

网络出版时间:2023-04-21 10:31:43 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20230420.1338.005.html

基于荧光法及分子对接研究黄褐毛忍冬抑制 丙型肝炎病毒 NS3/4A 蛋白酶活性

杨欣¹, 肖俊伟², 唐婷婷², 危英², 陈英², 向良珊², 周英²

摘要 目的 基于荧光实验及分子对接研究黄褐毛忍冬抗丙型肝炎病毒(HCV)NS3/4A蛋白酶的活性。方法 采用荧光法测试黄褐毛忍冬提取物抑制HCV NS3/4A蛋白酶活性,分子对接分析主要活性成分与HCV NS3/4A病毒蛋白酶结合情况。结果 黄褐毛忍冬水提物、醇提物能较好的抑制HCV NS3/4A蛋白酶活性,半数抑制浓度(IC₅₀)为0.005~0.019 mg/ml。分子对接和相互作用分析发现绿原酸、异绿原酸A、木犀草苷、木犀草素与HCV NS3/4A蛋白酶结合较好,可形成多个氢键。结论 初步明确异绿原酸A和木犀草素是黄褐毛忍冬抗HCV NS3/4A蛋白酶活性的有效成分。**关键词** 黄褐毛忍冬;HCV NS3/4A蛋白酶;活性测定;分子对接

中图分类号 R 285

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)05-0731-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.005

丙型肝炎是因为感染丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)引起的慢性疾病,易发展为慢性丙型肝炎、肝硬化和肝癌,其传播主要与输血有关。HCV由于病毒株高度变异性导致疫苗的开发变得非常困难,目前尚无针对HCV的疫苗^[1-2]。人类使用植物药治疗疾病已有上千年的历史,一些天然产物显示出抗病毒的活性,如抗疱疹病毒、流感病毒、获得性免疫缺陷综合征、乙型肝炎病毒和HCV等^[3-4]。黄褐毛忍冬(*Lonicera fulvotomentosa* Hsu et S. C. Cheng)为忍冬科、忍冬属藤本植物,具有清热解毒、疏散风热的功效,主治温病发热、热毒血痢、痈肿疔疮等多种感染性疾病^[5],分布广泛,资源丰富,且产量高。2020版《中国药典》将其收载为山银花基源植物之

一^[6],该药材在民间常用于代茶饮,其水煎剂或醇提物已制成药,如双黄连注射液、银黄注射液等已作为抗病毒药物广泛应用于临床。该研究采用荧光法和分子对接技术检测黔产道地药材黄褐毛忍冬抗HCV NS3/4A蛋白酶活性,拟期从中药、民族药中发现更多的抗病毒药效物质,阻断HCV的复制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验药材来源 黄褐毛忍冬药材于2016年3月采自贵州兴义,由贵州中医药大学陈德媛教授鉴定为*Lonicera fulvotomentosa* Hsu et S. C. Cheng,植物标本存放在贵州中医药大学科研楼中药民族药活性筛选实验室(标本号为LF201607)。

1.1.2 实验试剂 HCV NS3/4A蛋白酶、HCV蛋白酶试剂盒购自美国AnaSpec公司;信筒子醌购自美国Sigma Aldrich公司;绿原酸、异绿原酸A、木犀草苷、木犀草素、灰毡毛忍冬苷乙购自成都德锐可生物有限公司,样品纯度≥98%。

1.1.3 实验仪器 Synergy II酶标仪购自美国Bio Tech公司,分析天平MS205DU购自瑞士Mettler Toledo公司,384孔板购自美国Corning公司,Mili-Q系统超纯水购自美国Millipore公司,DMSO购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 黄褐毛忍冬不同提取物及主要活性成分 取黄褐毛忍冬药材25 g,共4份,粉碎,分别加250 ml的蒸馏水、30%甲醇、60%甲醇、85%甲醇,超声2 min后,加热回流提取3次,第1、2次回流提取1 h,第3次回流提取30 min,合并提取液,减压浓缩成浸膏,真空干燥,采用UPLC-HRMS技术对黄褐毛忍冬水提物及不同醇提物的化学成分变化情况进行研究^[7]。结合对照品比对、液质提供的精确分子量和多级质谱碎片离子信息进行定性分析,根据Lipinski类药五原则进行筛选。

