

doi:10.3969/j.issn.1001-4616.2018.03.014

# 痛泻要方潜在活性成分的分子靶向 对接虚拟筛选研究

李潇然, 杨星昊

(南京师范大学生命科学学院, 新药研究中心, 江苏 南京 210023)

**[摘要]** 肠易激综合征( IBS) 新型药物靶标, 应用分子靶向对接技术从痛泻要方化学成分中虚拟筛选具有活性潜力的天然小分子. 创建了包含 239 种化合物的痛泻要方活性成分数据库, 以色氨酸羟化酶 1(  $TPH_1$  ), 5-羟色胺跨膜转运蛋白( SERT ), 促肾上腺皮质激素释放因子受体 1(  $CRFR_1$  ) 和瞬时受体电位香草酸受体 1(  $TRPV_1$  ) 为对象, 采用配体库构建、受体蛋白准备、对接位点研究、对接参数设定、分子对接批量打分、结合模式分析、相互作用分析、药效团分析的虚拟筛选流程. 结果显示, 123 种天然成分显示了良好的配体-受体结合作用潜力, 呈现“单靶点, 多配体”的特征; Paeoniflorin、Deltoid、Naringin 和  $\beta$ -Vatirenene 等天然成分具有“单配体, 多靶点”的潜力. 4-O-methyl-paeoniflorin、iso-Paeoniflorin 和 Gallotannin; iso-Benzoylpaeoniflorin、iso-Paeoniflorin 和 Benzoylpaeoniflorin; Paeoniflorin、Albiflorin R1 和 Albiflorin; Deltoid、Galloylpaeoniflorin、Galloylpaeoniflorine 和 Benzoylpaeoniflorin 等 13 个化合物为最具潜力天然成分. 药效团模型分析揭示,  $TPH_1$  配体包含了 2 个氢键受体和 3 个氢键给体, SERT 配体包含 4 个氢键受体、2 个氢键给体和 1 个疏水中心;  $CRFR_1$  配体包含 1 个氢键受体、2 个氢键给体和 1 个疏水中心,  $TRPV_1$  配体包含 3 个氢键受体和 1 个疏水中心. 本研究为 IBS 治疗药物开发提供了候选化合物, 并从分子水平上阐明痛泻要方作用机制提供了参考.

**[关键词]** 痛泻要方, 分子靶向对接, 肠易激综合征

**[中图分类号]** R285 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2018)03-0085-10

## Study on the Molecular Targeting Docking Virtual Screening of Potential Active Components in Tong-Xie-Yao-Fang

Li Xiaoran, Yang Xinghao

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, New Drug Research Center, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** This study was based on a novel drug target of irritable bowel syndrome( IBS) and used molecular targeted docking technology to virtually screen promising natural small molecules from Tong-Xie-Yao-Fang. The active compound database of Tong-Xie-Yao-Fang was created, which contained a total of 239 compounds. And four proteins were selected as the targets including Tryptophan Hydroxylase 1(  $TPH_1$  ), Serotonin Transporter( SERT ), Corticotropin Releasing Factor Receptor 1(  $CRFR_1$  ), and Transient Receptor Potential Vanilloid Receptor 1(  $TRPV_1$  ). The whole process covers the ligands database construction, receptor protein preparation, docking site study, docking parameter setting, molecular docking batch scoring, binding mode analysis, interaction analysis, and pharmacophore analysis virtual screening process. The results showed that 123 of the natural compounds docked with the receptor scored the first 30% showing good ligand-receptor interaction, they present the characteristics of "single target, multiple ligands". This study also found that Paeoniflorin in the Paeoniae Radix Alba, Deltoid in the Radix Saposhnikoviae Divaricatae, Naringin in the Pericarpium Citri Reticulatae, and  $\beta$ -Vatirenene in the Atractylodes Macrocephala have the most "single component, multiple targets" therapeutic potential. The results showed that 13 compounds including 4-O-methyl-paeoniflorin, iso-Paeoniflorin and Gallotannin; iso-Benzoylpaeoniflorin, iso-Paeoniflorin and Benzoylpaeoniflorin; Paeoniflorin, Albiflorin R<sub>1</sub> and Albiflorin; Deltoid, Galloylpaeoniflorin, Galloylpaeoniflorine and Benzoylpaeoniflorin were the most promising natural compounds. The pharmacophore model analysis showed that the  $TPH_1$  ligand contained two hydrogen bond acceptors and three

收稿日期: 2018-05-08.

基金项目: 江苏省高校自然科学研究重大项目( 15KJA360001 ).

通讯联系人: 杨星昊, 教授, 研究方向: 中药物质基础研究. E-mail: yangxinh@ 126.com

hydrogen bond donors. The SERT ligand contained four hydrogen bond acceptors, two hydrogen bond donors and one hydrophobic center. CRFR<sub>1</sub> contained one hydrogen bond acceptor, two hydrogen bond donors and one hydrophobic center. TRPV<sub>1</sub> contained three hydrogen bond acceptors and one hydrophobic center. 12 potential compounds were achieved through the screening process above. This study provides candidate compounds for the development of IBS therapeutic drugs and reference for exploring the molecular mechanism of Tong-Xie-Yao-Fang.

**Key words:** Tong-Xie-Yao-Fang, targeting docking, irritable bowel syndrome

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是常见的肠功能紊乱性疾病。临床表现为腹部不适(腹痛、腹胀)和排便异常,以腹泻或便秘或混合出现为主要表现,具有持续性及间歇发作的特点,被公认为临床常见病和疑难病。其中欧美国家的IBS患病率约为10%~15%,大部分亚洲国家的流行率约在0.8%~10%之间<sup>[1]</sup>。现有治疗药物不同程度地存在“应用局限性、疗效不理想、毒副作用大”等缺点,亟需新颖机制的药物问世。研究表明,人体内脏高敏感性、肠道动力异常和脑-肠轴紊乱在IBS的发病中发挥了重要作用<sup>[2]</sup>,而5-HT信号系统、CRF信号系统、TRP受体家族与内脏感觉、胃肠道运动和脑-肠信号传递有紧密联系<sup>[3-5]</sup>。这些环节在IBS发生发展过程中的作用近年开始受到学术界的关注,逐渐成为IBS的病理研究方向和新药创制靶标<sup>[6]</sup>。目前进入临床前或临床研究的药物有作用于SERT靶点的5-HT重摄取抑制剂(SNRI) Venlafaxine XR和Duloxetine,针对CRF受体的CRFR拮抗剂 $\alpha$ -helical CRF9-41等均显示良好的开发前景,作用于TRPV<sub>1</sub>的药物也处于研发之中<sup>[6-8]</sup>。

