

银蓝调脂胶囊调节脂质代谢物质基础的筛选

郑柳怡¹, 黄丹娥², 许华珍¹, 陈玉兴^{2*}

(1. 广州中医药大学第五临床医学院, 广东 广州 510275; 2. 广东省中医药工程技术研究院, 广东省中医药研究开发重点实验室, 广东 广州 510095)

摘要:目的 筛选银蓝调脂胶囊调节脂质代谢的物质基础。方法 采用计算机辅助药物设计(CADD)技术,从TCMSP数据库下载银蓝调脂胶囊组方化学成分,分析候选靶标羧甲基戊二酰辅酶A(HMG-CoA)、过氧化物酶增殖物激活受体 α (PPAR α)、角鲨烯合成酶(SQS)配体结合模式,采用分子对接对银蓝调脂胶囊进行虚拟筛选,分子相似性将银蓝调脂胶囊成分与上述3个靶标已知的活性成分进行比较,对接得分归一化结果和相似性值对命中化合物综合评分。结果 HMG-CoA、PPAR α 、SQS的结合模式热点残基分别有8、7、4个。作用于HMG-CoA的潜在活性化合物主要来源于蜂胶中的奎宁酸及二咖啡奎宁酸类化合物,作用于PPAR α 的主要来自于蜂胶和化橘红中的黄酮类化合物以及奎宁酸及二咖啡奎宁酸类化合物,作用于SQS靶标的潜在活性化合物来源于绞股蓝中的侧链氧化型甾醇类化合物以及蜂胶中的奎宁酸及二咖啡奎宁酸类化合物。结论 银蓝调脂胶囊可通过多种化合物与HMG-CoA、PPAR α 和SQS结合,从而发挥调节脂质代谢治疗高脂血症的作用。

关键词:银蓝调脂胶囊;脂质代谢;物质基础;计算机辅助药物设计(CADD);HMG-CoA;PPAR α ;角鲨烯合成酶

中图分类号: R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)04-1337-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.04.058

计算机辅助药物设计(Computer-aided drug design, CADD)指基于分子模拟的分子设计技术^[1],根据靶点结构性质选择合适的方法对中药化合物进行筛选,得到潜在活性成分。作为计算机技术、分子药理学和分子生物学等多学科交叉发展的基础上形成的药物研发新技术,该技术在先导化合物发现和优化中有重要作用,可大大减少新药创制的盲目性和偶然性^[2],已广泛运用于中药及其复方药效的物质基础和分子机制的研究。

高脂血症(Hyperlipidemia, HLP)是由脂质代谢紊乱引起的某一种或多种血脂水平升高的病症^[3],严重危害人类健康,已成为多种心血管疾病发生的高危因素^[4],临床上以总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)升高作为诊断标准^[5]。HMG-CoA、SQS是TC合成过程的2种酶,抑制两者表达可有效抑制TC合成^[6];PPAR α 是TG合成的重要调控因子,可通过激动PPAR α 靶标有效抑制TG合成^[7]。

银蓝调脂胶囊由银杏叶、绞股蓝、化橘红、酒制蜂胶组成,能降低小鼠、大鼠、新西兰兔等多种实验性高脂血症动物模型血清中TC、TG水平^[8-10],但其有效成分及作用靶点尚未清楚。因此,本研究将采用CADD技术,通过分子对接、相似性检索从银蓝调脂胶囊中筛选有效降脂成分,旨在从分子水平阐释该制剂治疗高脂血症作用的药效物质基础,为其治疗高脂血症的临床应用及药物开发提供

依据。

1 材料与方法

1.1 银蓝调脂胶囊成分化学结构数据库建立 以“银杏叶”“绞股蓝”“化橘红”“蜂胶”为关键词,在Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform(TCMSP)数据库中搜索得到403个天然小分子的化学结构,其中银杏叶110个,蜂胶139个,绞股蓝104个,化橘红81个。采用ChemBioDraw绘图软件绘制结构式,并将结构式、药材来源、分子量等信息保存于ISISDatabase数据库中。

1.2 靶蛋白选择及可靠性认证 选择HMG-CoA、PPAR α 、角鲨烯合成酶蛋白晶体结构作为靶标,建立活性小分子化合物查询库,以银蓝调脂胶囊化合物库为检索库(403个化合物)进行检索,设定相似性阈值为70%。采用gacf_vs相似性检索软件,计算检索库和查询库中化合物相似性,相似性越高,靶标可靠性越强。

