

基于 PI3K/Akt 信号通路筛选附子-半夏抗肿瘤的 活性成分及关键靶点

杨欣, 李亚辉, 潘恩佳, 李尧锋, 陈向云, 杨长福*
(贵阳中医学院, 贵阳 550025)

[摘要] **目的:**以附子-半夏化学成分为切入点,基于系统药理学筛选附子-半夏抗肿瘤的活性成分,为开发附子-半夏抗肿瘤的无毒活性成分提供理论依据。**方法:**借助 Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology (TCSP) 平台构建附子-半夏小分子配体库;基于分子对接 (SYBYL2.1, Tripos) 将附子-半夏小分子与磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路中的关键靶标蛋白进行能量匹配;借助 Cytoscape 3.5.1 构建附子-半夏活性成分-靶标网络模型;基于 Ligplot 计算小分子与靶标蛋白形成的氢键、疏水作用和结构比对;附子-半夏抗肿瘤活性成分的理化性质基于 SwissADME 和 admetSAR 进行预测。**结果:**附子-半夏小分子活性成分 25 个,通过能量匹配发现半夏抗肿瘤的关键活性成分为 11-二十碳烯酸,10,13-二十碳二烯酸,黄芩苷,12,13-环氧-9-羟基十九碳-7,10-二烯酸;附子抗肿瘤关键活性成分为 deltoin,谷甾醇,neokadsuranic acid B,11,14-二十碳二烯酸。磷脂酰肌醇三激酶 α (PI3K α),类脂磷酸酶 (PTEN),3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (PDK1) 为附子-半夏抗肿瘤的关键靶标蛋白。附子-半夏 8 个关键活性成分具有较低的 CYP450 抑制性,基本遵循 Lipinski 规则。**结论:**从分子层面筛选出附子-半夏抗肿瘤的无毒活性成分及关键靶点,为有效的使用有毒中药,打破有毒中药应用的局限性提供新思路。

[关键词] 附子;半夏;抗肿瘤;分子对接;配伍;磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)10-0170-10

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.20191026

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190211.2001.006.html>

[网络出版时间] 2019-02-12 17:33

Screening of Antitumor Active Components and Key Targets of Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Pinelliae Rhizoma Based on PI3K/Akt Pathway

YANG Xin, LI Ya-hui, PAN Si-jia, LI Yao-feng, CHEN Xiang-yun, YANG Chang-fu*
(Guiyang University of Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

[Abstract] **Objective:** Screen out the antitumor constituents of Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Pinelliae Rhizoma base on system pharmacology with chemical constituents of Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Pinelliae Rhizoma as study objects, in order to provide the theoretical basis for the development of antitumor and nontoxic activities of Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Pinelliae Rhizoma. **Method:** The small molecule ligand library of Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Pinelliae Rhizoma was built based on Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology (TCSP), energy of Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Pinelliae Rhizoma was matched with the key protein targets of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signal pathway by molecular docking (SYBYL2.1, Tripos), the Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Pinelliae Rhizoma-targets network

[收稿日期] 20181022(003)

[基金项目] 贵州省科技计划项目(黔科合平台人才[2017]5735号-11);贵阳中医学院博士启动项目(20170005);贵州省一流学科建设项目(QYNYL[2017]005)

[第一作者] 杨欣,博士,讲师,从事中药药效物质基础的研究,E-mail:25066640@qq.com

[通信作者] *杨长福,博士,讲师,从事中药及天然药物防治疾病的生化机制研究,E-mail:yangchangfu@126.com

model was established based on Cytoscape 3.5.1, and the physicochemical properties of the antitumor activity in *Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Pinelliae Rhizoma* were predicted by using SwissADME and admetSAR. **Result:** There were 25 small molecule constituents of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Pinelliae Rhizoma*. Through the energy match, key antitumor constituents of *Pinelliae Rhizoma* were gondoic acid, 10, 13-eicosadienoic, baicalin, 12, 13-epoxy-9-hydroxynonadeca-7, 10-dienoic acid. Key antitumor constituents of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* were deltoin, sitosterol, neokadsuranic acid B, 11, 14-eicosadienoic acid. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K α), phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN), phosphoinositide dependent protein kinase 1 (PDK1) were key antitumor targets of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Pinelliae Rhizoma*. There were 8 key antitumor constituents of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Pinelliae Rhizoma*, which had a low CYP450 inhibition and basically followed the Lipinski rule. **Conclusion:** Antitumor nontoxic constituents of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Pinelliae Rhizoma* and key targets are screened out from the molecular level, which provides the new ideas for the effective use of nontoxic traditional Chinese medicine (TCM) and breaks the restrictions in using nontoxic TCM.

