

- [J]. 亚太传统医药, 2017, 13(10): 132-133.
- [9] Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, et al. STRINGv10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43 (Database issue): D447-D452.
- [10] 王献红, 王赞华, 张建锋, 等. 红花黄色素对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(19): 3017-3020.
- [11] 李丹君, 周敬群. β_2 肾上腺素能受体基因多态性与冠心病相关性的研究进展[J]. 海南医学, 2013, 24 (24): 3662-3664.
- [12] Small K M, McGraw D W, Liggett S B. Pharmacology and physiology of human adrenergic receptor polymorphisms [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2003, 43: 381-411.
- [13] 李永胜, 王 进, 王照华, 等. 丹参酮 II_A 对主动脉血管内皮细胞功能损伤的保护机制[J]. 中国急救医学, 2007, 27(8): 720-723.
- [14] 杨柳清, 李 亮, 衡先培, 等. 丹瓜方对糖尿病动脉粥样硬化大鼠炎症标志物及内皮细胞功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(6): 692-698.
- [15] 胡元佳. 丹参川芎嗪联合大黄承气汤在急性脂源性胰腺炎的疗效观察[J]. 中国实用医药, 2020, 15(23): 146-149.
- [16] 任智敏. 丹参川芎嗪注射液联合美托洛尔治疗冠心病心绞痛的疗效观察[J]. 现代药物与临床, 2016, 31 (11): 1712-1715.
- [17] 骆杰炉, 梁 俭, 梁文能. 红花黄色素 A 调控核受体 TR3 胞内移位抑制氧化应激对心肌细胞的损伤[J]. 中成药, 2020, 42(6): 1462-1467.
- [18] 沈志方. 注射用红花黄色素联合美托洛尔治疗冠心病心力衰竭的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2018, 33 (6): 1357-1360.
- [19] 封 亮, 柯仲成, 汪 刚, 等. 赤芍苷组分抗缺血缺氧损伤的代表性成分的发现与验证[J]. 药学报, 2018, 53 (12): 1954-1962.
- [20] 许惠玉, 徐广友, 陈志伟, 等. 赤芍总苷诱导肿瘤细胞凋亡机制的研究[J]. 中医药学刊, 2005, 23(10): 1798-1800.
- [21] 王建发, 赵国安. 芍药苷通过 cAMP-PKA 信号通路对心肌梗死大鼠保护作用的实验研究[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2018, 10(4): 479-483.
- [22] 杨志宏, 梅 超, 何雪辉, 等. 降香化学成分、药理作用及药代特征的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(11): 1679-1683.
- [23] 朱其恩, 赵西金. 自拟桃仁降香汤治疗冠心病的体会[J]. 中国中医急症, 2016, 25(3): 559-560.

基于分子对接的玉屏风风中端粒酶 TERT 激动剂的虚拟筛选

汤 建¹, 朱锐灵², 赵康琦¹, 夏海平^{3*}, 闻崇炜²

(1. 亳州学院中药学院, 安徽 亳州 236800; 2. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013; 3. 江苏大学附属四院神经内科, 江苏 镇江 212001)

摘要:目的 发现玉屏风中激活端粒酶逆转录酶 (TERT) 的小分子化合物, 基于分子对接技术初步解释玉屏风抗衰老的作用机制。**方法** 检索玉屏风中的化学成分, 确定 68 个小分子化合物 (配体); 采用 AutoDock Vina 软件将这些化合物与 TERT 对接, 根据打分值虚拟筛选玉屏风中潜在的激活端粒酶 TERT 的化学成分。**结果** 68 个化合物的对接分值与结构有明显的相关性, 异黄酮类及异黄烷醇类化合物具有最强的结合力, 其中毛蕊异黄酮苷和芒柄花苷与 TERT 对接打分值均为 -10.2 kcal/mol; 色原酮类化合物也具有较强的结合力; 大部分白术内酯类和香豆素类具有中等强度的结合力; 黄芪皂苷类化合物结合力普遍偏弱, 在 -7.0~-7.4 kcal/mol。**结论** 玉屏风的异黄酮类和色原酮类物质对激活端粒酶可能起关键作用。

