

柴胡-黄芩药对主要成分与环氧合酶-2 的对接研究

仝艳¹, 李晓飞^{1,2}, 王宪龄^{1*}, 南颖康¹, 张景亚¹, 李朋伟¹

(1. 河南中医学院药学院, 郑州 450008; 2. 南京大学化学化工学院, 南京 210093)

[摘要] 目的:用分子对接方法探讨柴胡-黄芩配伍治疗酒精性肝病和肝癌的作用靶点。方法:以环氧合酶-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,采用分子对接方法研究柴胡与黄芩配伍抗酒精性肝损伤和肝癌的作用机制。结果:分子对接显示,柴胡与黄芩起作用的靶点不同。结论:柴胡皂苷 A 和柴胡皂苷 D 与 COX-2 没有相互作用;黄芩苷和黄芩素与 COX-2 均有很强的结合能力。

[关键词] 柴胡; 黄芩; 配伍; 分子对接; 酒精性肝损伤; 肝癌

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0148-04

[doi] 10.11653/syjf2013110148

Molecular Docking Study on Constituents of Radix Bupleuri and Radix Scutellare and Cyclooxygenase

TONG Yan¹, LI Xiao-fei^{1,2}, WANG Xian-ling^{1*}, NAN Ying-kang¹, ZHANG Jing-ya¹, LI Peng-wei¹

(1. School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

[Abstract] **Objective:** Radix Bupleuri and Radix Scutellare in compatibility on liver injury induced by alcohol and hepatocellular carcinoma have been verified by experiments. **Method:** In this study, four active chemical components of Radix Bupleuri and Radix Scutellare were docked with cyclooxygenase (COX-2), respectively. The binding mode and docking energy of those components with COX-2 were analyzed. **Result and Conclusion:** It has been found that saikosaponin A and saikosaponin D in Radix Bupleuri have no binding capability with COX-2 and baicalin and baicalein in Radix Scutellare have strong binding capability with COX-2.

[Key words] Radix Bupleuri; Radix Scutellare; compatibility; molecular docking; alcoholic liver injury; hepatocellular carcinoma

柴胡-黄芩药对是仲景《伤寒论》柴胡类方中最具代表意义的配伍,具有疏肝解郁、清肝泄胆的作用,现代临床将其视为肝胆系疾病的经典对药倍受推崇,广泛应用于肝郁气滞所致的痞积肿块等症,疗

效显著。酒精性肝病包括酒精性脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝硬化,属中医酒疸、积聚、胁痛、臌胀等病范畴。笔者前期的实验表明,柴胡-黄芩配伍对酒精性肝病有良好的保护作用^[1-10]。肝细胞癌是酒精性肝炎、肝硬化的终末阶段,柴胡皂苷作为柴胡的主要化学和生物活性成分^[11],具有对抗多种因素导致的肝损伤和肝纤维化^[12],黄芩中的主要活性成分黄芩苷、黄芩素等对肝细胞癌均具有明显的抑制作用^[13]。

1 材料

环氧合酶(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。环氧合酶-2(cyclooxygenase,

[收稿日期] 20120718(014)

[基金项目] 河南省自然科学基金课题(994021900);郑州市科技攻关项目(10PTGS486-5);河南省教育厅自然科学研究项目(2011B180036);河南中医学院博士科研基金(BSJJ2009-12)

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

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

COX-2)是前列腺素类物质合成的关键酶,属于一种诱导性表达酶类,与多种细胞和组织的炎症损伤及增殖过程有关,COX-2 在体内的表达与调节对前列腺素的生物合成有重要意义。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,在肝细胞癌中的表达也明显增高,与肿瘤的发生有密切关系。有研究表明柴胡皂苷可能是通过抑制 COX-2 发挥抗肿瘤作用,其具体机制尚未明了。亦有部分学者认为柴胡皂苷对环氧合酶的活性没有直接的抑制作用。课题组实验结果提示柴胡黄芩配伍抗急性酒精性肝损伤的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]。COX-2 在酒精性肝损伤和肝癌的发生、发展中具有重要作用^[14-15],与酒精性肝病的发病过程的多个环节相关,目前 COX-2 作为酒精性肝病和肝癌的作用靶点受到越来越多的关注。

分子对接是研究配体和受体之间的相互作用及虚拟筛选的有效工具,在计算机辅助药物设计中起着非常重要的作用。据报道,分子对接软件 AutoDock 由于精度高,目前应用极为广泛^[16]。

