

补中益气汤活性成分筛选和寻找靶标的实例

李涛¹, 周丽梅¹, 崔露², 周欣欣^{2*}

(1. 蚌埠中医院, 安徽 蚌埠 233000; 2. 广州中医药大学, 广州 510006)

[摘要] **目的:**探索研究中药复方的新方法,以治疗重症肌无力的传统名方补中益气汤(BD)为例。**方法:**首先笔者把乙酰胆碱酯酶作为研究靶标,然后通过数据挖掘建立中药处方的化学成分数据库和乙酰胆碱酯酶抑制剂(AChEi)的数据库。采用利平斯基五规则,分子二维(2D),三维(3D)相似度叠合技术和 Glide 分子对接技术,对中药化学成分数据库进行基于乙酰胆碱酯酶抑制剂配体的模拟筛选并得到了实验的验证。**结果:**建立化合物与靶标的映射关系,预测相应的靶标,从而发现关键的活性化合物及其化学骨架。通过实验验证,还发现 5 个新的具有新骨架的乙酰胆碱酯酶抑制剂的化合物。**结论:**该研究为中药复方研究和靶向药物研发提供了新方向新方法,对中药现代化和创新发现具有重要意义。

[关键词] 重症肌无力; 补中益气汤; 药物筛选; 乙酰胆碱酯酶

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)13-0195-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016130195

Examples of Active Compounds Screening and Targets Searching in Buzhong Yiqi Tang

LI Tao¹, ZHOU Li-mei¹, CUI Lu², ZHOU Xin-xin^{2*}

(1. Hospital of Traditional Chinese Medicine of Bengbu, Bengbu 233000, China;
2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To find a new method in exploring traditional Chinese medicine (TCM) compounds, with the classical Chinese medicine prescription Buzhong Yiqi Tang (BD) for myasthenia gravis (MG) as the example. **Method:** In our study, acetylcholinesterase (AChE) was first supposed as the target, and then the TCM prescriptions' chemical component database and acetylcholinesterase inhibitors (AChEi) database were established by data mining method. With the application of Lipinski's five rules, composite technology of molecular two dimensional (2D) similarity and three dimensional similarity (3D), as well as Glide molecular docking technology, virtual screening of the candidate AChEi from the TCM prescriptions' chemical component database was done and verified by experiment. **Result:** The mapping relationship between the compounds and targets were established in this study to predict appropriate targets, and thus find the key active compounds and their chemical structures. Furthermore, 5 new compounds with new AChEi structures were found in the experiment. **Conclusion:** This study provides new direction and new method for research on TCM compounds as well as the development and research of targeted drugs, which is important for innovation and modernization of Chinese medicine.

[Key words] myasthenia gravis (MG); Buzhong Yiqi Tang; drug screening; acetyl cholinesterase inhibitors (AChEi)

重症肌无力(MG)的主要特点是肌肉的无力和易疲劳,通常活动后病情加重,休息后症状减轻。

MG 是一种自身免疫性疾病^[1-2],主要是由自身循环抗体阻塞乙酰胆碱感受器在突触后神经肌的结合位

[收稿日期] 20150607(011)

[第一作者] 李涛,中药师,从事中药炮制加工研究,Tel:13035029309,E-mail:lt_zlm@163.com

[通讯作者] *周欣欣,教授,从事中药复方活性成分研究,Tel:13802902324,E-mail:xinxin_zhou@163.com

点造成^[3]。1934 年,玛丽沃克发现毒扁豆碱[一种乙酰胆碱酶抑制剂(AChEi)]能够减轻 MG 患者的症状。自此,AChEi 疗法成为治疗 MG 的标准和主流的方法^[4-5]。抗 AChEi 是一种症状治疗方法,它减慢乙酰胆碱的水解,使得更多的乙酰胆碱激活正常的乙酰胆碱受体,使患者的症状得到短期缓解和改善^[6]。至今,AChEi 是一线和第一步治疗 MG 的方法,例如,吡斯的明已被安全用于临床 60 多年^[7]。

在中医方面,国医大师邓铁涛用补中益气汤(BD)加减治疗 MG^[8],这个处方药物配伍为①君药:黄芪,五指毛桃;②臣药:党参,当归,白术;③佐药:柴胡,升麻;④使药:甘草,陈皮。

