

# 细辛挥发油成分与 CYP1A2 酶的分子对接分析

于俏, 陈雨虹, 琚辉, 申蕊, 寇晓娣\*, 杨爱红\*  
(天津中医药大学 中药学院, 天津 301617)

**[摘要]** **目的:** 研究细辛中黄樟醚、肉豆蔻醚、甲基丁香酚、细辛脑四种挥发油成分以及黄樟醚活性中间体和肉豆蔻醚活性中间体同 CYP1A2 酶的作用方式。**方法:** 通过“Cocktail”探针底物法筛选细辛挥发油成分对 CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 和 CYP2C19 5 种人肝微粒体酶的抑制作用。采用半柔性分子对接的方式研究挥发油成分及中间体与 CYP1A2 酶的结合能力。**结果:** 结果表明挥发油成分对 CYP1A2 具有较强的抑制作用。分子对接评分结果分别为 3.048 7 kcal·mol<sup>-1</sup> (黄樟醚), 6.016 4 kcal·mol<sup>-1</sup> (肉豆蔻醚), 16.969 2 kcal·mol<sup>-1</sup> (甲基丁香酚), 16.013 8 kcal·mol<sup>-1</sup> (细辛脑), 23.923 3 kcal·mol<sup>-1</sup> (黄樟醚活性中间体) 和 25.594 3 kcal·mol<sup>-1</sup> (肉豆蔻醚活性中间体)。**结论:** 分子对接结果表明黄樟醚中间体和肉豆蔻醚中间体与 CYP1A2 酶的结合能力最强。进一步确定了黄樟醚和肉豆蔻醚是 CYP1A2 酶的基于机制性抑制剂, 与本课题组前期的 IC<sub>50</sub>-shift 及谷胱甘肽捕获实验的结果一致。

**[关键词]** 分子对接; 黄樟醚; 肉豆蔻醚; 活性中间体; CYP1A2

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)09-0202-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20200506

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191119.1137.004.html>

**[网络出版时间]** 2019-11-19 14:29

## Molecular Docking of Volatile Oily Constituents of Chinese Herbal Medicine Asari Radix et Rhizoma and CYP1A2 Enzyme

YU Qiao, CHEN Yu-hong, JU Hui, SHEN Rui, KOU Xiao-di\*, YANG Ai-hong\*

(School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the mechanisms of action of four volatile oil components (safrole, myristicin, methyleugenol and asarone) and the reactive metabolites of safrole and myristicin with CYP1A2. **Method:** The inhibitory effects of the volatile oil components of Asari Radix et Rhizoma on the human liver microsomal enzymes CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 and CYP2C19 were screened by the "Cocktail" probe substrate method. The ability of the volatile oil components and intermediates in binding to CYP1A2 enzyme was studied by means of semi-flexible molecular docking. **Result:** The screening results showed that the components had a strong inhibitory effect on CYP1A2. Molecular docking scores were 3.048 7 kcal·mol<sup>-1</sup> (safrole), 6.016 4 kcal·mol<sup>-1</sup> (myristicin), 16.969 2 kcal·mol<sup>-1</sup> (methyleugenol), 16.013 8 kcal·mol<sup>-1</sup> (asarone), 23.923 3 kcal·mol<sup>-1</sup> (safrole reactive metabolites) and 25.594 3 kcal·mol<sup>-1</sup> (myristicin reactive metabolites). **Conclusion:** Molecular docking results indicate that safrole metabolic intermediate and myristicin metabolic intermediate have the strongest ability in binding to CYP1A2 enzyme. This study further confirms that

**[收稿日期]** 20190818(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年项目(81503462);天津中医药大学人事科研启动费项目

**[第一作者]** 于俏,在读硕士,从事中药配位化学及中药活性成分方面研究,E-mail:yvqiao326@163.com

**[通信作者]** \*杨爱红,博士,副教授,从事中药配位化学及中药活性成分方面研究,E-mail:yah408@163.com;

\*寇晓娣,博士,教授,从事中药配位化学及中药活性成分方面研究,E-mail:xiaodikou2013@163.com

safrole and myristicin are the mechanism-based inhibitors of CYP1A2 enzyme, which is consistent with the results of previous  $IC_{50}$ -shift and glutathione capture experiments.

