

基于分子对接探讨红芪中小分子拮抗肿瘤坏死因子受体 1 的可能性

李研¹, 骆亚莉^{1,2}, 刘永琦^{1,2*}, 冯彩琴¹, 靳晓杰³, 朱永昌⁴

- (1. 甘肃中医药大学 甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究省级重点实验室, 兰州 730000;
2. 甘肃中医药大学 敦煌医学与转化省部共建教育部重点实验室, 兰州 730000;
3. 甘肃中医药大学 药学院, 兰州 730000;
4. 兰州大学 应用有机化学国家重点实验室, 兰州 730000)

[摘要] 目的: 基于分子对接的方法研究拮抗肿瘤坏死因子受体 1 (TNFR1) 的红芪小分子化合物。方法: 从相关中药化学成分化合物库下载红芪小分子化合物结构, 进行结构优化, 获得红芪成分化合物库; 确定炎症靶点 TNFR1 三维结构 (PDB ID: 1TNR), 进行加氢、去水等处理, 根据文献确定结合口袋残基; 根据确定的靶点结构和结合口袋, 将成分化合物库与靶点进行柔性分子对接, 获得打分值 (Glide Score); 基于分子对接结果, 选择 Glide Score 前 9 个小分子化合物为候选成分, 在此基础上进行类药性分析, 即符合氢键受体数、氢键供体数量、分子量、可旋转键的数量、脂水分配系数的数值范围的小分子化合物; 最后根据药代动力学参数及成分-靶点对接的复合物结构进行结合模式分析。结果: 确定 TNFR1 药物结合口袋的残基组成为谷氨酸 109 (Glu109), 赖氨酸 35 (Lys35), 丙氨酸 62 (Ala62), 丝氨酸 74 (Ser74), 赖氨酸 75 (Lys75), 半胱氨酸 76 (Cys76), 精氨酸 77 (Arg77), 谷氨酸 82 (Gln82), 苏氨酸 89 (Thr89), 天冬氨酸 91 (Asp91), 精氨酸 92 (Arg92), 天冬氨酸 93 (Asp93), 苏氨酸 94 (Thr94), 缬氨酸 95 (Val95), 半胱氨酸 96 (Cys96), 精氨酸 104 (Arg104), 酪氨酸 106 (Tyr106), 天冬酰胺 110 (Asn110), 亮氨酸 111 (Leu111), 苯丙氨酸 112 (Phe112), 谷氨酸 131 (Glu131), 赖氨酸 132 (Lys132); 检索得到红芪 43 个小分子化合物; 以对接打分等综合筛选出槲皮素、异甘草素、柚皮素、毛蕊异黄酮及甘草素 5 个红芪小分子化合物。结论: 红芪抗炎的有效物质基础槲皮素、异甘草素、柚皮素、毛蕊异黄酮及甘草素具有成为 TNFR1 拮抗剂的较大可能性。

[关键词] 红芪; 分子对接; 肿瘤坏死因子受体 1 拮抗剂 (TNFR1)

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)17-0173-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191704

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190520.0840.001.html>

[网络出版时间] 2019-05-21 11:34

Possible Effect of Small Molecule in Hedysari Radix in Antagonizing Tumor Necrosis Factor Receptor 1 Based on Molecular Docking

LI Yan¹, LUO Ya-li^{1,2}, LIU Yong-qi^{1,2*}, FENG Cai-qin¹, JIN Xiao-jie³, ZHU Yong-chang⁴

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine and Traditional Chinese Medicine for Prevention and Treatment of Major Diseases in Colleges and Universities of Gansu Province, Lanzhou 730000, China;

2. Key Laboratory of Dunhuang Medicine and Transformation, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

3. College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

4. State Key Laboratory of Applied Organic Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of small molecule compounds of Hedysari Radix in antagonizing

[收稿日期] 20190103(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81760804)

[第一作者] 李研, 在读硕士, 从事中西医结合防治肿瘤研究, E-mail: 913077068@qq.com

[通信作者] * 刘永琦, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合防治肿瘤研究, E-mail: liuyongqi73@163.com