关键词: 玉屏风; 分子对接; 抗衰老; 端粒酶; TERT

中图分类号: R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)06-2041-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.06.057

收稿日期: 2020-12-24

基金项目: 江苏省镇江市重点研发计划 (SH2021060); 中药原料产品研发安徽普通高校重点实验室 (KLAHEI18032); 安徽省亳州市第四批产业创新团队建设项目 (BZI-4002)

作者简介: 汤 建 (1977—), 男, 博士, 教授, 从事中药活性成分和分子药理学研究

* 通信作者: 夏海平 (1978—), 女, 硕士, 副主任医师, 从事防治脑血管疾病研究

玉屏风系中医扶正固本的经典名方,由黄芪、白术和防风组成,诸药合参,药简效宏^[1],具有抗衰老的可能性^[1-2]。玉屏风能明显地延长果蝇的平均寿命,对 BJ 细胞中的端粒酶有较好的激活作用,其抗衰老作用可能与端粒酶激活有关^[3]。玉屏风中化学成分繁杂,关键活性成分和激活端粒酶的机制尚不明确。

端粒酶是端粒复制所必须的一种特殊的 DNA 聚合酶,若激活端粒酶,可增加细胞分裂次数,从而延长细胞寿命^[4-5]。端粒酶逆转录酶(TERT)是端粒酶的限速亚单位,是端粒酶活性调节的关键基因,针对 TERT 的活性成分筛选是发现端粒酶激动剂(抗衰老)或抑制剂(抗癌)的有效方法^[6-7]。目前靶向端粒酶或 TERT 的研究以筛选端粒酶抑制剂居多^[7],而激动剂的研究较少,环黄芪醇是目前唯一被公认的通过激活端粒酶发挥抗衰老作用的天然膳食补充剂^[5-6]。为发现更多潜在的抗衰老活性化合物,以端粒酶 TERT 基因为靶蛋白,采用分子对接技术从传统中药玉屏风虚拟筛选激动 TERT 的活性成分。

分子对接是利用计算机软件模拟小分子配体与大分子受体之间活性位点的最佳结合模式的技术,在中药活性成分筛选和靶点确证方面有着广泛的应用前景^[8-9],与网络药理学联用在中药多组分、多途径发挥药效的解析工作中发挥了重要作用^[10]。本研究采用 AutoDock Vina 软件^[11],将检索到的玉屏风中的小分子化合物与端粒酶 TERT 基因进行分子对接,根据打分虚拟筛选出潜在的端粒酶激活剂,为阐明玉屏风的抗衰老活性机制提供科学依据。

1 材料

采用 ChemOffice2020 程序(美国 PerkinElmer 公司)中

的 ChemDraw 和 Chem 3D 模块、AutoDock Tools1.5.6 和 AutoDock Vina(斯克利普斯研究所)、Pymol 1.8(美国 DeLano Scientific LLC 公司)和 Discovery Studio 2017R2 client(美国 BIOVIA 公司)。

2 方法

2.1 靶蛋白 TERT 结构的获取和预处理 通过检索搜索 PDB 结构数据库(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>),获取靶点蛋白 TERT 复合物(PDB ID: 5CQG),将靶点蛋白依次导入 AutoDock Tools1.5.6 中,删除原配体 BIBR1532,水分子,加氢,保存为 pdbqt 格式,以备分子对接。

2.2 化合物(配体)库的建立 通过检索 PubChem 等数据库^[12]和相关文献,从玉屏风的水煎剂以及 3 种原药材黄芪、白术和防风中共收集 68 个化合物(配体),主要为三萜皂苷、黄酮、白术内酯、色原酮、香豆素等化合物,见表 1,ChemDraw 软件绘制分子结构,并用 Chem3D 转化成三维结构,MM2 力场进行最小能量优化,结果保存为 mol2 格式。AutoDock Tools1.5.6 对小分子进行加氢,计算 Gasteiger 电荷,合并非极性氢,最终保存为 pdbqt 格式,以备分子对接。