1.2.2 荧光法检测HCV NS3/4A蛋白酶抑制试验 以黄褐毛忍冬水提物、30%醇提物、60%醇提物、

2022-12-10 接收

基金项目:贵州省教育厅创新群体项目[编号:黔教合KY字2021(018)号];贵州省科技计划项目[编号:黔科合支撑2020(4Y213)号];国家自然科学基金(编号:81760758);中药、民族药活性评价及药效分子构建研究中心项目(编号:3411-4110000520364)

作者单位:贵州中医药大学¹基础医学院、²药学院,贵阳 550025

作者简介:杨欣,女,博士,副教授,责任作者,E-mail:weiying1969@126.com

85% 醇提取物为研究样本,采用荧光法测定样品抑制 HCV NS3/4A 蛋白酶活性^[8]。具体操作:10 μl 底物(用 1 : 100 实验缓冲溶液稀释 Component A)与 2 μl 抑制剂混合,然后加入 8 μl 酶(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)于 384 孔板,反应混合物在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,在 Em/Ex 为 490 nm 和 520 nm 下检测荧光。信筒子醌作为阳性对照运用于同一试验中,每个样品测试 3 次。抑制率计算公式:抑制率% = $100 \times (F_{\text{vehicle}} - F_{\text{sample}}) / F_{\text{vehicle}}$;式中的 F 为对照组和样品组荧光值。Graphpad Prism 计算半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50}),数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料采用 STDEV-*t* 检验计算抑制率。

1.2.3 受体与配体文件准备 从蛋白质晶体结构数据库 RCSB (<http://www.rcsb.org/pdb>) 获取 HCV 蛋白酶(PDB ID:1NS3)。利用 SYBYL2.1.1 对蛋白晶体结构进行抽离配体、删除水分子、加氢、修复侧链氨基酸、加电荷、提取配体等前处理,保存备用;运用 SYBYL2.1.1 构建黄褐毛忍冬主要活性成分配体库并完成分子优化,设置参数:选择 GasteigerHückel 电荷,采用 Tripos 力场,最大迭代系数设置为 10 000,其它参数均设为默认值。

1.2.4 SYBYL 2.1.1 分子对接实验 基于 SYBYL2.1.1 的 Docking Suite 模块,读取已生成的受体 SFXC 格式文件开始对接工作^[9]。实验结果以总分 >5 为阈值,采用 Ligplot1.4.5 软件进行相互作

用分析。实验结果以氢键、疏水作用和结构比对输出,筛选关键的氨基酸位点。

1.2.5 实验验证分析 采用荧光法验证 6 个黄褐毛忍冬中主要成分(绿原酸、异绿原酸 A、木犀草苷、木犀草素、灰毡毛忍冬苷乙和常春藤皂苷元)抑制 HCV NS3/4A 蛋白酶的活性^[10-13]。使用 SensiLyteTM 520 荧光 HCV NS3/4A 蛋白酶试剂盒,操作方法与前面实验保持一致性。

2 结果

2.1 黄褐毛忍冬不同溶剂提取物体外抑制 HCV NS3/4A 蛋白酶活性 在浓度为 1.0、0.1 和 0.01 mg/ml 时,黄褐毛忍冬不同溶剂提取物对 HCV NS3/4A 蛋白酶具有不同程度的抑制作用(表 1), IC_{50} 值范围为 0.005 ~ 0.019 mg/ml,其中黄褐毛忍冬 60% 醇提物显示较强的抗 HCV NS3/4A 蛋白酶的活性。

2.2 配体优化 绿原酸、异绿原酸 A、木犀草苷、木犀草素、灰毡毛忍冬苷乙、常春藤皂苷元 6 个活性成分可遵循 Lipinski 类药五原则。基于 SBYBL 对黄褐毛忍冬活性成分进行优化,图 1A 为未优化的活性成分棒状模型(Sticks),共有 6 个配体,红色代表氢原子,蓝色代表氧原子。对小分子配体进行基于 Tripos 力场的能量最小化计算,优化分子结构,获得合理构象(图 1B)。