tumor necrosis factor receptor type 1 (TNFR1) based on molecular docking. **Method:** The structure of small molecular compound of Hedysari Radix was downloaded from the chemical composition compound library of traditional Chinese medicine, and then optimized to obtain the composition compound library of Hedysari Radix. The three-dimensional structure of the inflammatory target TNFR1 (PDB ID: 1TNR) was identified. After hydrotreating and anhydrating, the binding pocket residues were identified according to the literature. According to the defined target structure and binding pocket, the flexible molecular docking was conducted between the composition compound library and the target, and the score (Glide Score) was obtained. Based on the results of molecular docking, the first nine small molecular compounds of Glide Score were selected as candidate components. On this basis, the drug-likeness was analyzed, which involved small molecular compounds that meet the number of hydrogen-bonded receptors, the number of hydrogen-bonded donors, the formula weight, the number of rotatable key and the numerical range of lipo-hydro partition coefficient. Finally, the binding mode was analyzed according to pharmacokinetic parameters and complex structure of composition-target docking. **Result:** The residue set in the TNFR1 drug-binding pocket were identified as glutamic acid109 (Glu109), lysine 35 (Lys35), alanine62 (Ala62), serine 74 (Ser74), lysine75 (Lys75), cysteine76 (Cys76), arginine 77 (Arg77), glutamine82 (Gln82), threonine89 (Thr89), asparticacid91 (Asp91), arginine92 (Arg92), aspartic acid93 (Asp93), threonine 94 (Thr94), valine95 (Val95), cysteine 96 (Cys96), arginine104 (Arg104), tyrosine106 (Tyr106), asparagine110 (Asn110), leucine111 (Leu111), phenylalanine112 (Phe112), glutamic acid 131 (Glu131) and lysine132 (Lys132). Totally 43 small molecular compounds of Hedysari Radix were obtained. Five small molecular compounds, namely hedysari radix, quercetin, isoliquiritin, naringenin, calycosin and liquiritigenin, were screened by comprehensive factors, like docking scoring. **Conclusion:** Quercetin, isoliquiritin, naringenin, calycosin and liquiritigenin are the effective anti-inflammatory substances of Hedysari Radix, with a great possibility of becoming TNFR1 antagonists.

[**Key words**] Hedysari Radix; molecular docking; tumor necrosis factor receptor type 1 antagonists (TNFR1)

作为肿瘤坏死因子(TNF)主要成员的 TNF- α 既是介导感染、创伤和炎症的重要细胞因子^[1],又与宿主防御和内环境稳定密切相关。研究报道 TNF- α 可损害宿主免疫防御,并增加潜伏感染再激活的风险,促进肺结核的发生^[2]。TNF- α 主要与肿瘤坏死因子受体肿瘤坏死因子受体 1(TNFR1)结合,介导下游核转录因子(NF)- κ B 等通路发挥抗炎作用。目前,TNF- α 单抗类药物可直接与 TNF- α 结合并中断其与 TNFR1 的结合用于治疗炎症性疾病。但同时他们也可能引起包括激活自身免疫抗体反应或减弱身体的免疫防御等严重副作用。因此,抑制 TNFR1 从而中断 TNF- α 结合与 TNFR1 结合的角度设计药物受到越来越多的关注。TNFR1 抑制剂的研发包括单抗、纳米材料、多肽、小分子抑制剂等。小分子抑制剂具有选择性好、安全性较高等优点,且来源于中药提取物的小分子抑制剂多靶点起效的优势使其成为众多研究学者关注的方向^[3]。在 2015 年版《中国药典》中记载,红芪具有补气升阳、固表止汗、托毒排脓、敛疮生肌等功效,如在五黄养阴颗

粒中红芪配伍诸药用于消渴病痰湿内滞、气阴两虚之证的治疗。近年来研究发现红芪及其提取物可用于治疗炎症性疾病^[4],如在调节炎症信号通路方面,含红芪的益气养血汤能增加快速老化小鼠 P₈(SAMP₈)的 p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路的表达^[5];含红芪的玉屏风散可提高 SAMP₈ 小鼠白细胞介素-2(IL-2)含量和上调磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)mRNA 表达^[6]。但红芪发挥抗炎作用的小分子化合物尚不明确。本研究针对已报道的 TNFR1 晶体结构作为靶点,运用分子对接技术筛选中药系统药理数据库和分析平台(TCMSP)数据库中红芪相关的与 TNF- α 竞争结合 TNFR1 从而发挥抗炎作用的小分子抑制剂,并对得到的小分子抑制剂与 TNFR1 的结合模式进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料 本研究所有的工作均在 Microsoft Windows 10 操作系统中完成,采用 PyMOL,TCMSP 数据库,RCSB-PDB(Protein data bank,http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do) 数据库,

schrodinger 9.4.5 软件(与兰州大学应用有机化学国家重点实验室共享)中的 Protein Preparation Wizard, Ligprep, Sitemap, Epik, Receptor Grid Generation 和 Induced Fit Docking 模块。

TCMSP 包括中国药典注册的 499 种中药,含 29 384 种成分,与其他数据库相比,其为每种化合物提供了药物药代动力学信息^[7],如成药相似性(DL),口服生物利用度(OB),肠上皮通透性(Caco-2),脂水分配系数(QPlogpo/w)和 H 键供体/受体(donorHB/acceptHB)的数量等。因此,使用 TCMSP 可进一步的筛选出中药中具有良好类似药物和吸收、分布、代谢、排泄(ADME)特征的化合物。

1.2 TNFR1 有效位点的确定 本文目的是确定红芪上具体哪个分子可作为有效分子,充当肿瘤坏死因子受体 1 拮抗剂的作用。因此确定 TNF- α -TNFR1 结合的关键活性位点至关重要。分子对接技术需要设定配体,受体。然而由于目前没有已知的 TNF- α -TNFR1 复合物结构,因此活性位点并不明确。