2.3 配体-靶蛋白的分子对接 在对接前,须确定验证对接过程中参数设置的合理性。首先用 AutoDock Tools 1.5.6 软件将靶点蛋白晶体复合物中的原配体取出,利用 AutoDock Vina 与受体重新对接,其结合能打分值为阈值,同时分析对接构象和原蛋白晶体结构中的构象的重叠度,通常认为均方根偏差(RMSD)在 2Å 范围内。

表 1 玉屏风中 68 个小分子化合物

编号	化合物名称	编号	化合物名称	编号	化合物名称	编号	化合物名称
1	黄芪皂苷 I	18	大豆皂苷 I	35	白术内酯 V	52	和汉黄芩素
2	黄芪皂苷 II	19	黄芪皂苷 VIII	36	8β-甲氧基白术内酯 I	53	补骨脂素
3	黄芪皂苷 III	20	毛蕊异黄酮苷	37	8β-乙氧基白术内酯 I	54	欧前胡素
4	黄芪皂苷 IV	21	毛蕊异黄酮	38	白术内酯 III	55	异欧前胡素
5	黄芪皂苷 V	22	芒柄花苷	39	双白术内酯	56	异补骨脂素
6	黄芪皂苷 VI	23	芒柄花素	40	双表白术内酯	57	香柑内酯
7	黄芪皂苷 VII	24	红车轴草素-7-O-葡萄糖苷	41	升麻苷	58	花椒毒素
8	异黄芪皂苷 I	25	红车轴草素	42	升麻素	59	珊瑚菜内酯
9	异黄芪皂苷 II	26	黄芪异黄酮醇	43	5-O-甲基维斯阿米醇苷	60	东莨菪亭
10	异黄芪皂苷 IV	27	黄芪异黄酮苷	44	5-O-甲基维斯阿米醇	61	秦皮啶
11	新黄芪皂苷 I	28	isomucronulatol-7, 2'-di-O-glucoside	45	亥茅酚苷	62	异秦皮啶
12	乙酰黄芪皂苷	29	(-)-methylnissolin	46	亥茅酚	63	紫花前胡苷元
13	膜荚黄芪皂苷 I	30	(-)-methylnissolin-3-O-glucoside	47	3-乙酰基亥茅酚	64	异紫花前胡苷
14	环黄芪苷 E	31	苍术酮	48	3-当归酰基亥茅酚	65	石防风素
15	agroastragaloside I	32	白术内酯 I	49	divaricatol	66	川白芷内酯
16	agroastragaloside II	33	白术内酯 II	50	防风色原酮	67	人参炔醇
17	astramembranoside B	34	白术内酯 IV	51	undulatoside A	68	法卡林二醇

分子对接的晶格中心设置为 $x = 24.667$, $y = 6.99$, $z = -31.485$ (nm), 对接空间(Grid Box): $30\text{ nm} \times 30\text{ nm} \times 30\text{ nm}$, 能量范围为 4。利用 Vina 软件进行半柔性对接(对接过程中受体是刚性,配体是柔性,可在一定范围内变化),得到配体分子与靶点蛋白(PDB ID: 5CQG)对接后

的能量打分值。

3 结果

通过分子对接,均选择序号 1 的打分值(dist from rmsd l. b. 值和 best mode rmsd u. b. 值均为 0),见表 2。发现 68 个化合物的对接分值与结构有明显的相关性。其中异黄酮

