

• 方药研究 •

基于分子对接技术预测苓桂术甘汤防治慢性心力衰竭的作用机制^{*}

周 鹏^{1,2,3}, 杨建澳¹, 许继公¹, 王国强¹, 李莹莹¹, 丁婉雪¹, 王 靓^{1,2,3}, 黄金玲^{1,2,3△}
(1. 安徽中医药大学中西医结合学院, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽中医药科学院中西医结合研究所, 安徽 合肥 230012;
3. 中药复方安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012)

摘要: **目的** 采用分子对接技术预测苓桂术甘汤防治慢性心力衰竭的作用机制。**方法** 运用分子对接软件 MOE(Molecule Operating Environment), 将苓桂术甘汤中的特征性化学成分与 AMPK/SIRT1/NF- κ B 炎症信号通路中的关键靶点 AMPK、SIRT1、IKK β 进行分子对接, 对分子对接结果进行分析。**结果** 甘草苷与 AMPK、SIRT1、IKK β 靶点的结合能力均高于自身配体, 其他化学成分与 AMPK、SIRT1、IKK β 靶点均有不同程度的结合。**结论** 分子对接技术预测苓桂术甘汤可能作用于 AMPK/SIRT1/NF- κ B 炎症信号通路, 为揭示苓桂术甘汤防治慢性心力衰竭的抗炎作用机制提供理论依据。

关键词: 分子对接; 苓桂术甘汤; 慢性心力衰竭; 作用机制; AMPK/SIRT1/NF- κ B 信号通路

中图分类号: R289.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2018)04-0082-06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2018.04.021

Prediction of the Mechanism of Lingui Zhugan Decoction in Preventing and Treating Chronic Heart Failure Based on Molecular Docking

ZHOU Peng^{1,2,3}, YANG Jianao¹, XU Jigong¹, WANG Guoqiang¹, LI Yingying¹,
DING Wanxue¹, WANG Liang^{1,2,3}, HUANG Jinling^{1,2,3}

(1. Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Research Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;
3. Anhui Province Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula, Hefei 230012, China)

ABSTRACT: **Objective** On the basis of molecular docking, to predict the mechanism of Lingui Zhugan Decoction in preventing and treating chronic heart failure. **Methods** Characteristic constituents of Lingui Zhugan Decoction docked with AMPK, SIRT1 and IKK β targets of AMPK/SIRT1/NF- κ B signaling pathway by using Molecule Operating Environment(MOE) software. **Results** The binding capacity of liquiritin to AMPK, SIRT1 and IKK β targets are higher than those of their own ligands. Other chemical components have different degrees of binding with AMPK, SIRT1 and IKK β targets. **Conclusion** Molecular docking predicts that Lingui Zhugan Decoction may play an important role in AMPK/SIRT1/NF- κ B signaling pathway, and it will provide a theoretical basis for revealing the anti-inflammatory mechanism of Lingui Zhugan Decoction in preventing and treating chronic heart failure.

KEY WORDS: molecular docking; Lingui Zhugan decoction; chronic heart failure; mechanism; AMPK/SIRT1/NF- κ B signaling pathway

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)在中
医辨证中属于“心悸”“水肿”“痰饮”“喘证”“心痹”

等范畴,证属本虚标实,本虚多为气虚、阳虚,标实
为水、湿、痰、瘀互阻,气虚阳衰,水阻血瘀是主要病

收稿日期: 2018-08-09

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81373533);安徽高校自然科学研究重点项目(KJ2017A303);2017 年研究生科技
创新基金(2017YB12);安徽中医药大学 2018 年度大学生创新创业基金项目(2018158)

第一作者简介: 周鹏(1986-),男,讲师,博士,研究方向:中药活性成分分析及作用机制。

△通信作者: 黄金玲, E-mail: jinling6181@126.com.

