

基于分子对接技术筛选中药来源的 HDAC3/8 小分子抑制剂

赵诗雨, 刘玉甜, 杨炳友, 刘艳, 吕邵娃*

(黑龙江中医药大学 省部共建教育部北药基础与应用研究重点实验室,
黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室, 哈尔滨 150000)

[摘要] **目的:** 发现具有组蛋白去乙酰化酶(HDAC)3/8 抑制活性的中药小分子活性成分。**方法:** 应用 AutoDock 4.2.6 软件进行分子对接技术,以 HDAC 抑制剂曲古抑菌素 A(TSA)为参照,对 19 种中药小分子成分进行筛选,设定默认对接构象数,获得对接结合能、活性位点氨基酸残基和氢键,并进行生物活性验证。**结果:** 19 种中药小分子与 HDAC3 和 HDAC8 均有不同程度的结合能,其中熊果酸、防己诺林碱和粉防己碱对 HDAC3 和 HDAC8 的结合能较低,结合活性较强。防己诺林碱与 HDAC3 处在 1 位点的最优结合能最低(-26.71 kJ·mol⁻¹),与 HDAC8 处在 9 位点的最优结合能最低(-26.84 kJ·mol⁻¹);粉防己碱与 HDAC3 处在 13 位点的最优结合能最低(-26.38 kJ·mol⁻¹),与 HDAC8 处在 12 位点的结合能最低(-25.41 kJ·mol⁻¹);熊果酸与 HDAC3 处在 16 位点的结合能最低(-25.83 kJ·mol⁻¹),与 HDAC8 处在 8 位点的最优结合能最低(-35.62 kJ·mol⁻¹)。通过 PyMOL 2.3.1 渲染出了 3 种小分子对接位点氨基酸,熊果酸与 HDAC3/8 结合时,活性位点均产生 2 个氢键,且相互作用较强,同时有较多活性位点氨基酸相连接。防己诺林碱与 HDAC3 活性位点产生 2 个氢键,与 HDAC8 活性位点产生 1 个氢键,与部分活性位点氨基酸进行疏水性结合。粉防己碱与 HDAC3/8 均无氢键作用,对接位点均由 4 种活性氨基酸对接。对接效果最优的 3 种小分子(熊果酸、防己诺林碱和粉防己碱)在 500 μmol·L⁻¹和 100 μmol·L⁻¹浓度下对 HDAC3/8 均有抑制活性,且抑制活性在选出的 10 种小分子中仍最优。**结论:** 在被筛选的 19 个小分子中,熊果酸、粉防己碱和防己诺林碱有可能是新型 HDAC3/8 抑制靶点抗炎药物,可为探索新的抗炎药物提供参考。

[关键词] 组蛋白去乙酰化酶; 分子对接; 抑制剂; 熊果酸; 防己诺林碱; 粉防己碱; 抗炎

[中图分类号] R22;R24;R28;C37;Q512 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)07-0186-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192446

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190826.0850.001.html>

[网络出版时间] 2019-08-27 14:00

Screening of HDAC3/8 Small Molecule Inhibitors from Traditional Chinese Medicine Based on Molecular Docking

ZHAO Shi-yu, LIU Yu-tian, YANG Bing-you, LIU Yan, LYU Shao-wa*

(Key Laboratory of Basic and Applied Research of Northern Medicine, Key Laboratory of Basic Research on Pharmacodynamic Substances of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine in Heilongjiang Province, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150000, China)

[Abstract] **Objective:** To discover a small molecule active ingredient of traditional Chinese medicine (TCM) with the inhibitory activity of histone deacetylase (HDAC) 3/8. **Method:** The molecular docking technique was performed by AutoDock 4.2.6 software. Trichostatin A (TSA) was used as a reference to screen 19 small molecular components from TCM, and the default docking conformation number was set to obtain the docking binding energy, active site amino acid residues and hydrogen bonds, and the biological activity was verified. **Result:** The binding energies of 19 small molecule components from TCM to HDAC3 and HDAC8 were different.

[收稿日期] 20190704(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373929);黑龙江中医药大学新药临床前研究基金项目(2018xy04)

[第一作者] 赵诗雨,在读硕士,从事中药新药的研究与开发,Tel:0451-87266916,E-mail:1921004800@qq.com

[通信作者] *吕邵娃,教授,硕士生导师,从事新药研究与开发工作,Tel:0451-87266916,E-mail:lswwa5599@hotmail.com

Among them, ursolic acid, fangchinoline and tetrandrine have low binding energies to HDAC3 and HDAC8, and their binding activities were strong. The optimal binding energy of fangchinoline and HDAC3 at the site 1 was the lowest ($-26.71 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), and that of HDAC8 at the site 9 was the lowest ($-26.84 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). The optimal binding energy of tetrandrine and HDAC3 at the site 13 was the lowest ($-26.38 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), and that of HDAC8 at the site 12 was the lowest ($-25.41 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). In addition, the binding energy of ursolic acid and HDAC3 at the site 16 was the lowest ($-25.83 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), and that of HDAC8 at the site 8 was the lowest ($-35.62 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Three kinds of amino acids at the docking site of small molecules were rendered by PyMOL 2.3.1. When ursolic acid was combined with HDAC3/8, the active sites produced two hydrogen bonds, and the interaction was strong, and many amino acids were connected at the active site. The fangchinoline formed two hydrogen bonds with the active site of HDAC3 and one hydrogen bond with the active site of HDAC8, and hydrophobic binding with some active site amino acids. There was no hydrogen bond between tetrandrine and HDAC3/8, and all docking sites were docked by 4 active amino acids. Three small molecules (ursolic acid, fangchinoline and tetrandrine) with the best docking effect had the inhibitory activity against HDAC3/8 at the concentration of $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, and the inhibitory activity was still optimal among the 10 selected small molecules. **Conclusion:** Among the screened 19 small molecules, ursolic acid, tetrandrine and fangchinoline may be the new anti-inflammatory drugs of HDAC3/8 inhibitory target, which provides a reference for further exploration and discovery of new anti-inflammatory drugs.