类 (20~25) 以及异黄酮醇类 (26~27) 等化合物具有最强的结合力 (≥ -9.0 kcal/mol); 色原酮类化合物 (41~52) 具有较强的结合力 ($-8.1 \sim -9.1$ kcal/mol); 大部分白术内酯类和香豆素类具有中等强度的结合力, 但双白术内酯 (39) 和双表白术内酯 (40) 与 TERT 的结合力较强, 分值为 -9.2 、 -9.9 kcal/mol。紫花前胡苷元 (63) 和异紫花前胡苷 (64) 也表现出较高的结合力, 分值分别为 -9.0 、 -9.5 kcal/mol; 黄芪皂苷类化合物 (1~19) 结合力普遍偏弱, 大部分黄芪皂苷物质的分值在 $-7.0 \sim -7.4$ kcal/mol。所有化合物与 TERT 的对接分值均低于原配体 BIBR1532 (-10.7 kcal/mol)。

表 2 化合物与受体蛋白 TERT 的结合能 (kcal/mol)

编号	结合能	编号	结合能	编号	结合能	编号	结合能
1	-7.4	18	-6.7	35	-8.1	52	-8.8
2	-7.3	19	-7.8	36	-7.6	53	-8.2
3	-7.4	20	-10.2	37	-7.4	54	-8.1
4	-7.1	21	-9.5	38	-8.6	55	-8.0
5	-7.1	22	-10.2	39	-9.2	56	-7.8
6	-7.0	23	-9.3	40	-9.9	57	-7.7
7	-7.0	24	-9.6	41	-8.5	58	-7.9
8	-7.3	25	-9.1	42	-8.5	59	-7.7
9	-7.4	26	-9.0	43	-8.5	60	-7.2
10	-7.4	27	-9.3	44	-9.0	61	-6.8
11	-7.4	28	-8.3	45	-9.1	62	-6.8
12	-7.0	29	-8.4	46	-8.3	63	-9.0
13	-7.4	30	-8.7	47	-8.4	64	-9.5
14	-7.2	31	-7.4	48	-8.9	65	-8.8
15	-7.7	32	-8.3	49	-8.1	66	-8.1
16	-7.0	33	-8.6	50	-8.5	67	-6.8
17	-7.4	34	-8.0	51	-8.5	68	-5.9

注: 环黄芪醇和 BBIR1532 与 5CQG 的结合能分别为 -7.7 和 -10.9 kcal/mol。

玉屏风 68 个化合物中, 打分值最高的是毛蕊异黄酮苷 (20) 和芒柄花苷 (22)。3D 图显示毛蕊异黄酮苷的分子卡在蛋白 5CQG 的凹槽内 (图 1A)。2D 图中可见化合物与残基 GLY553、PHE478 和 TRP498 形成范德华力; 糖片段的 3-OH 与残基 ARG557、GLY495 形成氢键; 黄酮苷元的 A、C 环与残基 MET482 之间, B 环与残基 MET483 之间形成 π -疏键; A、C 环与残基 TYR551 之间, A、B、C 环与残基 PHE494 之间形成 π - π 键; 分子还与残基 LEU554、ILE497 和 ILE550 形成 π -烷基键 (图 1B)。图 1C 显示, 芒柄花苷的分子与蛋白 5CQG 有着类似的结合方式, 芒柄花苷与残基 PHE478、GLY495、ARG557 和 GLY553 形成范德华力; 糖片段的 3-OH 与残基 TRP498 形成氢键; 黄酮苷元的 A、C 环与残基 MET482 之间, B 环与残基 MET483 之间形成 π -疏键; A、C 环与残基 TYR551 之间, A、B、C 环与残基 PHE494 之间形成 π - π 键; 分子还与残基 ILE497、LEU554 和 ILE550 形成 π -烷基键 (图 1D)。毛蕊异黄酮苷和芒柄花苷与蛋白的结合紧密, 存在着作用明显的作用力, 这也很好地解释了这两个化合物与 TERT 的结合力最强的原因。