机特征^[1]。苓桂术甘汤 (Lingui Zhugan Decoction, LGZGD)出自汉代张仲景《伤寒杂病论》,由茯苓、桂枝、白术、甘草4味中药组成,主治心下有停饮、胸胁支满、眩晕及心下逆满、气上冲胸、起则头眩、脉沉紧之阳虚饮停证,是益气温阳、健脾化饮的经典名方,切中CHF病机特点,临床疗效显著^[2-3]。而CHF的病理生理基础是急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI)造成心肌缺血性损伤后,神经激素系统被激活导致机体发生代偿性改变,加重了心肌损伤和心功能恶化^[4]。课题组前期的体内、外实验研究发现,苓桂术甘汤抑制心室重构的作用机制与抑制IKK/I κ B/NF- κ B信号通路的过度激活有关^[5-6],但对其上游AMPK/SIRT1信号通路尚未研究,可通过分子对接技术将中药化学成分与靶点进行对接,以预测可能的作用机制。

反向分子对接则是以中药的化学成分为探针,在已知的靶点数据库里面搜索可能与之结合的生物靶点大分子,通过空间和能量匹配相互识别形成复合物,筛选药物潜在的作用靶点,从而根据靶点预测其作用机制^[7]。因此,本研究以反向分子对接技术为研究方法,将苓桂术甘汤水提取物中的特征性主要化学成分(甘草苷、甘草素、桂皮酸、桂皮醛、甘草酸、白术内酯III)^[8]与AMPK/SIRT1/NF- κ B炎症信号通路中的关键靶点AMPK、SIRT1、IKK β 靶点进行分子对接,为揭示苓桂术甘汤防治CHF的抗炎作用机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 靶点的获取和预处理 选择对AMPK/SIRT1/

NF- κ B炎症信号通路中的关键靶点,分别是腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK)、SIRT1和IKK β ,从蛋白数据库蛋白数据库PDB (<http://www.rcsb.org>)下载三维结构,代码分别为4ZHX^[9]、4I5I^[10]和4KIK^[11]。采用分子对接软件Molecule Operating Environment (MOE, 2008.10)^[12]进行原始结构的预处理,进行Protonate 3D加氢,加电荷操作,删除水分子、离子、配体小分子操作,之后进行能量优化,最后保留靶点的活性区域。

1.2 配体构建 Molecular Operating Environment (MOE, 2008.10)将甘草苷、甘草素、桂皮酸、桂皮醛、甘草酸、白术内酯III转变为三维结构,对每个分子进行Minimize能量优化及加氢处理,得到柔性分子。

1.3 分子对接 用MOE-Dock模块,将配体与受体进行半柔性对接,放置函数选用Triangle Matcher、打分函数选用London dG,其余采用默认参数^[13],分别得到每个化合物与3个靶点的对接得分值,得分值越低,配体与受体结合越稳定,将通过得分值的高低和与氨基酸残基结合的数目评价化合物与靶点的结合活性。

2 结果

分子模拟对接结果显示,甘草苷与AMPK靶点的结合能力高于自身配体,甘草素和甘草酸与AMPK靶点的结合能力略低于自身配体;甘草苷、甘草素、桂皮酸和甘草酸与SIRT1靶点的结合能力高于自身配体,白术内酯III与SIRT1靶点的结合能力和自身配体相当;甘草苷、甘草酸与IKK β 靶点的结合能力高于自身配体,甘草素与IKK β 靶点的结合能力略低于自身配体。见表1所示。

表1 苓桂术甘汤主要化学成分与AMPK、SIRT1和IKK β 靶点对接能量打分结果(kcal/mol)

作用靶点	自身配体	甘草苷	甘草素	桂皮酸	桂皮醛	甘草酸	白术内酯III
AMPK	-13.4865	-13.9013	-11.9878	-9.5886	-7.1574	-10.9215	-8.6389
SIRT1	-9.9639	-15.7171	-13.0367	-10.4855	-7.6082	-11.8723	-9.9116
IKK β	-14.0118	-14.8948	-11.5850	-8.9460	-7.0159	-14.6648	-8.5314