[**Key words**] *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*; *Pinelliae Rhizoma*; anti-tumor; molecular docking; compatibility; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt)

肿瘤一直是世界面临的难题,严重威胁人类健康和生命,在肿瘤的发生和发展过程中,信号通路控制细胞的代谢、转录、翻译等生物学过程,信号通路是肿瘤早期和预后的重要检测指标^[1]。磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路在肝癌、胃癌、鼻咽癌等多种肿瘤中表达失调^[2-4],与多数肿瘤细胞的增值、凋亡和侵袭密切相关,对肿瘤形成起到辅助作用,但是不能直接导致肿瘤的形成,以其通路为切入点的抗肿瘤抑制剂备受关注^[5]。PI3K 有多种亚型(I, II, III),各种亚型在机体中发挥不同的功能,I 型主要在细胞的分化、存活中发挥重要作用;II 型与钙离子通道密切相关;III 型主要参与细胞的自噬。目前多数肿瘤抑制剂都是基于 I 型 PI3K 研究开发,I 型 PI3K 包括 IA 型和 IB 型,其中 IA 型 PI3K 可以被多种因素和特定的致癌基因所激活。PI3K/Akt 信号通路的核心是 Akt 的持续活化, Akt 持续活化影响细胞生长和凋亡,导致肿瘤的发生; PTEN 是肿瘤抑制基因,具有双重酶活性,可以通过脱磷酸的形式抑制或阻断 PI3K/Akt 信号通路^[6];白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)是典型的胞外激活剂,可以激活多种细胞反应,是重要的 PI3K 激活剂^[7];目前,国内外多数研究表明 PI3K/Akt 在细胞内的过度表达与肿瘤的发生、发展和预后密切相关,开发 PI3K 抑制剂成为研究的热点,针对不同肿瘤筛选各种 PI3K 选择性抑制剂。

药对配伍是中药复方用药的特色,以疗效肯定、相辅相成的形式发挥药效,达到治疗病证的目的。

附子和半夏虽是“下品”之药,但附子和半夏配伍在临床上应用广泛。附子散、附子粳米汤和半夏汤等均为附子-半夏同用的方剂^[8]。半夏是天南星科多年生草本植物半夏 *Pinelliaternata ternata* 的干燥块茎,以干燥块茎入药,性温味辛有小毒,现代药理学研究表明,半夏具有镇静、镇吐、抗心律失常、抗肿瘤等作用。半夏的主要成分包括生物碱类、有机酸类、氨基酸类等^[9-10]。半夏化学成分中的尿黑酸、原儿茶醛、草酸钙针晶等是致突变、致畸、中枢神经系统毒性的物质基础^[11];附子是毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* 的子根加工品,在抗炎、镇痛、抗肿瘤和抗衰老等方面发挥重要作用。含有多糖、生物碱和脂类等多种化学成分,其中双酯型二萜类生物碱是附子毒性的主要物质基础^[12-13]。附子和半夏部分化学成分具有毒性,炮制后的附子和半夏毒副作用比较温和。临床研究表明附子和半夏配伍具有较好的抗肿瘤的作用^[14],但是其发挥抗肿瘤的活性成分尚未明确。本研究以化学成分为切入点,通过与 PI3K/Akt 信号通路中的靶标蛋白进行相互作用,找出重要的氨基酸位点,筛选附子-半夏抗肿瘤活性成分,减少毒性成分的使用,从而找出附子-半夏中的潜在药物,为开发肿瘤抑制剂提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 筛选附子-半夏化学成分及能量优化 通过中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP, <http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmspsearch>) 相关指标^[15],口服生物利用度(oral bioavailability, OB),相对分

子质量 (molecular weight, MW), 类药性 (drug likeness, DL) 筛选附子和半夏化学成分, 需要同时满足 $OB \geq 30\%$, $DL > 0.18$ 和 $MW < 500$ 为目标化合物, 列入小分子配体中, 下载其 mol2 结构。配体基于 SYBYL2.1 软件打开, Tirpos 力场 Minimize 程序对其加氢、加电荷, 优化参数为优化次数设置为 10 000, 能量收敛标准设置为 $0.005 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}$, 添加 Gasteiger-Hückel 电荷, 基于 Powell 能量梯度法优化得到最低能量构象, 提高分子对接的准确性, 保存为 SLN 格式。

表 1 关键靶标的基本信息

Table 1 Basic information on key targets

PDB ID	靶点名称	生物学效应
3ZIM	磷脂酰肌醇-3-激酶 α (PI3K α)	在大量肿瘤中都出现扩增和突变, 表达异常升高而产生病变 ^[16]
2Y3A	磷脂酰肌醇-3-激酶 β (PI3K β)	细胞的生长、分化、凋亡等 ^[17]
3APC	磷脂酰肌醇-3-激酶 γ (PI3K γ)	分布在白细胞中, 对白细胞的功能起重要调控作用 ^[18]
4AJW	磷脂酰肌醇-3-激酶 δ (PI3K δ)	在免疫和炎症相关细胞的募集和激活过程中起到核心作用 ^[19]
1ALU	IL-6	炎症因子, 可以激活多种细胞级联反应 ^[7]
4KEL	蛋白激酶 B (Akt)	代谢、生长、增殖、存活、转录以及蛋白质合成 ^[21-22]
1DR5	类脂磷酸酶 (PTEN)	具有双重特异磷酸酶活性的肿瘤抑制基因 ^[5]
1UUF	3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (PDK1)	激活 Akt/PKB 和多种 AGC 激酶