[Key words] histone deacetylase; molecular docking; inhibitor; ursolic acid; fangchinoline; tetrandrine; anti-inflammatory

炎症是导致很多重大疾病的根源,严重影响着人们的正常生活,如果未得到及时治疗,很容易癌变恶化,因此抗炎药物的研究一直以来都是世界性的热点问题^[1]。由于抗炎活性化合物的分离和合成都非常耗时耗力,所以在发现抗炎新药过程中借助先进的技术手段更能够有效地实现。近年来,分子对接技术已被广泛用于药物的研究和设计,尤其在大分子与小分子对接方面应用日渐完善^[2]。借助分子对接技术可以从大量数据库中筛选出具有特征结构的小分子,大大减少了不必要的后期实验工作量,节约了时间以及实验耗材。大分子靶标的确定是开展该技术的前提和基础。组蛋白去乙酰化酶(HDAC)是一类新型炎症靶标蛋白酶,对染色体的结构修饰和基因表达调控发挥着重要的作用^[3]。HDAC不仅能够介导组蛋白底物赖氨酸的去乙酰化,调控基因表达、细胞周期及细胞分化等生命过程^[4-5],还能够催化非组蛋白底物赖氨酸的去乙酰化,在更多的细胞调控通路中发挥着至关重要作用^[6-10]。

近年来,乙酰化的研究结果显示,对 HDAC 活性的抑制,除能够产生抗肿瘤作用以外,还可以有效地促使炎症细胞周期阻滞、诱导炎症细胞凋亡,抑制炎症生成,从而起到抗炎效果^[11]。HDAC 的高表达是导致炎症的重要原因,所以有效的抑制 HDAC 过

表达对早日找到新的抗炎药具有重要意义。目前研究发现了人体内存在 18 种 HDAC,与抗炎关系最为密切的是 HDAC3 和 HDAC8^[12]。基于中药来源的很多小分子都具有很好的抗炎活性^[13-14],例如,熊果酸、异槲皮苷、木犀草苷、山柰酚等,本研究选择利用 AutoDock 4.2.6 分子对接筛选的方法,将这些具有抗炎活性的中药来源小分子分别与 HDAC3 和 HDAC8 进行虚拟对接,获得对接最佳结合位点和结合能,再通过 PyMOL 2.3.1 渲染作图,分析其起作用的氨基酸,同时利用美国 BioVision 公司的荧光试剂盒对对接结合较好的小分子进行初步生物活性研究,为后期以 HDAC3/8 为靶标的抗炎新药的发现提供科学依据。

1 材料

SpectraMax 型酶标仪(美国 PerkinElmer 公司), DL-CJ-2N 型超净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司)。荧光 96 孔板(美国 Costar 公司),白屈菜红碱、蝙蝠葛碱、橙皮苷、粉防己碱、防己诺林碱、甘草酸、黄芩苷、芒果苷、马钱子碱、木犀草苷、木犀草素、山柰酚、芍药苷、新芒果苷、熊果酸、盐酸麻黄碱、盐酸小檗碱、异甘草素、异槲皮苷(中国科学院成都生物研究所,批号分别为 34316-15-9, 524-17-4, 220137-96-2, 318-34-3, 33889-68-8, 1405-86-3, 21967-41-9, 21002-12-7, 876-14-2, 54300-65-1,

A0108, 15291-75-5, 23180-57-6, 64809-67-2, 77-52-1, 7372-30-7, 24365-81-4, 2086-83-1, 961-29-5, 纯度依次为 98.30%, 99.70%, 98.56%, 99.90%, 98.76%, 98.66%, 98.80%, 97.88%, 96.70%, 98.00%, 98.90%, 98.79%, 99.30%, 98.67%, 97.62%, 97.94%, 99.41%, 98.32%, 99.23%), 二甲亚砜(DMSO, 中国赛国生物科技有限责任公司, 批号 67-68-5), 组蛋白去乙酰化酶(HDAC)3 和 HDAC8 抑制剂荧光筛选试剂盒(美国 BioVision 公司, 批号分别为 K363-100 和 K368-100)。

本研究所有工作均在 Microsoft Windows XP Professional 操作系统中完成, 采用 ChemBioOffice 2004 程序中的 ChemBioDraw 模块以及 Chem3D 模块(美国剑桥公司), AutoDock 4.2.6 (Scripps 研究所 Olson 实验室) 以及 PyMOL 2.3.1 (DeLano Scientific LLC 公司), 分子可视化程序 VMD (visual molecular dynamics) 1.9.3 (伊利诺伊州立大学香槟分校 UIUC 研发)。参数设置除非特殊指明, 均采用默认值。

2 方法

2.1 分子对接

2.1.1 大分子蛋白数据库的建立 选用与抗炎关系最为密切的 HDAC3 和 HDAC8, 均从 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) 中搜索并下载, 保留其 PDB 格式文件。在网址中获得大分子的基本信息, HDAC3 和 HDAC8 的 PDB 编号分别为 O15379, Q9BY41, 均为人类 A, B 链, 突变均为 0, 通过 VMD 1.9.3 构建其 3D 模型。将 HDAC 的结构删掉配体和多余的水分子, 保存成为 protein.pdb, 作为分子对接的受体结构。