由于,BD 含有大量的活性化合物和药物靶标,对于了解中药机制和保证中药质量是一个巨大的挑战^[9-10]。本研究运用虚拟筛选和相似度计算^[11-12]的技术方法,建立了一个阐明中药活性化合物和靶标的方法。因为 BD 有很多的活性化合物和靶标,为简化过程,假定 AChEi 为 BD 的研究靶标。研究的主要问题是①在君臣佐使中,哪些草药主要针对靶标,即抗 AChEi。②对于主要的抗 AChEi 的草药,哪些骨架结构是抑制 AChEi 的。在回答这些问题过程中,通过 BD 中活性化合物骨架衍生的方法,搜索化合物库,发现 5 个新的 AChEi。

1 材料与方法

1.1 建立君臣佐使化合物库 从中药系统药理数据库^[13]和文献中,总共找到 1 198 个化合物。黄芪、五指毛桃、党参、当归、白术、柴胡、升麻、甘草、陈皮分别有 87,47,134,125,55,288,119,280,63 个化合物。经过去重合并后,君、臣、佐、使数据库里分别含有 131,299,403,338 个化合物。

1.2 建立 AChEi 数据库 8 805 个抑制剂来源于 Binding database。去除半数抑制浓度(IC₅₀)大于 10 μmol·L⁻¹或未知,结构模糊和重复的结构。挑选得到 57 个化合物组成 AChEi 数据库(Supplementary material S1)。把这些抑制剂作为探针,寻找 BD(君臣佐使数据库)的活性成分。

1.3 类药物过滤 利平斯基也称作五规则,是用于去除数据库中拥有不理想的药物类属性的化学结构。用 MOE 计算五规则的药物动力学参数^[14-15],君、臣、佐和使 4 个数据库过滤后,分别包含 98,270,331,306 个化合物。这些化合物被认为是候选的活性化合物或潜在的 AChEi。

1.4 从 BD 中发现活性成分的方法 设定 AChEi 为主要的靶标,潜在的活性成分是类 AChEi 的化合

物。为从补中益气汤中找到 AChEi 类的化合物,本研究采用 3 种方法:2D 相似计算,3D 相似计算和分子对接方法。

1.4.1 2D 相似度方法 2D 相似(或拓扑相似)是基于 2 个化学结构连接表。相似度计算是基于树状拓扑片段(CEEDTF)编码的化学环境指纹。用此方法,比较君臣佐使数据库和 AChEi 库^[12]。BD 中的所有化合物 $X_1, X_2, \dots, X_i, \dots, X_n$ 都与 57 个 AChEi 进行相似度计算,得到 $S_{(1-57)}$ 个相似度值,将最大的相似度值指派给 X_i 。3D 相似度值得到方法同理。公式为 $S(X_i)_{2D} = \text{Max}(\text{AChEi})$ 。

1.4.2 3D 相似度方法 3D 相似度计算是用高斯加权算法(WEGA),其中的分子形状密度被表示为加权原子高斯函数的线性组合。原子的权重是这些原子和其他原子之间重叠的总和的功能^[16-17]。由于 WEGA 不产生分子构象,所以用 DS 3.5 (Discovery Studio, version 3.5, Accelrys, Inc., San Diego, CA, U. S. A.) 中的 Caesar 模块,产生抑制剂的分子的构象。每个分子最多产生 50 个构象。BD 中的化合物用 MOE 程序(CCG, Montreal, Canada)进行能量最小化。WEGA 有基于形状,基于药效团和结合体(基于形状和药效团)3 种相似度计算方法。运用基于形状的计算方法,得到 3D 相似度的结果。公式为 $S(X_i)_{3D} = \text{Max}(\text{AChEi})$ 。

1.4.3 Glide docking 从 RCSB 蛋白数据库中获取合适的人类 AChE (hAChE) PDB 结构进行对接研究。4EY7 被选用为对接的受体,其分辨率为 2.35×10^{-9} 。对于 Glide 对接^[18],Maestro suite 的蛋白准备向导工作流程(PPW)被用于蛋白质的准备。晶体结构进行预处理,质子化,优化,去掉形成小于 3 个氢键的水分子,然后在 OPLS2005 的电场下进行能量最小化。对接受体的格点文件的生成用受体格点生成(RGG)面板。蛋白晶体的自身配体的位置定义为受体的结合位点。在配体对接面板中,视配体为灵活的结构,选用 GLIDE-XP 的模式进行对接。在受体准备好后,自身配体 Donepezil 进行自身对接。其 RMSD 值为 0.42 Å,表明 GLIDE-XP 的对接方案能准确预测解析的化合物。然后将 2D 和 3D 的命中化合物进行分子对接,每个分子保留最好的打分值。