[ **Key words** ] molecular docking; safrole; myristicin; reactive metabolites; CYP1A2

细辛为马兜铃科植物北细辛、汉城细辛或华细辛的干燥根和根茎<sup>[1]</sup>。细辛主要用于治疗风寒头痛、痰饮咳喘、关节疼痛、鼻塞和牙痛等<sup>[2]</sup>，是一味常用中药。随着细辛日趋广泛的应用，相关药物不良反应的报道也越来越多<sup>[3-4]</sup>。尤其是细辛挥发油成分引起的药物性肝损伤一直备受关注。

药物性肝损伤(DILI)是指在药物使用过程中造成肝脏损伤,是药物不良反应的原因之一,有较高的发病率<sup>[5-6]</sup>。DILI 其发病机制尚不明确,主要包括可预测和不可预测两大类<sup>[7-9]</sup>,细胞色素 P450 (CYP450)代谢异常是可预测 DILI 的主要发病机制。药物主要通过诱导、可逆性抑制和基于机制性抑制(MBI)等途径影响 CYP450 酶的活性,引起代谢异常。其中 MBI 是指药物经 CYP450 酶代谢生成的活性中间体(RMs)与 CYP450 酶活性部位近端亲核氨基酸残基共价结合导致 CYP450 酶不可逆性失活<sup>[10]</sup>。MBI 介导的途径可以在较长时间抑制 CYP450 酶,进而可能引起药物相互作用(DDI)<sup>[11]</sup>。因此 MBI 的研究对个体化用药、预测药物潜在的 DDI,合理用药等意义重大。

分子对接(molecular docking)是一种将科学计算与物理化学结合在一起,基于“诱导契合”的原理,深入地了解蛋白质与配体的相互作用以及与蛋白质活性位点的结合方式的科学方法。配体与受体之间通过静电作用、范德华力、空间立体结构等作用进行匹配,并通过打分函数来评价配体与受体结合能力。分子对接在毒性预测、理解分子生物功能,以及虚拟药物筛选等方面都有广泛应用,是预测药物潜在的 DDI 的一个重要工具<sup>[12-15]</sup>。

细辛中的挥发油成分黄樟醚(safrole,图 1a)和肉豆蔻醚(myristicin,图 1b)含有的亚甲二氧基苯基是引起 CYP450 酶 MBI 的最常见亚结构之一<sup>[16]</sup>。本课题组前期通过“Cocktail”探针底物法筛选出了黄樟醚和肉豆蔻醚对 CYP1A2 酶的抑制能力最强。并且利用 UPLC-MS/MS 以及谷胱甘肽(GSH)捕获的方法<sup>[17-18]</sup>,分析了黄樟醚、肉豆蔻醚的醌式结构的活性中间体(图 1e,1f),推测这两种挥发油成分是 CYP1A2 酶的基于机制性抑制剂。本实验将通过“Cocktail”探针底物法对细辛中另外两种挥发油成分甲基丁香酚(methyleugenol,图 1c)和细辛脑

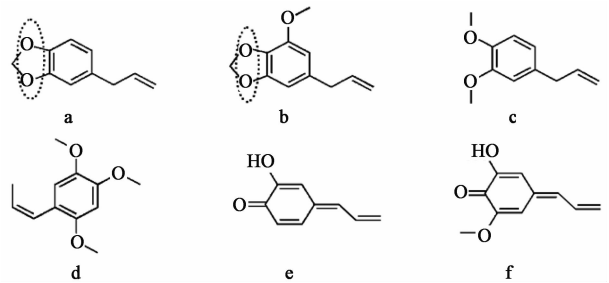


图 1 黄樟醚(a),肉豆蔻醚(b),甲基丁香酚(c),细辛脑(d),黄樟醚活性中间体(e)及肉豆蔻醚活性中间体(f)的分子结构

Fig. 1 Molecular structure of safrole (a), myristicin (b), methyleugenol (c), asarone (d), safrole RMs (e) and myristicin RMs (f)