通过薛定谔的 SiteMap 模块,对 TNFR1 与人淋巴毒素(lymphotoxin, LT)复合物的晶体结构(PDB ID:1TNR)^[8]的受体 TNFR1 进行蛋白与蛋白结合界面的模拟,参数默认,选择 Detect shallow binding sites,打分见表 1,发现 sitemap-7-site-3 分值最高,达到 0.893。通过 Pymol 软件查看 sitemap-7-site-3 所在受体 TNFR1 的位置,见图 1。sitemap-7-site-3 所包含的残基包括 GLU109, LYS35, ALA62, SER74, LYS75, CYS76, ARG77, GLN82, THR89, ASP91, ARG92, ASP93, THR94, VAL95, CYS96, ARG104, TYR106, ASN110, LEU111, PHE112, GLU131, LYS132。见表 1。

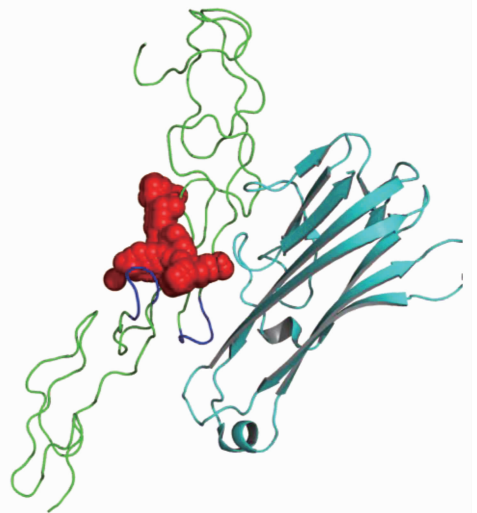
表 1 TNFR1 结合位点预测结果的名称及打分

Table 1 Name and scoring of predicted results for TNFR1 binding sites

位点名称	位点得分/分
sitemap-7-site-3	0.893
sitemap-7-site-1	0.867
sitemap-7-site-2	0.858
sitemap-7-site-4	0.846
sitemap-7-site-5	0.543

现今已确定 TNFR1 上部分活性位点,如 LI 等^[9]指出,TNF- α -TNFR1 关键的结合位点区包括 3 个必须环,其中包括环苯丙氨酸(Phe)60-组氨酸(His)66,半胱氨酸(Cys)76-缬氨酸(Val)183,以及

环色氨酸(Trp)107-亮氨酸(Leu)111(简称 R107-111),并且通过模拟 TNFR1 上的 Arg77-Val83 的环状结构建立一个小分子-C87,发现其可以有效的结合 TNF- α ;无独有偶,Murali 等^[10]也通过环 R107-111 模拟了一个环外肽,通过与 TNFR1 结合从而限制 TNF α -TNFR1 的结合;Mukai 等^[11]认为 TNFR1 的较长环结构 ARG77,赖氨酸(Lys)78,谷氨酸(Glu)79,蛋氨酸(Met)80,甘氨酸(Gly)81(简称 R77-81)作为一个活性位点,通过范德瓦尔斯接触在宽的表面区域与 TNF- α 结合。有研究报道 TNF- α -TNFR1 相互作用的破坏剂 IW927 的一个芳环通过 TNFRc1 上的 Ala-62 主链氮与受体共价连接从而破坏 TNF- α -TNFR1 相互作用。研究表明 Ser74, Lys75 和 Arg77 位于 TNFR1 的额外环区域,这个 TNFR1 区域为抑制剂结合口袋的一部分^[12]。Etemadi 等^[13]通过创建 TNF- α -TNFR1 模型发现,TNFR1 上的 Trp107(R107)与 TNF- α 具有边缘-面的相互作用,此外还发现,当 TNF- α -TNFR1 结合时,Arg77, Lys78, Glu79 有明显的侧链移动。以上残基均在 sitemap-7-site-3 所包含的残基形成的口袋中,见图 1。因此,sitemap-7-site-3 可能是 TNF- α -TNFR1 关键的结合位点。



红色. sitemap-7-site-3;蓝色. R77-81, R107-111;靛蓝色. TNF- β ;绿色. TNFR1

图 1 TNF- α -TNFR1 关键的结合位点

Fig.1 Key binding site map of TNF- α -TNFR1

1.3 分子对接 将 TNF- α -TNFR 结合位点 sitemap-7-site-3 作为口袋,将 TCMSP 分子库中红芪的所有小分子与 TNFR1 对接,寻找综合打分靠前的小分子。

红芪小分子与 TNFR1 蛋白分子对接的筛选①分子对接通过 Schrodinger 2015 软件实现。使用

的 TNFR1 蛋白结构从 TNF- β -TNFR1 复合物中 (PDB 代码: 1TNR, 分辨率为 2.50Å) 得到, 使用 Protein Preparation Wizard 板块对蛋白结构加氢, 在 PH7 条件下质子化, 并在 OPLS-2005 力场下进行结构优化。②分子对接过程共有 43 个配体小分子, 使用 Ligprep 板块对其进行结构优化; 每一个配体三维结构的电离状态及互变异构体均使用 Epik 模块产生, 并且保留其初始手性; 其他所有参数保留默认值。③选择 sitemap-7-site-3 作为结合口袋, 使用 Receptor Grid Generation 板块定义结合位点; 其格点的产生均保持默认设置。使用额外精度 (XP) 打分模式, 将所有配体小分子与 TNFR1 对接, 并对对接结果进行打分。