1.3 分子对接 采用药物分子设计模拟 SYBYL 2.1 软件的 Surflex-Dock 模块完成分子对接研究^[24]。初始筛选采用标准模式进行对接, 修饰后的小分子与靶标蛋白进行半柔性对接, 对接过程中阈值参数 0.5, 其他参数为系统缺省值。选用 AMBER7 FF99 力场进行能量优化; 基于 Ligand 模式产生活性口袋, 优化完毕后保存为 SFXC 文件作为对接文件, 其他参数均采用 SYBYL 默认值^[25]。每个分子会产生 20 种构象。分子对接结果以 Total-Score, Crash and Polar 打分函数筛选活性成分。基于遗传算法的柔性对接程序 (Flexi-dock) 对附子-半夏化学成分与关键靶标蛋白进行复筛, 进一步探索配体和受体的精确作用模式。

1.4 相互作用分析 Ligplot 作为经典的配体与蛋白二维相互作用作图软件, 应用较广泛, 氢键和疏水作用基于 HBPLUS 程序计算, 以 2D 的形式展示结构, 方便观察。本研究基于 Ligplot1.4.5 版本, 小分子与蛋白 Merg 为 PDB 格式保存, 导入 Ligplot 软件中, 可以研究多个配体在同一个受体中的结合、单个配体与不同受体的结合或者不同配体在不同受体中的结合, 并自动计算形成的氢键、疏水作用和结构比对。

1.2 PI3K/Akt 信号通路中靶标蛋白 结合已有的 PI3K/Akt 信号通路文献^[16-22], 选取关键和重要的靶点作为研究对象, 基于 puniversal protein (UniProt) 数据库查询靶标蛋白的生物学效应 (表 1), 从蛋白质晶体结构数据库 RCSB PDB (<http://www.rcsb.org/pdb>) 获取 3D 晶体结构^[23], 晶体结构分别在 2.85 \AA (PI3K α), 3.3 \AA (PI3K β), 2.544 \AA (PI3K γ), 2.8 \AA (PI3K δ), 1.9 \AA (1ALU), 1.148 \AA (4KEL), 2.4 \AA (1DR5) 和 1.76 \AA (1UUF) 的解象下以 X 衍射的方法获得。

1.5 关键化学成分的 ADME/T 性质 基于 SwissADME^[26] (<http://www.swissadme.ch/>) 和 admetSAR (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admet>)^[27] 进行初期药物开发毒性筛选。附子和半夏的主要化学结构转换成 SMILES 码复制到 SwissADME 和 admetSAR 进行药物代谢在线预测。相关参数包括有溶解度, 血脑屏障穿透性, 代谢稳定性, CYP450 酶的抑制性 (CYP inhibitory promiscuity), 氢键受体数 (H-bond acceptors, HBA), 氢键供体数 (H-bond donors, HBD), 可旋转键数 (rotatable bonds, RBN), 人体肠吸收 (human intestinal absorption, HIA), 血屏障穿透性 (blood-brain barrier, BBB), Caco-2 细胞通透性 (Caco-2 cell permeability) 等。

2 结果

2.1 附子-半夏化学成分筛选 基于 TCSMP 数据库筛选半夏和附子的活性成分, 同时符合 $OB \geq 30\%$ $DL \geq 0.18$ 和 $MW \leq 500$ 3 个条件的化学成分 25 个 (表 2), 其中半夏筛选出 13 个化学成分, 附子 12 个化学成分。

2.2 分子对接结果分析 每个小分子输出 20 种构象, 打分函数以 T_score (total_score), polar, crash,

表 2 附子-半夏化合物基本信息

Table 2 Chemical composition of Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Pinelliae Rhizoma

TCMSP ID	成分 ¹⁾	OB	DL	TCMSP ID	成分 ²⁾	OB	DL
MOL005030	11-二十碳烯酸	30.7	0.2	MOL002211	11,14-二十碳二烯酸	40	0.2
MOL006936	10,13-二十碳二烯酸	40	0.2	MOL002392	deltoin	46.7	0.4
MOL006967	黄嘌呤核苷	44.7	0.2	MOL002395	deoxyandrographolide	56.3	0.3
MOL002714	黄芩素	33.5	0.2	MOL002397	多根乌头碱	51.7	0.7
MOL006937	12,13-环氧-9-羟基十九碳-7,10-二烯酸	42.2	0.2	MOL002398	karanjin	69.6	0.3
MOL006957	(3S, 6S)-3-(benzyl)-6-(4-hydroxybenzyl) piperazine-2,5-quinone	46.9	0.3	MOL002401	neokadsuranic acid B	43.1	0.9
MOL000519	松柏苷	31.1	0.3	MOL002410	苯甲酰萘酚	34.1	0.5
MOL000358	β -谷甾醇	36.9	0.8	MOL002415	6-demethyl-desoline	51.9	0.7
MOL002776	黄芩苷	40.1	0.8	MOL002419	去甲乌药碱	82.5	0.2
MOL000449	豆甾醇	43.8	0.8	MOL002421	脲碱	84.1	0.3
MOL001755	sitostenone	36.1	0.8	MOL002422	异塔拉乌头定	50.8	0.7
MOL003578	环阿尔廷醇	38.7	0.8	MOL000359	谷甾醇	36.9	0.8
MOL002670	cavidine	35.6	0.8				