(asarone,图 1d)对 CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 和 CYP2C19 5 种人肝微粒体酶的抑制作用进行筛选。并且采用半柔性分子对接(surflex dock)研究黄樟醚、肉豆蔻醚、甲基丁香酚、细辛脑四种挥发油成分以及黄樟醚活性中间体和肉豆蔻醚活性中间体与 CYP1A2 的作用强度和模式,为进一步研究细辛肝毒性机制、药物 MBI 毒副作用提供新的理论依据。以肉豆蔻醚为例的体外实验和分子对接相互验证过程。见图 2。

### 1 材料

**1.1 药物和试剂** 甲基丁香酚、细辛脑均购自中国药品生物制品鉴定所;非那西丁(CYP1A2),咪达唑仑(CYP3A4),去甲右美沙芬(CYP2D6),美芬妥英(CYP2C19),氯唑沙宗(CYP2E1)和 NADPH 均购自美国 Sigma 公司;人肝微粒系统(HLMs)购于瑞德肝脏疾病研究(上海)有限公司,经患者完全同意,根据中国器官捐赠条例从人体肝组织中制备,批号 SUBK;甲醇、乙腈(色谱纯)购自天津康科德科技发展有限公司;DMSO( $\geq 99.7\%$ )购于美国 Sigma 公司;其他试剂均为分析纯及以上。

**1.2 仪器** ZORBXXDB 型液质联用系统[安捷伦科技(中国)有限公司,  $C_{18}$  色谱柱(3.5  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm  $\times$  50 mm)]; ALLEGRA-64R 型高速离心机(美国 Beckman 公司);WH-3 型微型涡旋混合器(上海泸西分析仪器厂有限公司);DKB-501A 型超级恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司);Millipore Milli-Q/30 L 型超纯水(法国 Millipore 公司)。

**1.3 对接软件** RCSB 型蛋白数据库(PDB),由结

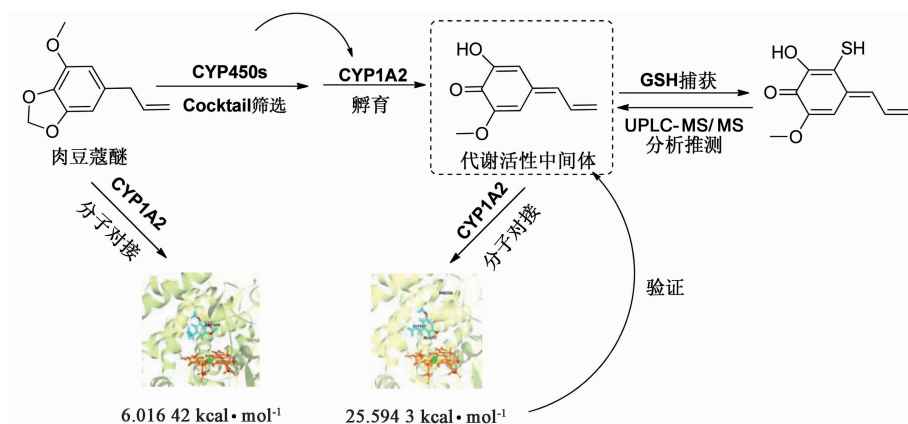


图 2 肉豆蔻醚与 CYP1A2 的相互作用的体外实验和分子对接相互验证过程

Fig. 2 *In vitro* experiment and molecular docking mutual verification process of interaction between myristicin and CYP1A2

构生物学合作研究协会 RCSB)管理;分子对接软件 Discovery Studio (DS, V7. 6) 软件(北京迅利创成科技有限公司);分子结构绘制软件: ChemBio Draw Ultra12. 0 软件,英国剑桥公司;Pymol-1 型结果输出软件(DeLano Scientific LLC 公司)。

**1. 4 CYP1A2 酶晶体结构** 从 RCSB 蛋白数据库下载 CYP1A2 酶晶体结构的 PDB 文件, PDB 的 ID 号为 2HI4。

**1. 5 配体分子** 从 PubChem 数据库中下载配体黄樟醚, 肉豆蔻醚、甲基丁香酚、细辛脑 4 种化合物 3D 结构的 PDB 文件, ID 号分别为 5144, 4276, 7127, 636822。ChemBioDraw Ultra12. 0 软件绘制出黄樟醚和肉豆蔻醚活性中间体结构以 pdb 格式保存。