2.1.2 待筛选小分子库的建立 在中国知网 (CNKI) 中找到所有待筛选小分子以及曲古抑菌素 A (TSA) 的化学结构式, 通过 ChemBioDraw 14.0 画出其 2D 构架图, 构建二维结构数据库, 转换至 Chem3D 模块获得小分子的三维结构图及每个小分子的 pdb 格式文件。将小分子的 pdb 格式进行加氢、电荷、质子化状态确认, 最后保存 ligand.pdb 作为分子对接的配体结构。

2.1.3 大分子蛋白与小分子对接过程 运行 AutoDock 4.2.6 打开 ligand.pdb, 构建 ligand.pdbqt 文件, 该文件中包含了配体结构中的原子信息和可旋转键的信息等。通过 GridBox 设置对接的盒子大小, 保存设置后保存其 gpf 文件。运行 Docking-Lamrcian GA 4.2, 选择拉马克遗传算法作为对接算

法, 保存成为 protein_ligand.dpf 文件, 该文件中包含了分子对接的信息, 默认对接的构象数为 10 个, 手动修改对接的构象数目为 20 个 (ga_run20)。运行 AutoGrid 4.2.6 和 AutoDock 4.2.6 程序。运行 AutoGrid4 程序, 得到对接中所有原子的信息; 运行 AutoDock4 程序进行对接, 对接的结果文件保存在 dlq 文件中, 得到对接评分。AutoDock 4.2.6 软件可以给出大分子蛋白和小分子不同结合位点的结合能, 能量值越低, 说明结合能越好。根据得到的结合能数据, 分别选取 HDAC3 和 HDAC8 对接最优的 3 种小分子模型进行 PyMOL 2.3.1 渲染作图。

2.2 HDAC3/8 抑制生物活性验证 称取分子对接结果中较优的 10 个待测小分子对照品及 TSA 适量, 分别用 DMSO 1 mL 溶解成 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液。取各母液 200 μL , 分别加入 DMSO 200 μL 配成浓度为 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液, 待用。另取各母液 100 μL , 分别加入 DMSO 900 μL 配成浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液, 待用。用试剂盒中的 buffer 将 2 种浓度的待测小分子溶液稀释 4 倍, 同时将 TSA 溶液稀释 10 倍。根据说明书进行操作, 设置空白孔 (不含 HDAC 和待测样品) 以及酶孔 (含有 HDAC, 不含待测样品)。用酶标仪进行荧光强度检测。 $R_{\text{EC}}, R_{\text{S}}, R_{\text{EC}}$ 分别代表空白孔、待测样品孔或 TSA 孔、酶孔的荧光强度。计算不同浓度待测样品对 HDAC3 和 HDAC8 的抑制率, 计算公式为抑制率 = $(R_{\text{EC}} - R_{\text{S}}) / (R_{\text{EC}} - R_{\text{EG}}) \times 100\%$ 。

3 结果

3.1 基于分子对接获得的结合位点与结合能

3.1.1 HDAC3 通过 AutoDock 4.2.6 计算结合能, 在 ga_run20 中选取最优结合能。结果发现防己诺林碱、粉防己碱、熊果酸、白屈菜红碱以及 TSA 依次处在 1, 13, 16, 11, 10 位点的最优结合能最低。见表 1。

3.1.2 HDAC8 通过 AutoDock 4.2.6 计算结合能, 在 ga_run20 中选取最优结合能, 结果发现熊果酸、防己诺林碱、粉防己碱、白屈菜红碱以及 TSA 依次处在 8, 9, 12, 16, 3 位点的最优结合能最低, 见表 2。

3.2 最低结合能小分子与 HDAC3/8 对接模型分析

3.2.1 HDAC3 根据 HDAC3 对接结果, 发现对接效果最佳的小分子为防己诺林碱, 其次为粉防己碱和熊果酸。通过 PyMOL 2.3.1 渲染作图, 见图 1 ~ 3。图中所有 A 部分黄色虚线代表范德华力作用,

表 1 HDAC3 和小分子在不同位点的结合能

Table 1 Binding energies of HDAC3 and small molecules at different sites

小分子	可旋转键 /个	非极性氢 /个	芳香碳 /个	位点	对接能量 /kJ·mol ⁻¹
白屈菜红碱 cheletyhrine	0	18	20	11	-23.78
蝙蝠葛碱 dauricine	11	43	24	12	-20.14
橙皮苷 hesperidin	15	26	15	18	-15.74
粉防己碱 tetrandrine	4	40	12	13	-26.38
防己诺林碱 fangchinoline	4	39	24	1	-26.71
甘草酸 glycyrrhizic acid	15	54	0	19	-15.99
黄芩苷 baicalin	10	12	15	5	-8.29
芒果苷 mangiferin	11	10	13	11	-7.79
马钱子碱 brucine	3	26	8	1	-22.48
木犀草苷 cynaroside	11	13	15	14	-10.68
木犀草素 luteolin	5	8	12	4	-18.80
山柰酚 kaempferol	5	6	15	19	-19.93
芍药苷 paeoniflorin	14	25	6	3	-5.99
新芒果苷 neomangiferin	16	17	13	11	-3.73
熊果酸 ursolic acid	3	46	0	16	-25.83
盐酸麻黄碱(1R,2S)-(-)-ephedrine hydrochloride	4	13	6	10	-19.01
盐酸小檗碱 berberine hydrochloride	2	18	16	7	-21.48
异甘草素 isoliquiritigenin	6	9	12	5	-18.38
异槲皮苷 isoquercitrin	9	12	16	6	-11.76
TSA	2	7	6	10	-16.96

注:排名均为 1(表 2 同)。

红色箭头表示 β -折叠,浅蓝色螺旋为 α -螺旋,紫色线为无规则卷曲。B ~ E 部分品红色虚线代表氢键。活性位点氨基酸残基均用黄色二级结构表示,图中绿色部分为小分子的二维结构。