苓桂术甘汤主要特征性化学成分与AMPK、SIRT1和IKK β 靶点中的氨基酸残基结合主要以分子间的氢键为主(见表2、3、4;图1、2、3所示),分子间的氢键是较为重要的稳定作用力,可使得配体与受体之间结合更加稳定,进而发挥调控蛋白的作用。由

此说明,苓桂术甘汤的主要特征性化学成分与AMPK、SIRT1、IKK β 靶点均具有较好的结合能力,说明苓桂术甘汤可能作用于AMPK、SIRT1、IKK β 靶点,故推断苓桂术甘汤可能作用于AMPK/SIRT1/NF- κ B炎症信号通路。

表 2 零桂术甘汤体外特征性化学成分与 AMPK 靶点的对接情况

特征性化学成分	靶点	氢键数目	氨基酸残基	芳烃-阳离子作用数目	氨基酸残基	$\pi-\pi$ 共轭	氨基酸残基
甘草苷	AMPK	5	Arg 70,Arg1 52,Lys 170	1	Arg 269	0	—
甘草素	AMPK	3	Arg 70,Ser 225,Thr 89	1	Arg 152	2	His 151,His 298
桂皮酸	AMPK	1	Val 96	0	—	0	—
桂皮醛	AMPK	1	Lys 45	0	—	0	—
甘草酸	AMPK	2	Val 96	0	—	0	—
白术内酯 III	AMPK	1	Val 24	0	—	0	—