2 结果

2.1 数据整理 以额外精度打分 (XP docking) 为

准, 将打分靠前的小分子, 根据类药五原则^[14] 进一步筛选。符合筛选类药分子的 5 条基本规则的化合物会有更好的药代动力学性质, 在生物体内代谢过程中会有更高的生物利用度, 因而也更有可能是口服药物。将 43 个红芪成分与 TNFR1 进行对接, 以 XP docking 为准, 符合类药五原则且排名前 9 位的化合物见表 2。通过 XP docking 高精度筛选红芪的有效成分即目标化合物, 发现红芪中槲皮素, 异甘草素, 柚皮素, 2-(2-羟基-4-甲氧基苯基)-6-甲氧基-1-苯并咪唑-5-醇, 毛蕊异黄酮, 2-(2-羟基-4-甲氧基苯基)-1-苯并咪唑-6-醇, 龙胆山酮酚以及甘草素均具有与 TNFR1 对接的可能。

2.2 对筛选得到的目标化合物进行文献查阅, 为实验验证提供理论依据 通过查阅相关文献后发现, 上述 9 个目标化合物大部分已见报道, 确属红芪

表 2 综合打分前 9 的小分子的名称, 额外精度打分及类药五原则相关指标

Table 2 Comprehensive scoring of top 9 small molecule names, XP docking and drug-related five principles related indicators

No.	TCMSP 编号	小分子名称	额外精度 打分/分	相对分子 质量	可旋转键 的数量	氢键供 体数量	氢键受 体数量	脂水分 配系数
1	MOL000098	槲皮素	-7.288	302.240	5	4	5.25	0.367
2	MOL000436	异甘草素	-5.28	256.257	7	2	3.25	1.535
3	MOL004328	柚皮素	-5.197	272.257	3	2	4	1.631
4	MOL004644	2-(2-羟基-4-甲氧基苯基)-6-甲氧基-1-苯并咪唑-5-醇	-5.131	286.284	4	2	3.5	2.871
5	MOL004941	(2R)-7-羟基-2-(4-羟基苯基)-苯并-二氢色烯-4-酮	-4.567	256.257	2	2	3.5	2.871
6	MOL000417	毛蕊异黄酮	-4.492	284.268	4	2	4.75	1.917
7	MOL002953	2-(2-羟基-4-甲氧基苯基)-1-苯并咪唑-6-醇	-4.281	256.257	3	2	2.75	2.718
8	MOL005575	龙胆山酮酚	-4.123	288.256	4	1	4.5	1.966
9	MOL001792	甘草素	-4.111	256.257	2	2	4.25	1.740

注: 能量均以千卡/摩尔为单位。

治疗炎症疾病的有效成分, 见表 3。例如, 槲皮素可显著降低 TNF- α 的 mRNA (促炎 microRNA-155) 和蛋白水平, 在 6 周内喂食富含槲皮素的饮食 (0.1 mg 槲皮素/g 饮食) 的小鼠体内证实了槲皮素的抗炎特性^[15]; 异甘草素对血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) 和 E-选择素的诱导阻断直接通过其在炎症条件下通过 NF- κ B 依赖性机制干扰细胞黏附分子 (CAM) mRNA 转录来介导^[16]; 柚皮素 (NG) 对肥大细胞介导的过敏性炎症反应具有抑制作用, 其机制可能与 NG 显著降低胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP) 处理的人肥大细胞系 HMC-1 细胞中 IL-13 和 TNF- α 的产生有关^[17]; 有研究表明, 在体内急性炎症发作时, 甘草素可能是通过抑制巨噬细胞中 NF- κ B 活化, 减

少了诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 和 TNF- α 的产生从而发挥抗炎作用^[18]; 毛蕊异黄酮通过小鼠 p38 MAPK 和 NF- κ B 信号通路抑制炎症反应和氧化应激, 减轻了雨蛙红素诱导的急性胰腺炎^[19]。通过进一步排除假阳性的 XP docking 筛选红芪治疗炎症疾病的目标化合物并进行文献查阅发现, 本文的分子对接结果与目前研究报道相符, 可作为进一步验证实验提供理论依据。

2.3 对文献筛选得到的目标化合物进行相互作用的分析 对上述文献进一步筛选得到的目标化合物, 分析其与 TNFR1 二者结合的相互作用。见图 2。可以发现 MOL000098 异鼠李素与所确定的位点残基 R77, S108-N110 以及 E109 分别具有静电

表 3 综合打分前 9 的红芪小分子其与炎症、肿瘤相关的文献

Table 3 Literature on relationship between small molecules of Hedysari Radix (in top 9 of comprehensive scoring) and inflammation, tumor