由图 1 ~ 3 可知,小分子防己诺林碱与活性位点处 ASP-93 和 ASP-92 具有氢键作用,形成 2 个氢键,且相互作用较强;其中与氨基酸 LEU-266, GLY-143 形成非极性疏水性结合,对接过程中相关氨基酸共 7 种,分别是 LEU-266, PHE-199, HIS-172, PHE-200, ASP-93, GLY-143 和 ASP-92。小分子粉防己碱与活性位点处并未形成氢键;其中与氨基酸 ALA-211 形成非极性疏水性结合,对接过程中相关氨基酸共 4 种,分别是 TYR-182, ALA-211, GLN-178 和 GLU-208。小分子熊果酸与活性位点处 TYR-331 和 LYS-25 具有氢键作用,形成 2 个氢键,且相互作用较强;其中与氨基酸 VAL-300 形成非极性疏水性结合,对接过程中相关氨基酸共 5 种,分别是 TYR-331, LYS-25, HIS-17, VAL-300 和 ARG-301。

3.2.2 HDAC8 根据 HDAC8 对接结果,发现对接

效果最佳的小分子为熊果酸,其次为防己诺林碱和粉防己碱。通过 PyMOL 2.3.1 渲染作图,见图 4 ~ 6。结果发现小分子熊果酸与活性位点处 GLN-53 和 LEU-14 具有氢键作用,形成 2 个氢键,且相互作用较强;其中与氨基酸 LEU-292, LEU-323, ILE-322, PRO-16 和 VAL-15 形成非极性疏水性结合,对接过程中相关氨基酸共 8 种,分别是 LEU-292, LEU-323, ILE-322, LYS-325, GLN-53, LEU-14, PRO-16 和 VAL-15。小分子防己诺林碱与活性位点处 SER-351 具有氢键作用,形成 1 个氢键,且相互作用较强;其中与氨基酸 ILE-348 形成非极性疏水性结合,对接过程中相关氨基酸共 7 种,分别是 SER-351, ILE-348, GLU-347, THR-349, ASN-310, PRO-342 和 ASP-343。小分子粉防己碱与活性位点处并未形成氢键;其中与氨基酸 PHE-152 形成非极性疏水性结合,对接过程中相关氨基酸共 4 种,分别为 TYR-306, PHE-152, LYS-33 和 TYR-100。

3.3 HDAC3/8 抑制生物活性的验证试验 根据分子对接结果,选取与 HDAC3/8 呈现极好对接趋势

表 2 HDAC8 和小分子在不同位点的结合能

Table 2 Binding energies of HDAC8 and small molecules at different sites

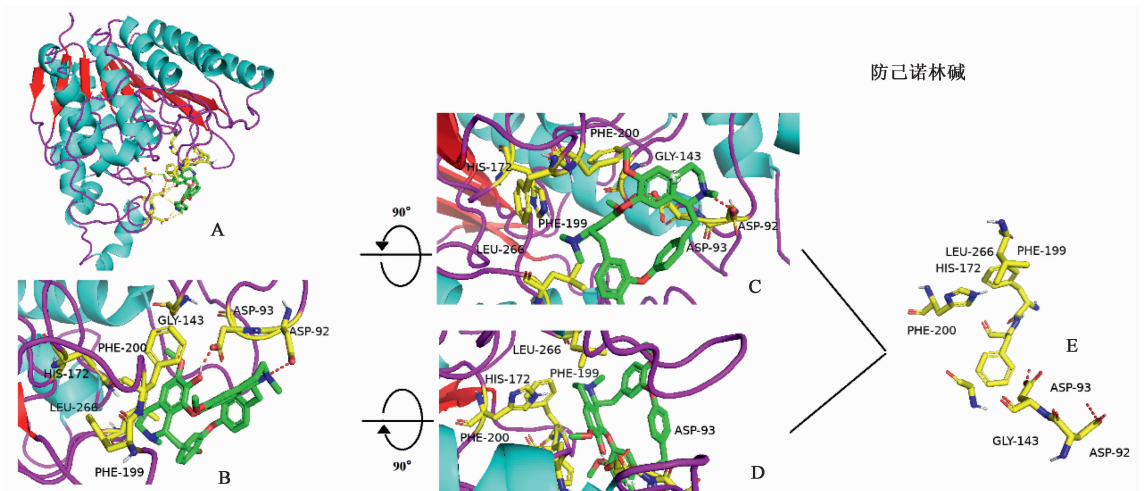
小分子	可旋转键 /个	非极性氢 /个	芳香碳 /个	位点	对接能量 /kJ·mol ⁻¹
白屈菜红碱	0	18	20	16	-23.70
蝙蝠葛碱	11	43	24	5	-9.42
橙皮苷	15	26	15	14	-8.92
粉防己碱	4	40	12	12	-25.41
防己诺林碱	4	39	24	9	-26.84
甘草酸	15	54	0	11	-22.65
黄芩苷	10	12	15	13	-10.63
芒果苷	11	10	13	3	-8.16
马钱子碱	3	26	8	3	-24.03
木犀草苷	11	13	15	15	-12.02
木犀草素	5	8	12	5	-18.80
山柰酚	5	6	15	12	-15.95
芍药苷	14	25	6	14	-8.67
新芒果苷	16	17	13	19	-0.21
熊果酸	3	46	0	8	-35.62
盐酸麻黄碱	4	13	6	4	-19.34
盐酸小檗碱	2	18	16	9	-23.57
异甘草素	6	9	12	7	-17.50
异槲皮苷	9	12	16	8	-11.26
TSA	2	7	6	3	-19.68