表 1 黄褐毛忍冬不同溶剂提取物体外抑制 HCV NS3/4A 蛋白酶活性($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品名称	抑制率(%)			IC_{50} (mg/ml)
	1.0 mg/ml	0.1 mg/ml	0.01 mg/ml	
黄褐毛忍冬水提物	92.02 \pm 1.65	72.76 \pm 6.04	47.70 \pm 2.82	0.013 \pm 0.003
黄褐毛忍冬 30% 醇提物	92.54 \pm 2.37	82.75 \pm 3.90	35.70 \pm 2.19	0.019 \pm 0.003
黄褐毛忍冬 60% 醇提物	93.03 \pm 2.19	79.84 \pm 1.10	58.10 \pm 5.48	0.005 \pm 0.003
黄褐毛忍冬 85% 醇提物	99.52 \pm 0.28	79.31 \pm 1.02	49.50 \pm 3.01	0.010 \pm 0.001
信筒子醌(阳性对照)	123.28 \pm 0.38	105.92 \pm 1.33	73.10 \pm 2.46	0.008 \pm 0.003

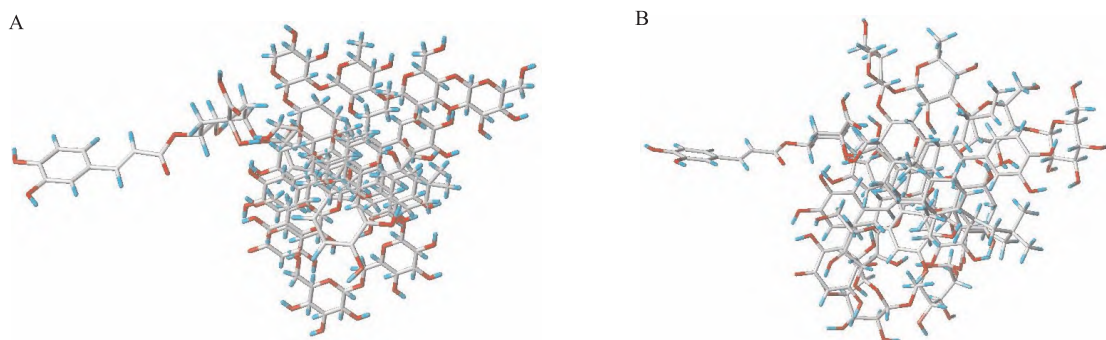


图 1 黄褐毛忍冬主要活性成分优化

A: 未优化的活性成分棒状模型; B: 优化的活性成分棒状模型

2.3 受体优化 基于 PDB 数据库下载 HCV 蛋白酶结构见图 2A, Resolution: 2.80 Å, 通过 SYBYL 去水、加全氢、加电子, 选择 Ligand (B/ZN690) 模式形成口袋。图 2B 绿色区域为对接口袋的位置, 是受体中配体结合的区域。

