

基于分子对接方法进行金银花、连翘抗流感病毒 H7N9 的研究^{*}

罗旋 沈霞 胡本祥^{**}

(陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046)

摘要:目的 从金银花-连翘药对中寻找能够应对流感病毒 H7N9 的潜在抑制剂。方法 以 H7N9 神经氨酸酶 N9 及其两种突变型 N9-R294K 和 N9-R292K 为受体, 以金银花-连翘中 24 个化合物为配体, 应用分子对接方法研究配体与受体之间的相互作用关系。结果 研究发现金银花-连翘药对中 19 个成分与 H7N9 神经氨酸酶发生作用。其中 M1、M4、M5、M7、M8、M10、M12、M14、M16、M17、M19、M22、M23 等小分子是金银花-连翘药对作用 H7N9 神经氨酸酶的主要化合物。分子对接结果显示 M4 和 M22 与 N9、N9-R294K、N9-R292K 的对接分值分别为 9.86、11.42、8.02、8.69、11.15、7.24; M5、M10 与 N9-R294K 对接得分为 10.36、8.36, 均显著高于对照组奥司他韦羧酸盐。结论 金银花-连翘药对能够通过分子间的协同效应有效防治 H7N9 流感病毒。M4(连翘酯苷 A)和 M22(亚油酸乙酯)可以作为流感病毒 H7N9(包括两种突变型)的潜在抑制剂进行进一步研究开发。

关键词: H7N9; 突变; 分子对接; 金银花、连翘; 抑制剂

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-0571(2016)02-0075-04

DOI: 10.13424/j.cnki.mtem.2016.02.027

Molecular Docking – based Study on the Anti – influenza H7N9 of *Flos Lonicerae* and *Fructus Forsythiae*

Luo Xuan Shen Xia Hu Benxiang

(Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi, 712046)

Abstract Objective: The purpose of this paper is to find the potential inhibitors of influenza H7N9 from herbal medicine *Flos Lonicerae* and *Fructus Forsythiae*. **Methods:** In this study, we used the general H7N9 neuraminidase (N9) and oseltamivir – resistant neuraminidase including N9 – R294K and N9 – R292K mutations as acceptors and employed the 24 small molecules in *Flos Lonicerae* and *Fructus Forsythiae* as ligands to perform the molecular docking for exploring the binding abilities between these small molecules and neuraminidase. **Results:** According to the docking scores (> = 6), we found the 19 components in the herbs showed obvious synergistic effect to fight influenza H7N9. Comparing the docking results with oseltamivir. M1, M4, M5, M7, M8, M10, M12, M14, M16, M17, M19, M22, M23 showed high scores which could be as the main composition of *Flos Lonicerae* and *Fructus Forsythiae* to inhibit H7N9. Among these molecules, M4, M5, M10, M22 present oseltamivir – comparable high scores with neuraminidase, but M4 and M22

* 基金项目: 陕西省科技厅项目(2014JQ4148); 浙江省高校生物学重中之重学科 2015 年开放基金(2015D12)。

** 通信作者: 胡本祥(1960-), 男, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 生药质量控制与研究。E-mail: hubenxiang@tom.com.

showed interaction with 3 different subtypes of N9. **Conclusion:** *Flos Lonicerae* and *Fructus Forsythiae* can inhibit H7N9 neuraminidase including drug-resistant mutants through synergistic effect and the small molecules M4 (Forsythoside A) and M22 (Ethyl linoleate) can be as potential inhibitors for neuraminidase of H7N9.

Keywords H7N9, mutations, molecular docking, *Flos Lonicerae* and *Fructus Forsythiae*, inhibitors

自2013年以来,我国出现了感染人的新型禽流感病毒H7N9^[1],截止2014年6月份,WHO已经确认感染H7N9人数450,死亡165(<http://www.who.int>)。H7N9具有导致流感的大爆发的潜力^[2],引起了全世界的广泛关注。

奥司他韦作为流感病毒神经氨酸酶抑制剂,是防治流感的一线药物^[3],并且对新型流感病毒H7N9也具有抑制作用^[4]。可是随后H7N9对奥司他韦产生了耐药性。研究得知,神经氨酸酶的突变是致流感病毒产生耐药性的主要原因^[5,6],流感病毒H7N9神经氨酸酶的活性腔中292和294位氨基酸位点发生了突变,能够减弱与奥司他韦的相互作用,导致耐药性的发生,产生了R292K-N9和R294K-N9两种突变型^[7,8]。这对于成分单一的药物是很难克服的缺点,我们需要新的思路和方法进行流感病毒抑制剂的探索。