祖国传统医学认为,IBS相关症状属于中医的“腹痛”、“泄泻”、“便秘”范畴,常由脾虚肝旺、肝气乘脾、升降失常所致。中药复方在IBS治疗的总有效率、复发率、毒副作用等方面具有明显特色和优势<sup>[9]</sup>,痛泻要方由白术、白芍、陈皮和防风组成,为始载于《丹溪心法》,是中医临床治疗的最常用基础方<sup>[10]</sup>。近年来研究提示,痛泻要方临床治疗肠易激综合征具有多靶点作用机制,提示痛泻要方中可能蕴含了生物多靶点调控的有效成分群及规律性<sup>[11]</sup>。但其有效成分的组成、作用靶点和作用机制尚不明确,亟待进一步研究。

基于计算机辅助药物设计(computer aided drug design, CADD)的分子靶向对接虚拟筛选技术展现出了低成本高效率的显著优势,近年来被广泛应用于中药复方中活性化合物的筛选,并且取得了良好的成效<sup>[12-14]</sup>。本研究旨在应用分子靶向对接虚拟筛选技术,以痛泻要方化学成分为对象,以TPH<sub>1</sub>、SERT、CRFR<sub>1</sub>、TRPV<sub>1</sub>为靶标,筛选与这些生物大分子具有作用潜力的天然成分,为IBS治疗药物开发提供候选化合物,并从分子水平上阐明痛泻要方作用机制提供科学依据。

## 1 资料与方法

分子对接打分采用Scripps研究所的AutoDock Vina,结合模式分析和药效团模型构建采用BIOVIA公司的Discovery Studio v3.5,相互作用关系分析采用CCG公司的MOE 2014。

### 1.1 痛泻要方活性成分库的准备

中医药资料库TCM database @ Taiwan (<http://tcm.cmu.edu.tw/>)是全球最大可以提供免费下载供虚拟筛选的中医药小分子的化合物数据库之一<sup>[15]</sup>。以痛泻要方中白芍、防风、陈皮和白术作为关键字在该数据库中进行检索,共整理出239种活性成分。随后使用Open Babel(v2.3.2)软件将配体分子的格式转换成pdbqt保存备用。

### 1.2 蛋白结构的准备

查询RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)数据库,对TPH<sub>1</sub>、SERT、CRFR<sub>1</sub>和TRPV<sub>1</sub>这4个蛋白的三维结构进行检索。选择蛋白晶体结构的原则为:(1)人源型的优先;(2)晶体结构中氨基酸残基没有突变的野生型蛋白优先;(3)测定的晶体结构分辨率越低的优先。

通过检索和比对,最终选定TPH<sub>1</sub>的三维结构PDB ID为3HF8,原配体为抑制剂LP-533401(ML0);SERT为5I6X,原配体是抑制剂Paroxetine(8PR);CRFR<sub>1</sub>为4K5Y,原配体是抑制剂CP-376395(1Q5);TRPV<sub>1</sub>为5IS0,原配体是抑制剂Capsazepine(6ET)。

采用Pymol(v1.8.0.0)软件对蛋白的结构文件进行预处理和结构优化。步骤如下:(1)提取晶体结构文

件中与活性位点结合的自带配体,单独保存为新的 PDB 格式文件;(2)删去晶体结构文件中的水分子;(3)删去冗余的蛋白质晶体构象,包括多余的多肽链,以及所有结构文件无用的配体和离子;(4)给蛋白结构文件添加极性氢原子,以保证其在体内生理条件下( $\text{pH} = 7.0$ ),多肽链末端精氨酸侧链和赖氨酸侧链的质子化和谷氨酸侧链和天冬氨酸侧链的非质子化,促使蛋白结构更加贴近体内真实状况,从而让对接结果更加合理和可靠.最后使用 MGLTools 1.5.6 软件分别将 4 个处理好的蛋白文件以及它们自带的配体文件转化为 pdbqt 格式并保存备用.

### 1.3 对接位点的预测

受体蛋白的活性位点(活性口袋)是这个蛋白质的重要部分,分子对接往往就是在这个蛋白的活性位点处进行的,通过研究受体与原配体在对接位点处的空间位置关系,可以获得对接位点的信息,从而为分子对接所用参数的设定提供参考.使用 POCASA Online v1.1 ([http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/Research/POCASA\\_e.html](http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/Research/POCASA_e.html))对蛋白质的结合位点进行分析预测.将 Grid size 设置为  $1^\circ$ ,Probe radius 设置为  $2^\circ$ ,Single point flag 设置为 16,Protein depth flag 设置为 18,其余参数采用默认值.随后分别将预测结果文件与其对应的蛋白结构文件和原配体文件导入 Pymol 中,调整三维结构的显示方式对它们进行观察和分析,结果见图 1.从图 1 中可见,4 个蛋白都存在良好的口袋或空腔可以作为分子对接的结合位点,而晶体中的原配体与对应蛋白的结合情况良好,其与受体蛋白对接的位点适宜用于虚拟筛选.