注: ¹⁾半夏; ²⁾附子。

C_{score}(concensus score)等分析, Surflex-Dock 打分结果以 log(Kd)表示结合能力。当 C-score > 4, total score 大小表示小分子和靶标蛋白结合的稳定性。附子-半夏 25 个化学成分与靶标蛋白结合的强弱为 PTEN > PDK1 > PI3K α > Akt > PI3K β > PI3K δ > IL-6 > PI3K γ (表 3)。附子-半夏活性较强的化学成分为二十碳-11-烯酸(半夏), 10,13-二十碳二烯酸(半夏), 黄芩苷(半夏), 12,13-环氧-9-羟基十九碳-7,10-二烯酸(半夏), deltoin(附子), 谷甾醇(附子), neokadsuranic acid B(附子), 11,14-二十碳二烯酸(附子), 将进一步进行柔性对接验证分析。

2.3 构建化学成分-靶标网络模型 基于 Cytoscape3. 5. 1^[28]绘制附子-半夏化学成分-靶标网络模型, 根据度(degree)的大小筛选关键靶点及化学成分, 整个网络包括化学成分和靶标 2 类节点(node)。分别计算网络每个节点的度, 整个网络中节点(node)的大小与此节点的度(degree)成正比, 即与此节点相连的边越多, 度越大, 节点也就越大。半夏关键化学成分为二十碳-11-烯酸(MOL005030), 10,13-二十碳二烯酸(MOL006936), 黄芩素(MOL002714), 12,13-环氧-9-羟基十九碳-7,10-二烯酸(MOL006937); 附子关键化学成分为 deltoin(MOL002392), 谷甾醇(MOL000359), neokadsuranic acid B(MOL002401), 11,14-二十碳二烯酸(MOL002211)。磷脂酰肌醇三激酶 α (PI3K α), 类脂磷酸酶(PTEN), 3-磷酸肌醇依赖性

蛋白激酶 1(PDK1)为关键靶标蛋白。见图 1。

2.4 关键化学成分与靶标蛋白柔性对接 基于遗传算法的柔性对接程序(flexible docking)对化学成分与关键靶标蛋白进行复筛, 进一步探索配体和受体的精确作用模式。这种对接方式比刚性对接、半柔性对接的准确性更高。结果发现关键化学成分与靶标蛋白柔性对接结果与半柔性对接结果具有一致性。由表 4 可知, 附子-半夏化学成分与靶标蛋白结合的强弱为 PTEN > PDK1 > PI3K α > PI3K γ > PI3K β > Akt > PI3K δ > IL-6(表 4), 与 PI3K δ 和 IL-6 的相互作用较弱。

2.5 相互作用分析 基于 Ligplot1. 4. 5 软件进行相互作用分析, 结果以氢键、疏水作用和结构比对输出, 筛选关键的氨基酸位点。相同位置和类型的氨基酸残基用红色圆圈圈出。结构比对结果(图 2, 3)显示, 附子-半夏化学成分与 PI3K α 相互作用有很大的相似性, 形成 11 个氢键, 结构比对显示 MET 772, Ile800, Val850, Trp780 等氨基酸残基相对位置相同, 氨基酸类型相同; 附子-半夏化学成分与 PI3K β 相互作用有很大的相似性, 形成 16 个氢键, 结构比对显示 Val847, Ser851, Asp931, Ile930, Ile845, Trp780 和 Asp802 等氨基酸残基相对位置相同, 氨基酸类型相同; 附子-半夏化学成分与 PI3K γ 相互作用有很大的相似性, 形成 15 个氢键, 结构比对显示 Ile879, Ile963, Met953 和 Asp964 等氨基酸残基相对位置相同, 氨基酸类型相同; 附子-半夏化学成分

表 3 附子-半夏 25 个化学成分与靶标蛋白分子对接

Table 3 25 chemical composition of Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Pinelliae Rhizoma and target protein molecule docking