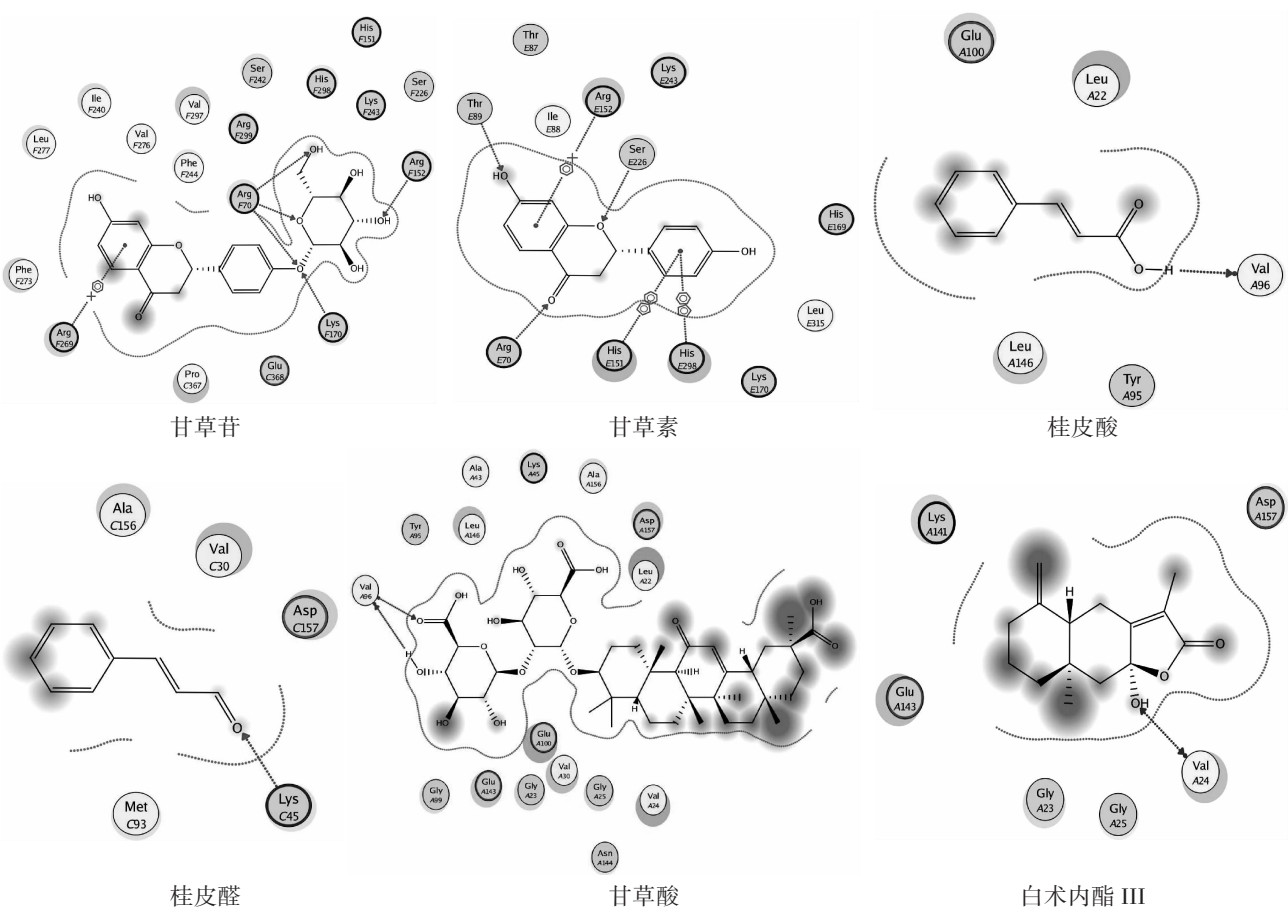


图 1 零桂术甘汤体外特征性化学成分与 AMPK 靶点氨基酸残基对接情况

表 3 零桂术甘汤体外特征性化学成分与 SIRT1 靶点的对接情况

特征性化学成分	靶点	氢键数目	氨基酸残基	芳烃-阳离子作用数目	氨基酸残基
甘草苷	SIRT1	7	Arg 466, Ser 275,Asn 465, Ser 442,Ser 441, Gln 345, Asn346	1	Arg 466
甘草素	SIRT1	3	Asn 456, Cys 482,Asp 481	1	Arg 466
桂皮酸	SIRT1	1	Ala 262	0	—
桂皮醛	SIRT1	1	Ala 262	0	—
甘草酸	SIRT1	11	Gly 415, Glu 416,Phe 413, Arg 446, Val 412, Ser 441, Leu 443, Ser 442, Glu 467, Asn 465	0	—
白术内酯 III	SIRT1	1	Val 412	0	—