中药防治流感有着悠久的历史。中药不仅仅通过调整机体抗病力而达到防病目的,且能直接作用病毒本身,具有疗效好,副作用少,作用范围广的特点^[9]。现代药理研究表明,金银花、连翘具有抗流感病毒的效果。不论是临床经验还是实验研究,二者相须配伍的抗病毒效果均优于单味药。周伟^[10]发现金银花、连翘组成的药对抗流感病毒H1N1活性成分主要是:隐绿原酸、绿原酸、新绿原酸等。而刑学峰等^[11]对金银花、连翘药对配伍挥发油成分做了GC-MS分析,检测出了31种挥发油成分。然而关于金银花-连翘药对抗流感病毒H7N9的物质基础及其分子机理研究尚未见报道。本研究将采用分子对接及构建分子网络的方法对金银花-连翘药对进行抗H7N9流感病毒的物质基础及分子机制进行初步研究。

1 材料和方法

1.1 分子结构的准备 从RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) 蛋白质数据库中获取H7N9神经氨酸酶结构,包括N9-

R294(PDB code:4MWQ)、N9-R294K(PDB code:4MWW)和N9-R292K(PDB code:2QWE)。将3种神经氨酸酶导入到ADT界面,抽提出其配体,去金属离子和水分子之后,进行加电荷和氢原子的处理,并保存为PDB格式待用,见表1。

表1 金银花-连翘药对中24个成分与H7N9神经氨酸酶对接分值

编号	化学名	Binding free energies (-kcal/mol)		
		4MWW	4MWQ	2QWE
M1	异绿原酸 B Isochlorogenic acid B	6.08	6.42	4.94
M2	奎宁酸 Quinic acid	4.14	4.8	3.93
M3	咖啡酸 Caffeic acid	4.2	5.49	4.53
M4	连翘酯苷 A Forsythoside A	9.86	11.42	8.02
M5	连翘酯苷 B Forsythoside B	10.36	5.74	6.32
M6	芦丁 Rutin	5.75	5.63	6.49
M7	异槲皮素 Isoquercitrin	6.19	5.81	5.19
M8	金丝桃苷 Hyperoside	6.19	5.81	5.21
M9	紫云英苷 Astragaloside	5.31	5.25	5.12
M10	木犀草素 Cynaroside	8.04	7.32	5.66
M11	槲皮素 Quercetin	4.45	4.98	4.99
M12	染料木苷 Genistin	7	6.64	6.95
M13	染料木素 Genistein	2.68	3.62	3.8
M14	连翘苷 Forsythoside	5.79	4.44	7.43
M15	松脂素 Pinoresinol	5.23	5.09	6.6
M16	牛蒡子苷元 Arctigenin	7.08	6.99	7.21
M17	连翘脂素 Phillygenin	6.51	5.19	5.47
M18	新绿原酸 Neochlorogenic acid	4.84	6.53	6.36
M19	隐绿原酸 Cryptochlorogenic acid	5.82	6.27	4.13
M20	异绿原酸 A Isochlorogenic acid A 苯二羧酸二丁基酯	5.49	6.8	4.91
M21	1,2 - Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester	5.7	7.14	4.73
M22	亚油酸乙酯 Ethyl linoleate	8.69	11.15	7.24
M23	马钱子苷 Loganin	6.76	4.43	5.09
M24	绿原酸 Chlorogenic Acid	4.88	6.42	5.6
OTC	奥司他韦羧酸盐 oseltamivir carboxylate	5.78	9.26	6.92

通过初步的分子对接选择了金银花、连翘药对的24种成分进行分子对接研究:

新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、奎宁酸、咖啡酸、连翘酯苷 A、连翘酯苷 B、芦丁、异槲皮苷、金丝桃苷、紫云英苷、木犀草苷、槲皮素、木犀草素、染料木苷、染料木素、连翘苷、牛蒡子苷元、松脂素、马钱子苷以及两种挥发油成分苯二羧酸二丁基酯、亚油酸乙酯(表1)。上述所有成分的结构均从 NCBI compound 数据库中获得,本次研究以神经氨酸酶抑制剂奥司他韦羧酸盐(OTC)对接得分为参照对象。