本工作运用 Autodock4.2 进行了柴胡-黄芩药对主要成分(黄芩苷、黄芩素、柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D)与 COX-2 的分子对接,计算得到了它们与 COX-2 的可能结合位点以及之间的相互作用,预测了其用于酒精性肝病和肝癌的作用靶点^[17]。

2 计算方法

2.1 COX-2 的构象结构准备 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),用 Chimera 软件^[18]删除整个 B 链,除去晶体中的溶剂分子和氟比洛芬,以及 HEM 和 NAG 等小分子,之后加上氢原子,以此结构作为对接的初始构象。

2.2 配体小分子的结构准备 使用 Gaussview3.09 构建黄芩苷、黄芩素、柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D 的分子结构,并采用半经验方法(PM3)进行结构优化,计算采用 MOPAC 程序^[19],对优化后的小分子结构用 Autodock Tools 程序添加 gasteiger 电荷,合并非极性氢原子后的结构作为对接配体分子的初始构象。

2.3 分子对接

2.3.1 晶体重现的分子对接 使用 AutoGrid4.2 程序选取受体格点盒子(Grid box)大小为:65 × 65 × 65,格点间距 0.375 Å,即空间大小为 24.375 Å × 24.375 Å × 24.375 Å。格点盒子中心坐标(25.971,

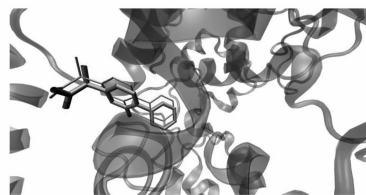
21.973, 14.891)。使用 Autodock Tools 程序对 COX-2 和配体分子添加 gasteiger 电荷,合并非极性氢原子。采用 Lamarckian 遗传算法,将局部能量搜索与遗传算法相结合,以半经验势函数作为能量打分函数,对小分子构象和位置进行全局搜索,遗传算法的种群个体数设为 150,能量评估的极大值设为 10 000 000,最大变异代数(maximum number of generations)设为 27 000,其他参数为程序默认值,进行 50 次独立杂化的 GA 运算,最后根据打分函数和簇分析,选取最大簇中打分函数最高的作为对接后的复合物结构。

2.3.2 柴胡-黄芩药对的主要成分与 COX-2 的分子对接 将柴胡-黄芩药对中的 4 个主要成分(黄芩苷、黄芩素、柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D)分别与 COX-2 进行分子对接,其过程选用的参数和上步晶体对接相同。其中柴胡中的柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D 的与 COX-2 的相互作用能为正值,表明它们与 COX-2 的活性口袋不匹配。因此笔者只讨论黄芩中的黄芩苷、黄芩素与 COX-2 的分子对接结果。

3 结果与讨论

3.1 复合物氟比洛芬-COX-2 分子结构的晶体重现

为了考察 Autodock4.2 能否应用于该体系的对接,将抑制剂氟比洛芬与 COX-2 进行分子对接,然后与晶体结构(id: 3PGH)相比较。如图 1 所示,分子对接结果与复合物氟比洛芬-COX-2 晶体结构非常一致。两个结构的均方根偏差(RMSD)为 0.77,表明对接软件 Autodock4.2 可以很好的重现原晶体结构,完全适用于该体系的对接研究。

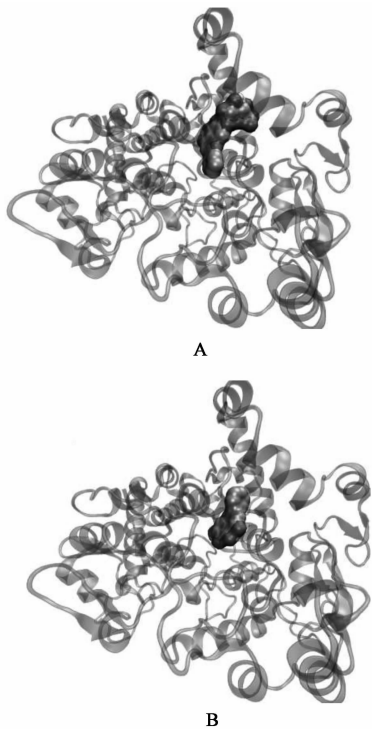


用 VMD^[20] 画图;氟比洛芬在原晶体中的用细线模型表示,在分子对接结构中用键模型表示
图 1 复合物氟比洛芬-COX-2 分子结构的晶体重现

3.2 黄芩苷、黄芩素、柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D 与 COX-2 的分子对接 将柴胡黄芩中 4 种活性成分黄芩苷、黄芩素、柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D 分别与 COX-2 进行分子对接,其中黄芩苷、黄芩素与 COX-2 可以对接,柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D 则不能与 COX-2 对接。对 4 个小分子结构(黄芩苷、黄芩素、柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D)进行分析发现:COX-2 的活性口袋较小,柴胡皂苷 A 和柴胡皂苷 D 的分子体积大,与