1.3 银蓝调脂胶囊与HMG-CoA、PPAR α 、角鲨烯合成酶作用靶标结合模式分析 选择HMG-CoA、PPAR α 、角鲨烯合成酶蛋白晶体作为虚拟筛选靶点结构,从Protein Data Bank(PDB)数据库中获取分辨率 $<3 \text{ \AA}$ ($1 \text{ \AA} = 1 \times 10^{-10} \text{ m}$),并且含有活性小分子配体的靶标晶体结构HMG-CoA 13个(PDB代码1HW9、1HWJ、1HWK、1HWL、2Q1L、2Q6C、

收稿日期:2021-05-19

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81973508);广东省科技计划项目(2017A070701017);广东省中医药局科研项目(20201017);广州市科研计划项目(202002030215)

作者简介:郑柳怡(1996—),女,硕士生,研究方向为中药药理学。Tel:15626254496, E-mail:627139378@qq.com

*通信作者:陈玉兴(1971—),男,主任中药师,从事中药药理学研究。Tel:13360558288, E-mail:cyx89333@qq.com

2R4F、3BGL、3CCT、3CCZ、3CD0、3CD7、3CDA), PPAR α 11 个 (PDB 代码 1I7G、1KKQ、2P54、2REW、2ZNN、3ET1、3FEI、3G8I、3KDT、3R5M、3VI8), 角鲨烯合成酶 7 个 (1EZF、3ASX、3LEE、3Q2Z、3Q30、3V66、3VJC)。通过将靶标所有的蛋白质晶体结构导入 MOE 中, 设定参数将蛋白质进行叠合, 使蛋白质按照同样的骨架和氨基酸进行叠合, 小分子配体会随着蛋白质骨架的叠合而叠合在同一位置。采用 MOE The Protein Ligand Interaction Fingerprints (PLIF) 受体-配体相互作用指纹图谱分析程序, 分别对 HMG-COA、PPAR α 、角鲨烯合成酶靶标进行结合模式分析, 即按照指纹图谱运算程序设定参数, 得到所有晶体结构及其配体的结合模式指纹图谱。

1.4 对接软件认证 不同蛋白质晶体结构因其所处环境 (如水、离子、小分子配体等) 的差异, 导致整个蛋白质晶体体系不同, 加之不同软件算法差异, 更使得软件对蛋白体系的适应性有所差别, 故在进行分子对接前, 应先考虑对接软件对目标蛋白体系的适应性。本研究使用 Cdocker 程序对 HMG-COA、PPAR α 、角鲨烯合成酶靶标系统适用性进行考察。

1.5 分子对接计算及结果分析 将 HMG-COA、PPAR α 、角鲨烯合成酶晶体结构文件 3CDA 分别导入对接软件, 加

CHARMM 力场, 定义受体和结合位点, 选用 Cdocker 程序对接, 参数设置为默认值。以银蓝化合物 “-Cdocker _energy” 及与靶标结合情况 (以晶体靶标蛋白的结合模式为标准, 化合物与靶标结合应跟结合模式热点残基氨基酸全部或部分结合) 为标准选出潜在活性化合物, 将其与靶标相似度进行综合评价, 采用 consensus score (CS_i) 方法计算同时满足对接筛选条件和相似度 > 70% 的化合物的 CS_i 值, 其数值越大, 表明化合物活性越强, 公式为 $CS_i = X_i \times Y_i$, $X_i = [x_i - \min(x)] / [\max(x) - \min(x)]$, 其中 X 是化合物与靶标对接得到的标准对接值, x_i 是该化合物与靶标蛋白对接得到的归一化数值, Y_i 是该化合物与已知晶体靶标活性化合物相似度。

2 结果

2.1 银蓝调脂胶囊作用靶标及其可靠性 将 HMG-COA、PPAR α 、角鲨烯合成酶靶标纳入相似度搜索, 采用相似度软件计算银蓝调脂胶囊化合物库与上述靶标活性小分子化合物的相似性, 结果以 > 70% 相似度化合物数、平均相似度、命中比例为评判标准, 大于 70% 化合物的数量越多, 靶标越可靠。结果, 银蓝调脂胶囊化合物与已知活性化合物的相似度均大于 70%, 见表 1。