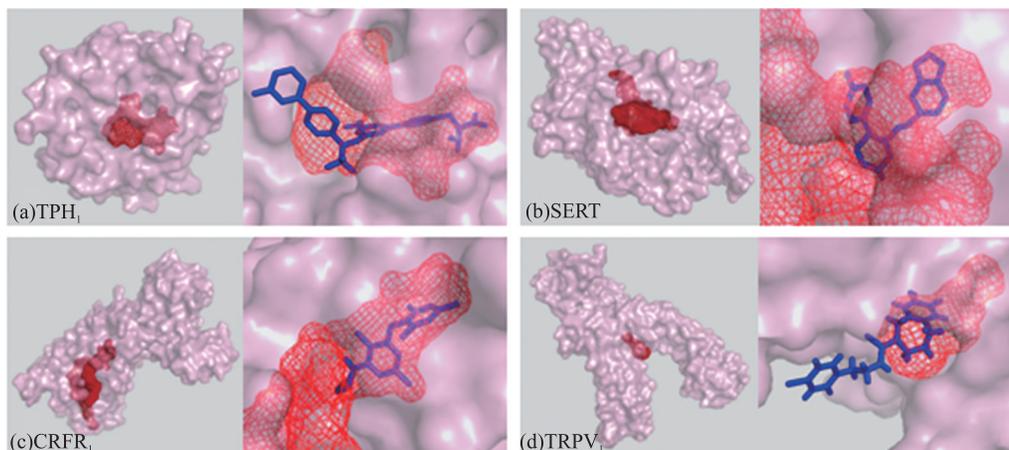


图 1 中每组小图左侧为该蛋白活性位点的预测,右侧为蛋白的原配体与活性位点的位置关系

图 1 预测结果显示

Fig. 1 Results of predictions

### 1.4 分子对接参数的设定

使用 MGLTools 1.5.6 中的 Grid box 工具对参数进行模拟和查看,对接参数的设定参考下载的受体蛋白结构中原配体的位置信息,并结合之前对于蛋白结合位点的预测结果,需包含原配体结合位点周边的全部氨基酸.最终确定 4 个受体蛋白的对接参数见表 1.

表 1 对接参数详情

Table 1 Details of docking parameters

Target Name	PDB ID	Grid box( $x \times y \times z$ )/ $\text{nm}^3$ <sup>a</sup>	Central( $x, y, z$ ) <sup>b</sup>	Ligand	Affinity/( $\text{kcal/mol}$ ) <sup>c</sup>
TPH <sub>1</sub>	3HF8	19.5×15×15	6.459, 2.528, 20.559	ML0	-12.8
SERT	5I6X	15×15×15	-31.847, -21.103, 2.12	8PR	-10.8
CRFR <sub>1</sub>	4K5Y	15×15×15	-39.982, -20.573, 35.457	1Q5	-9.7
TRPV <sub>1</sub>	5IS0	15×15×15	107.52, 94.061, 101.735	6ET	-7.1

a 对接区域的 Grid box 尺寸, b 对接中心的位置, c 配体与受体对接时的最小自由能.

### 1.5 分子对接

使用 AutoDock Vina 分别对 4 个不同蛋白与痛泻要方配体库中全部化合物进行分子对接,来进行虚拟筛选.

### 1.6 结果分析与研究

对筛选出的化合物和之对应的蛋白使用 Discovery Studio v3.5 和 MOE 2014 分别进行结合模式分析和

相互作用关系分析,模拟筛选出的化合物与蛋白的具体结合和作用情况.再使用 Discovery Studio v3.5 中 Catalyst 的 Hip-hop 算法来构建各蛋白打分结果排名前五化合物的“药效团(Pharmacophore)”模型,以总结这些化合物在分子结构和空间效应上的共性.

图 2 即为本研究所用计算方法的操作流程图.

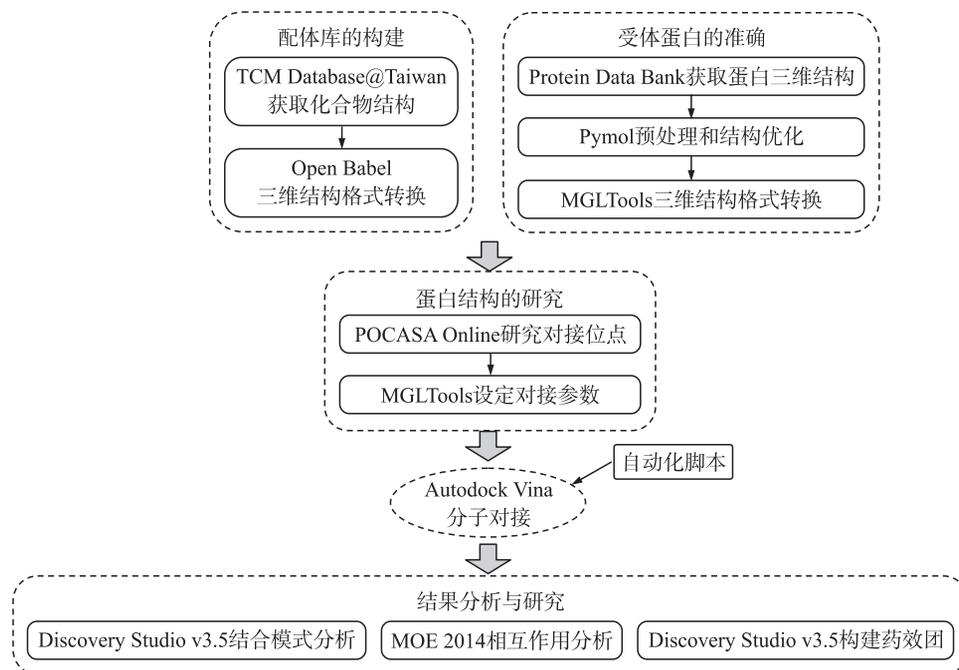


图 2 操作流程图

Fig. 2 Flow chart of operations

## 2 结果

整理分析 AutoDock Vina 的对接打分结果,以打分结果中的自由能(Affinity)值为标准由低到高进行排序.因篇幅有限,表 2 列出各蛋白打分成绩位于前 20 的天然成分作为参考.