化合物	PI3K α	PI3K β	PI3K γ	PI3K δ	Akt	IL-6	PTEN	PDK1	Total
MOL005030	8.49	7.66	6.56	7.4	10.82	6.05	8.41	8.31	63.7
MOL006936	7.66	6.73	8.74	6.2	8.71	7.1	7.26	8.96	61.36
MOL006967	6.57	4.71	7.92	-	4.84	-	4.66	6.05	34.75
MOL002714	5.9	5.03	5.07	3.55	3.03	3.35	4.91	5.07	35.91
MOL006937	7.6	9.62	9.67	7.71	-	4.87	8.39	7.92	55.78
MOL006957	5.72	3.42	-0.61	4.97	4.27	4.15	5.66	5.77	33.35
MOL000519	4.07	4.73	5.34	4.28	5.99	3.03	4.36	5.2	37
MOL000358	4.44	5.83	3.7	4.66	3.54	2.57	6.55	4.63	35.92
MOL002776	7.58	7.73	6.7	2.17	2.77	3.7	6.9	6.01	43.56
MOL000449	3.74	3.98	-1.36	5.85	4.01	2.83	7.51	6.14	32.7
MOL001755	5	1.14	0.64	5.54	5.2	2.5	7.86	-	27.88
MOL003578	5.53	2.57	-23.29	-	3	2.71	4.73	-	-4.75
MOL002670	5.2	4.66	4.61	5.47	7.36	2.54	4.6	4.84	39.28
MOL002211	7.36	7.13	8.71	9.36	8.81	5.18	9.78	7.85	64.18
MOL002392	6.84	5.58	5.53	4.55	7.59	3.89	7.45	6.4	47.83
MOL002395	2.44	3.51	4.23	3.77	6.2	4.13	-	5.19	29.47
MOL002397	-0.76	-	-2.82	1.79	-	2.59	2.28	3.62	6.7
MOL002398	4.02	3.84	4.97	5.24	3.9	3.77	4.83	4.33	34.9
MOL002401	7.08	5.38	5.88	6.03	5.89	5.6	-	6.34	42.2
MOL002410	-1.84	-8.19	-1.89	3.35	-	3.88	-0.85	4.72	-0.82
MOL002415	3.95	-	-10.82	0.52	3.53	2.3	3.35	2.99	5.82
MOL002419	4.88	6.5	-	5.61	3.72	3.58	4.78	4.06	33.13
MOL002421	5.15	3.66	0.93	2.51	-	4.21	5.59	4.41	26.46
MOL002422	-0.86	4.48	-1.67	-3.86	2.96	2.76	-	2.19	6
MOL000359	6.02	5.65	1.02	5.5	4.24	5.4	8.86	5.98	42.67
Total	121.78	105.35	47.76	102.17	110.38	92.69	127.87	126.98	-

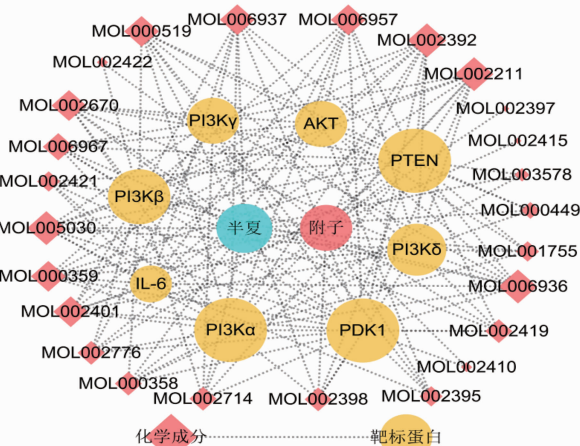


图 1 化学成分-靶标网络模型

Fig.1 Chemical composition-target network model

与 Akt 相互作用有很大的相似性,形成 16 个氢键,结构比对显示 Glu159, Lys158, Gly162, Ala177, Val64, Glu234, Tyr229, Met281, Leu156 和 Phe438 等氨基酸残基相对位置相同,氨基酸类型相同;附子-半夏化学成分与 PTEN 相互作用有很大的相似性,形成 22 个氢键,结构比对显示 Ser76, Leu75, Gly53, Gly117, Val120 等氨基酸残基相对位置相同,氨基酸类型相同;附子-半夏化学成分与 PDK1 相互作用有很大的相似性,形成 13 个氢键,结构比对显示 Val96, Leu212, Leu88, Gly89, Lys111, Ala109, Asp222 等氨基酸残基相对位置相同,氨基酸类型相同。可以推测这些残基就是本课题组要寻找 PI3K α , PI3K β , PI3K γ , Akt, PTEN, PDK1 的重要残基,他们在决定酶的催化特性中起到了重要作用。

表 4 附子-半夏关键化学成分与靶标蛋白分子对接

Table 4 Chemical composition of Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Pinelliae Rhizoma and target protein molecule docking

化合物名称	PI3K α	PI3K β	PI3K γ	PI3K δ	Akt	IL-6	PTEN	PDK1	total
11-二十碳烯酸(半夏)	7.95	8.78	7.39	1.46	7.54	2.49	11	7.22	53.83
10,13-二十碳二烯酸(半夏)	9.15	7.18	6.55	0.56	7.45	2.91	10.59	9.26	53.65
黄芩苷(半夏)	10.1	7.17	9.9	5.4	3.06	3.25	9	8.95	56.83
12,13-环氧-9-羟基十九碳-7,10-二烯酸(半夏)	7.97	8.22	9.29	4.54	6.1	5.97	10.26	8.3	60.65
deltoin(附子)	6.79	4.69	8.56	3.73	8.12	4.91	9.43	7.92	54.15
谷甾醇(附子)	6.03	7.18	5.84	1.71	5.56	-0.18	6.52	7.61	40.27
neokadsuranic acid B(附子)	7.59	5.29	4.97	4.73	7.58	5.35	7.78	9.79	53.08
11,14-二十碳二烯酸(附子)	7.4	4.96	8.98	0.78	6.88	2.13	11.9	7.2	50.23
total	62.98	53.47	61.48	22.91	52.29	26.83	76.48	66.25	-