1.4.4 选择分子对接 选择 2D 和 3D 打分的阈值分别为 0.7 和 0.6,笔者合并得到了 209 个命中化合物。将这些化合物对接到 4EY7 的活性部位,最终有 129 个化合物(Supplementary material S2)表现出很好的对接结构,其打分值小于等于 -9。在对这

129 个化合物进行骨架分析后^[19],最终得到了 24 个苯基苯唑啉类的化合物进行实验测试。

1.4.5 Ellman 分析 使用 Ellman 法^[20]来检测 24 个化合物对 hAChE 的抑制活性。化合物用反应缓冲液稀释(磷酸盐缓冲液,0.08 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄和 0.02 mol·L⁻¹ NaH₂PO₄,pH 8.0)0.057 U·mL⁻¹的 hAChE 同化合物在 37 ℃ 孵育 15 min,后加入 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)显色液,至终浓度 50 μmol·L⁻¹,再与终浓度 50 μmol·L⁻¹的底物硫代乙酰胆碱混合后,立即在 412 nm 波长检测吸光度,1 min 间隔连续取 5 次值,求每分钟变化值的平均值。抑制率为加药组与非加药组的比值,

Donepezil 作为阳性对照。抑制率 = (1 - 加药组每分钟吸光度变化/无药组每分钟吸光度变化) × 100%,每次取前 5 分钟的平均值,重复 3 次,计算标准差,计算各化合物不同浓度下 IC₅₀。

2 结果与讨论

2.1 2D 结果分析 以相似度阈值为 0.7,君臣佐使分别得到 29,35,27,70 个命中化合物。合并君臣佐使的命中化合物,得到 137 无重复的化合物。有 22 个已知的 AChEi (IC₅₀ 从 0.23 nmol·L⁻¹ 到 10 μmol·L⁻¹)发现与补中益气汤中的 137 个化合物相似。其中有 14 个 AChEi 的 IC₅₀ 从 0.23 到 100 nmol·L⁻¹。结构图见图 1。

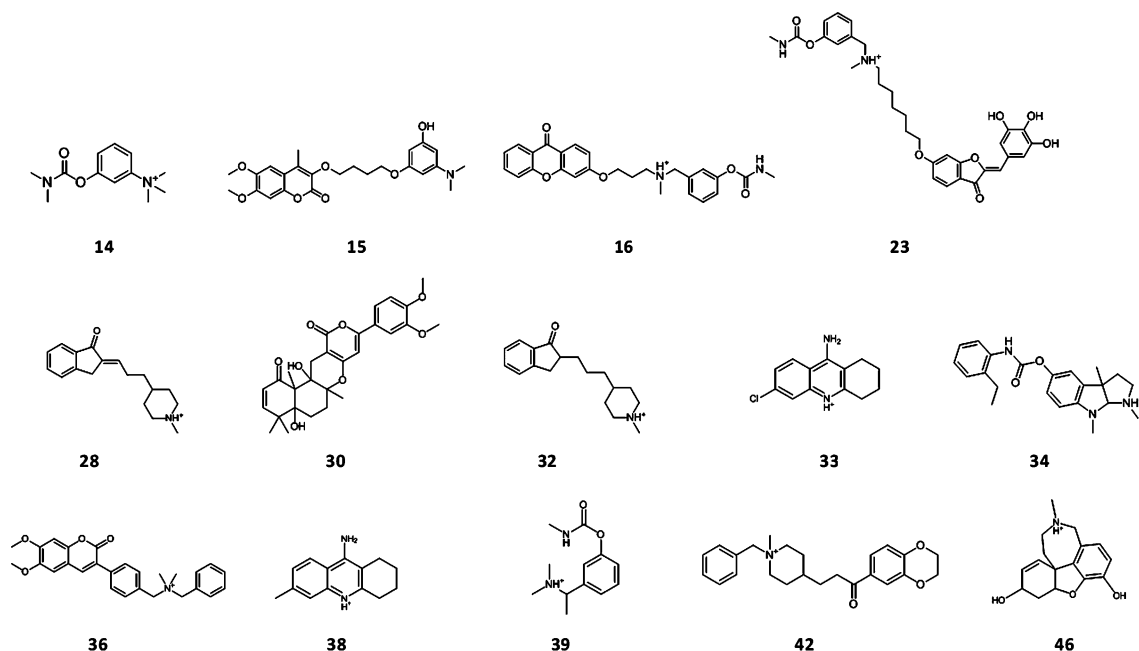


图 1 与补中益气汤中化合物类似的 14 非常活跃的乙酰胆碱酯酶抑制剂

Fig.1 Top-14 AChE inhibitors that were found similar to compounds existing in Buzhong Yiqi Tang