4 讨论

玉屏风为扶正固本经典名方, 对机体的免疫功能具有双向调节作用, 在抗疲劳、抗衰老等方面均具有良好的应用前景。原药材黄芪的主要活性成分为皂苷、黄酮和多糖; 白术的化学成分主要是挥发油、内酯类化合物、苷类化合物以及多糖; 防风的化学成分主要为色原酮类化合物、香豆素、挥发油、聚炔和多糖等。虽然通过色谱手段分离鉴定了大量的天然小分子化合物, 其中白术中分离得到的倍半萜类化合物就有 100 多种, 但玉屏风的水煎剂中通过 LC-MS 等手段, 仅仅发现了 10 余种成分, 其中白术药材中只有 3 种成分进入水煎剂。以玉屏风水煎剂中的 15 个化合物

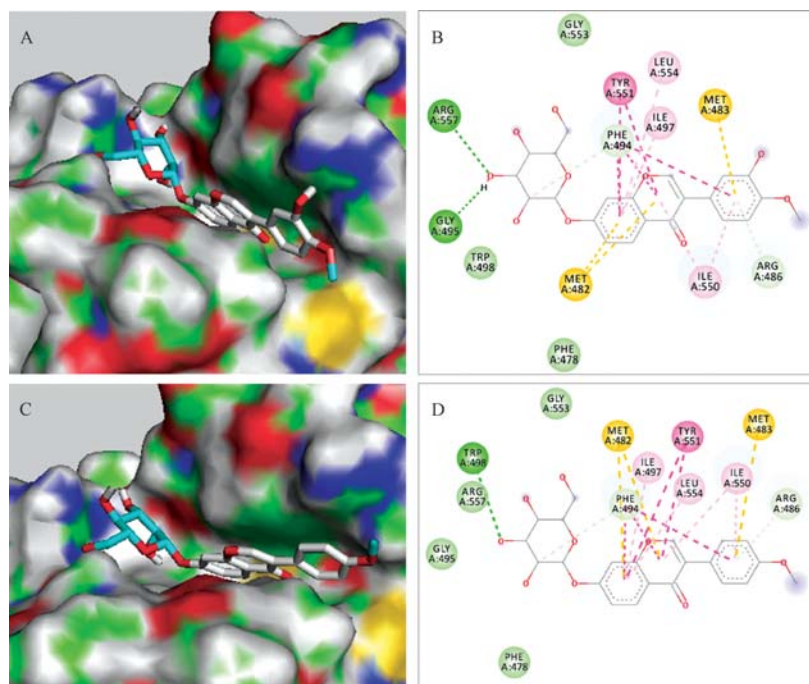


图 1 毛蕊异黄酮苷 (A、B) 和芒柄花苷 (C、D) 与 TERT (5CQG) 的对接示意图

为主要成分,经适当扩充,选择了 68 种小分子化合物进行研究,其中 30 种源于黄芪,10 种源于白术,28 种源于防风。虽然多糖成分具有良好的免疫增强等活性,但其化学结构尚不能确定,不适合进行分子对接^[9]。目前 PDB 数据库中还未收录人类端粒酶逆转录酶(hTERT)的结晶结构,因此以高度近似的昆虫赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*) TERT 基因为模板进行分子对接^[7]。又因目前尚无 TERT 基因与其激活剂的结晶复合物,故本文中使用赤拟谷盗 TERT 基因与抑制剂 BIBR1532 结晶复合物(PDB ID: 5CQG)作为对接蛋白^[7,13]。

68 个化合物中,有些化合物与 TERT 对接打分值和实验药理活性的差距较大。环黄芪醇能够明显地增加 TERT 表达而激活端粒酶^[5-6]。前期筛选端粒酶激活剂研究中发现,黄芪甲苷具有温和的激活端粒酶的活性,能促进 BJ 细胞生长,只是弱于其苷元环黄芪醇。但本文中环黄芪醇与 TERT 对接的分值为-7.7 kcal/mol,其糖苷化合物(黄芪甲苷)的对接分值仅为-7.1 kcal/mol,属中等强度。人参炔醇和法卡林二醇在细胞模型中均表现出良好的细胞毒活性^[14-15],推测其与 TERT 可能有较高的结合力,但分子对接结合力较弱,分值仅为-6.8、-5.9 kcal/mol。