小分子英文名称	小分子中文名称	参考文献
quercetin	槲皮素	[20-22]
isoliquiritigenin	异甘草素	[23-25]
naringenin	柚皮素	[26-28]
2-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-6-methoxy-1-benzofuran-5-ol (2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) Chroman-4-one	2-(2-羟基-4-甲氧基苯基)-6-甲氧基-1-苯并呋喃-5-醇 (2R)-7-羟基-2-(4-羟基苯基)-苯并-二氢色烯-4-酮	-
calycosin	毛蕊异黄酮	[29-30]
2-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1-benzofuran-6-ol	2-(2-羟基-4-甲氧基苯基)-1-苯并呋喃-6-醇	-
gentiacaulein	龙胆山酮酚	-
liquiritigenin	甘草素	[31-33]

作用、疏水相互作用以及氢键作用;MOL000417 毛蕊异黄酮与所确定的位点残基 R77, S108-N110 以及 E109 分别具有静电作用、疏水相互作用以及氢键作用;MOL000436 异甘草素与所确定的位点残基 R77 和 E109-N110 分别具有静电作用、疏水相互作用;MOL001792 甘草素与所确定的位点残基 R77 既具有静电作用还具有氢键作用,同时与 E109-N110-L111 具有疏水相互作用;MOL004328 柚皮素与所确定的位点残基 R77, E109 以及 N110 分别具有静电作用、氢键作用以及疏水相互作用。见图 2。

2.4 对文献筛选得到的目标化合物进行 DL, OB 以及 Caco-2 分析 中药口服成分经吸收进入全身血液循环的相对量即 OB 值,是药物过滤级联的重要药代动力学参数之一;DL 一般是指“含有官能团或具有与大多数已知药物相一致的物理特性的分子”;Caco-2 用于预测药物通过肠道上皮细胞屏障的口服吸收特性。以上参数的筛选有助于选择中药中大部分在化学和药理学上都适用于药物的化合物^[34]。故本研究运用 TCMSp 分析上述文献筛选得到的化合物 DL, OB 以及 Caco-2 的药代动力学参数,以期进一步确定目标化合物。此外,研究表明,OB ≥ 30%, DL ≥ 0.18, 可视为潜在的活性化合物^[35], Caco-2 值 < 0.4 的分子不具有渗透性^[36], 结果发现 MOL000098, MOL0004328, MOL000417, MOL001792 以及 MOL000436 均符合上述参数范围。见表 4。

3 讨论

TNF-α 作为炎症性疾病过程中关键的细胞因子,其不良反应主要是通过通过与 TNFR1 的相互作用介导的。因此,发现能够与 TNFR1 结合以防止 TNF-α-TNFR1 复合物形成的分子将是非常有意义的。本研究是在通过 TNFR1 三维结构确定其结合位点

的基础上,对红芪小分子化合物库进行分子对接,筛选活性化合物,并对筛选到的小分子进行类药性分析,获得目标化合物。然后根据成分-靶点对接的复合物结构对目标化合物的靶向相互作用进行结合模式分析。最后对目标化合物进行药理学计算,深入了解红芪中是否具有最为 TNFR1 拮抗剂的小分子。

首先利用 sitemap 模块计算对接位点, sitemap-7-site-3 得分最高,确定其为对接位点。然后分别进行分子对接,受体采用 OPLS_2005 力场,配体小分子采用 MMFFS 力场。分子对接采用 XP 对接模块,XP 模式相对于 SP 模式,其中的构象搜索算法和打分函数可更好的估计配体-受体蛋白亲和力和优化。Glide/XP 推导出的能量项被映射到不同的配体原子上,从而规范化确定某一特定构象为最有希望的药效特征^[37]。分别对每一个化合物进行 XP 精度的分子对接,从对接打分分析筛选出前 9 个配体小分子。最后通过文献和药代动力学参数确定 5 个具有药效活性的小分子,以期为后续的生物化学实验研究打下了基础。

通过研究报道发现,上述小分子化合物与 TNF-α 介导的下游炎症通路关系密切,例如,槲皮素,体内槲皮素抗炎作用涉及槲皮素的释放,槲皮素通过下调 NF-κB 途径抑制炎症^[38]。有研究表明,槲皮素对 iNOS, 环氧合酶-2 (COX-2) 和 C 反应蛋白 (CRP) 的调节可能通过可能涉及阻断 NF-κB 活化的机制,从而在肝细胞中发挥抗炎作用^[39];柚皮素,一种黄烷酮,被视为抗氧化剂和抗炎剂,有研究发现,在百草枯 (PQ) 诱导的 SH-SY5Y 细胞炎症环境的前两个小时,加入 80 μmol 的柚皮素,可降低其炎症环境中促炎细胞因子 TNF-α 的水平^[40]。此外,在抗癌方面发现,柚皮素可通过抑制 NF-κB p65, COX-2, iNOS 的免疫染色以及显著减弱 TNF-α 的水平从