表 1 银蓝调脂胶囊化学成分与靶标活性小分子化合物的相似度

靶标	已知活性化合物数/个	银蓝调脂胶囊 > 70% 相似性化合物数/个	平均相似度/%	命中率/%
HMG-COA	227	156	75.92	35.48
PPAR α	1 909	135	80.70	31.11
角鲨烯合成酶	461	153	84.99	35.25

2.2 晶体靶标结合模式 结合模式指纹图谱体现的是该蛋白与活性小分子配体结合的氨基酸的种类和个数及出现的频数, 出现频数高的氨基酸即为热点残基。热点残基可作为判断虚拟筛选化合物潜在活性的标准, 若虚拟筛选的化合物与热点残基有结合, 表明该化合物具有潜在的活性。因此, 指纹图谱结合氨基酸是后续虚拟筛选结果评判的标准之一。

2.2.1 HMG-COA 通过 PLIF 软件对 HMG-COA 的 13 个晶

体结构进行计算分析, 结合模式指纹图谱 (图 1), 有 10 个氨基酸与 HMG-COA 靶标晶体结合, 其中 Arg590、Ser654、Asp690、Lys691、Lys692、GluB559、LysB735、AsnB755 氨基酸结合率为 100%, 即所有晶体都与它们相结合, SerB565 出现频率为 76.92%, Cys561 出现频率为 23.08%。因此, Arg590、Ser654、Asp690、Lys691、Lys692、GluB559、LysB735、AsnB755 是虚拟筛选化合物结合氨基酸参考标准。

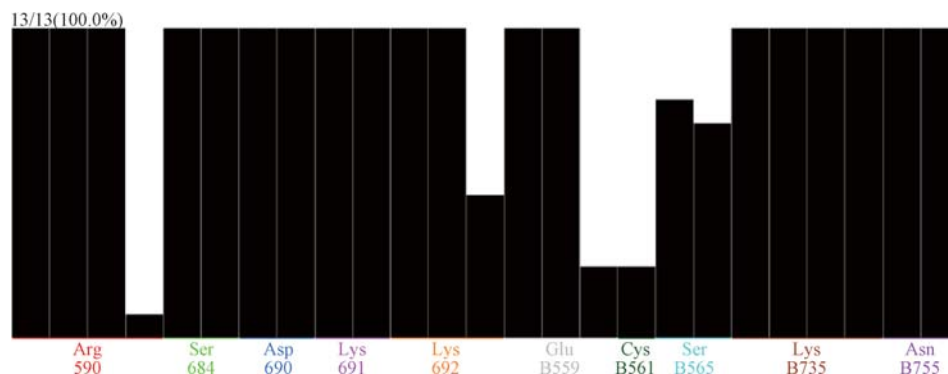


图 1 HMG-COA 结合模式指纹图谱

2.2.2 PPAR α 通过 PLIF 软件对 PPAR α 的 11 个晶体结构进行计算分析, 结合模式指纹图谱 (图 2), 结合频率最

高的氨基酸为 Cys276、Ser280、Yyr314、His440、Tyr464, 结合率为 90.9%; 其次是 Cys275、Val332, 结合率为

72.73; Thr279 为 36.36%; Leu321 为 27.27%; 结合 1 次的是 Glu268、Phe273、Val306、Gly313、Ile354、Met355、Leu436、Val444。因此, Cys276、Ser280、Yyr314、His440、Tyr464、Thr279、Leu321 是虚拟筛选化合物结合氨基酸参考的标准。