对接的分值较高,说明化合物与 TERT 的结合力较强,但不能确定是激活剂还是抑制剂。如毛蕊异黄酮的结合力为-10.2 kcal/mol,但实验证明,该物质既有良好的抗肿瘤活性,又有显著的抗衰老活性^[16]。药效的表达不是简单的抑制或激活,而是一个复杂的调节过程。

综上所述,玉屏风具有良好的激活端粒酶能力,在抗衰老等方面具有良好的应用潜力,其活性物质可能通过 TERT 激活端粒酶。分子对接只能预测化合物与靶酶 TERT 的结合力,但这些化合物是激动剂还是抑制剂还需要细胞或动物实验确证。

参考文献:

- [1] 金哲峰,王 聪.难病奇方系列丛书—玉屏风散[M].北京:中国医药科技出版社,2010:4-12.
- [2] 朱晓奕,洪 庆,徐卫东,等.经典方玉屏风散防治老年痴呆症探讨[J].亚太传统医药,2018,14(1):74-76.
- [3] 朱晓奕,洪 庆,朱锐灵,等.玉屏风对果蝇抗衰老和激活 BJ 细胞端粒酶活性的作用[J].中成药,2019,41(10):2479-2483.

- [4] Jaskelioff M, Muller F L, Paik J, et al. Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase deficient mice [J]. *Nature*, 2011, 469(7328): 102-106.
- [5] Harley C B, Liu W, Flom P L, et al. A natural product telomerase activator as part of a health maintenance program: Metabolic and cardiovascular response [J]. *Rejuvenation Res*, 2013, 16(5): 386-395.
- [6] Rosen J, Jakobs P, Ale-Agha N, et al. Non-canonical functions of telomerase reverse transcriptase-impact on redox homeostasis [J]. *Redox Biol*, 2020, 34, 101543.
- [7] Baginski M, Serbakowska K. *In silico* design of telomerase inhibitors[J]. *Drug Discov Today*, 2020, 25(7): 1213-1222.
- [8] 朱锐灵,沈 悦,马飞鸿,等.分子对接技术在中药抗炎活性成分筛选和作用机制研究中的应用[J].中国药理学与毒理学杂志,2018,32(6):497-506.
- [9] 李志立,杨 冰,翟艳敏,等.基于分子对接技术虚拟筛选红花中抗心肌缺血活性组分[J].中国中药杂志,2020,45(12):2881-2890.
- [10] 詹群璋,黄英杰,林树红,等.基于网络药理学和分子对接的玉屏风散预防新型冠状病毒肺炎(COVID-19)活性化合物的研究[J].中草药,2020,51(7):1731-1740.
- [11] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading[J]. *J Comput Chem*, 2010, 31(2):455-461.
- [12] 谢 清,洪 庆,朱晓奕,等.玉屏风散及原药材化学物质基础的研究进展[J].中国野生植物资源,2018,37(2):40-42;49.
- [13] Bryan C, Rice C, Hoffman H, et al. Structural basis of telomerase inhibition by the highly specific BIBR1532 [J]. *Structure*, 2015, 23(10):1934-1942.
- [14] Lee J H, Leem D G, Chung K S, et al. Panaxydol derived from panax ginseng inhibits G1 cell cycle progression in non-small cell lung cancer via upregulation of intracellular Ca²⁺ levels[J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(11):1701-1707.
- [15] Jin H R, Zhao J, Zhang Z, et al. The antitumor natural compound falcariindiol promotes cancer cell death by inducing endoplasmic reticulum stress [J]. *Cell Death Dis*, 2012, 3(8):e376.
- [16] 张冬青,王海宝,王淑芳,等.毛蕊异黄酮生物活性的研究进展[J].中国中药杂志,2015,40(22):4339-4345.