补中益气汤活性成分与乙酰胆碱酯酶抑制剂的二维相似关系频率见图 2。

在这 137 个活性成分中,58% (79 个)都是类似于很好活性的乙酰胆碱酯酶抑制剂;它们中的 42% (58 个)类似中等活性的乙酰胆碱酯酶抑制剂。图 1(15 香豆素生物碱)是最有效的乙酰胆碱酯酶抑制剂(IC₅₀ = 0.236 nmol·L⁻¹)。实际上,最好的乙酰胆碱酯酶抑制剂是生物碱类。而君药和使药大多数的活性化合物是香豆素类和黄酮类化合物,相似性搜索表明君药和使药是这些类似于香豆素类生物碱的乙酰胆碱酯酶抑制剂化合物发挥作用,图 1 化合物 15,36(IC₅₀ = 10.5 nmol·L⁻¹)。

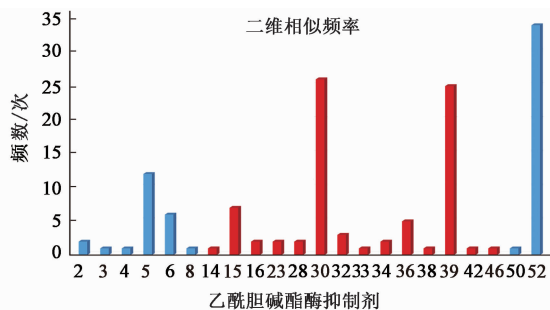
2.2 3D 结果分析 以 0.6 的相似性为阈值,在君

药中发现 24 个命中化合物;在臣药中发现 33 个命中化合物;在佐药中发现 27 个命中化合物和在使药中发现 41 个命中化合物。合并所有的 3D 命中结果,笔者得到了 108 个没有重复的命中化合物。有 18 个已知的乙酰胆碱酯酶抑制剂 (IC₅₀ 0.04 ~ 10 μmol·L⁻¹)类似补中益气汤的活性成分。其中有 10 个 AChEi 的 IC₅₀ 0.23 ~ 100 nmol·L⁻¹,见图 3。

补中益气汤活性成分与乙酰胆碱酯酶抑制剂的三维相似关系频率图,见图 4。

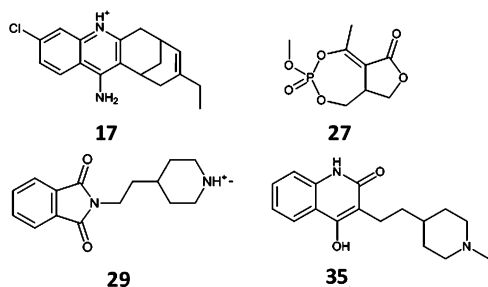
其中的 108 个补中益气汤的活性化合物,59% (64)类似高效的乙酰胆碱酯酶抑制剂;它们中的 41% (44)类似中等活性的乙酰胆碱酯酶抑制剂。

2.3 合并 2D 和 3D 相似性命中 2D 和 3D 的搜索



红色线代表非常活跃的乙酰胆碱酯酶抑制剂 ($IC_{50} 0.23 \sim 100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)

图 2 乙酰胆碱酯酶抑制剂类似于补中益气汤中活性组分的分布
Fig. 2 AChE inhibitors that are similar to active components in Buzhong Yiqi Tang



化合物 14, 28, 29, 22, 33, 38, 39, 46 见图 1

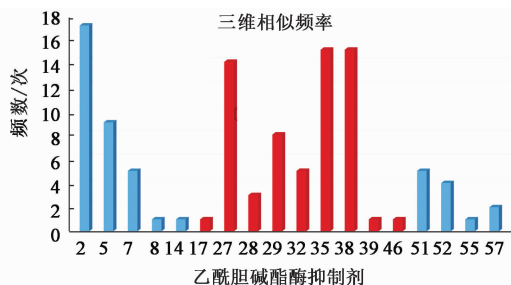
图 3 类似补中益气汤中活性成分的 10 个非常活跃的乙酰胆碱酯酶抑制剂

Fig. 3 Top-10 AChE inhibitors that were found similar to compounds existing in Buzhong Yiqi Tang