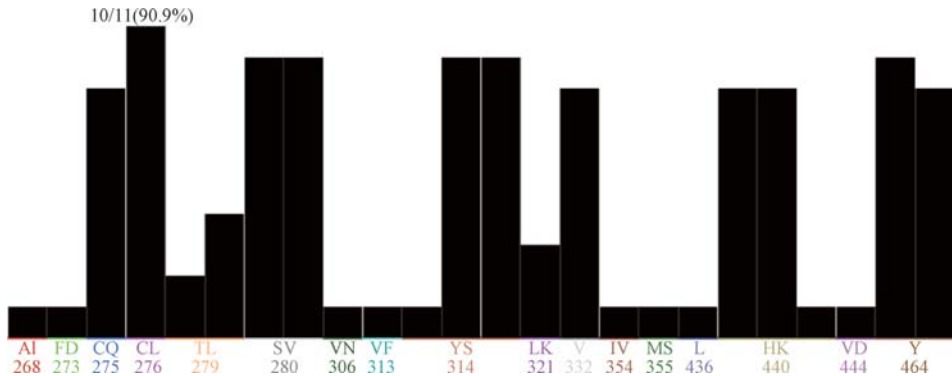


图 2 PPAR α 结合模式指纹图谱

2.2.3 角鲨烯合成酶 通过 PLIF 软件对角鲨烯合成酶的 7 个晶体结构进行计算分析, 结合模式指纹图谱 (图 3), 其中结合率最高的氨基酸是 Tyr73, 为 85.7%; 其次是 Phe54、Leu211, 为 71.43%; Arg77 为 42.86%; Arg52、Sre53、Asp80、Gln212、Asn215 结合频数为 2 次; Thr50、Ser51、Lys117、Try171、Arg218 结合频数为 1 次。因此, Tyr73、Phe54、Leu211、Arg77 为热点残基氨基酸。

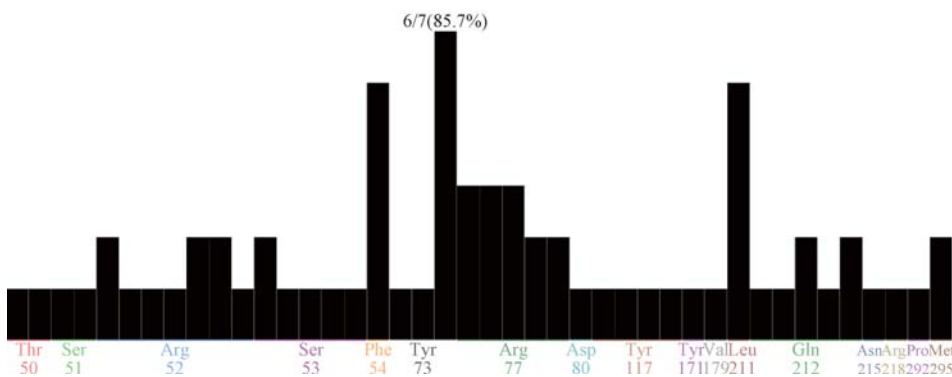


图 3 角鲨烯合成酶结合模式指纹图谱

2.3 分子对接软件适用性 将晶体结构自身配体对接到原空间位置上, 选取 10 个最优构象, 将其与晶体结构原来构象进行比较, 要求 RMSD 值<1 或在 1 个固定值范围内波动, 用于 HMG-COA、PPAR α 、角鲨烯合成酶对接的晶体 PDB 代码分别为 3CDA、3VI8、3V66, 发现三者自身配体对接产生的 10 个构象与原来配体的构象叠合, 对接前后构象变化不大, 符合对接软件适用性要求, 见表 2、图 4。因此, 选择 Cdocker 对接软件对这 3 个靶标进行虚拟筛选。

表 2 3CDA、3VI8、3Q30 自身配体对接 RMSD 结果

名称	参考配体	RMSD	名称	参考配体	RMSD	名称	参考配体	RMSD
3CDA	3CDA	0	3VI8	3VI8	0	3Q30	3Q30	0
3CDA_1	3CDA	1.377 3	3VI8_1	3VI8	0.260 2	3Q30_1	3Q30	0.622 7
3CDA_2	3CDA	1.398 2	3VI8_2	3VI8	0.258 0	3Q30_2	3Q30	0.663 3
3CDA_3	3CDA	1.093 3	3VI8_3	3VI8	0.278 3	3Q30_3	3Q30	0.654 9
3CDA_4	3CDA	1.346 1	3VI8_4	3VI8	0.251 6	3Q30_4	3Q30	1.629 4
3CDA_5	3CDA	1.689 1	3VI8_5	3VI8	0.307 5	3Q30_5	3Q30	2.713 5
3CDA_6	3CDA	1.338 8	3VI8_6	3VI8	0.259 4	3Q30_6	3Q30	1.758 1
3CDA_7	3CDA	1.721 6	3VI8_7	3VI8	0.316 3	3Q30_7	3Q30	0.659 0
3CDA_8	3CDA	1.648 2	3VI8_8	3VI8	0.304 5	3Q30_8	3Q30	1.531 1
3CDA_9	3CDA	1.306 1	3VI8_9	3VI8	0.243 0	3Q30_9	3Q30	1.269 3
3CDA_10	3CDA	1.683 7	3VI8_10	3VI8	0.295 4	3Q30_10	3Q30	1.251 2