1.2 配体与靶点的分子对接 本次研究使用 AutoDock 软件进行分子对接,H7N9 神经氨酸酶作为与小分子对接的靶蛋白。甲型流感病毒神经氨酸酶的活性腔是高度保守的。因此对接口袋以活性腔中 8 个氨基酸残基为基准 Arg - 118, Asp - 151, Arg - 152, Arg - 224, Glu - 276, Arg - 292, Arg - 371, and Tyr - 406^[7]。运行 autogrid 计算格点中的能量,运行 Autodock 计算小分子与 N9 间的结合能,把以上步骤得到的文件在 ADT 界面中展开,得到小分子与 N9 的对接打分(表1)。

1.3 构建分子靶标网络 根据对接结果,OTC 的对接分值(score)最低为 5.78,见表1。选择对接得分 score > = 6 的分子导入到 Cytoscape2.8^[12] 中构建分子-靶标相互作用网络。

2 结果与分析

2.1 筛选得到的金银花-连翘药对成分与流感病毒 H7N9 神经氨酸酶 N9 及其两种突变型 N9 - R294K 和 N9 - R292K 的相互作用分析,选择对接得分 score > = 6 的分子,于是从金银花-连翘药对中选择 24 个成分中 19 个能与 N9、N9 - R294K、N9 - R292K 相互作用。为了更清楚的认识,我们构建了分子-靶点网络图分析成分与靶点之间的互作(图1)。其中 11 个分子能够与 4MWQ、4MWW 发生,9 个分子能够与 2QWE 相互作用。M6、M14、M15 只单一作用于 2QWE。其余分子均能与一个以上的靶点发生互作。由此得出金银花-连翘药对中 19 种成分可以通过相互协同与流感病毒 H7N9 作用。

奥司他韦作为流感病毒神经氨酸酶抑制剂是防治流感的有效药物,为了更进一步认识网络,我

们以它的羧酸盐 OTC 与 3 种 N9 对接得分作为参照(表1)。表1中,OTC 与 N9 - R294K(4MWW)对接得分为 5.78。M1、M4、M5、M7、M8、M10、M12、M14、M16、M17、M19、M22、M23 对接得分分别为 6.08、9.86、10.36、6.19、6.19、8.04、7.00、5.79、7.08、6.51、5.82、8.69、6.76,均高于 OTV 与 4MWW 的对接得分;OTC 与 N9(4MWQ)对接得分为 9.26, M4、M22 对接得分分别为 11.42、11.15,高于 OTC 与之对接得分。OTC 与 N9 - R292K(2QWE)对接得分为 6.92, M4、M12、M14、M16、M22 对接得分分别为 8.02、6.95、7.43、7.21、7.24,高于 OTC 与之对接得分。综上所述, M1、M4、M5、M7、M8、M10、M12、M14、M16、M17、M19、M22、M23 成分作为成分-靶点网络中的重要化合物,是金银花-连翘药对抑制流感病毒 H7N9 的主要成分。

2.2 连翘酯苷 A 和亚油酸乙酯可以作为抑制 H7N9 的先导化合物 结果 2.1 中得到了 13 种抗流感病毒主要化合物,我们从中选择得分高并且与 3 种 N9 都能够作用的分子作为抗流感病毒的潜在抑制剂。表1中,与 N9 - R294K(4MWW)对接的多数分子对接分值高于 OTC,其中 M4、M5、M10、M22 四个分子的对接得分均高于 8;M4、M22 与 N9(4MWQ)的对接得分大于 11;M4、M22 与 N9 - R292K(2QWE)的对接分值也能达到 8.02、7.24。上述分子 M4、M22 对接分值高,而且能够与 N9、N9 - R294K 和 N9 - R292K 相互作用(图1)。所以推测分子 M4(连翘酯苷 A)、M22(亚油酸乙酯)是 H7N9 的潜在抑制剂的先导化合物。

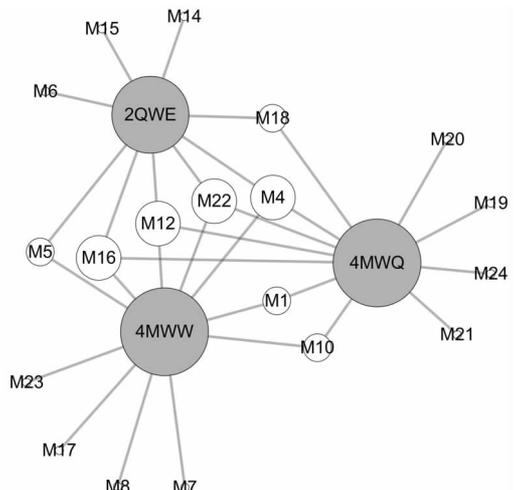


图1 金银花-连翘药对中的成分与 H7N9 神经氨酸酶的关系网络

注:灰色的圆圈是 H7N9 神经氨酸酶, R294(4MWQ) 和两种突变型 R294K(4MWW)、R292(2QWE)。白色的是金银花-连翘药对筛选的 19 个成分。圆圈的大小代表相互作用对象的数量。