映射补中益气汤化合物分别得到 22 和 18 个已知的乙酰胆碱酯酶抑制剂。22 个已知乙酰胆碱酯酶抑制剂包括 10 个二维映射的乙酰胆碱酯酶抑制剂。这表明, 2D 相似性搜索覆盖比 3D 搜索更具多样性。结合 2D 和 3D 得到 209 个唯一的化合物, 作为预测补中益气汤潜在的乙酰胆碱酯酶抑制剂。

2.4 Glide 分子对接试验 137 个二维相似搜索命中和 108 个三维相似性搜索命中合并, 得到 209 个相似性搜索命中(类似于乙酰胆碱酯酶抑制剂)。将这些命中物对接到乙酰胆碱酯酶的晶体结构中。在之前进行的对接试验中, 笔者选择了最佳的对接方案和共晶体 hAChE 结构。笔者测试 MOE (CCG), Cdocker (DiscoveryStudi, Accelrys 公司), 和 Glide (薛定谔) 的对接方案, 从 RCSB 数据库中检索 6 个 hAChE 共晶体结构。其对接的 RMSDs 见表 1, 若 RMSDs 越小, 其对接方案越好。

表 1 表明 Glide 程序对接的整体结果最佳, 具有最低 RMSD 值(范围 0.20 ~ 0.56)。4EY7 的配体结构共晶体为 donepezil, 见图 5, 最类似于补中益



红色线代表非常活跃的乙酰胆碱酯酶抑制剂 ($IC_{50} 0.04 \sim 100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)

图 4 乙酰胆碱酯酶抑制剂类似于补中益气汤中活性组分的分布
Fig. 4 AChE inhibitors that are similar to active components in Buzhong Yiqi Decoction

表 1 选择对接模式和共晶结构

Table 1 Selecting docking programs and co-crystal structures

代码	分辨率 / $\times 10^{-9}$	配体	MOE RMSD	Cdocker RMSD	Glide RMSD
4MOE	2.00	dihydratanshinone I	0.6	0.42	0.24
4MOF	2.30	territrem B	0.9	0.92	0.56
4BDT	3.10	huprine W	0.61	0.38	0.36
4EY5	2.30	(-)-huperzine A	0.49	3.47	0.20
4EY6	2.40	(-)-galantamine	0.68	0.49	0.20
4EY7	2.35	donepezil	0.91	0.44	0.42

气汤的活性成分, 因此 4EY7 被选定为由于对接实验的蛋白晶体, 发现补中益气汤的主要活性化合物。

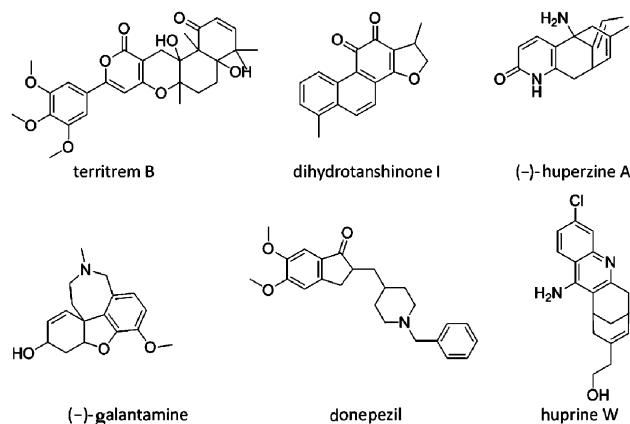


图 5 配体结构为表 1 中的 6 个共晶体结构
Fig. 5 Ligand structures for six co-crystal structures in Table 1