表 2 部分对接打分成绩

Table 2 Part of the docking results

排名	TPH <sub>1</sub>		SERT		CRFR <sub>1</sub>		TRPV <sub>1</sub>	
	数据库 ID	Affinity/(kcal/mol)	数据库 ID	Affinity/(kcal/mol)	数据库 ID	Affinity/(kcal/mol)	数据库 ID	Affinity/(kcal/mol)
1	9032	-12.0	8863	-11.9	1650	-9.6	10231	-7.6
2	13409	-11.9	13409	-11.6	7617	-9.4	15628	-7.5
3	7616	-11.6	89	-11.3	11064	-9.4	11534	-7.5
4	13340	-11.3	11534	-10.8	tcm03_007163	-9.2	10205	-7.5
5	15628	-11.2	14431	-10.7	10231	-9.2	9616	-7.4
6	11334	-11.2	9872	-10.5	tcm03_007162	-9.0	5383	-7.4
7	10205	-11.2	10231	-10.5	8829	-9.0	12808	-7.4
8	tcm03_007020	-11.0	1650	-10.3	12808	-9.0	12450	-7.4
9	9351	-11.0	12919	-10.1	31210	-8.9	11524	-7.4
10	1706	-11.0	10205	-10.1	12919	-8.9	11471	-7.4
11	11534	-11.0	30870	-10.0	1706	-8.8	459	-7.3
12	7617	-10.9	15628	-9.9	12822	-8.8	31210	-7.3
13	1650	-10.9	9520	-9.8	8765	-8.6	1650	-7.3
14	12919	-10.9	9032	-9.8	6928	-8.6	13409	-7.3
15	8863	-10.7	1706	-9.8	11524	-8.6	9520	-7.1
16	14432	-10.7	7616	-9.7	9032	-8.5	6928	-7.1
17	3981	-10.6	10732	-9.7	1657	-8.5	12831	-7.1
18	10825	-10.6	7611	-9.6	13712	-8.5	12830	-7.1
19	89	-10.4	14432	-9.6	12483	-8.5	12478	-7.1
20	7888	-10.4	9795	-9.4	11471	-8.5	7616	-7.0

其中,与  $\text{TPH}_1$  结合的自由能最低的 3 个化合物分别是 4-O-methyl-paeoniflorin (9032)、iso-Paeoniflorin (13409) 和 Gallotannin (7616),自由能依次为  $-12.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 、 $-11.9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  和  $-11.6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ;与 SERT 结合自由能前三的化合物为 iso-Benzoylpaeoniflorin (8863)、iso-Paeoniflorin (13409) 和 Benzoylpaeoniflorin (89),自由能分别是  $-11.9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 、 $-11.6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  和  $-11.3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ;与  $\text{CRFR}_1$  结合自由能前三的化合物是 Paeoniflorin (1650)、Albiflorin  $\text{R}_1$  (7617) 和 Albiflorin (11064),自由能依次为  $-9.6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 、 $-9.4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  和  $-9.4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ;而与  $\text{TRPV}_1$  结合自由能前三的化合物分别为 Deltoin (10231)、Galloylpaeoniflorin (15628)、Galloylpaeoniflorine (11534) 和 Benzoylpaeoniflorin (10205),自由能为  $-7.6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 、 $-7.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 、 $-7.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  和  $-7.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  (3 个化合物并列第二)。

使用软件对筛选出的活性成分进行分析和检验. 分别选取 4 个蛋白打分排名第一的化合物,以它们为例应用 Discovery Studio Visualizer v3.5 对蛋白与化合物的结合模式进行分析,并使用 MOE 2014 分析两者复合物间的氢键作用及疏水作用情况,结果见图 2,受体蛋白与配体产生氢键和疏水作用的氨基酸位置见表 3.

表 3 结果汇总  
Table 3 Summary of results

化合物名称	中药来源	作用蛋白	自由能/ $(\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1})$	氢键相互作用基因	疏水相互作用基因
4-O-methyl-paeoniflorin (ID 9032)	白芍	$\text{TPH}_1$	-12.0	Phe241、Leu242、Tyr312、Phe313、Glu317、Pro238、Ala309、Cys364	Phe268、Tyr235、Phe318、Ile366、Leu236
iso-Benzoylpaeoniflorin (ID 8863)	白芍	SERT	-11.9	Glu493、Asp98、Tyr95、Ser439、Gly498	Phe335、Ala173、Gly442、Phe341、Tyr175、Thr497、Ile172、Tyr176
Paeoniflorin (ID 1650)	白芍	$\text{CRFR}_1$	-9.7	Met206、Thr316、Leu319、Asn283、Leu320、Leu323	Glu209、Tyr327、Phe203、Leu287、Leu280
Deltoin (ID 10231)	防风	$\text{TRPV}_1$	-7.1	Ser512、Arg557	Met547、Thr550、Ile573、Leu553、Ala556、Ile569、Tyr511、Glu570、Leu515

图 3 中上半部分是结合模式模拟结果,蓝色区域为对接位点,黄色为配体化合物,其余结构是对接位点附近的蛋白结构;下半部分是受体蛋白与配体化合物之间相互作用关系的模拟。

图 3(a) 显示  $\text{TPH}_1$  结合区域周围的氨基酸 Phe241、Leu242、Tyr312、Phe313、Glu317、Pro238、Ala309 和 Cys364 分别与配体 9032 形成了氢键作用;而氨基酸 Phe268、Tyr235、Phe318、Ile366 和 Leu236 则与配体 9032 产生了疏水相互作用;而图 3(b) 显示 SERT 的氨基酸 Glu493、Asp98、Tyr95、Ser439 和 Gly498 分别与配体 8863 形成了氢键作用,而氨基酸 Phe335、Ala173、Gly442、Phe341、Tyr175、Thr497、Ile172 和 Tyr176 则与配体 8863 产生了疏水相互作用;图 3(c) 则显示  $\text{CRFR}_1$  的 Met206、Thr316、Leu319、Asn283、Leu320 和 Leu323 分别与配体 1650 形成了氢键作用,氨基酸 Glu209、Tyr327、Phe203、Leu287 和 Leu280 则与配体 1650 产生了疏水相互作用;最后,图 3(d) 显示  $\text{TRPV}_1$  的氨基酸 Ser512 和 Arg557 与配体 10231 形成了氢键作用,而氨基酸 Met547、Thr550、Ile573、Leu553、Ala556、Ile569、Tyr511、Glu570 和 Leu515 则与配体 10231 产生了疏水相互作用。

本研究结果显示,同一受体的配体化合物的类型多样,差异很大. 为了进一步探索同一受体的配体化合物之间的共性,分别选取各蛋白的结合配体中排名前五的成分,使用 Discovery Studio 软件中的 Hip-hop 算法分别构建 4 个药效团模型,见图 4. 其中绿色为氢键受体,紫色为氢键给体,蓝色为疏水中心. 对于与  $\text{TPH}_1$  结合的化合物而言,药效团模型中包含了 2 个氢键受体和 3 个氢键给体;对于 SERT 而言,包含 4 个氢键受体、2 个氢键给体和 1 个疏水中心;而就  $\text{CRFR}_1$  而言,包含 1 个氢键受体、2 个氢键给体和 1 个疏水中心;对于  $\text{TRPV}_1$  而言,包含为 3 个氢键受体和 1 个疏水中心. 这些化合物结构中的双键氧原子等含有孤对电子的氮、氧等原子形成了氢键受体;而羟基和氨基等与氧原子和氮原子相连的氢原子形成了氢键给体;疏水中心则是指结构中不溶于水这一部分,透过相互作用、能量效应和熵效应等热力学作用聚集在一起,这些疏水基团能够与蛋白结合位点的疏水口袋发生疏水相互作用,对两者的结合与作用造成影响. 药效团模型分析表明,化学结构差异较大的配体化合物由于相似的药效团结构,因此对同一蛋白具备了较强的结合能力。