## 2 方法

**2. 1 “Cocktail” 探针筛选** 采用两步稀释法用于分析和筛选挥发油成分对 5 种 CYP450 酶的抑制作用。选择 CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP2C19 作为探针底物。所有孵育反应均在 37 °C 振荡浴中进行, 预孵育体系的总体积为 200  $\mu\text{L}$ 。包括 0. 1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲液 (PBS) pH 7. 4, 2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  人肝微粒体蛋白, 测试药物 (5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  或 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 加入或不加入 1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NADPH (用等体积 PBS 替换) 预孵育 30 min。将预孵育后的样品稀释 10 倍, 即将 20  $\mu\text{L}$  预孵育的样品加入到含有 NADPH (1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 100  $\mu\text{L}$  和混合探针底物 (10, 2. 5, 20, 5, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 80  $\mu\text{L}$  的系统中, 孵育 15 min 后, 加入冰甲醇 400  $\mu\text{L}$  (含 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  卡马西平) 以停止反应。最后将样品离心 (4 °C, 5 min, 1 万  $\times g$ )。上清液用于通过 LC-MS 测定 5 种代谢

物, 并平行 3 次进行测定。

## 2. 2 分子对接

**2. 2. 1 结构优化** 运行 Prepare protein 程序优化蛋白结构, 优化蛋白结构 (加氢 protonate, 去水 remove water, 补全肽链 build loops) 并赋予 CharMm Forcefield 立场得到 Pre-CYP1A2<sup>[19]</sup>。运行 Minimize ligand 程序, 对 3 个配体施加 CharMm Forcefield, 优化配体分子结构。

**2. 2. 2 参数设置** 设置 Pose Cluster Radius 值为 0. 5  $\text{\AA}$  以确保 docking pose 的多样性, 将 RMSD 值设为 0. 5  $\text{\AA}$  能够确保对接构象尽可能具有多样性。其余参数均设为系统默认值。

**2. 2. 3 对接方法** 采用半柔性对接方法, 运用模拟退火的算法寻找配体与受体的最优构象。活性位点为靠近 CYP1A2 铁卟啉环附近的活性空腔, 该活性位点是由氨基酸残基和血红蛋白共同构成, 符合 PDB 文献记录的位置, 并根据 CDOCKER Energies (分子对接打分函数) 的高低来评价化合物与酶的对程度, 该打分函数值越高表示二者亲和力越强。利用上述参数设置, 将配体重新接入 CYP1A2 晶体结构 (PDB 2HI4) 的活性位点中, 比较对接所产生的构象与天然配体的 RMSD 值, 结果 < 2  $\text{\AA}$ , 说明方法可行, 对接方法有效。得到复合物结构, 并通过打分函数判断其空间结合能力。

## 3 结果

**3. 1 “Cocktail” 探针筛选结果** 筛选结果表明甲基丁香酚浓度在 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时对 5 种 CYP450 酶几乎没有抑制作用, 当浓度增加到 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时显示其对 CYP1A2 和 CYP2C19 酶有抑制作用, 加 NADPH 后抑制作用增强, 其中对 CYP1A2 酶的抑制

作用最明显(图 3)。而细辛脑在浓度为  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,对酶有很弱的抑制作用,当浓度增加到  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,抑制作用增强,其中对 CYP1A2 酶有很明显的抑制作用(图 4)。前期“Cocktail”探针筛选的结果表明黄樟醚和肉豆蔻醚均对 CYP1A2 有很强的抑制作用<sup>[17-18]</sup>。