根据在 1.4.5 项讨论的标准, 24 个苯基苯唑样化合物见图 6, 被筛选为最终化合物进行埃爾曼测定。这些化合物可以被看作是黄酮样骨架见图 7。

黄酮类化合物已经报道为乙酰胆碱酯酶抑制剂。举例来说, Jung and Park 报道槲皮素的胆碱酯酶抑制率是二氢吴茱萸 (DHED) 2 倍多; Ahmad

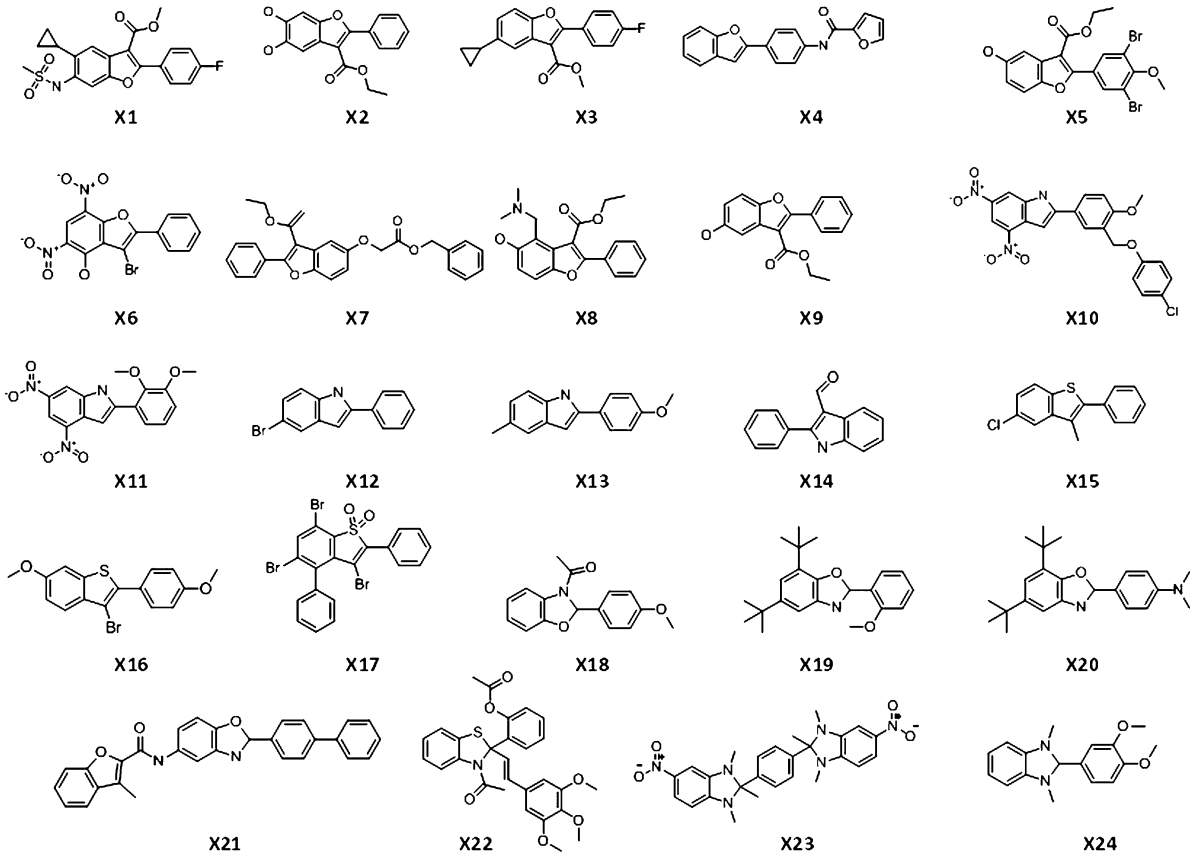


图 6 Ellman 测定的 24 个苯基苯唑样活性化合物
Fig. 6 Phenylbenzofuran-like compounds tested with Ellman assays

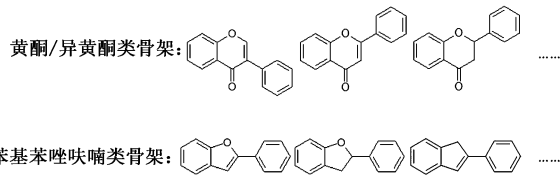


图 7 补中益气汤化合物类似于乙酰胆碱酯酶抑制剂的骨架
Fig. 7 Main scaffolds existing in Buzhong Yiqi Tang compounds, which were similar to AChE inhibitors

等^[22]报道 hispidone 具有显著抑制乙酰胆碱酯酶的活性; Williams 等^[23]报道了 9 个天然的黄酮乙酰胆碱酯酶抑制剂; 本课题组总结了 12 类黄酮和香豆素乙酰胆碱酯酶抑制剂被收集在 Supplementary Material S3。

但是, 苯基苯唑咪喃类化合物是一类新的被预测为乙酰胆碱酯酶的抑制剂。苯基苯并咪喃类化合物主要来自补中益气汤中的君, 使药见图 8。君药和使药的苯基苯唑咪喃类骨架明显不同。该苯基苯唑咪喃类骨架在佐药中很少, 在臣药里甚至没有。这表明, 在补中益气汤, 君药和使药主要针对乙酰胆碱酯酶, 但臣药和佐药可能有不同的功能, 并需要进一步调查。