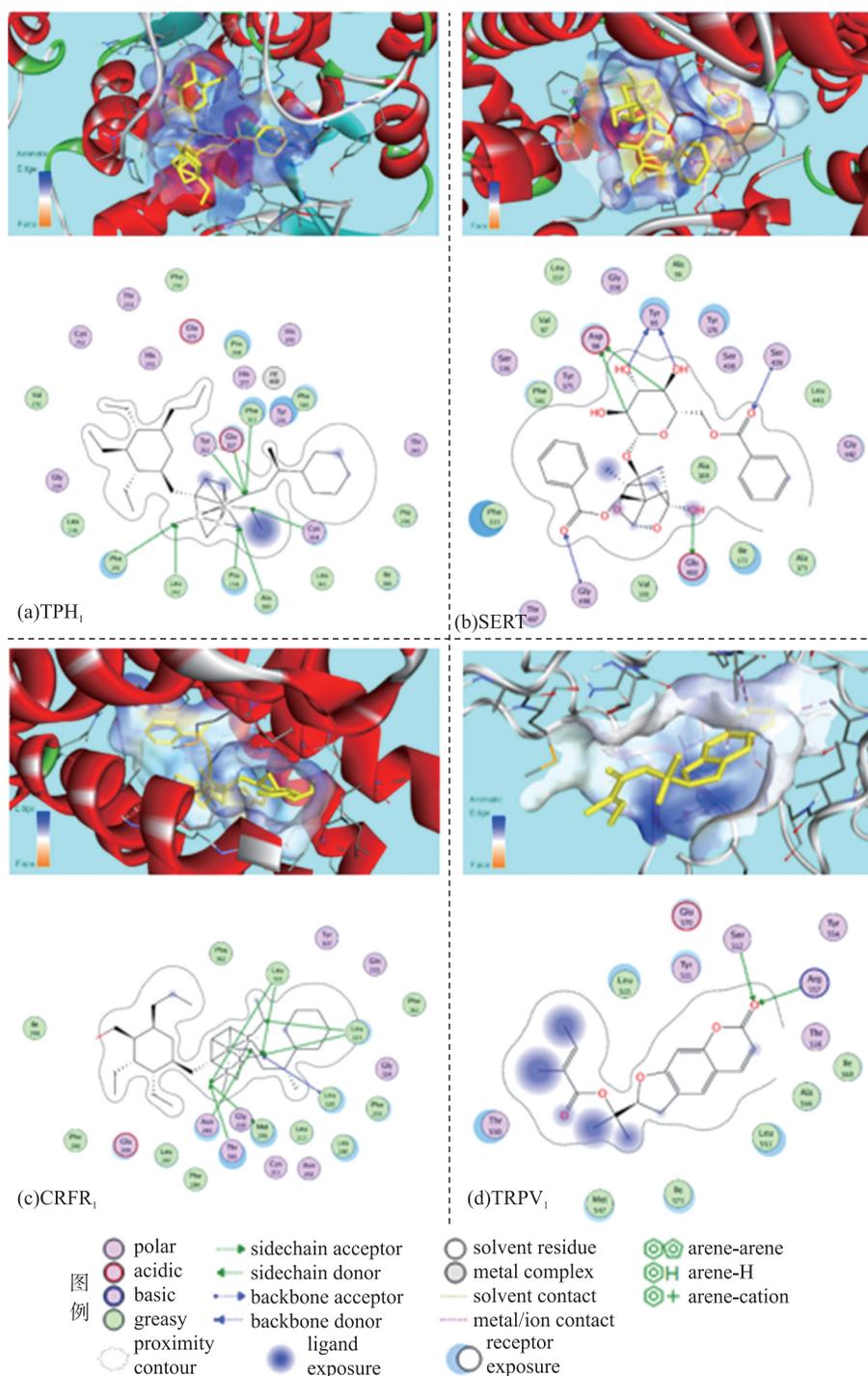


图 3 结合模式与相互作用关系模拟

Fig. 3 Simulations of binding modes and interactions

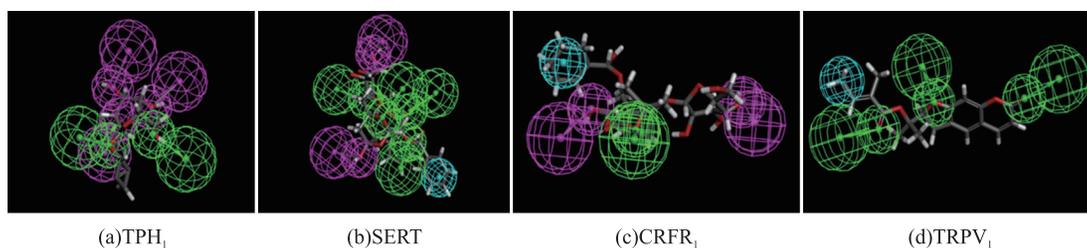


图 4 药效团模型模拟

Fig. 4 Simulations of pharmacophore models

### 3 讨论

由于中药复方中天然活性成分的复杂性及其作用靶点的多样性,将复方中的单个成分提取出来,研究其对于多个靶点的作用是一项艰难且耗时耗力的工作,往往只能对少部分成分开展有限的活性筛选工作。而计算机虚拟筛选技术的发展与应用大大降低了药物筛选的难度与成本,其为开展后续活性验证实验提供了科学指导,大大提升了药物筛选的命中率,提高了药物研发的效率。近年来,虚拟筛选技术就在中药和中药复方的成分筛选中取得了可喜的成绩:Xiang等<sup>[16]</sup>使用 AutoDock 4.2 和 AutoDock Vina 从中药黄连中虚拟筛选出了 6 种潜在的  $\alpha 7$  烟碱乙酰胆碱受体 ( $\alpha 7$ -nAChR) 激动剂用以治疗阿尔茨海默病;Tian等<sup>[17]</sup>则通过虚拟筛选技术,从 TCM Database @ Taiwan 中药化合物库中筛选出了 1,5-O-咖啡酰奎宁酸 (1,5-O-Dicaffeoyl-quinic Acid) 作为一种潜在的新型 NMDA 受体抑制剂。这些筛选出来的化合物为相应的药物研发做出了有价值的参考,为药物的进一步研发提供了可能。