的 10 个小分子进行生物活性验证,见表 3。结果发现 TSA 呈现出了很好的抑制效果,对 HDAC3 抑制率可达到 94.433%,对 HDAC8 的抑制率可达到 95.980%。提示分子对接结果良好的小分子在生物活性验证试验中,仍可以在一定程度上抑制 HDAC3/8 活性,且熊果酸、防己诺林碱和粉防己碱仍为最佳。

4 讨论

分子对接技术作为现在计算机模拟技术中非常重要的方法,已经得到了广泛的应用。其不仅可以减少新药研发过程中的盲目性,提高效率,减少研发所消耗的时间,还可以在大数据很多的时候,给出后期研究的大方向。基于分子对接技术的虚拟筛选应用,开始于一个受体大分子靶标和待筛小分子数据库中,对接分析基本流程^[15-16]为①首先通过相关化合物的文献信息,完成小分子数据库二维结构的建立,并优化成三维结构;②完成生物大分子质子化和原子电荷的归属,以及实现结构的优化,明确小分子的结合位点并建立计算网络;③将生物大分子的结合作用位点与三维数据库中的每种小分子都进行匹配连接,计算两者之间的结合强度并打分;④依照评分结果筛选出得分较高的化合物,分析并进行评价,最终对选出的分子进行研究。

基于荧光检测的 HDAC3/8 抑制剂筛选,其原理是先乙酰化含有乙酰化赖氨酸侧链的 HDAC



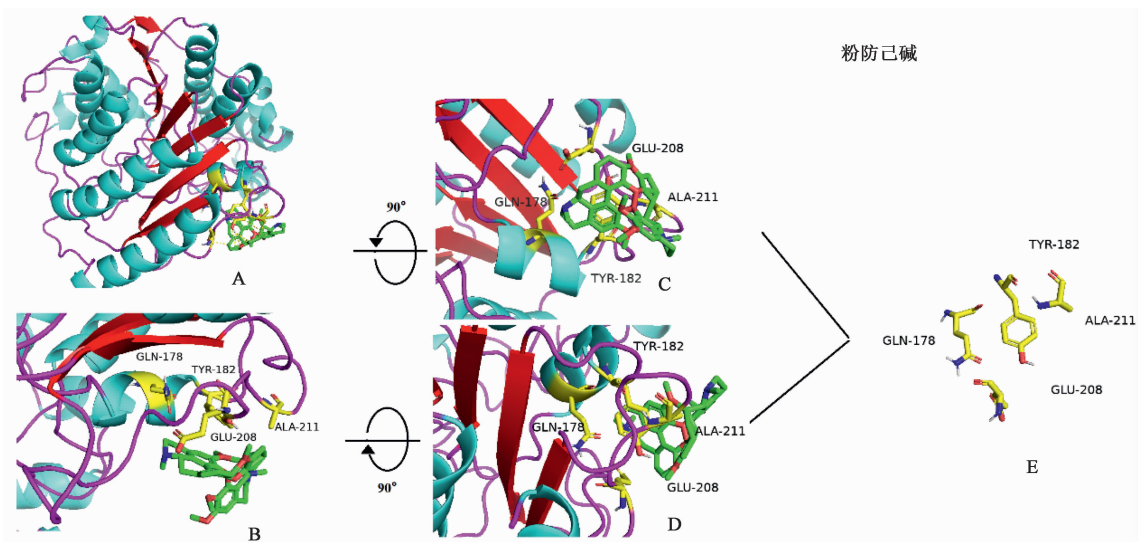
A. HDAC3 与防己诺林碱最可能的对接模式;B. HDAC3 和防己诺林碱的结合模型;C. 结合模型上旋转 90 度展示;D. 结合模型下旋转 90 度展示;E. 活性位点周围的氨基酸残基;ASP. 天冬氨酸;GLY. 甘氨酸;PHE. 苯丙氨酸;HIS. 组氨酸;LEU. 亮氨酸(图 3~6 同)

图 1 HDAC3 与防己诺林碱的对接模式

Fig. 1 Binding mode of HDAC3 and fangchinoline

底物,再发生赖氨酸反应导致脱乙酰化并裂解底物以释放多肽分子,再通过荧光法检测[激发波长

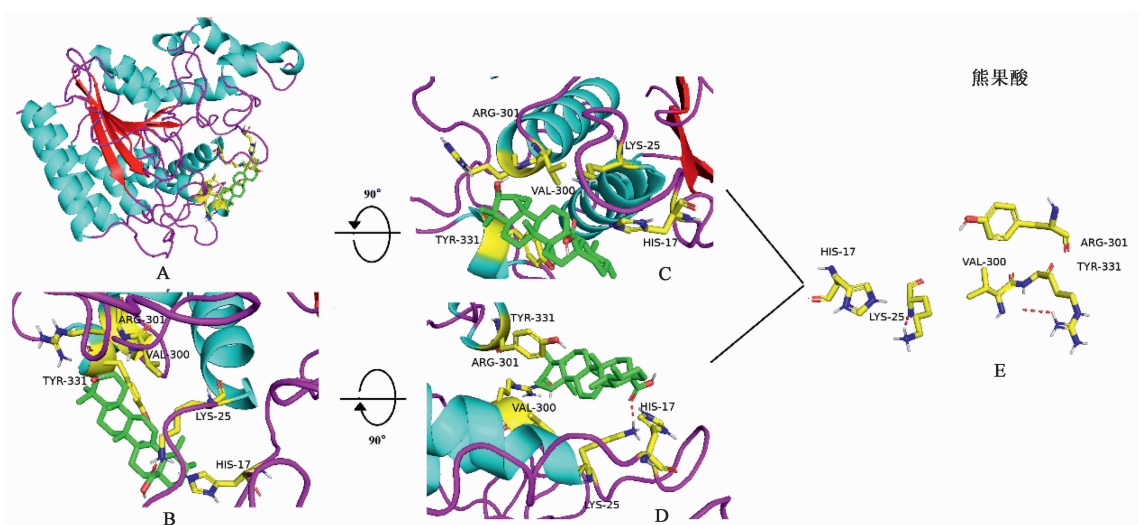
(Ex)/发射波长(Em) = 380 nm/500 nm]。检测得到的荧光强弱可反映 HDAC 的活性,在 HDAC 抑制



