
- [28] Wallace A C, Laskowski R A, Thornton J M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions [J]. Protein Eng, 1995, 8(2):127.

[责任编辑 邹晓翠]