注：棍棒模型表示的化合物为配体原本的构象，线性模型表示的是对接后产生的构象。

图 4 3CDA、3VI8、3Q30 自身配体的化学结构及对接构象叠合

2.4 分子对接

2.4.1 作用于 HMG-CoA 靶标 使用 Cdocker 软件对接并计算得到 CS_i 值，结合相似度大于 70% 筛选出 13 个潜在的活性化合物，均来自于蜂胶，表明该药材通过抑制 HMG-CoA 靶点来抑制胆固醇合成，从而降低胆固醇水平，见表 3、图 5。

表 3 潜在 HMG-CoA 抑制活性 CS_i 值 (1 kcal/mol=4.18 kJ/mol)

编号	-Cdocker_energy/ (kcal·mol ⁻¹)	来源	X_i 值	Y_i 值	CS_i 值
1	56.73	蜂胶	1.00	70.83	70.83
2	48.07	蜂胶	0.80	80.00	64.37
3	54.31	蜂胶	0.95	75.56	71.44
4	54.40	蜂胶	0.95	76.60	72.59
5	49.53	蜂胶	0.84	73.47	61.54
6	46.74	蜂胶	0.77	94.74	73.38
7	46.69	蜂胶	0.77	72.73	56.26
8	39.02	蜂胶	0.60	72.73	43.66
9	39.33	蜂胶	0.61	71.64	43.50
10	33.29	蜂胶	0.47	76.19	35.88
11	30.30	蜂胶	0.40	71.64	28.90
12	13.24	蜂胶	0.02	71.60	1.31
13	12.43	蜂胶	0	73.08	0

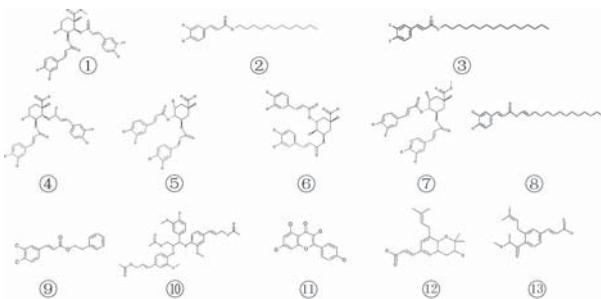


图 5 HMG-CoA 靶标潜在活性化合物分子结构式

2.4.2 作用于 PPAR α 靶标 根据 CS_i 值，结合相似度大于 70% 筛选出 26 个潜在的活性化合物，来源于蜂胶、化橘红，表明这 2 种药材通过激活 PPAR α 靶标来促进脂肪酸的分解代谢并降低体内甘油三酯水平，见表 4、图 6。

表 4 潜在 PPAR α 激动活性 CS_i 值 (1 kcal/mol = 4.18 kJ/mol)

编号	-Cdocker_energy/ (kcal·mol ⁻¹)	来源	X_i 值	Y_i 值	CS_i 值
1	54.41	蜂胶	1.00	78.26	78.26
2	49.50	蜂胶	0.86	77.97	66.98
3	45.99	蜂胶	0.76	79.17	60.02
4	44.03	蜂胶	0.70	83.72	58.75
5	45.40	蜂胶	0.74	71.88	53.29
6	38.43	蜂胶	0.54	83.72	45.29
7	37.81	蜂胶	0.52	73.85	38.63
8	34.02	蜂胶	0.41	80.00	33.15
9	30.21	蜂胶	0.31	83.72	25.54
10	29.00	蜂胶/化橘红	0.27	85.71	23.15
11	28.85	化橘红	0.27	85.71	22.79
12	27.96	蜂胶	0.24	85.71	20.61
13	27.27	蜂胶	0.22	82.61	18.23
14	26.34	蜂胶	0.19	87.18	16.89
15	25.32	蜂胶	0.16	100.00	16.44
16	26.37	化橘红	0.19	73.68	14.33
17	25.08	蜂胶	0.16	80.85	12.74
18	24.33	蜂胶	0.14	80.00	10.88
19	21.58	化橘红	0.06	73.17	4.18
20	-	化橘红	-	91.67	-
21	-	化橘红	-	96.00	-
22	-	化橘红	-	100.00	-
23	-	蜂胶	-	90.91	-
24	-	蜂胶	-	98.25	-
25	-	蜂胶	-	97.44	-
26	-	蜂胶	-	96.30	-