2.6 关键化学成分的理化性质 将分子对接总分前 8 (总分 > 40) 的化学成分进行 ADMET 性质分析,筛选出具有潜在开发价值的化学成分。Caco-2 的结果以吸收较好 (Caco²⁺) 和吸收差 (Caco²⁻) 表示;HIA 结果以吸收良好 (HIA⁺) 和吸收不佳 (HIA⁻) 表示;BBB 的结果以穿透血脑屏障 (BBB⁺) 和难以穿透血脑屏障 (BBB⁻) 表示;CYP Inhibitory

结果以高抑制 (high) 和低抑制 (low) 表示;根据 Lipinski 规则,小分子应该具备 H-bond acceptors < 5, H-bond donors < 10, rotatable bonds < 10。如果过多参数不符合,会影响药物的溶解性及肠吸收能力,附子-半夏的关键活性成分具有较好的口服吸收利用度,较低的 CYP450 抑制性,基本遵循 Lipinski 规则(表 5)。

表 5 关键化学成分理化性质

Table 5 Physical and chemical properties of key chemical constituents

化合物	Caco-2	HBA	HBD	RBN	CYP Inhibitory
11-二十碳烯酸(半夏)	Caco ²⁺	2	1	17	low
10,13-二十碳二烯酸(半夏)	Caco ²⁺	2	1	16	low
黄芩苷(半夏)	Caco ²⁻	11	6	4	low
12,13-环氧-9-羟基十九碳-7,10-二烯酸(半夏)	Caco ²⁺	4	2	14	low
deltoin(附子)	Caco ²⁻	5	0	4	high
谷甾醇(附子)	Caco ²⁺	1	1	6	low
neokadsuranic acid B(附子)	Caco ²⁺	3	1	5	low
11,14-二十碳二烯酸(附子)	Caco ²⁺	2	1	16	low

注:BBB 均为 BBB⁺;HIA 均为 HIA⁺。

3 讨论

附子和半夏为临床常用中药材,两者均具有毒性,为中药“十八反”中的“乌头反半夏”,对于两者配伍应用历代说法不一致,有增毒减效和相反相激之说,但并没有阻碍附子-半夏在临床上的应用^[29]。多数研究表明在一定剂量范围内附子与半夏配伍不会导致毒性或疗效降低。目前,已有研究者发现附子和半夏单独、配伍使用均具有抗肿瘤的作用。钱珍^[30]发现附子多糖联合乌头碱具有抗肿瘤作用;张亚平等^[31]发现附子总生物碱能改善乳腺癌小鼠的体征,阻止肿瘤的发生、发展;任丽娅^[32]发现附子提

取物具有抗移植性肝癌 H22 的作用,主要通过影响细胞凋亡、抑制细胞增殖发挥抗肿瘤作用。近年文献报道,半夏有效成分(提取物、生物碱、多糖等)具有抑制人肺癌细胞^[33],肝癌细胞 Bel-7402^[34],人胃癌细胞^[35],实体瘤,人宫颈癌细胞株 HeLa 和 CaSki^[36]等。由此可见,附子和半夏抗肿瘤作用的受到广泛关注。同时,莫晓文^[14]对附子、半夏抗阳虚疲饮型的恶性肿瘤进行了安全性评价,发现并没有产生明显毒性,而且还有延缓肿瘤发展的作用。附子和半夏配伍在妇科、儿科、内科等多种疾病中也发挥重要作用。

选择具有代表性的 PI3K 有 4 种亚型 (PI3K α , PI3K β , PI3K γ , PI3K δ) 及相关因子 Akt, PTEN 等^[37-38], 主要从抑制剂角度出发, 筛选抗肿瘤抑制剂。PI3K α , PI3K δ 为治疗肿瘤的常见靶点, PI3K α 抑制剂在不同类型的癌症中发挥重要作用, 已经有文献表明半夏泻心汤通过调节 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制人结肠癌 HT-29 细胞增殖和转移, 本研究也发现附子-半夏活性成分与 PI3K α 有较好的结合, 配伍后与 PI3K α 的结合形成多个氢键, 这对于附子和半夏化学成分与 PI3K α 的结合以及 PI3K α 构象的稳定性至关重要。附子-半夏化合物与 PI3K α 的结合模式很相似(如形成氢键、结合的氨基酸), 结构比对显示 MET 772, Ile800, Val850, Trp780 等氨基酸残基相对位置相同, 氨基酸类型相同, 提示可能具有协同的作用。PI3K δ 与免疫系统疾病和癌症相关, 研究发现附子-半夏活性成分与 PI3K δ 结合一般, 将不深入研究。PTEN 突变或缺失会影响 Akt 持续活化, 导致肿瘤的发生、发展, 研究发现附子-半夏化学成分与 PTEN 和 Akt 结合较好, 附子-半夏化合物与 PTEN 和 Akt 的结合模式很相似, 提示附子和半夏的化学成分可能通过协同调节 PTEN 和 Akt 发挥抗肿瘤的作用。