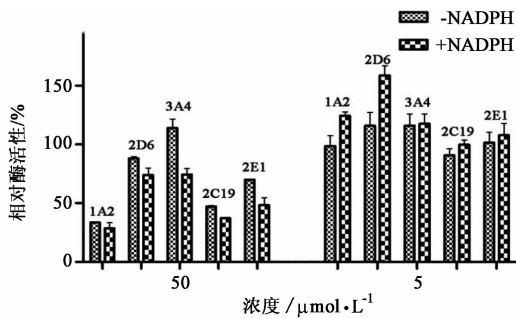


图 3 “Cocktail”探针法筛选甲基丁香酚

Fig. 3 “Cocktail” probe method for screening methyleugenol

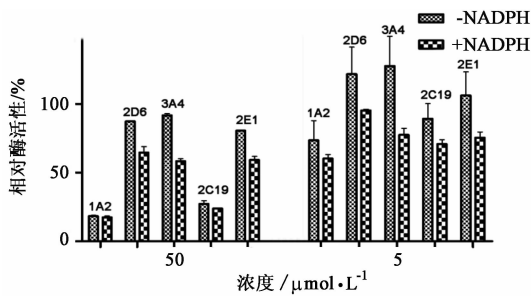


图 4 “Cocktail”探针法筛选细辛脑

Fig. 4 “Cocktail” probe method for screening asarone

**3.2 分子对接结果** CDOCKER 的对接结果显示,细辛中 4 种挥发油成分以及代谢活性中间体与 CYP1A2 酶的活性位点发生结合。其中黄樟醚和肉豆蔻醚活性中间体与 CYP1A2 的作用强度明显高于单体,与本课题组已报道实验结果一致<sup>[17-18]</sup>。见表 1。

表 1 细辛 4 种挥发油成分及黄樟醚活性中间体和肉豆蔻醚活性中间体与 CYP1A2 对接的评分

Table 1 Docking of four volatile oil components, safrole RMs and myristicin RMs with CYP1A2

配体分子	评分/ $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$
黄樟醚	3.048 7
肉豆蔻醚	6.016 4
甲基丁香酚	16.969 2
细辛脑	16.013 8
黄樟醚 RMs	23.923 3
肉豆蔻醚 RMs	25.594 3