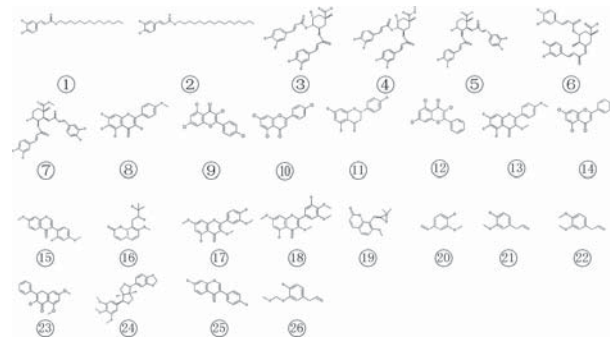


图 6 PPAR α 靶标潜在活性化合物

2.4.3 作用于角鲨烯合成酶靶标 使用 Cdocker 软件对接并计算得到 CS_i 值，结合相似度大于 70% 筛选出 19 个潜在的活性化合物，来源于蜂胶、绞股蓝、银杏叶、化橘红，表明银蓝调脂胶囊可通过抑制角鲨烯合成酶靶标，使胆固醇合成通路受到抑制，从而降低体内胆固醇水平，见表 5、图 7。

3 讨论

高脂血症是以血液中甘油三酯以及总胆固醇异常升高为主要特征的引起脂质水平紊乱的代谢性疾病^[11]。在脂质代谢中，PPAR α 是关键转录因子之一，促进脂肪酸合成途径相关酶的表达，加速脂肪酸的分解代谢，降低体内甘油

表 5 潜在角鲨烯合成酶抑制活性 CS_i 值 ($1 \text{ kcal/mol} = 4.18 \text{ kJ/mol}$)

编号	-CDOCKER_energy/ ($\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)	来源	X_i 值	Y_i 值	CS_i 值
1	54.87	银杏叶	0.99	88.24	87.68
2	63.39	蜂胶	1.21	72.22	87.65
3	62.22	蜂胶	1.18	73.47	86.95
4	56.72	蜂胶	1.04	75.00	78.12
5	56.69	蜂胶	1.04	72.22	75.15
6	52.75	蜂胶	0.94	73.97	69.45
7	37.78	绞股蓝	0.55	95.52	52.81
8	40.18	蜂胶	0.61	70.00	43.03
9	30.28	绞股蓝	0.36	88.24	31.70
10	17.63	蜂胶	0.03	76.60	2.51
11	16.36	蜂胶	0	70.18	0
12	-	绞股蓝	-	100.00	-
13	-	绞股蓝	-	98.55	-
14	-	绞股蓝	-	98.55	-
15	-	绞股蓝	-	100.00	-
16	-	绞股蓝	-	100.00	-
17	-	绞股蓝	-	100.00	-
18	-	绞股蓝	-	100.00	-

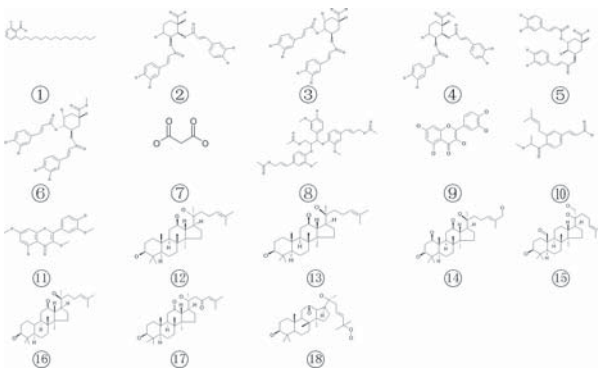


图 7 角鲨烯合成酶靶标潜在活性化合物

三酯的水平^[12]。HMG-CoA 还原酶是体内生物合成胆固醇过程中的限速酶，体内胆固醇水平的升高与该蛋白的过度表达密切相关^[13]。SQS 是胆固醇合成途径中的关键酶，抑制 SQS 可以有效降低 TC、TG 水平^[14]。前期研究发现银蓝调脂胶囊降低高脂血症新西兰兔以及高脂血症大鼠血清 TC、TG 水平^[8-10]。