5-HT 信号通路在调制肠道和中枢神经系统感觉信号传递、调控外周神经递质释放、维持肠道蠕动,调节肠壁分泌功能中发挥关键作用。研究表明,外周 5-HT 水平增高或 5-HT 受体水平异常等因素可引起 IBS 患者内脏敏感性增高和肠动力紊乱,出现痛阈减低、腹泻、便秘等症状,与 IBS 发生发展有密切关系。在 5-HT 信号传导过程中,合成限速酶 (TPH) 催化合成 5-HT,转运体 (SERT) 回收 5-HT,共同调控了外周 5-HT 的水平<sup>[3,18,19]</sup>。

CRF 是参与调节摄食及能量代谢的一种重要神经肽,广泛参与神经内分泌、炎症反应、肠道运动等多项调控。CRF 可以通过旁分泌或自分泌的方式进入到胃肠道中,作用于 CRF 受体,从而调节肠道的运动。在应激发生时,下丘脑及其相关脑区会释放 CRF,作用于外周 CRFR<sub>1</sub> 等受体,引发肠超敏,并使得内脏敏感性增高;同时,这些释放的 CRF 同时作用于中枢神经系统 CRFR<sub>1</sub> 等受体,参与了机体对心理刺激的应对反应,使得焦虑感增加,引起肠道对外部刺激的反应增强甚至异常。CRF 信号通路与应激相关的结肠功能改变及内脏高敏感性相关,肠道特别是结肠的运动功能与 CRFR<sub>1</sub> 紧密相关<sup>[4,20,21]</sup>。

TRPV<sub>1</sub> 离子通道蛋白位于细胞膜或胞内细胞器膜上,在人体内分布广泛。通过将化学刺激、热刺激等各种类型的刺激信号转化为电信号进而传递至中枢神经系统,使机体产生疼痛感。TRPV<sub>1</sub> 在胃肠道中由上皮细胞、粘膜层和肌层的感受神经元中表达,参与了包括胃肠道感觉、胃肠道运动和胃泌素调节等多种胃肠道生理活动,与内脏高敏感性和多种功能性或器质性疾病如消化不良、肠炎性肠病、胃食管反流病等存在联系。TRPV<sub>1</sub> 的激活,它在肠道刺激的转移和传递过程中起到了关键性的作用,是引起肠道痛觉、诱导 IBS 发病的重要因素<sup>[5,22,23]</sup>。

大量临床和实验研究表明,痛泻要方通过调节 5-HT 通路、CRF 通路或 TRPV<sub>1</sub> 表达等途径最终实现对 IBS 的治疗效果。林震群等<sup>[24]</sup>使用痛泻要方对共计 70 例 D-IBS 患者进行分组对比治疗,结果显示痛泻要方使患者结肠粘膜 5-HT 水平与治疗前相比均明显减少,逐渐恢复正常水平,且 IBS 显著治愈率 (62.86%) 及总有效率 (80.00%) 高于匹维溴胺组 (51.43%, 77.14%)。晁冠群<sup>[25]</sup>等采用免疫组化的方法发现痛泻要方可以明显降低内脏高敏感大鼠下丘脑、第三脑室下侧以及脊髓的 CRF 表达程度,提示痛泻要方可能是基于影响 CRF 信号通路来降低内脏高敏感性,治愈 IBS 效果。吴嫣然<sup>[26]</sup>的研究则指出,痛泻要方对慢性应激模型鼠的内脏高敏感和肠道动力异常具有明显的改善作用,其中调节与肠道感觉和动力相关的分子 TRPV<sub>1</sub> 的表达可能是其内在的作用机制。因此,本研究选择为靶标筛选痛泻要方活性成分具有理论依据和实验基础。

本研究所选用的化合物库台湾中医药资料库 TCM database @ Taiwan 是全球最大可以提供免费下载虚拟筛选的中医药小分子的化合物数据库之一<sup>[15]</sup>。该数据库收集了来源于 352 种中草药的 37 170 余种化合物成分,供了包括中医药及中医药化合物查询、分子模拟对接计算、蛋白质与蛋白质相互作用模拟等多种检索和计算模拟服务。库中的化合物均通过 Lipinski's 类药五规则的筛选,并采用 NM2 能量力场进行优化,具有更好的药代动力学性质,在生物体内生物利用度更高,因而也更具有成为上市药物的潜力<sup>[27]</sup>。POCASA Online 是由日本北海道大学近年推出的新型在线活性位点预测工具,它采用了一种名为“Roll”的特定算法,通过驱使“Roll”沿着蛋白的表面不断滚动,来检测已知蛋白三维结构中的蛋白质口袋和空腔,从而实现了对已知蛋白活性位点的预测分析<sup>[28]</sup>。借助该工具可以找到蛋白的活性口袋周围的全部

相关氨基酸,对接区域选择时应涵盖这些关联氨基酸,显著提高了虚拟对接效果的可靠性和准确性. AutoDock Vina 基于半柔性对接的计算方式,即在整个分子对接的过程中,配体小分子是柔性可变的,而受体蛋白的对接区域则是刚性固定的. 与刚性对接和柔性对接相比,半柔性对接在速度与精确度之间找到了平衡. 在对接时,AutoDock Vina 优先生成对应的 Grid 格点信息,采用经过优化改良过的拉马克遗传算法(lamarckian genetic algorithm, LGA)进行能量优化,寻找配体与受体间最佳的结合方式,最后再使用半经验自由能函数来对分子的结合情况评价. AutoDock Vina 同时兼顾了高精度和高计算效率,是一款先进的分子对接软件,在虚拟筛选领域中被广泛使用. 但由于 Autodock Vina 本身一次运行只能对单个化合物和蛋白实行对接打分,无法直接对整个配体库中的全部化合物进行批量化的自动打分,因此本研究以 Autodock 官网提供的脚本为基础,使用 Python 语言编写了批量处理脚本来实现自动化打分,在保证一定可靠性的前提下,大幅度减少了对接打分消耗的时间,显著提高了虚拟筛选的效率,同时也降低了对计算机设备的投入. 通过 Discovery Studio v3.5、MOE 2014 对蛋白与化合物的结合模式进行分析,模拟了化合物与蛋白结合时的具体空间位置和相互作用关系,解析复合物间的氢键作用及疏水作用,应用 Discovery Studio 软件中 Hip-hop 算法进行药效团分析,探索蛋白配体之间的同性,有效提高了配体蛋白结合物的图形性、可视性和规律性,使得筛选结果更加科学可靠.