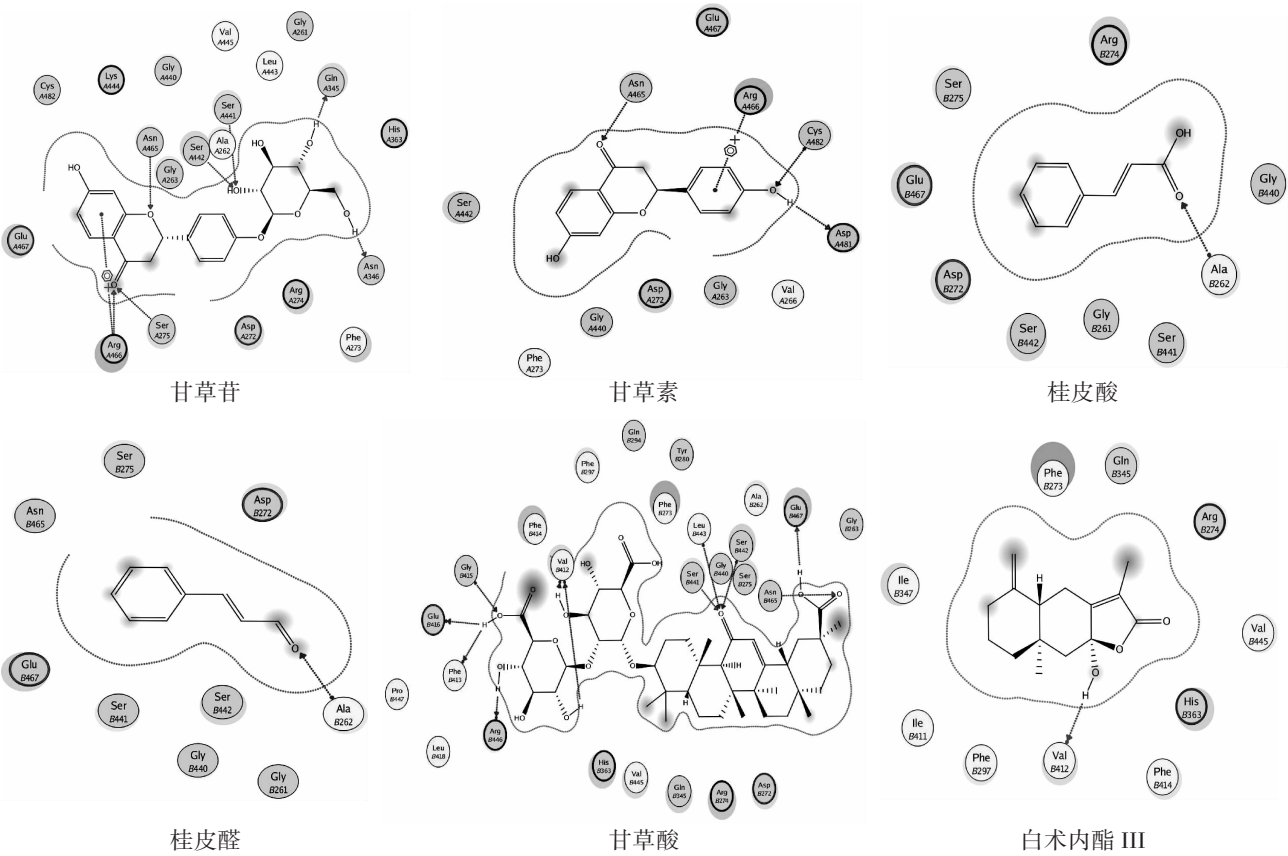


图 2 苓桂术甘汤体外特征性化学成分与 SIRT1 靶点氨基酸残基对接情况

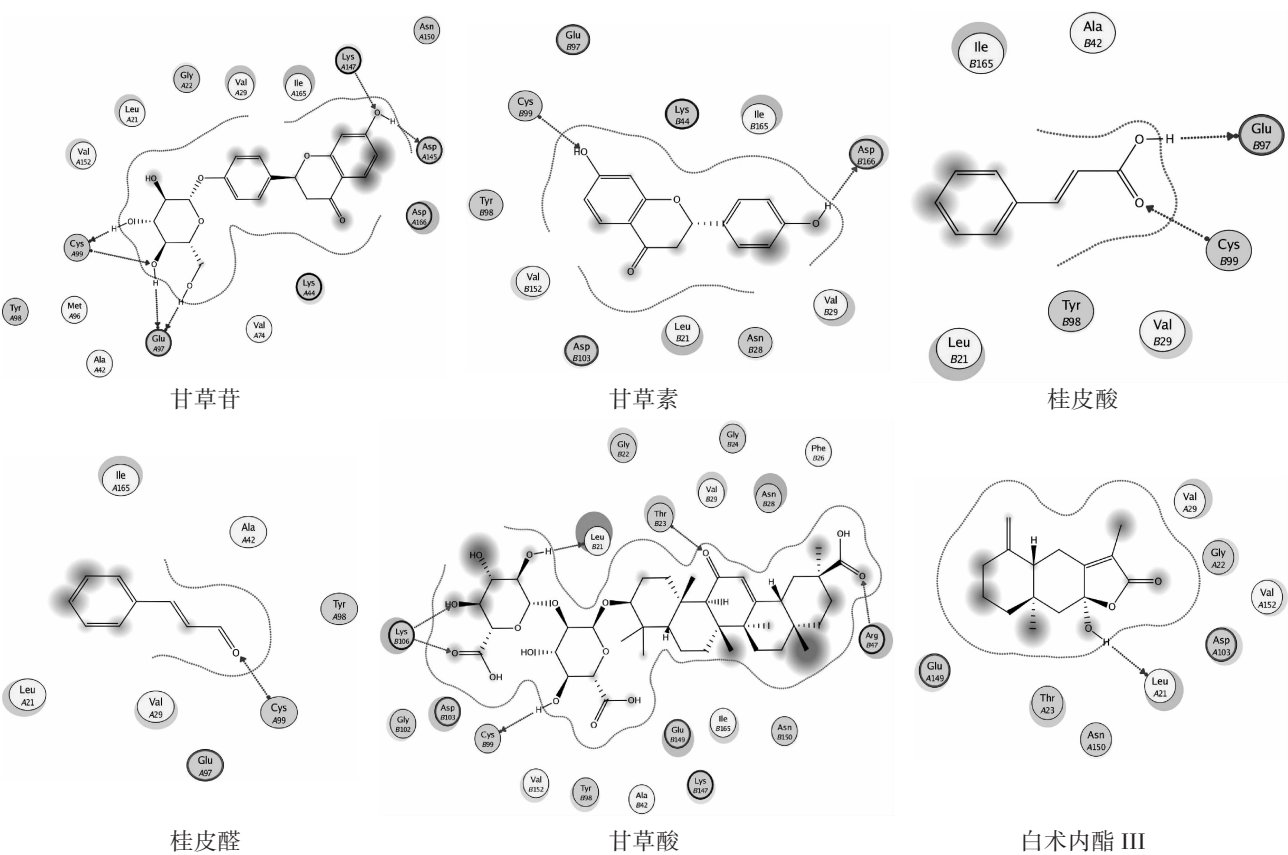


图 3 苓桂术甘汤体外特征性化学成分与 IKKβ 靶点氨基酸残基对接情况

表 4 苓桂术甘汤体外特征性化学成分与 IKKβ 靶点的对接情况

特征性化学成分	靶点	氢键数目	氨基酸残基
甘草苷	IKKβ	6	Cys 99, Glu 97, Lys 147, Asp 145
甘草素	IKKβ	2	Cys 99, Asp166
桂皮酸	IKKβ	2	Cys 99, Glu 97
桂皮醛	IKKβ	1	Cys99
甘草酸	IKKβ	6	Lys 106, Leu 21, Thr 23, Arg 47, Cys 99
白术内酯 III	IKKβ	1	Leu 21

3 讨论

中药复方发挥临床疗效的关键在于中药中的有效化学成分可以与相应靶点结合，进而发挥药理作用,其本质是药物分子与受体的氨基酸残基结合形成药物-受体复合物，这其中的相互作用主要有静电作用、离子键、分子间氢键和范德华力等。而分子对接技术就是运用模拟软件虚拟的将蛋白质受体和药物小分子进行结合,主要通过几何匹配和能量匹配相互识别,实现药物筛选相应靶点的过程^[14]。中药复方具有多组分、多途径、多靶点的特点,使得研究中药的作用机制研究较为复杂,呈现出中药组分越多,作用于机体不同途径的靶点也越多^[15],因此,可通过分子对接对中药复方的作用机制进行预测后,进一步通过实验方法验证其作用机制。

AMPK 是一种进化保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在维持细胞和机体能量平衡中发挥重要作用^[16],在正常和缺血条件下心脏代谢的调节因子。AMPK 在心脏肥大、炎症反应和纤维化中产生重要作用^[17]。AMPK 可通过激活沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1, SIRT1)、过氧化物酶体增植物激活受体 γ 共激活因子-1α (PPARγ coactivator-1 α/β, PGC-1α)、叉头蛋白 3α(FoxO3α)和 p300 等抗炎信号途径来控制炎症的发生和发展^[18-19]。沉默信息调节因子 2(SIR2)相关蛋白(Sirtuin)能够催化组蛋白与非组蛋白赖氨酸残基的去乙酰化^[20]。在哺乳动物中,SIR2 蛋白共有 7 个同源的成员 (SIRT1-SIRT7),SIRT1 是被发现最早也是被研究得最多的 SIRT 家族成员,存在于细胞核与胞浆中,在 DNA 修复和抗炎反应等方面发挥作用,被认为是众多心血管疾病的潜在治疗位点^[21]。AMPK 是一个 SIRT1 的