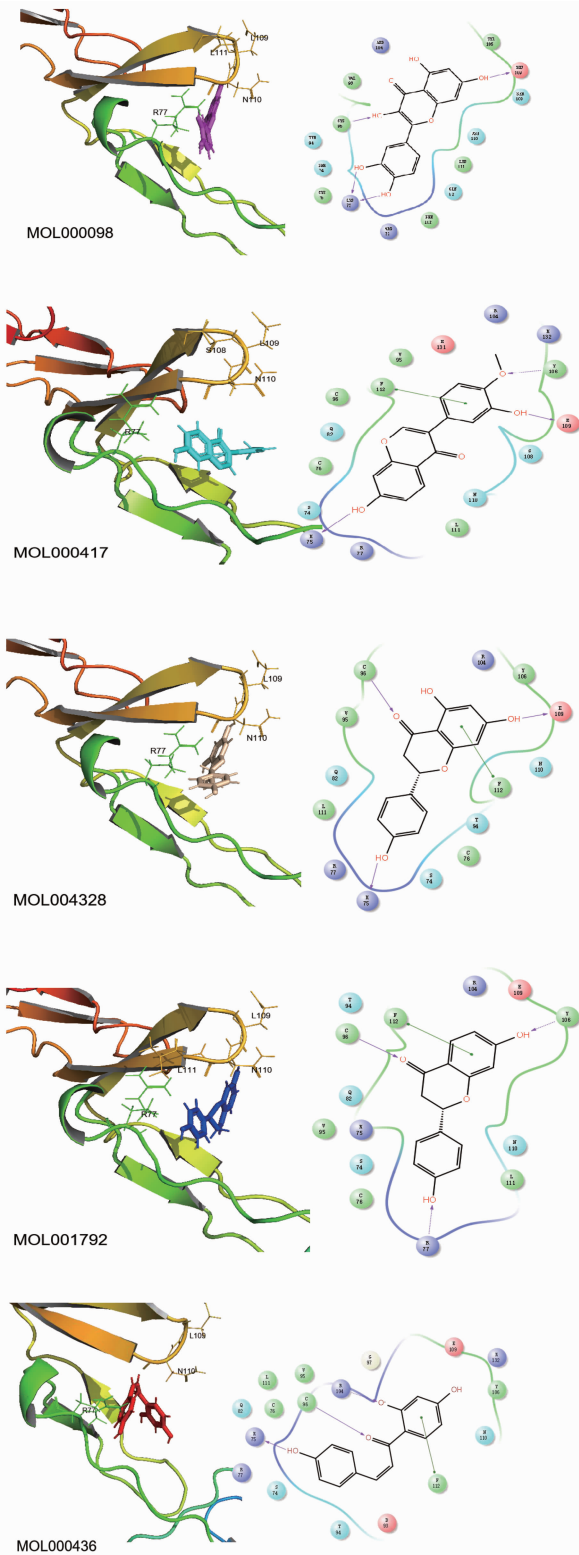


图 2 MOL000098, MOL0004328, MOL000417, MOL001792, MOL000436 与 TNFR1 的 2D,3D 作用模式

Fig. 2 2D and 3D interaction pattern of MOL000098, MOL0004328, MOL000417, MOL001792, MOL000436 and TNFR1

而改善由 1,2-二甲基胍 (DMH) 诱导的结肠癌前病变;甘草素是一种可从甘草中分离的黄酮类化合物。

表 4 MOL000098, MOL0004328, MOL000417, MOL001792 以及 MOL000436 的药代动力学参数

Table 4 The pharmacokinetic parameters of MOL000098, MOL0004328, MOL000417, MOL001792 and MOL000436

No.	TCMSP 编号	小分子中文名称	DL	OB	Caco-2
1	MOL000098	槲皮素	0.28	46.43	0.05
2	MOL000436	异甘草素	0.15	87.51	0.20
3	MOL004328	柚皮素	0.21	59.29	0.28
4	MOL000417	毛蕊异黄酮	0.24	47.75	0.52
5	MOL001792	甘草素	0.18	32.76	0.51

其经常被用作传统的东方医学草药治疗肿胀和损伤以及解毒^[41]。有研究表明,甘草素可能是预防糖尿病肾病(DN)发展的有希望的治疗剂,其机制是通过抑制 NF- κ B 和 NLRP3 炎症体途径减弱高糖(HG)诱导的细胞外基质(ECM)积聚,氧化应激和炎症^[42];异甘草素是具有简单查尔酮结构的天然色素,为甘草中异黄酮类化合物,具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎等作用。有研究表明,异甘草素可以有效的抑制人肝癌细胞(Hep G2)内 NF- κ B 信号通路及其通路下游靶分子 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl)-XL 和凋亡抑制蛋白 1/2(c-IAP1/2)蛋白的表达^[42]。毛蕊异黄酮是从甘肃红芪中分离得到的重要异黄酮类活性化合物,有研究表明,在小鼠肺部炎症情况下,给予毛蕊异黄酮会降低血清中 IL-6, TNF- α , 转化生长因子(TGF)- β_1 的水平,其抗炎机制可能与抑制 NF- κ B 和 MAPK 通路有关^[43]。通过 TCMSP 上 MOL000098, MOL0004328, MOL000417 及 MOL001792 的药代动力学参数发现,上述化合物的 OB 均 $\geq 30\%$, DL 均 ≥ 0.18 , 视为潜在的活性化合物。故本研究认为红芪的抗炎作用,可能是由于红芪中有效成分槲皮素、异甘草素、柚皮素、毛蕊异黄酮及甘草素在 TNFR1 上与 TNF- α 竞争结合,影响 TNF- α -TNFR1 复合物的产生,进而减弱或阻断下游炎症因子的表达。