A. HDAC3 和粉防己碱最可能的对接模式; B. HDAC3 和粉防己碱的结合模型; C. 结合模型上旋转 90 度展示; D. 结合模型下旋转 90 度展示; E. 活性位点周围的氨基酸残基; GLN. 谷氨酰胺; TYR. 酪氨酸; ALA. 丙氨酸; GLU. 谷氨酸 (图 3 ~ 6 同)

图 2 HDAC3 和粉防己碱的对接模式

Fig. 2 Binding mode of HDAC3 and tetrandrine



A. HDAC3 与熊果酸最可能的对接模式; B. HDAC3 和熊果酸的结合模型; C. 结合模型上旋转 90 度展示; D. 结合模型下旋转 90 度展示; E. 活性位点周围的氨基酸残基; VAL. 缬氨酸; ARG. 精氨酸; LYS. 赖氨酸 (图 4, 6 同)

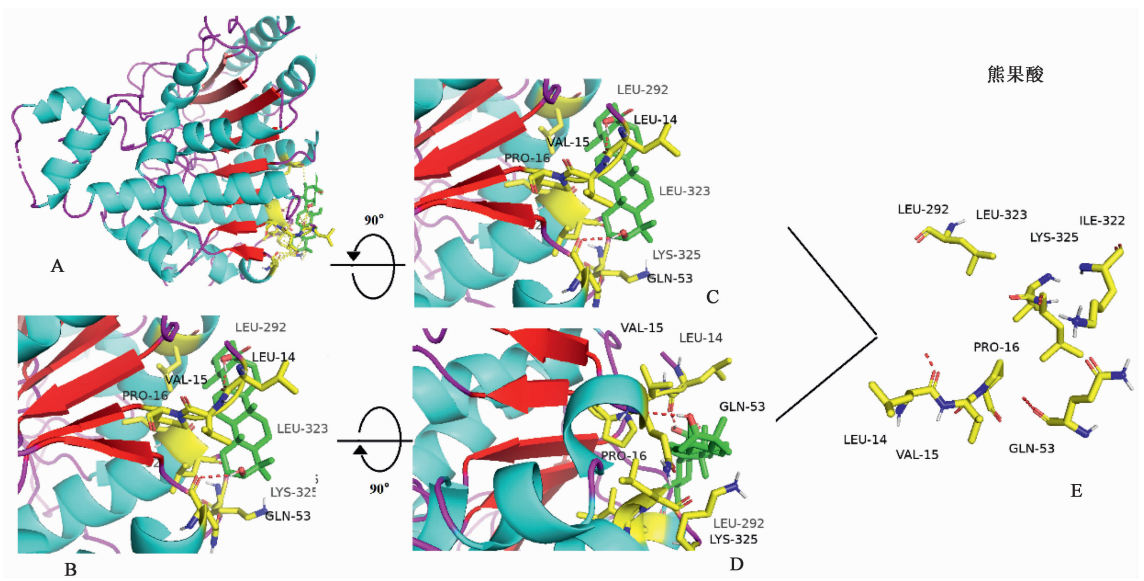
图 3 HDAC3 与熊果酸的对接模式

Fig. 3 Binding mode of HDAC3 and ursolic acid

剂的存在下,产生的荧光越弱,代表 HDAC 抑制剂对 HDAC 活性的抑制能力越强。现已上市很多有效的 HDAC 抑制剂,其中 TSA 是第 1 个被发现可以抑制 HDAC 的天然羟基化合物^[17]。

本研究采用基于分子对接的虚拟筛选技术,筛选与 HDAC3/8 有对接活性的抗炎中药小分子,选择 TSA 为参照,结果说明该对接方法、所选检测方法及参数的设定可行。本文研究结果发现熊果酸、防己诺林碱和粉防己碱与 HDAC3/8 的结合优于其他中药来源小分子,并呈现出了不同程度的与 TSA