激动剂,AMPK 能促进 NAD⁺合成限速酶烟酰胺磷酸核糖转移酶 (NAM phosphoribosyl-transferase, Nampt) 的转录及活性的升高,增加细胞 [NAD⁺]/[NADPH]水平,介导 SIRT1 激活,发挥抗炎作用^[22]。SIRT1 途径是 AMPK 抗炎的主要途径,SIRT1 对炎症反应的调控与 NF-κB 通路的修饰有关。核转录因子-κB(NF-κB)的功能可以调控机体防御、组织损伤、应激及炎症过程中相关基因的表达^[23]。具体而言:(1)SIRT1 可通过对 NF-κB p65 亚基的 Lys310 氨基酸残基去乙酰化,进而抑制 NF-κB 转录活性;(2)通过降低 NF-κB 上游的多种蛋白激酶如 NF-κB 抑制蛋白 (inhibitory nuclear factor-κB, IκB)、IκB 激酶 (IκB kinase, IKK) 等的活性,抑制 NF-κB 磷酸化发挥抗炎作用^[24]。因此,苓桂术甘汤可通过激活 AMPK,上调 SIRT1 的表达水平,调节 NF-κB 炎症相关蛋白的活性,下调其下游相关炎症因子的表达,从而抑制炎症反应。

近期课题组对苓桂术甘汤抗炎机制研究结果表明,体内实验结果显示苓桂术甘汤抑制心室重构的作用机制与抑制心肌组织 IKK/IκB/NF-κB 信号通路的过度激活有关,可降低心肌炎性细胞因子 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的过度表达^[5];体外实验结果显示苓桂术甘汤含药血清可通过上调 IKK-β,减少磷酸化的 IKK-β 生成,阻止 IκB-α 磷酸化,抑制 NF-κBp65 解离及核转移,降低 NF-κBp65 蛋白表达,干预下游靶分子的转录调控,减少 TNF-α、IL-1、IL-6 生成^[6]。即苓桂术甘汤抑制心室重构的作用机制与其抑制心肌组织 NF-κB 信号通路过度激活有关,而对于其上游 AMPK/SIRT1 信号通路尚未研究。本文利用分子对接技术,结果发现苓桂术甘汤中的主要特征性化学成分对 AMPK/SIRT1/NF-κB 炎症信号通路中的关键靶点 AMPK、SIRT1、IKKβ 具有较好的结合,主要是分子间的氢键和 π-π 共轭,可以推测苓桂术甘汤可能通过作用于 AMPK/SIRT1/NF-κB 信号通路发挥抗炎作用,为揭示苓桂术甘汤防治慢性心力衰竭的抗炎作用机制提供理论依据。后期将会运用药理学方法采用体内外相结合的方法,对预测的 LGZGD 可能作用于 AMPK/SIRT1/NF-κB 炎症信号通路的作用机制进行验证,为苓桂术甘汤防治慢性心力衰竭的抗炎作用机制提供实验依据。

参考文献:

- [1] 桑方方,黄金玲. 苓桂术甘汤的临床应用进展[J]. 中医药临床杂志,2010,22(7):619-621.
- [2] 黄金玲,桑方方,王桐生,等. 苓桂术甘汤对充血性心衰竭大鼠心脏指数与血流动力学的影响 [J]. 安徽中医学院学报,2009,28(5):58-61.
- [3] 周鹏,黄金玲,汪婷婷,等. 基于 CiteSpace 软件研究苓桂术甘汤知识图谱的可视化分析 [J]. 长江大学学报(自科版),2018,15(8):1-3.
- [4] 许闪,黄金玲,王靓,等. 苓桂术甘汤含药血清对 TGF- β 1 诱导的大鼠心肌细胞 H9c2 中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的影响[J]. 云南中医学院学报,2015,38(6):1-3.
- [5] 施慧,许闪,王靓,等. 苓桂术甘汤调节心室重构模型大鼠心肌组织 NF- κ B 信号通路的分子机制研究 [J]. 中药材,2017,40(3):680-683.
- [6] 施慧,王靓,黄金玲,等. 苓桂术甘汤含药血清对脂多糖诱导大鼠心肌细胞 IKK/I κ B/NF- κ B 信号通路蛋白表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2017,37(10):1215-1219.
- [7] 关宏伟,徐丽君,董慧. 反向分子对接技术在中药作用靶点预测、有效成分筛选及作用机制探索中的应用[J]. 中国中药杂志,2017,42(23):4537-4541.
- [8] WANG P, WANG B, XU J, et al. Detection and chemical profiling of Ling-Gui-Zhu-Gan decoction by ultra performance liquid chromatography-hybrid linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry [J]. J Chromatogr Sci, 2015,53(2):263-273.
- [9] LANGENDORF C G, NGOEI K R, SCOTT J W, et al. Structural basis of allosteric and synergistic activation of AMPK by furan-2-phosphonic derivative C2 binding[J]. Nat Commun,2016(7):10912.
- [10] ZHAO X, ALLISON D, CONDON B, et al. The 2.5 angstrom crystal structure of the SIRT1 catalytic domain bound to nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) and an indole(EX527 analogue)reveals a novel mechanism of histone deacetylase inhibition [J]. J Med Chem,2013,56(3):963-969.
- [11] LIU S, MISQUITTA Y R, OLLAND A, et al. Crystal structure of a human I kappa B kinase beta asymmetric dimer[J]. J Biol Chem,2013,288(31):22758-22767.
- [12] MAIER J K, LABUTE P. Assessment of fully automated antibody homology modeling protocols in molecular operating environment[J]. Proteins,2014,82(8):1599-1610.
- [13] 崔国祯,陈言,郭琳,等. 丹参素抗血小板凝聚作用的靶点研究[J]. 中药新药与临床药理,2017,28(4):450-453.
- [14] 李洋,夏厚林,周厚琴,等. 基于分子对接技术预测人面子叶中黄酮成分抗菌作用靶点[J]. 中国医院用药评价与分析,2016,16(10):1303-1307.
- [15] 吴佳妮,郭书文,陈曦,等. 益气活血方分子作用于心肌缺血疾病靶点的网络药理学研究 [J]. 中华中医药杂志,2016,31(2):467-471.
- [16] 姚烽,汲广岩,张力. 腺苷酸活化蛋白激酶:炎症调控新靶点[J]. 生理学报,2012,64(3):341-345.
- [17] FENG Y, ZHANG Y, XIAO H. AMPK and cardiac remodeling[J]. Sci China Life Sci,2018,61(1):14-23.
- [18] CHEN Y, CHEN C, DONG B, et al. AMPK attenuates ventricular remodeling and dysfunction following aortic banding in mice via the Sirt3/Oxidative stress pathway [J]. Eur J Pharmacol,2017,814:335-342.
- [19] KUNDU B K, ZHONG M, SEN S, et al. Remodeling of glucose metabolism precedes pressure overload-induced left ventricular hypertrophy:review of a hypothesis [J]. Cardiology,2015,130(4):211-220.
- [20] FINKEL T, DENG CX, MoSTOSLAVSKY R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins[J]. Nature,2009,460(7255):587-591.
- [21] D'ONOFRIO N, SERVILLO L, BALESTRIERI M L. SIRT1 and SIRT6 signaling pathways in cardiovascular disease protection [J]. Antioxid Redox Signal,2018,28(8):711-732.
- [22] FULCO M, CEN Y, ZHAO P, et al. Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt[J]. Dev Cell,2008,14(5):661-673.
- [23] KONDYLIS V, KUMARI S, VLANTIS K, et al. The interplay of IKK,NF- κ B and RIPK1 signaling in the regulation of cell death,tissue homeostasis and inflammation [J]. Immunol Rev,2017,277(1):113-127.
- [24] ZHANG H, SHAN Y, WU Y, et al. Berberine suppresses LPS-induced inflammation through modulating Sirt1/NF- κ B signaling pathway in RAW264. 7 cells[J]. Int Immunopharmacol,2017,52:93-100.