3 讨论

在我国,中药抗流感有着几千年的应用历史,然而其治病的分子机制一直缺乏深入研究。主要原因是中药成分、作用靶点复杂^[12-13]。本次研究利用分子对接的方法预测和分析了金银花-连翘药对对于 H7N9 神经氨酸酶的抑制作用。在周伟^[10]、刑学锋等^[11]对金银花-连翘药对化学成分的研究基础上,我们通过分子对接先期筛选了 24 个化学成分(表 1),包括有机酸、黄酮类、苷类、挥发油。与奥司他韦羧酸盐对接得分比较,构建分子和靶点互作网络,我们发现这些成分可以通过相互协同作用同一靶点,增强单个成分与靶点的相互作用。初步阐明了金银花-连翘药对作用流感病毒 H7N9 及其突变型的分子机制。

本次研究以从中药中发掘流感病毒 H7N9 的主要抑制剂为目的,从金银花-连翘药对中寻找了两种化合物作为潜在抑制剂,进而对金银花-连翘药对作用流感病毒 H7N9 的分子机制进行初步分析探索。然而中药治疗疾病具有很强的系统性^[14],并不只是作用神经氨酸酶。病毒进入人体引起的一系列生化反应,参与这些反应的大分子蛋白都可以作为靶标进行研究,我们可以构建更大的网络^[15]从更多的角度分析并完善金银花-连翘药对防治流感的分子机制。

参考文献

[1] Gao R. et al. Human infection with a novel avian - origin influenza A (H7N9) virus. *New England Journal of Medicine*, 2013, 368(20):1888 - 1897.

[2] Uyeki TM, Cox NJ. Global concerns regarding novel influenza A (H7N9) virus infections. *New England Journal of Medicine*, 2013, 368(20):1862 - 1864.

[5] Hansen E, Day T, Arino J. et al. Strategies for the use of oseltamivir and zanamivir during pandemic outbreaks. *Canadian journal of infectious diseases and medical microbiology*, 2010, 21(1):28 - 63.

[4] Hu Y. et al. Association between adverse clinical outcome in human disease caused by novel influenza A H7N9 virus and sustained viral shedding and emergence of antiviral resistance. *Lancet*. 2013, 381(9885):2273 - 2279.

[5] Samson M, Pizzorno A, Abed Y. et al. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Research*, 2013, 98(2):174 - 185.

[6] Whitley RJ, Boucher CA, Lina B. et al. Global assessment of resistance to neuraminidase inhibitors: 2008 - 2011. The influenza resistance information study (IRIS). *Clinical infectious diseases*, 2013, 56(9), 1197 - 1205.

[7] Zekun Liu, Junpeng Zhao, Weichen Li. et al. Molecular Docking of Potential Inhibitors for Influenza H7N9. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2015, 480764.

[8] Woods CJ, Malaisree M, Long B. et al. Computational Assay of H7N9 Influenza Neuraminidase Reveals R292K Mutation Reduces Drug Binding Affinity. *Scientific reports*, 2013, 3:3561.

[9] 国钰妍. 中医辨证论治与奥司他韦治疗流感轻症的临床随机对照研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2014.

[10] 周伟. 基于“银翘”药对的中药制剂生物有效性综合评价体系的构建与应用[D]. 南京:南京中医药大学, 2014.

[11] 邢学锋, 陈飞龙, 罗佳波. 金银花、连翘药对配伍挥发油成分的 GC - MS 分析[J]. *中药新药与临床药理*, 2009, 20(4): 358 - 360.

[12] Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J. et al. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2011, 27: 431 - 432.

[13] 潘家祐. 基于网络药理学的药物研发新模式[J]. *中国新药与临床杂志*, 2009, 28(10):721 - 726.

[14] 陈佳韵, 陈艳. 浅谈对抗病毒类中药的研究[J]. *求医问药*, 2013, 11(6):171 - 172.

[15] 张博, 李慧颖, 李梢. 网络药理学: 中医药与转化医学研究新途径[J]. *转化医学研究*, 2013, 3(3): 1 - 11.

(收稿日期:2015-09-19 编辑:文颖娟)