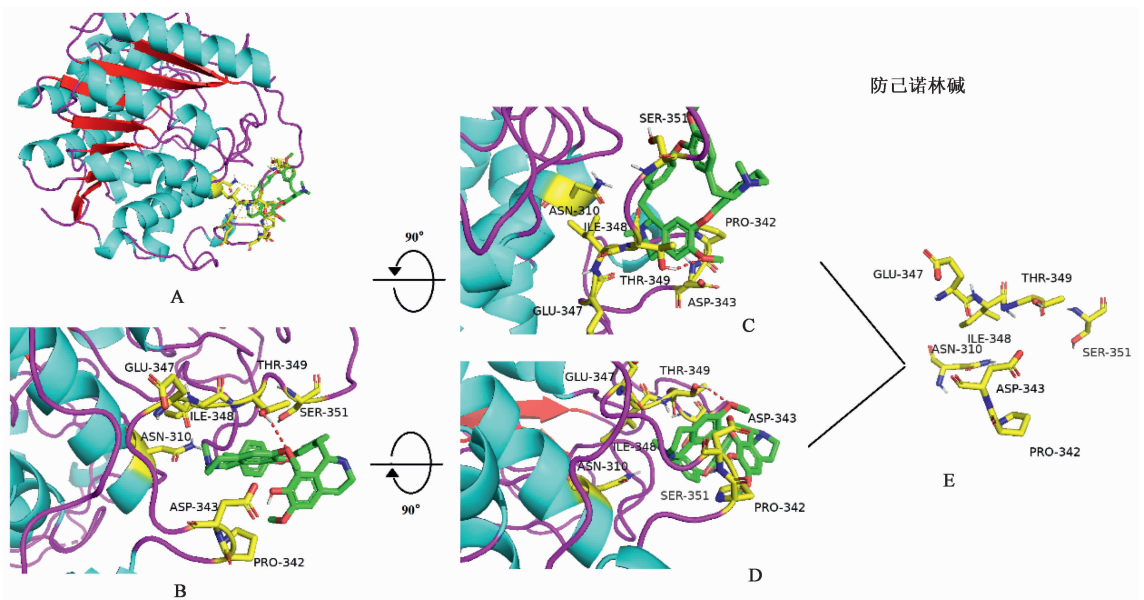
抑制 HDAC3/8 的相似活性。熊果酸作为一种广泛分布在乌梅、山楂、车前草、女贞子等天然植物中的三萜类化合物,对于类风湿性关节炎、支气管炎、肠炎等炎症均有很好的疗效^[18]。刘雁飞等^[19]通过对前列腺炎症模型大鼠灌胃给药,发现熊果酸可以降低血液中细胞因子白细胞介素(IL)-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 和 IL-10 水平,对炎症有明显改善。防己诺林碱和粉防己碱均为植物防己中的化学成分,作为我国传统中药之一,防己在抗炎方面具有广泛的药理作用^[20]。LI 等^[21]通过 Wistar 大鼠建立类风



A. HDAC8 与熊果酸最可能的对接模式; B. HDAC8 和熊果酸的结合模型; C. 结合模型上旋转 90 度展示; D. 结合模型下旋转 90 度展示; E. 活性位点周围的氨基酸残基; ILE. 异亮氨酸; PRO. 脯氨酸(图 5 同)

图 4 HDAC8 与熊果酸的对接模式

Fig. 4 Binding mode of HDAC8 and ursolic acid



A. HDAC8 与防己诺林碱最可能的对接模式; B. HDAC8 和防己诺林碱的结合模型; C. 结合模型上旋转 90 度展示; D. 结合模型下旋转 90 度展示; E. 活性位点周围的氨基酸残基; THR. 苏氨酸; ASN. 天门冬酰胺; SER. 丝氨酸

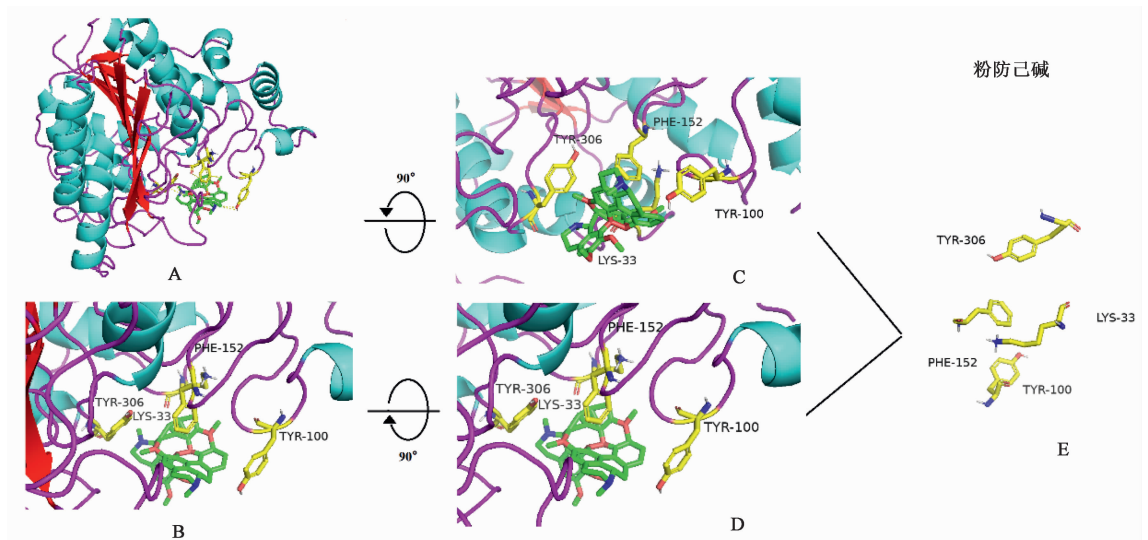
图 5 HDAC8 与防己诺林碱的对接模式

Fig. 5 Binding mode of HDAC8 and fangchinoline

湿性关节炎 (RA) 模型, 计算足肿胀率、关节炎指数和免疫器官指数; 采用荧光定量逆转录聚合酶链式反应和蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测大鼠外周血单核细胞 (PBMCs) mRNA 和环氧合酶 (COX)-2 的表达。结果显示粉防己碱对 RA 模型大鼠具有抗炎和免疫抑制作用, 还能降低外周血中 COX-2 的表达, 降低 RA 大鼠血清中炎症因子的浓度。虽然上

述 3 种小分子在抗炎常用中药处方中出现, 但其作用机制并不明确。ANGIOLILLI 等^[22] 研究了 HDAC1, 3, 6, 8 对 RA 成纤维样滑膜细胞 (FLS) 炎症基因表达的潜在贡献, 结果发现 HDAC3 和 HDAC8 均是与抗炎相关的靶点。