2.5 Ellman 的 hAChE 抑制试验结果 从 Specs 获得 24 苯基苯唑样化合物见图 6, 通过 Ellman 法测定 hAChE 抑制活性测试。见图 9。

在 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 5 个苯基苯唑样化合物对 hAChE 显示出 50% 以上的抑制率。以 donepezil 作为阳性对照, 并测得它们的 IC_{50} , 见图 10。X21 (2.3 ± 0.15) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的活性最好。其 IC_{50} 曲线描绘在 Supplementary Material F1。

3 结论

该项目的最初目标是确定补中益气汤的活性成分能够治疗重症肌无力。本研究以乙酰胆碱酯酶为靶标。通过收集和挖掘胆碱酯酶抑制剂和君臣佐使化学结构数据, 并证明了补中益气汤活性成分主要存在于君使草药。这些活性成分是黄酮衍生物类乙酰胆碱酯酶抑制剂。臣药和佐药对治疗 MG 可能具有不同的功能, 并需要进一步研究。通过分析对乙酰胆碱酯酶的活性成分的结构, 笔者能够通过骨架分析方法和 Ellman 实验, 以发现新的类乙酰胆碱酯酶抑制剂。这项研究表明, 基于结构的药物发现识别活性成分可以从中药处方中得到启发。

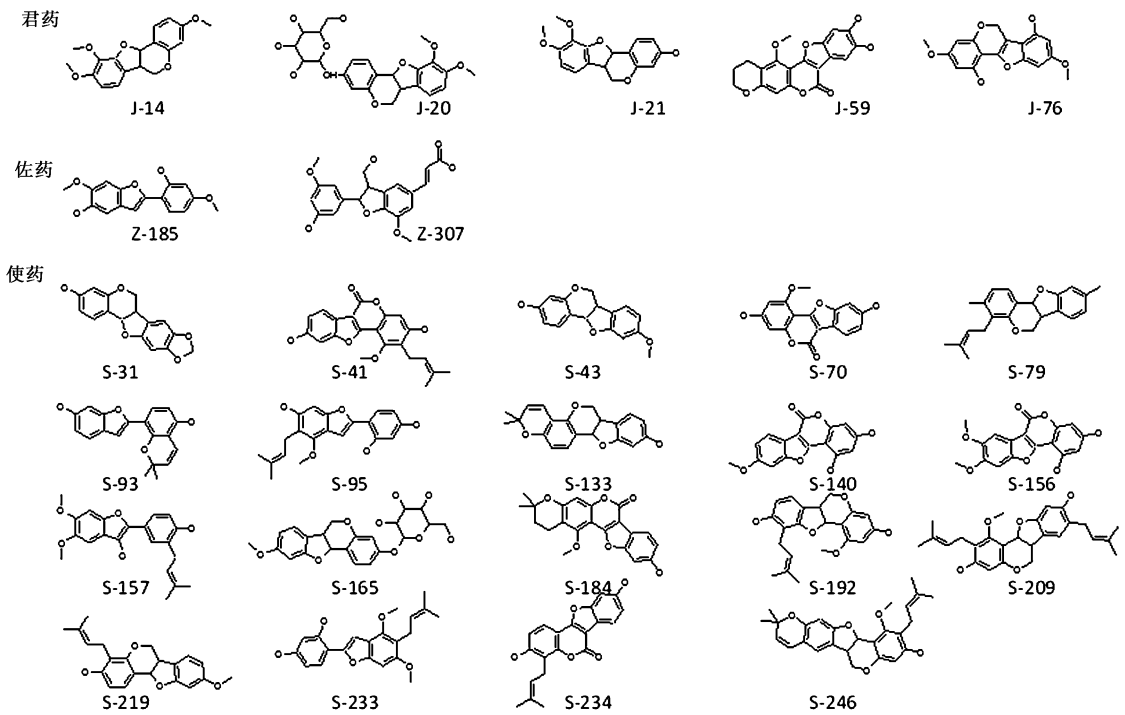


图 8 苯基苯呋喃类化合物, 主要分布于君药和使药

Fig. 8 Phenylbenzofuran-like compounds mainly distributed in Jun and Shi herbs

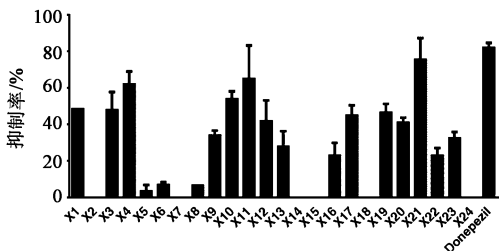


图 9 24 个苯基苯呋喃类化合物在 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Inhibition of 24 phenylbenzofuran-like compounds at $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\bar{x} \pm s, n=3$)