我们构建了包含 239 个活性成分的痛泻要方化合物库,与  $\text{TPH}_1$ 、SERT、 $\text{CRFR}_1$  和  $\text{TRPV}_1$  4 个 IBS 的潜在治疗靶点对接,从中筛选出了共 4-O-甲基芍药苷等 13 个具有研究潜力的成分,并使用 DS 和 MOE 软件对筛选出的成分进行了分析与验证. 从活性成分的结构特征来看,这些化合物的分子结构在空间表面周围都含有较多的氧原子或包含氧原子的基团,这使得它们更倾向于和对应目标蛋白结合位点附近的活性氨基酸如苯丙氨酸(Phe)、亮氨酸(Leu)和谷氨酸(Glu)等形成氢键相互作用,进而降低了两者的自由能,稳定了它们与蛋白结合后复合体的稳定性. 此外,它们与蛋白对接位点周围的苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)和异亮氨酸(Ile)等氨基酸形成疏水相互作用,进一步起到了稳定二者结合的作用.

同时,痛泻要方中多个成分与同一个蛋白分子存在结合的可能性,具有“单靶点,多配体”的特点. 打分结果分析发现,对于每个蛋白受体而言,位于前 30% 的配体化合物的结合自由能较为接近. 例如在  $\text{TPH}_1$  的前 30% 约 71 个配体化合物,其结合自由能范围从  $-12 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  到  $-8.9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ . 根据一般经验,这些配体化合物与  $\text{TPH}_1$  蛋白都具有一定的结合潜力. 我们将每个受体对接打分结果中位于前 30% 的化合物整理,共筛选得到 123 种活性成分,约占整个痛泻要方配体库的 51.5%. 图 5b 中进一步分析了这 123 种活性成分的中药归属,可以发现共有 44 种来自于痛泻要方中的白芍,约占 36%;有 24 种来自于白术,约占 20%;有 22 种来自于陈皮,约占 18%;余下的 32 种则来自于防风,约占 26%. 提示痛泻要方中各药材的化学成分对不同靶点均有贡献,具有相互协同作用.

研究结果进一步表明,复方中同一成分与多个蛋白分子存在结合的可能性,具有“单成分,多靶点”的特征. 如图 5a 所示,在 123 种成分中共有 33 种对全部 4 个蛋白的打分结果均较好,约占 26.8%;有 58 种与 3 个及以上蛋白的打分结果较好,约占 47.2%;还有 81 种与 2 个及以上蛋白的打分结果较优,约占 65.9%. 将这 33 种有与 4 个蛋白结合潜力的成分单独考虑,分别把它们与 4 个蛋白的对接自由能结果相

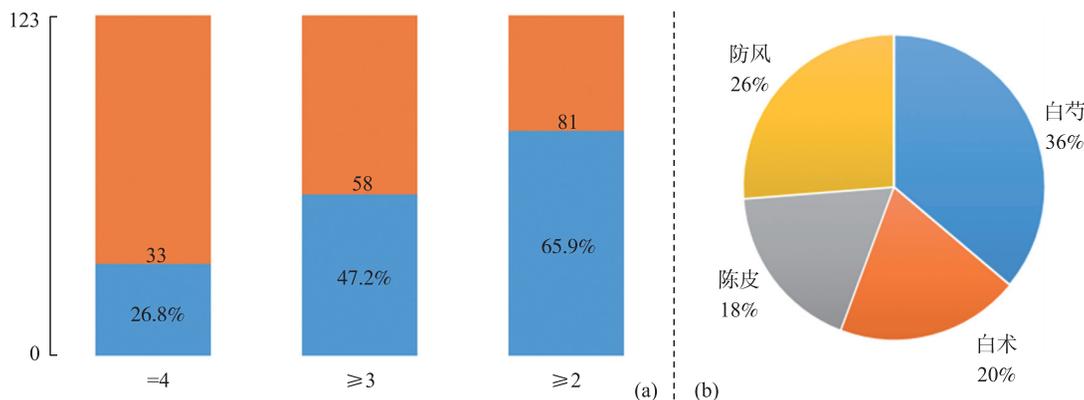


图5 (a)多受体结合分析(b)化合物中药归属分布

Fig. 5 (a) Analysis of multiple receptors binding (b) Distribution of TCM for compounds

加,其代数和按从小到大顺序排列,位于前五名的成分依次是: iso-Paeoniflorin (13409)、Paeoniflorin (1650)、iso-Benzoylpaeoniflorin(8863)、Deltoin(10231)和 Albiflorin R<sub>1</sub>(7617)。这些成分对4个蛋白具有较好的“单成分、多靶点”作用潜力。而如白芍中的 Paeoniflorin (1650)分别位于 TPH<sub>1</sub>、SERT、CRFR<sub>1</sub>和 TRPV<sub>1</sub> 4组打分结果中的第13名、第8名、第1名和第12名;又如防风中的 Deltoin(ID 10231)分别位于 SERT、CRFR<sub>1</sub>和 TRPV<sub>1</sub>受体的打分结果中的第7名、第5名和第1名,只有在 TPH<sub>1</sub>受体的打分结果中位于第39名;再如陈皮中的 Naringin(ID 13340)在 TPH<sub>1</sub>和 TRPV<sub>1</sub>受体的打分结果中分别处在第4名和第22名;还有白术中的  $\beta$ -Vatirenene(ID 14432)则分别位于 TPH<sub>1</sub>的第16名,SERT的第19名,TRPV<sub>1</sub>的第23名。痛泻要方中存在着一批特定成分与多个蛋白都具有良好的结合性,呈现“单成分、多靶点”的特征。提示痛泻要方中存在着具有多靶点作用的重要成分,尚待深入研究。