据本研究预测结果表明, 熊果酸、防己诺林碱和粉防己碱的抗炎作用极有可能是以 HDAC 为



A. HDAC8 和粉防己碱最可能的对接模式; B. 粉防己碱和 HDAC8 对接氨基酸三维图; C. 氨基酸视图上旋转 90 度展示; D. 氨基酸视图下旋转 90 度展示; E. 对接氨基酸残基

图 6 HDAC8 和粉防己碱的对接模式

Fig. 6 Binding mode of HDAC8 and tetrandrine

表 3 不同浓度小分子对 HDAC3 和 HDAC8 的抑制率

Table 3 Inhibitory rates of small molecules with different concentrations on HDAC3 and HDAC8 %

样品	工作浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	HDAC3 抑制率	HDAC8 抑制率
熊果酸	500	53.792	53.361
	100	38.562	37.983
白屈菜红碱	500	39.701	26.486
	100	24.344	14.332
木犀草素	500	9.484	7.423
	100	4.575	3.684
山柰酚	500	14.374	-
	100	6.130	-
粉防己碱	500	44.213	53.884
	100	23.539	37.962
防己诺林碱	500	57.971	36.747
	100	31.345	28.972
异甘草素	500	13.606	33.934
	100	9.763	18.338
盐酸麻黄碱	500	6.526	3.635
	100	4.611	-
马钱子碱	500	21.875	16.974
	100	16.200	9.326
盐酸小檗碱	500	12.243	7.825
	100	8.937	-
TSA	1.25	94.433	95.980

靶点的,但其作用机制尚需进一步验证。同时,分子对接技术也可能会出现假阳性现象,本实验中异甘草素、木犀草素、白屈菜红碱、山柰酚等也显示出较好的 HDAC 抑制活性,在排除假阳性预测结果之后,进一步探讨这些小分子的抗炎机制,可为发现新的以 HDAC 为靶点的抗炎药物提供启示,并为寻找新的中药来源的小分子抗炎药物奠定基础。

[参考文献]

[1] 王秋实. 基于 NF- κ B 和 MAPK 通路的类叶牡丹及其特征成分抗炎机制研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2016.

[2] KONG L Y, TAN R X. Artemisinin, a miracle of traditional Chinese medicine[J]. Nat Prod Rep,2015,32(12):1617-1621.

[3] KOUTSOGIANNOULI E A, SCHULZ W A. *Histone Acetyltransferases* [M]. Heidelberg: Springer-Verlag, 2017:151.

[4] WADE P A. Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin[J]. Hum Mol Genet,2001,10(7):693-698.

[5] CRESS W D, SETO E. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer[J]. J Cell Physiol, 2000,184(1):1-16.

[6] JUAN L J, SHIA W J, CHEN M H, et al. Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (27) :

- 20436-20443.
- [7] VAZIRI H, DESSAIN S K, NG-EATON E, et al. hSIR2 (SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase [J]. *Cell*, 2001, 107 (2) : 149-159.
- [8] BRUNET A, SWEENEY L B, STURGILL J F, et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase [J]. *Science*, 2004, 303 (5666) : 2011-2015.
- [9] HUBBERT C, GUARDIOLA A, SHAO R, et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase [J]. *Nature*, 2002, 417 (6887) : 455-458.
- [10] WOLFSON N A, PITCAIRN C, FIERKE C A. HDAC8 substrates: histones and beyond [J]. *Biopolymers*, 2013, 99 (2) : 112-126.
- [11] GLAUBEN R, SIEGMUND B. Molecular basis of histone deacetylase inhibitors as new drugs for the treatment of inflammatory diseases and cancer [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 512 : 365-376.
- [12] TOUSSIROT E, KHAN K A, HERBEIN G. Histone deacetylase inhibitors: a new and promising drug class for the treatment of arthritis? [J]. *Clin Epigenetics*, 2010, 1 (1/2) : 3-6.
- [13] 刘莹, 王振洲, 李平亚, 等. 天然药物抗炎成分及作用机制的研究进展 [J]. *特产研究*, 2017, 39 (1) : 69-76.
- [14] 张立虎, 李冬冬, 萧伟, 等. 基于网络药理学与分子对接法预测银杏叶提取物的抗炎机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24 (7) : 192-198.
- [15] 吉日木巴图, 范娜, 王蕊, 等. 基于分子对接技术探讨残黄片退黄作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25 (10) : 154-161.
- [16] THAL D M, SUN B, FENG D, et al. Crystal structures of the M1 and M4 muscarinic acetylcholine receptors [J]. *Nature*, 2016, 531 (7594) : 335-340.
- [17] GILARDINI MONTANI M S, GRANATO M, SANTONI C, et al. Histone deacetylase inhibitors VPA and TSA induce apoptosis and autophagy in pancreatic cancer cells [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2017, 40 (2) : 167-180.
- [18] WANG Y Z, LI L, DENG S M, et al. Ursolic acid ameliorates inflammation in cerebral ischemia and reperfusion injury possibly via high mobility group Box 1/Toll-like receptor 4/NF- κ B pathway [J]. *Front Neurol*, 2018, doi: 10. 3389/fneur. 2018. 00253.
- [19] 刘雁飞, 韩盼, 赖永继. 熊果酸对慢性非细菌性前列腺炎模型大鼠的治疗作用 [J]. *医药导报*, 2015, 34 (10) : 1292-1295.
- [20] 王蓉, 马腾茂, 刘飞, 等. 防己的药理作用及临床应用研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42 (4) : 634-639.
- [21] LI X, WU Z, HE B, et al. Tetrandrine alleviates symptoms of rheumatoid arthritis in rats by regulating the expression of cyclooxygenase-2 and inflammatory factors [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16 (3) : 2670-2676.
- [22] ANGIOLILLI C, KABALA P A, GRABIEC A M, et al. Histone deacetylase 3 regulates the inflammatory gene expression programme of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76 (1) : 277-285.

[责任编辑 刘德文]