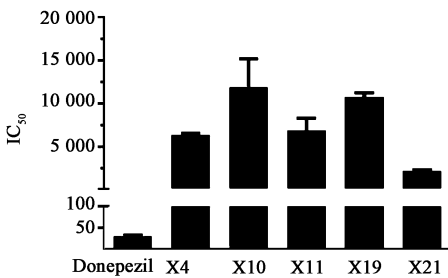


图 10 5 个活性化合物和阳性对照多奈哌齐的 IC_{50} ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 10 Inhibitory activities of 5 candidates and positive control donepezil on hAChE ($\bar{x} \pm s, n=3$)

[参考文献]

[1] Berrih-Aknin S, Frenkian-Cuvelier M, Eymard B. Diagnostic and clinical classification of autoimmune

myasthenia gravis [J]. J Autoimmunity, 2014, 48/49 (2):143-148.

[2] Berrih-Aknin S, Le Panse R. Myasthenia gravis: a comprehensive review of immune dysregulation and etiological mechanisms [J]. J Autoimmunity, 2014, 52: 90-100.

[3] Conti-Fine B M, Milani M, Kaminski H J. Myasthenia gravis: past, present, and future [J]. J Clin Invest, 2006, 116(11):2843-54.

[4] Pearce J M S. Mary Broadfoot Walker (1888-1974): a historic discovery in myasthenia gravis [J]. Eur Neurol, 2005, 53(1):51-53.

[5] Hughes T. The early history of myasthenia gravis [J]. Neuromuscular Disord, 2005, 15(12):878-886.

[6] Keesey J C. Clinical evaluation and management of myasthenia gravis [J]. Muscle Nerve, 2004, 29 (4): 484-505.

[7] Maggi L, Mantegazza R. Treatment of myasthenia gravis focus on pyridostigmine [J]. Clin Drug Investig, 2011, 31(10):691-701

[8] Jiang C, Liu P, Liang Y, et al. Clinical treatment of myasthenia gravis with deficiency of spleen and kidney based on combination of disease with syndrome theory [J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33(4):444-448.

[9] Zhao J, Jiang P, Zhang W. Molecular networks for the study of TCM pharmacology [J]. Brief Bioinform, 2010,

- 11(4):417-30.
- [10] Normile D, Asian medicine. The new face of traditional Chinese medicine [J]. Science, 2003, 299 (5604): 188-190.
- [11] Ge H, Wang Y, Li C, et al. Molecular dynamics-based virtual screening; accelerating the drug discovery process by high-performance computing [J]. J Chem Inf Model, 2013, 53(10):2757-2764.
- [12] Yan X, Gu Q, Lu F, et al. GSA: a GPU-accelerated structure similarity algorithm and its application in progressive virtual screening [J]. Mol Divers, 2012, 16(4):759-769.
- [13] Ru J, Li P, Wang J, et al. TCMSp: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. J Cheminform, 2014, 6(8):13.
- [14] Lipinski C A, Lombardo F, Dominy B W, et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 46(1/3):3-26.
- [15] Quinn R J, Carroll A R, Pham N B, et al. Developing a drug-like natural product library [J]. J Nat Prod, 2008, 71(3):464-468.
- [16] Yan X, Li J, Liu Z, et al. Enhancing molecular shape comparison by weighted Gaussian functions [J]. J Chem Inf Model, 2013, 53(8):1967-1978.
- [17] Yan X, Li J, Gu Q, et al. gWEGA: GPU-accelerated WEGA for molecular superposition and shape comparison [J]. J Comput Chem, 2014, 35 (15): 1122-1130.
- [18] Cheung J, Rudolph M J, Burshteyn F, et al. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands [J]. J Med Chem, 2012, 55(22):10282-10286.
- [19] Xu J. A new approach to finding natural chemical structure classes [J]. J Med Chem, 2002, 45 (24): 5311-5320.
- [20] Ellman G L, Courtney K D. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. Biochem Pharmacol, 1961, 7(2):88-95.
- [21] Jung M, Park M. Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from *Agrimonia pilosa* [J]. Molecules, 2007, 12(9):2130-9.
- [22] Ahmad I, Anis I, Malik A, et al. Cholinesterase inhibitory constituents from *Onosma hispidum* [J]. Chem Pharm Bull, 2003, 51(4):412-414.
- [23] Williams P, Sorribas A, Howes M J R. Natural products as a source of Alzheimer's drug leads [J]. Nat Prod Rep, 2011, 28(1):48-77.

[责任编辑 顾雪竹]