本研究对于从痛泻要方的化学成分中筛选具有开发潜力的候选药物提供了参考,为进一步研究其作用机制提供了科学依据。

### [参考文献]

- [1] TORPY J M,LYNM C, GLASS R M. Irritable bowel syndrome[J]. Journal of the American medical association,2004,292(7):886.
- [2] SALVIOLI B,PELLEGATTA G,MALACARNE M,et al. Autonomic nervous system dysregulation in irritable bowel syndrome[J]. Neurogastroenterol motil,2015,27(3):423-430.
- [3] DUNLOP S P, JENKINS D, NEAL K R, et al. Relative importance of enterochromaffin cell hyperplasia, anxiety, and depression in postinfectious IBS[J]. Gastroenterology,2003,125(6):1651-1659.
- [4] TACH Y, MILLION M, NELSON A G, et al. Role of corticotropin-releasing factor pathways in stress-related alterations of colonic motor function and viscerosensitivity in female rodents[J]. Gender medicine,2005,2(3):146-154.
- [5] BOESMANS W, OWSIANIK G, TACK J, et al. TRP channels in neurogastroenterology: opportunities for therapeutic intervention[J]. British journal of pharmacology,2011,162(1):18-37.
- [6] BRADESI S, TILLISCH K, MAYER E. Emerging drugs for irritable bowel syndrome[J]. Expert opinion on emerging drugs,2006,11(2):293-313.
- [7] CHIAL H J, CAMILLERI M, FERBER I, et al. Effects of venlafaxine, buspirone, and placebo on colonic sensorimotor functions in healthy humans[J]. Clin Gastroenterol Hepatol,2003,1(3):211-218.
- [8] SHEKHAR C, WHORWELL P J. Emerging drugs for irritable bowel syndrome[J]. Expert opinion on emerging drugs,2009,14(4):673-685.
- [9] 薛丽君,杨怡玲,唐剑,等. 肠易激综合征的药物治疗进展[J]. 医学综述,2016(1):118-121.
- [10] 唐丽明,宋宁,袁红霞. 中药复方治疗肠易激综合征的实验研究进展[J]. 中国实验方剂学,2013(19):355-360.
- [11] 缪乐涛,张婧娴,芮俊乾,等. 基于系统药理学探索痛泻要方治疗肠易激综合征的分子机制[J]. 中国现代中药,2017,19(11):1555-1561.
- [12] HEROWATI R, WIDODO G P. Molecular docking studies of chemical constituents of *Tinospora cordifolia* on glycogen phosphorylase[J]. Procedia chemistry,2014,13:63-68.
- [13] CHEN C Y. Computational screening and design of Traditional Chinese Medicine (TCM) to block phosphodiesterase-5[J]. Journal of molecular graphics & modelling,2009,28(3):261-269.
- [14] CHOI R J, ROY A, JUNG H J, et al. BACE1 molecular docking and anti-Alzheimer's disease activities of ginsenosides[J]. Journal of ethnopharmacology,2016,190:219-230.
- [15] CHEN C Y C. TCM Database@ Taiwan:the world's largest traditional Chinese medicine database for drug screening in silico[J]. PloS one,2011,6(1):e15939.
- [16] XIANG L, XU Y, ZHANG Y, et al. Virtual screening studies of Chinese medicine *Coptidis Rhizoma* as alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonists for treatment of Alzheimer's disease[J]. Journal of molecular structure,2015,1086:207-215.
- [17] XING, TIAN, JIAN, et al. 1,5-O-Dicaffeoyl-quinic Acid as a novel potential NMDA receptor inhibitor from traditional Chinese medicine database by virtual screening[J]. Chinese herbal medicines,2016,8(4):366-370.
- [18] GRASBERGER H, CHANG L, SHIH W, et al. Identification of a functional TPH1 polymorphism associated with irritable bowel syndrome bowel habit subtypes[J]. American journal of gastroenterology,2013,108(11):1766-1774.

- [19] GEERAERTS B, OUDENHOVE L V, TACK J. Serotonin transporter gene polymorphisms in irritable bowel syndrome[J]. *Neurogastroenterology & motility the official journal of the european gastrointestinal motility society*, 2010, 18(11):957-959.
- [20] SAGAMI Y, SHIMADA Y, TAYAMA J, et al. Effect of a corticotropin releasing hormone receptor antagonist on colonic sensory and motor function in patients with irritable bowel syndrome[J]. *Gut*, 2004, 53(7):958-964.
- [21] LARAUCHE M, GOURCEROL G, WANG L, et al. Cortagine, a CRF1 agonist, induces stresslike alterations of colonic function and visceral hypersensitivity in rodents primarily through peripheral pathways[J]. *Ajp gastrointestinal & liver physiology*, 2009, 297(1):215-227.
- [22] AKBAR A, YIANGOU Y, FACER P, et al. Increased capsaicin receptor TRPV1-expressing sensory fibres in irritable bowel syndrome and their correlation with abdominal pain[J]. *Gut*, 2008, 57(7):923-929.
- [23] NAGY I, S NTHA P, JANCS G, et al. The role of the vanilloid(capsaicin)receptor(TRPV1) in physiology and pathology[J]. *European journal of pharmacology*, 2004, 500(1):351-369.
- [24] 林震群, 张维波, 周文博. 痛泻要方颗粒对腹泻型肠易激综合征的结肠黏膜 5-HT<sub>3</sub> 受体表达的影响[J]. *福建中医药*, 2011, 42(5):14-16.
- [25] 晁冠群, 吕宾, 孟立娜, 等. 痛泻要方对内脏高敏感大鼠脑、脊髓 CRF 表达的影响[J]. *中国中药*, 2010(15):2012-2016.
- [26] 吴嫣然. 痛泻要方对慢性应激导致的内脏高敏感和肠道动力异常的作用及机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2016.
- [27] LIPINSKI C A. Lead-and drug-like compounds; the rule-of-five revolution[J]. *Drug discovery today technologies*, 2004, 1(4):337-341.
- [28] YU J, ZHOU Y, TANAKA I, et al. Roll: a new algorithm for the detection of protein pockets and cavities with a rolling probe sphere[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1):46-52.

[责任编辑:黄 敏]