本研究筛选出的活性成分黄芩苷^[39], 谷甾醇^[40] 已经有文献表明在胃癌、肝癌中发挥重要作用。不难发现, 本研究筛选出附子和半夏抗肿瘤的关键成分多为有机酸类。目前, 尚未报道附子和半夏有机酸类化合物在抗肿瘤方面的作用, 但是已经有文献显示有机酸类成分药理作用广泛, 具有抗炎、抗血栓、诱导肿瘤细胞凋亡等作用, 主要调节 PI3K/Akt 信号通路, MAPK 信号通路等介导肿瘤细胞凋亡^[41]。目前, 多种有机酸诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制处于探索阶段^[42-44]。本研究基于计算机辅助药物设计, 主要以化学成分-通路-靶点为切入点, 筛选附子和半夏抗肿瘤的活性成分及关键靶点, 主要因为毒性中药的部分化学成分对机体具有伤害, 限制其在临床、配伍、方剂中的使用。附子-半夏配伍抗肿瘤的作用目前研究较少, 而且分子机制尚不明确, 限制其药理作用的开发和使用, 所以本研究筛选有效成分及关键靶标蛋白, 可以有效的使用有毒中药, 打破有毒中药应用的局限性, 剔除毒性成分和明确靶标蛋白是组分配伍的新思想, 为相反中药应用的安全性、广泛性和高效性开辟新途径。希望在配伍理论的支撑下, 能有效的利用和开发毒性中药。筛选出的附子-半夏有机酸类活性成分进行组分

配伍是否具有协同作用, 需要进一步进行体内实验研究, 治疗效果能否强于附子-半夏水煎液配伍值得进一步思考和探索。

[参考文献]

- [1] Shamji A F, Nghiem P, Schreiber S L. Integration of growth factor and nutrient signaling: implications for cancer biology[J]. *Mol Cell*, 2003, 12(2): 271-280.
- [2] Pal I, Mandal M. PI3K and Akt as molecular targets for cancer therapy: current clinical outcomes [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(12): 1441-1458.
- [3] 章尤权, 王清泰, 陈旭征, 等. 白花蛇舌草对人肝癌 HepG2 细胞裸鼠皮下移植瘤 PI3K/Akt 信号通路的影响[J]. *肿瘤基础与临床*, 2015, 28(4): 277-280.
- [4] 杨宁, 王恬, 惠起源. PI3K-Akt 信号通路在胃癌的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2010, 18(1): 197-200.
- [5] 黎金华, 吴万垠, 杨小兵. 扶正抗癌方通过 PTEN/PI3K/Bad 通路调控肺癌 A549 细胞增殖与凋亡[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(21): 98-103.
- [6] 黄丽艳, 王娜, 汤黎明, 等. PTEN 基因表达对 E C9706 细胞增殖、侵袭、凋亡能力的影响[J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2013, 48(1): 16-20.
- [7] Tanaka Y, Martin Mola E. IL-6 targeting compared to TNF targeting in rheumatoid arthritis: studies of olokizumab, sarilumab and sirukumab[J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(9): 1595-1597.
- [8] 朱林平, 李志强, 李侠. 附子、半夏配伍研究[J]. *中成药*, 2007, 29(12): 1817-1818.
- [9] 武峰, 秦志丰, 李勇进, 等. 半夏化学成分抗肿瘤研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2013, 31(2): 270-272.
- [10] 陈芳, 邓惠玲, 张宜. 半夏生物总碱对人肝癌细胞增殖的影响[J]. *中国药师*, 2011, 14(10): 1449-1451.
- [11] 钟凌云, 吴皓, 张科卫, 等. 生半夏中草酸钙针晶的刺激性作用研究[J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(20): 1706-1710.
- [12] 张亚平, 杜钢军, 孙婷, 等. 附子总生物碱对乳腺癌小鼠的抗肿瘤作用[J]. *中草药*, 2012, 43(10): 1986-1990.
- [13] YANG Z, LU Z Q, ZHANG Y J, et al. Looking for agonists of beta2 adrenergic receptor from Fuzi and Chuanwu by virtual screening and dual-luciferase reporter assay [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2016, 18(6): 550-561.
- [14] 莫晓文. 附子、半夏配伍治疗恶性肿瘤的临床研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [15] RU J, PENG L, WANG J, et al. TCMSPP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6(13):