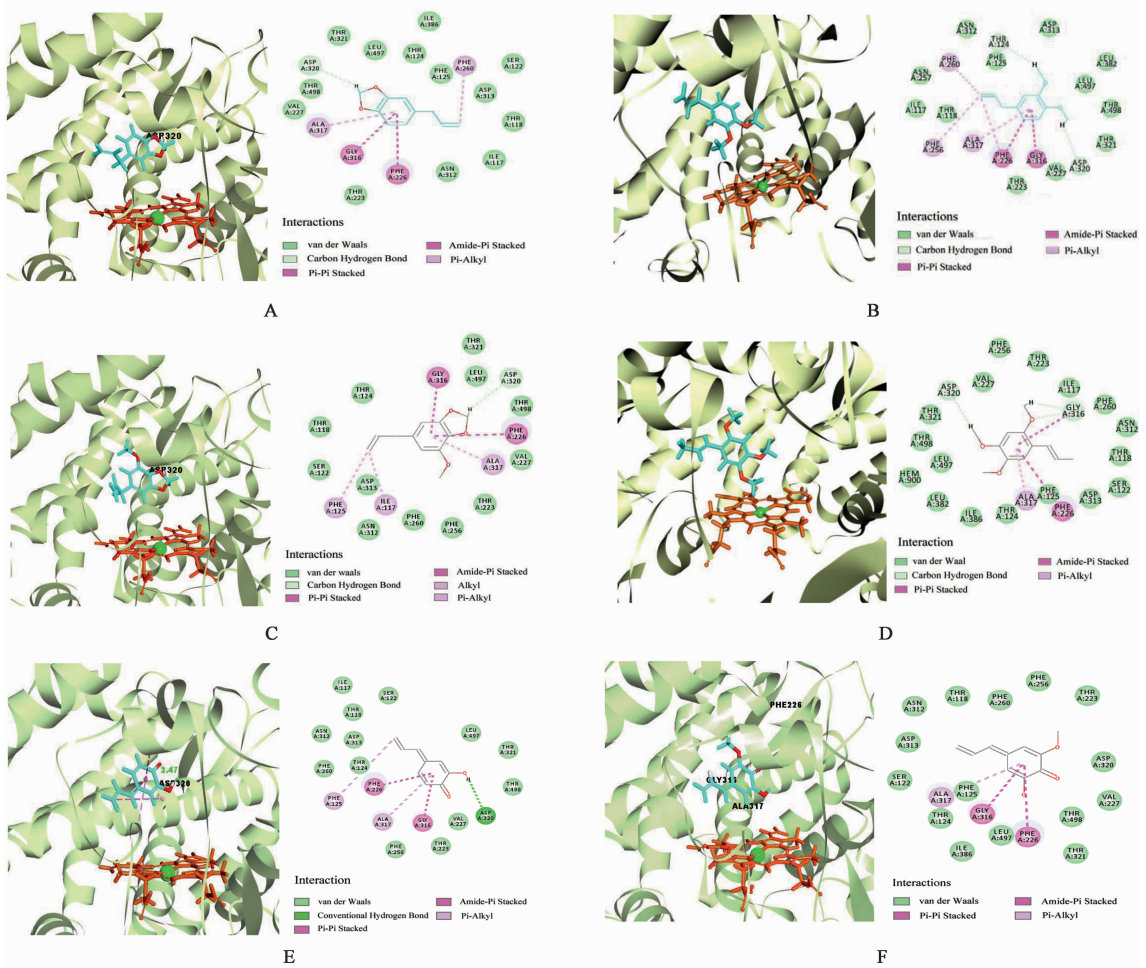
黄樟醚中苯环与 CYP1A2 中的甘氨酸 Gly316 和苯丙氨酸 Phe226 具有  $\pi$ - $\pi$  堆积作用,且与丙氨酸 Ala317 有  $\pi$ -烷基化相互作用,亚甲二氧基苯基中的氢原子与 CYP1A2 中的天冬氨酸 Asp320 氨基酸残基具有弱氢键作用,末尾双键部分和 Phe260 具有  $\pi$ -烷基化相互作用。肉豆蔻醚中苯环与 Gly316 和 Phe226 具有堆积作用,和丙氨酸 Ala317, Phe125 和亮氨酸 Ile117 具有烷基化和  $\pi$ -烷基化相互作用,和 Asp320 具有弱的氢键作用。甲基丁香酚苯环与 Gly316 和 Phe226 具有堆积的作用,与 Phe260, Phe256, Ala317 之间通过  $\pi$ -烷基化相互作用,且与 Asp320 之间具有弱氢键作用。细辛脑与 Gly316 和 Phe226 具有堆积作用,与 Ala317 具有  $\pi$ -烷基相互作用,且与 Asp320, Gly316 具有弱氢键作用。从图 9 可以看出,黄樟醚活性中间体中苯环与 CYP1A2 的苯环与 Gly316 和 Phe226 具有堆积作用,和丙氨酸 Ala317 和 Phe125 具有烷基化和  $\pi$ -烷基化相互作用,和 Asp320 氨基酸残基具有较强的氢键相互作用,它们之间的距离为  $2.47 \text{ \AA}$ 。肉豆蔻醚活性中间体与 CYP1A2 活性位点中的 Phe226 氨基酸残基通过  $\pi$ -烷基化相互作用,与 Gly316 和丙氨酸 Ala317 具有  $\pi$ - $\pi$  堆积作用。从分子对接结果可以看出含有亚甲二氧基苯基结构的黄樟醚和肉豆蔻醚经过代谢成为的活性中间体与 CYP1A2 酶的结合能力明显优于原化合物以及其他挥发油成分,进一步验证了前期实验中对黄樟醚和肉豆蔻醚是 CYP1A2 酶的基于机制性抑制剂的结论。见图 5。

#### 4 结论

“Cocktail”探针筛选表明甲基丁香酚与细辛脑对 CYP1A2 酶有抑制作用,CDOCKER 的对接结果显示黄樟醚、肉豆蔻醚、甲基丁香酚、细辛脑及黄樟醚和肉豆蔻醚的活性中间体都能与 CYP1A2 酶通过多重作用方式结合。其中黄樟醚和肉豆蔻醚产生的活性代谢中间体与 CYP1A2 酶的结合能力明显高于其他四种挥发油成分,说明活性中间体与 CYP1A2 酶更易形成结构稳定的复合物,在体内蓄积而产生毒性作用,进一步造成临床肝毒性。分子对接结果与实验结果一致,为细辛肝毒性的机制和药物 MBI 致毒副作用研究提供了新的理论依据。

#### [参考文献]

- [1] 丁香,赵万秋,蔡林. 中药细辛的现代临床应用研究[J]. 临床合理用药杂志, 2015, 8(30): 177-179.
- [2] 李明,周强,杨丽娜,等. 基于历代中医文献的细辛证