COX-2 的活性口袋大小不匹配,黄芩苷和黄芩素的分子体积小,与 COX-2 的活性口袋大小匹配。对接结果显示柴胡皂苷 A 和柴胡皂苷 D 与 COX-2 的结合能为正值,大于 $100 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,表明 COX-2 可能不是柴胡皂苷 A, D 的作用靶点,酒精性肝病的作用靶点不是唯一的;也表明柴胡皂苷 A, D 对环氧合酶的活性可能没有直接的抑制作用。

黄芩苷和黄芩素与 COX-2 对接后的复合物结构如图 2 所示,该两个小分子都能很好的与蛋白质活性口袋结合。黄芩苷、黄芩素与 COX-2 的平均结合能分别为 $-6.87, -7.26 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。可以看出它们的平均结合能大小差别不大,与 COX-2 的结合能力都很强。



A. 黄芩苷; B. 黄芩素(图 4 同)

COX-2 用 cartoon 模型表示,黄芩苷和黄芩素用 Surface 模型表示

图 2 黄芩苷、黄芩素与 COX-2 的对接结果

将复合物黄芩苷-COX-2 与黄芩素-COX-2 的对接结构进行对比分析,结果如图 3 所示。黄芩素、黄芩苷与 COX-2 的结合位点基本一致,都是在由 Helix1 (Pro86-Thr94), Helix2 (Leu108-Tyr122), Helix3 (Asp325-His351), Helix4 (Ala378-Tyr385) 以及 Helix5 (Glu520-Gly536) 组成的活性口袋中与 COX-2 结合。

黄芩素是黄芩苷的苷元,黄芩苷经水解后生成黄芩素,7 位的 D-葡萄糖醛酸变为 OH。虽然两者的主体结构相似,但与 COX-2 结合的方式是不同

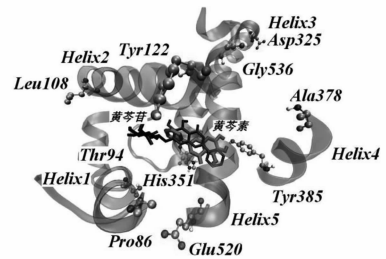


图 3 比较复合物黄芩素-COX-2 与黄芩苷-COX-2 的对接结构的。当黄芩苷与 COX-2 对接时,2 位的苯基朝向活性口袋的内部,D-葡萄糖醛酸在外部;当黄芩素与 COX-2 结合时,黄芩素的邻三酚羟基朝里,伸进 COX-2 活性口袋的内部,2 位的苯基在外部。当蛋白与配体分子结合时,配体分子会选择最有利的结合方式来进行分子对接,例如氢键是蛋白与配体分子的主要结合力之一。由图 4 所示,黄芩苷与 Helix2 上的残基 Ser119 和 Arg120 分别形成氢键,黄芩素可以与 Helix4 上的 Tyr385 和 Helix5 上的残基 Ser530 分别形成氢键。

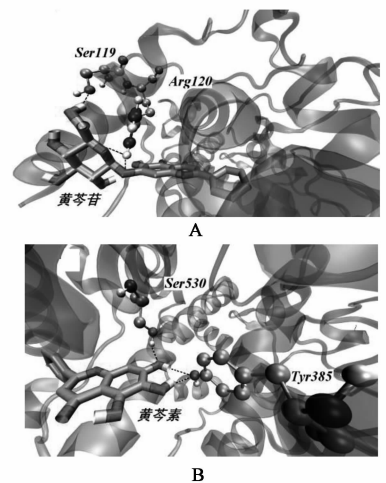


图 4 黄芩素、黄芩苷与 COX-2 对接结构的氢键网络

研究工作表明柴胡皂苷 A 和柴胡皂苷 D 都不能与 COX-2 结合,而黄芩中的活性成分黄芩苷和黄芩素与 COX-2 有很好的结合,黄芩苷和黄芩素可能通过抑制 COX-2 表达发挥抗酒精性肝病和抗肿瘤作用。结果还显示出黄芩苷和黄芩素的结合位点基本一致,但两者结合方式有较大差别。柴胡在肝损伤和肝癌中的应用很广泛,但柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D 作用于环氧合酶-2 具体机制还不清楚,有部分学者认为, Kodama Y^[21] 的观点——柴胡皂苷对环氧合酶-2 的活性没有直接的抑制作用,笔者初步的试验数据表明黄芩苷、柴胡皂苷及其配伍能抑制人肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖和诱导凋亡,同时还能明显下调 SMMC-7721 的环氧合酶-2 蛋白质的表达