分子对接虚拟筛选方法提高了化学活性评价的效率和先导化合物发现的导向性,为进一步挖掘中药资源提供了新方法。针对阿尔茨海默病和输卵管阻塞性不孕症,朱伟课题组对蛋白质数据库中相关靶酶活性口袋进行对接分析,筛选出中药化学数据库中具有多靶作用的化学成分,为新型药物的研制提供参考^[44]。徐青青等^[45]基于分子对接的虚拟筛选推断 LWDH 中抑制 α -葡萄糖苷酶活性的有效物质。此外,根据目前已有的研究发现,槲皮素、异甘草素、柚皮素、毛蕊异黄酮及甘草素之间的微小结构

差异决定了他们的抗炎特性和抑制信号分子的效率的差异^[46],从而具有不同的治疗效果。但还未见以肿瘤坏死受体为靶标的红芪抗炎成分的系统性比较相关报道。本课题组拟通过生物学实验开展进一步研究。

[参考文献]

[1] Zaka M, Abbasi B H, Durdagi S. Proposing novel TNF- α direct inhibitor Scaffolds using fragment-docking based e-pharmacophore modeling and binary QSAR-based virtual screening protocols pipeline [J]. *J Mol Graph Model*, 2018, 85: 111-121.

[2] Uysal H, Chavez-Galan L, Vesin D, et al. Transmembrane TNF and partially TNFR1 regulate TNFR2 expression and control inflammation in mycobacterial-induced pleurisy [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7):1959.

[3] 朱伟,姚丽梅. 肿瘤坏死因子- α 中药小分子抑制剂的计算机虚拟筛选[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(13):199-202.

[4] 万生芳,张凌伟,王晓丽,等. 当归红芪超滤膜提取物对糖尿病肾病大鼠肾组织中 NF- κ B, TNF- α 表达的影响[J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(1):27-30.

[5] 李纬,程卫东,张文君,等. 含红芪、黄芪的益气养血汤对 SAMP8 小鼠免疫衰老及 p38 MAPK 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(24):105-110.

[6] 孙美花,程卫东,张文君,等. 含红芪与含黄芪的玉屏风散对 SAMP8 小鼠脾 T 细胞及 PI3K 表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(3):1276-1280.

[7] 杨欣,李亚辉,钱海兵,等. 基于网络药理学及分子对接分析熊果酸抗类风湿性关节炎的分子机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(18):207-214.

[8] Banner D W, D'Arcy A, Janes W, et al. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex; implications for TNF receptor activation [J]. *Cell*, 1993, 73(3):431-445.

[9] LI M, GONG H, ZHU H, et al. A novel small-molecule TNF- α inhibitor attenuates inflammation in a hepatitis mouse model [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289 (18): 12457-12466.

[10] Murali R, CHENG X, Berezov A, et al. Disabling TNF receptor signaling by induced conformational perturbation of tryptophan-107[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(31):10970-10975.

[11] Mukai Y, Nakamura T, Yoshikawa M, et al. Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex [J]. *Sci Signal*, 2010, 3(148):ra83.

[12] MA L, GONG H, ZHU H, et al. A novel small-molecule tumor necrosis factor α inhibitor attenuates

inflammation in a hepatitis mouse model [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(18):12457-12466.

[13] Etemadi N, Holien J K, Chau D, et al. Lymphotoxin α induces apoptosis, necroptosis and inflammatory signals with the same potency as tumour necrosis factor [J]. *FEBS J*, 2013, 280(21):5283-5297.

[14] Christopher A L, Franco L, Beryl W D, et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, 23 (1/3):3-26.

[15] Boesch-Saadatmandi C, Loboda A, Wagner A E, et al. Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression; role of miR-155 [J]. *J Nutr Biochem*, 2011, 22(3):293-299.

[16] Kwon H M, Choi Y J, Choi J S, et al. Blockade of cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression by licorice isoliquiritigenin through NF-kappaB signal disruption [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2007, 232(2):235-245.

[17] HAN N R, Moon P D, Ryu K J, et al. Inhibitory effect of naringenin via IL-13 level regulation on thymic stromal lymphopoietin-induced inflammatory reactions [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2017, 45(4):362-369.

[18] Kim Y W, ZHAO R J, Park S J, et al. Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF- κ B-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production [J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 154 (1):165-173.

[19] MA R, YUAN F, WANG S, et al. Calycosin alleviates cerulein-induced acute pancreatitis by inhibiting the inflammatory response and oxidative stress via the p38 MAPK and NF- κ B signal pathways in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105:599-605.

[20] Kumar K S, Sabu V, Sindhu G, et al. Isolation, identification and characterization of apigenin from *Justicia gendarussa* and its anti-inflammatory activity [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 59:157-167.

[21] ZOU H, ZHENG Y F, GE W, et al. Synergistic anti-tumour effects of quercetin and oncolytic adenovirus expressing TRAIL in human hepatocellular carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):2182.

[22] 刘艳飞. 中药治疗代谢综合征的药物筛选及分子作用机制研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2018.