A. 黄樟醚; B. 甲基丁香酚; C. 肉豆蔻醚; D. 细辛脑; E. 黄樟醚活性中间体; F. 肉豆蔻醚活性中间体  
图 5 细辛 4 种挥发油成分、黄樟醚活性中间体、肉豆蔻醚活性中间体与 CYP1A2 的相互作用方式 (3D/2D)  
Fig. 5 Interaction of four volatile oil components, saffrole RMs, myristicin RMs and CYP1A2 (3D/2D)

治规律与常用剂量探索[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(8): 23-28.

[ 3 ] JOHANNA M, OLUSHEYI B, KITE G C, et al. Medicinally used asarum species: high-resolution LC-MS analysis of aristolochic acid analogs and *in vitro* toxicity screening in HK-2 cells[J]. Front Pharmacol, 2017, 8 (215): 1-9.

[ 4 ] 高皓, 贾党生, 郝俊霞, 等. 基于网络分析细辛毒理学[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(10): 180-187.

[ 5 ] 陈成伟. 药物性肝损伤的研究进展及我国存在的问题[J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34(6): 10-14.

[ 6 ] SUK K T, KIM D J. Drug-induced liver injury: present and future [J]. Clin Mol Hepatol, 2012, 18 (3): 249-257.

[ 7 ] BJORNSSON E S, BERGMANN O M, BJORNSSON H K, et al. Incidence, presentation, and outcomes in patients with drug-induced liver injury in the general population of iceland[J]. Gastroenterology, 2013, 144

(7): 1419-1425.

[ 8 ] ZHANG C, CHENG F, LI W, et al. In silico prediction of drug induced liver toxicity using substructure pattern recognition method[J]. Mol Inform, 2016, 35 (3/4): 136-144.

[ 9 ] HADEM J, TACKE F, BRUNS T, et al. Etiologies and outcomes of acute liver failure in Germany [J]. Clin Gastroenterol H, 2012, 10(6): 664-669.

[ 10 ] HO H K, CHAN J C Y, HARDY K D, et al. Mechanism-based inactivation of CYP450 enzymes: a case study of lapatinib[J]. Drug Metab Rev, 2015, 47 (1): 21-28.

[ 11 ] TAKAHASHI N, SUBEHAN, KADOTA S. Mechanism-based CYP2D6 inactivation by acridone alkaloids of Indonesian medicinal plant *Lunasia amara* [J]. Fitoterapia, 2012, 83(4): 774-779.

[ 12 ] 郝俊霞, 高梓森, 高皓, 等. 基于网络药理学的雷公藤肾毒性机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019,

- 25(16): 142-151.
- [13] HUANG S Y, ZOU Y Q. Advances and challenges in protein-ligand docking [J]. *Int J Mol Sci*, 2010, 11(8): 3016-3034.
- [14] 汪祺,王亚丹,杨建波,等. 基于分子对接及体外抑制实验预测芹菜素潜在药物相互作用[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(18): 4043-4047.
- [15] 雒银珍,赵博文,陈茜,等. 基于分子模拟技术的豨莶通栓制剂调脂作用机制及剂型选择研究[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(7): 1436-1441.
- [16] FONTANA E, DANSETTE P M, POLI S M. Cytochrome p450 enzymes mechanism based inhibitors: common sub-structures and reactivity [J]. *Curr Drug Metab*, 2005, 6(5): 413-454.
- [17] YANG A H, HE X, CHEN J X, et al. Identification and characterization of reactive metabolites in myristicin-mediated mechanism-based inhibition of CYP1A2 [J]. *Chem Biol Interact*, 2015, 237: 133-140.
- [18] YANG A H, ZHANG L, ZHI D X, et al. Identification and analysis of the reactive metabolites related to the hepatotoxicity of safole [J]. *Xenobiotica*, 2018, 48(11): 1164-1172.
- [19] 李曼华,孙昊鹏,尤启冬. CYP1A2 抑制剂预测模型的建立及评价[J]. *中国药科大学学报*, 2013, 44(5): 401-409.
- [责任编辑 周冰冰]