本研究采用计算机辅助药物设计技术，使用 gacf vs 相似度检索软件以及 CDOCKER 程序对银蓝调脂胶囊化合物与 HMG-CoA、PPAR α 以及 SQS 靶标蛋白的相互作用进行了对接计算研究，发现蜂胶作用于 HMG-CoA、PPAR α 以及 SQS 靶点，具有多靶点效应。银蓝调脂胶囊发挥调节胆固醇合成与代谢作用的主要药物为蜂胶。化橘红作用于 PPAR α ，发挥促进脂肪酸代谢以降低体内甘油三酯水平的作用，而银杏叶与绞股蓝作用于 SQS 靶标，抑制胆固醇的合成。人参皂苷 Rb₁ 具有促进细胞增殖、降脂等多种药理活性，绞股蓝皂苷 A 具有抗炎、防治动脉粥样硬化的作

用^[15-16]。本研究发现，单个化合物能作用于多个靶标，如山柰酚之于 HMG 和 PPAR α 靶标，再选择 HMG-CoA、PPAR α 以及 SQS 靶标，采用计算机辅助药物设计联合靶点反向预测的研究方法，初步阐明了银蓝调脂胶囊调节高脂血症的物质基础及分子机制。

参考文献:

[1] 尚佳铤. 计算机辅助设计在药物研发中的应用现状探究[J]. 现代养生, 2019(24): 296-297.

[2] 谢治深, 宋军营, 张振强, 等. 计算机辅助药物设计方法及其在新药研发中的应用[J]. 河南大学学报(医学版), 2019, 38(2): 148-152.

[3] Flora G D, Nayak M K. A brief review of cardiovascular diseases, associated risk factors and current treatment regimes[J]. *Curr Pharm Des*, 2019, 25(38): 4063-4084.

[4] 李文毅, 周春阳. 高脂血症与动脉粥样硬化和脂代谢研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(10): 811.

[5] 童早英. 匹伐他汀钙片联合阿司匹林治疗冠心病高脂血症的临床效果[J]. 中国当代医药, 2021, 28(3): 83-86.

[6] 顾觉奋, 牛 佳. 角鲨烯合成酶抑制剂降血脂作用及机制的研究进展[J]. 药学进展, 2007, 31(1): 15-20.

[7] 王晓艳, 李伟霞, 张 辉, 等. 五味子-甘草配伍的调血脂作用及对甘油三酯合成途径的影响[J]. 中国药理学通报, 2021, 37(1): 136-142.

[8] 谢凯枫, 卓俊城, 曾晓会, 等. 银蓝调脂胶囊通过促进 RCT 和 TG 水解调控高脂血症小鼠脂质代谢的机制研究[J]. 中药材, 2018, 41(4): 955-960.

[9] 陈玉兴, 黄雪君, 杜铁良, 等. 银蓝调脂胶囊对实验性高脂血症新西兰兔血清脂质水平的影响[J]. 中成药, 2014, 36(7): 1518-1521.

[10] 陈玉兴, 黄雪君, 杜铁良, 等. 银蓝调脂胶囊对实验性高脂血症大鼠的调血脂作用研究[J]. 江西中医药, 2013, 44(10): 65-68.

[11] 杨晓云. 高脂血症治疗的临床研究进展[J]. 海峡药学, 2016, 28(12): 99-101.

[12] 任佳月, 吴斐华. PPAR α 在非酒精性脂肪肝发病机制中的作用[J]. 保健文汇, 2020(12): 167-168.

[13] 何俊芳. 苦荞麦对高脂血症大鼠的降脂作用及其机制[D]. 上海: 复旦大学, 2014.

[14] Mac ías-Alonso M, Andrés L S, Córdova-Guerrero I, et al. Inhibition of squalene synthase of rat liver by abietane diterpenes derivatives[J]. *Nat Prod Res*, 2019, 21: 1-5.

[15] Shi G, Liu D, Zhou B, et al. Ginsenoside Rb1 alleviates oxidative low-density lipoprotein-induced vascular endothelium senescence via the SIRT1/beclin-1/autophagy axis [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2020, 75(2): 155-167.

[16] 孙晓宁, 宋 园, 杨 潇, 等. 绞股蓝皂苷 A 通过调节线粒体功能改善 ox-LDL 诱导的 EA. h926 细胞损伤的机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(1): 77-80.