- 1-6.
- [16] Ohwada J, Ebiike H, Kawada H, et al. Discovery and biological activity of a novel class I PI3K inhibitor, CH5132799[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(6): 1767-1772.
- [17] HAN M, ZHANG J Z. Class I phospho-inositide-3-kinases (PI3Ks) isoform-specific inhibition study by the combination of docking and molecular dynamics simulation[J]. *J Chem Inf Model*, 2010, 50(1): 136-145.
- [18] 白崇亮. PI3K 亚型选择性抑制剂的药效团分析及以 PI3K 为靶点的虚拟筛选[D]. 兰州:兰州大学, 2012.
- [19] 朱景宇. 新型 PI3K 抑制剂的计算机虚拟筛选及其在多发性骨髓瘤治疗中的应用[D]. 苏州:苏州大学, 2014.
- [20] ZHANG Y, WANG Q, CHEN X, et al. Effect of hedyotis diffusa willd on PI3K/Akt pathway in nude mice implanted hepatoma Hep G2 cells [J]. *J Basic Clin Oncol*, 2015(4): 277-280.
- [21] Wee S, Wiederschain D, Maira S M, et al. PTEN-deficient cancers depend on PIK3CB [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(35): 13057-13062.
- [22] Cully M, You H, Levine A J, et al. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(3): 184-192.
- [23] Berman H M, Westbrook J, Feng Z, et al. The protein data bank [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 235-242.
- [24] 林桂源, 姚华聪, 郑细娜, 等. 基于分子对接技术的常用降糖中药有效成分虚拟筛选[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(15): 202-206.
- [25] Spitzer R, Jain A N. Surflex-Dock: docking benchmarks and real-world application [J]. *J Comput Aided Mol Des*, 2012, 26(6): 687-699.
- [26] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42717.
- [27] CHENG F X, LI W H, ZHOU Y D. admetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical admet properties [J]. *J Chem Inf Model*, 2012, 52(11): 3099-3105.
- [28] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [29] 王超, 王宇光, 梁乾德, 等. UPLC/Q-TOFMS 分析十八反乌头半夏配伍化学成分的变化 [J]. *药学学报*, 2010, 45(10): 1301-1306.
- [30] 钱珍. 附子多糖联用乌头碱对肝细胞肝癌的作用及机理初步研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2015.
- [31] 张亚平, 杜钢军, 孙婷, 等. 附子总生物碱对乳腺癌小鼠的抗肿瘤作用 [J]. *中草药*, 2012, 43(10): 1986-1990.
- [32] 任丽娅. 附子提取物抗移植性肝癌 H22 的实验研究 [D]. 成都:成都中医药大学, 2005.
- [33] 周茜, 唐瑛, 孙欢, 等. 半夏总生物碱对人肺癌细胞增殖的抑制作用 [J]. *药学实践杂志*, 2013, 31(1): 38-41.
- [34] 陈芳, 唐瑛, 文晔, 等. 半夏生物碱对人肝癌细胞 Bel-7402 的生长抑制作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(10): 83-84.
- [35] 陈雅琳, 唐瑛, 王庆敏, 等. 半夏总生物碱对人胃癌细胞增殖的抑制作用 [J]. *海军医学杂志*, 2014, 35(3): 179-182.
- [36] 赵永娟, 王蕾, 侯琳, 等. 半夏多糖抗肿瘤作用研究 [J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(3): 368-371.
- [37] Braccini L, Cirraolo E, Martini M, et al. PI3K keeps the balance between metabolism and cancer [J]. *Adv Biol Regul*, 2012, 52(3): 389-405.
- [38] WANG X, DING J, MENG L H. PI3K isoform-selective inhibitors: next-generation targeted cancer therapies [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36(10): 1170-1176.
- [39] 陈凤琴, 王宏伟, 李海龙, 等. 黄芩苷通过死亡受体通路诱导胃癌 MGC-803 和 BGC-823 细胞凋亡 [J]. *肿瘤*, 2015, 35(12): 1314-1321.
- [40] 赵秀红. β -谷甾醇对肝癌 HepG2 细胞增殖和凋亡的影响及机制研究[D]. 兰州:兰州大学, 2018.
- [41] Achiwa Y, Hasegawa K, Udagawa Y. Regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt and the mitogen-activated protein kinase pathways by ursolic acid in human endometrial cancer cells [J]. *Biosci Biotech Bioch*, 2007, 71(1): 31-37.
- [42] 王蓬, 陈孝平, PBSLai, 等. 二十碳五烯酸对三种肝癌细胞系作用的实验研究 [J]. *中华普通外科杂志*, 2001, 16(1): 24-27.
- [43] 罗红, 糜漫天, 张乾勇. 二十碳五烯酸联合视黄酸对 HL-60 细胞凋亡相关基因表达的影响 [J]. *免疫学杂志*, 2003, 19(3): 198-200.
- [44] 李雯, 王建华, 徐世荣. 有机酸诱导肿瘤细胞凋亡研究进展 [J]. *现代肿瘤医学*, 2005, 13(5): 706-710.

[责任编辑 张丰丰]