[23] ZHANG W, WANG G, ZHOU S. Protective effects of isoliquiritigenin on LPS-induced acute lung injury by activating PPAR- γ [J]. *Inflammation*, 2018, 41 (4): 1290-1296.

[24] YU D, LIU X, ZHANG G, et al. Isoliquiritigenin

- inhibits cigarette smoke-induced COPD through attenuating inflammation and oxidative stress via regulating Nrf2 and NF- κ B signaling pathways [J]. *Front Pharmacol*, 2018, doi: 10. 3389/fphar. 2018.01001.
- [25] Nakamura S, Watanabe T, Tanigawa T, et al. Isoliquiritigenin ameliorates indomethacin-induced small intestinal damage by inhibiting NOD-like receptor family, pyrin domain-containing 3 inflammasome activation [J]. *Pharmacology*, 2018, 101 (5/6): 236-245.
- [26] ZENG W, JIN L, ZHANG F, et al. Naringenin as a potential immunomodulator in therapeutics [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 135: 122-126.
- [27] Bansal Y, Singh R, Saroj P, et al. Naringenin protects against oxido-inflammatory aberrations and altered tryptophan metabolism in olfactory bulbectomized-mice model of depression [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 355: 257-268.
- [28] Khajevand-Khazaei M R, Ziaee P, Motevalzadeh S A, et al. Naringenin ameliorates learning and memory impairment following systemic lipopolysaccharide challenge in the rat [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 826: 114-122.
- [29] XU Y, FENG L, WANG S, et al. Calycosin protects HUVECs from advanced glycation end products-induced macrophage infiltration [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(1): 359-370.
- [30] GAO J, LIU Z J, CHEN T, et al. Pharmaceutical properties of calycosin, the major bioactive isoflavonoid in the dry root extract of *Radix astragali* [J]. *Pharm Biol*, 2014, 52(9): 1217-1222.
- [31] YIN L, GUAN E, ZHANG Y, et al. Chemical profile and anti-inflammatory activity of total flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch [J]. *Iran J Pharm Res*, 2018, 17(2): 726-734
- [32] YANG M, JIN Y, YANG L P. A systematic summary of natural compounds in *Radix Glycyrrhizae* [J]. *Tradit Med Res*, 2018, 3(2): 82-94.
- [33] ZHU X, SHI J, LI H. Liquiritigenin attenuates high glucose-induced mesangial matrix accumulation, oxidative stress, and inflammation by suppression of the NF- κ B and NLRP3 inflammasome pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 976-982.
- [34] GAO Y, GAO L, TIAN J S, et al. A network pharmacology approach to decipher the mechanisms of anti-depression of Xiaoyaosan formula [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2017, 31(5): 477.
- [35] 刘楠, 姜云耀, 黄婷婷, 等. 基于网络药理学方法研究补阳还五汤治疗脑梗死的作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(11): 2190-2198.
- [36] GAO Y, GAO L, TIAN J S, et al. A network pharmacology approach to decipher the mechanisms of anti-depression of Xiaoyaosan formula [J]. *World J Trad Chin Med*, 2018, 4(4): 147.
- [37] Zaka M, Abbasi B H, Durdagi S. Proposing novel TNF- α direct inhibitor Scaffolds using fragment-docking based e-pharmacophore modeling and binary QSAR-based virtual screening protocols pipeline [J]. *J Mol Graph Model*, 2018, 85: 111-121.
- [38] Comalada M, Camuesco D, Sierra S, et al. *In vivo* quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappaB pathway [J]. *Eur J Immunol*, 2010, 35(2): 584-592.
- [39] Garcíamediavilla V, Crespo I, Collado P S, et al. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 557(2): 221-229.
- [40] Oliveira M R D, Fürstenau C R. Naringenin exerts anti-inflammatory effects in paraquat-treated SH-SY5Y cells through a mechanism associated with the Nrf2/HO-1 Axis [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(4): 894-903.
- [41] Ko Y H, Kwon S H, Hwang J Y, et al. The memory-enhancing effects of liquiritigenin by activation of NMDA receptors and the CREB signaling pathway in mice [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2018, 26(2): 109-114.
- [42] Hsu Y L, KUO P L, LIN L T, et al. Isoliquiritigenin inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human hepatoma cells [J]. *Planta Med*, 2005, 71(2): 130-134.
- [43] 张媛媛. 毛蕊异黄酮对小鼠放射性肺损伤的防治作用的实验研究 [D]. 济南: 济南大学, 2015.
- [44] 朱伟, 罗颂平. 治疗输卵管阻塞性不孕的中药多靶活性成分计算机虚拟筛选 [J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(6): 1531-1532.
- [45] 徐青青, 肖敏, 王鹏, 等. 分子对接虚拟筛选六味地黄方中 α -葡萄糖苷酶抑制剂 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(5): 64-70
- [46] Crespo I, Garcíamediavilla M V, Gutiérrez B, et al. A comparison of the effects of kaempferol and quercetin on cytokine-induced pro-inflammatory status of cultured human endothelial cells [J]. *Br J Nutr*, 2008, 100(5): 968-976.

[责任编辑 周冰冰]