水平,有关黄芩苷、黄芩素、柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D 抗肝损伤和抗肿瘤活性研究尚在进行中,柴胡皂苷 A、D 究竟是通过直接或间接的途径影响环氧合酶-2 的表达还有待于进一步的试验研究来证实。

中医药对肝病和肝癌有着既可改善临床症状,又可调整机体免疫功能的优势,具有多靶向的特点,故研究柴胡-黄芩配伍治疗酒精性肝损伤和肝细胞癌机制是比较复杂的过程。结合现代科学技术,采用多方法、多手段、多渠道系统、深入探索柴胡与黄芩配伍的作用机制、有效物质、作用靶向可为两者配伍临床广泛用于肝胆疾病和肿瘤的治疗提供依据。

[参考文献]

[1] 王宪龄,刘仁慧,刘方洲,等.柴胡黄芩配伍对大鼠急性酒精性肝损伤整体调节作用初探[J].中医研究,2004,17(5):24.

[2] 王宪龄,刘仁慧,张影,等.柴胡黄芩配伍抗小鼠急性酒精性肝损伤的实验研究[J].中药材,2004,27(10):756.

[3] 王宪龄,卢依平.柴胡黄芩配伍抗大鼠急性酒精性肝损伤作用研究[J].中药药理与临床,2005,21(4):10.

[4] 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.

[5] 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保护作用的比较[J].中国临床康复,2006,10(19):94.

[6] 王宪龄,穆海博,刘仁慧,等.柴胡黄芩不同配伍比例干预急性酒精性肝损伤大鼠肝脾、胸腺、肾上腺指数及肾上腺中维生素 C 含量的变化[J].中国临床康复,2006,10(15):180.

[7] 刘仁慧,王宪龄,刘方洲,等.柴胡黄芩配伍抗大鼠急性酒精性肝损伤作用的实验研究[J].时珍国医国药,2006,17(2):163.

[8] 王宪龄,宋宁,崔姗姗.柴胡黄芩配伍不同提取部位抗大鼠急性酒精性肝损伤的作用机制研究[J].中药药理与临床,2010,26(1):55.

[9] 宋宁,王宪龄,李瑞琴.柴胡黄芩配伍不同提取部位对大鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J].中药药理

与临床,2006,22(6):8.

[10] 王宪龄,李瑞琴,吴磊.柴胡黄芩配伍不同提取部位对小鼠急性酒精性肝损伤的作用[J].中药药理与临床,2007,23(1):10.

[11] 史青,聂淑琴,黄璐琦,等.柴胡属植物化学成分及药理研究新进展[J].中国实验方剂学杂志,2002,8(5):53.

[12] 黄幼异,黄伟,孙蓉.柴胡皂苷对肝脏的药理毒理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(17):298.

[13] Shimizu, Ichiro. Sho-saiko-to; Japanese herbal medicine for protection against hepatic fibrosis and carcinoma[J]. Gastroen Hepatol, 2000,15(Suppl):84.

[14] Nanji A A. Role of Kupffer cells in alcoholic hepatitis[J]. Alcohol, 2002, 27(1): 13.

[15] 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, 36,439.

[16] 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.

[17] Sousa S F, Fernandes P A, Ramos M J. Protein-ligand docking: current status and future challenges[J]. Proteins, 2006, 65(1): 15.

[18] Pettersen E F, Goddard T D, Huang C C, et al. UCSF Chimera-A visualization system for exploratory research and analysis[J]. J Comput Chem, 2004, 25(13):1605.

[19] Stewart J J P. MOPAC: A semiempirical molecular orbital program[J]. J Comput Aided Mol Des, 1990, (1):1.

[20] Humphrey W, Dalke A, Schulten K. 'VMD-visual molecular dynamics'[J]. J Mol Graph, 1996, 14(1):33.

[21] Kodama Y, Xiaochuan L, Tsuchiya C, et al. Dual effect of saikogenin D: *in vitro* inhibition of prostaglandin E₂ production and elevation of intracellular free Ca²⁺ concentration in C6 rat glioma cells[J]. Planta Med, 2003, 69(8): 765.

[责任编辑 邹晓翠]