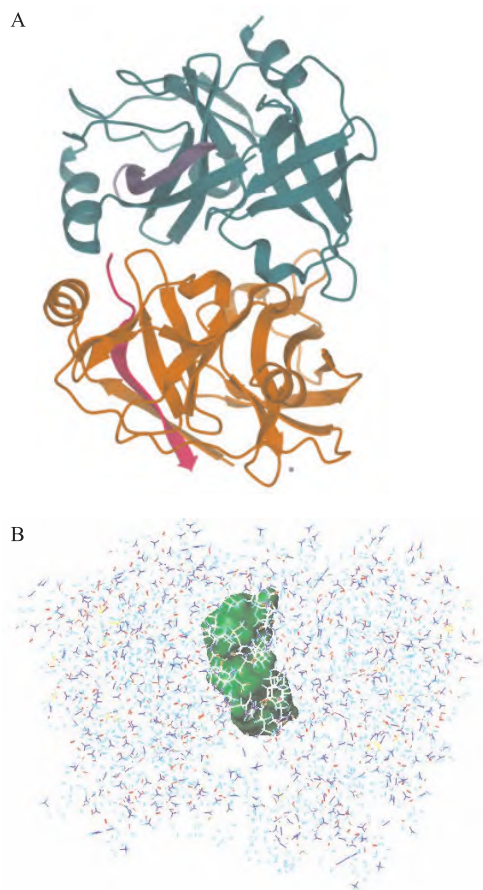


图 2 HCVNS3/4A 蛋白酶优化及结合口袋

A: PDB 数据库下载 HCV 蛋白酶结构; B: 对接口袋的位置

2.4 分子对接分析 基于原配体进行对接, 阳性对照信筒子醌与 HCV 蛋白酶的总分为 7.1, C 分数值为 5, 说明信筒子醌与 HCV 蛋白酶结合能力较好。绿原酸、异绿原酸 A、木犀草苷、木犀草素与 HCV 蛋白酶有较好的结合 (总分 >5), 其中异绿原酸 A、木犀草素与 HCV 蛋白酶结合能力接近阳性对照药 (表 2), 课题组将采用实验研究验证分子对接的结果。

2.5 相互作用分析 运用 Ligplot1.4.5 软件对结合较好的蛋白复合物相互作用力进行分析, 明确氢键和疏水作用力在对接中起着重要的作用。绿原酸与 HCV 结合后形成 4 个氢键 (Ser139、His57、Lys136、Arg109); 异绿原酸 A 与 HCV 结合后形成 7

个氢键 (Gly137、Lys136、Cys159、His57、Ser42、Arg156、Thr40); 木犀草苷与 HCV 结合后形成 2 个氢键 (Lys136、Gln41); 木犀草素与 HCV 结合后形成 1 个氢键 (Gln41); 信筒子醌与 HCV 结合后形成 3 个氢键 (Ser42、Lys136、Thr40)。

表 2 黄褐毛忍冬主要活性成分与 HCV 蛋白酶分子对接

化合物	分子式	分子量	CAS 号	总分
绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.31	202650-88-2	6.5
异绿原酸 A	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516.40	89919-62-0	6.6
木犀草苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.40	5373-11-5	5.8
木犀草素	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.24	491-70-3	7.0
灰毡毛忍冬皂苷乙	C ₆₅ H ₁₀₆ O ₃₂	1 399.53	136849-88-2	-1.2
常春藤皂苷元	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	472.70	465-99-6	3.1
信筒子醌(阳性对照)	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	294.40	550-24-3	7.1

2.6 荧光法测试黄褐毛忍冬主要化合物抗 HCV NS3/4A 蛋白酶活性 在浓度为 0.01 mg/ml 时, 结果显示均具有抑制 HCV 蛋白酶活性 (表 3), 其中异绿原酸 A 和木犀草素对 HCV NS3/4A 蛋白酶抑制率分别为 60.5% 和 43.1%。异绿原酸 A、木犀草素的 IC₅₀ 值分别为 0.008 mg/ml 和 0.019 mg/ml。

表 3 黄褐毛忍冬主要活性成分抑制 HCV NS3/4A 蛋白酶活性 (n=3)

化合物	CAS 号	分子量	抑制率 (%)
绿原酸	202650-88-2	354.31	35.23 ± 8.08
异绿原酸 A	89919-62-0	516.40	60.51 ± 4.85
木犀草苷	5373-11-5	448.40	38.02 ± 5.70
木犀草素	491-70-3	286.24	43.19 ± 2.03
灰毡毛忍冬皂苷乙	136849-88-2	1 399.53	16.63 ± 3.48
常春藤皂苷元	465-99-6	472.70	35.62 ± 3.48
信筒子醌(阳性对照)	550-24-3	294.40	100.00 ± 0.16

3 讨论

HCV 是引发肝脏疾病的主要病因, 对人类健康影响较大, 尚无疫苗预防 HCV 感染, 近 10 年来治疗主要以利巴韦林联合长效聚乙二醇 I 型干扰素, 但是存在联合抗病毒治疗无效的情况, 同时也容易出现副作用, 如抑郁症、机体免疫下降、贫血等, 且联合用药周期长, 因此在临床上应用受限。HCV 复制的两个主要药物病毒因子包括 RNA 聚合酶 NS5B 和非结构蛋白 NS3/4A^[14]。目前已经成为人们筛选药物的关键靶点, 且取得了较大的进展, 但临床治疗药物治疗费用较高, 不能让所有患者受益。因此不断从中药中开发低毒、高效、安全的抗病毒小分子用

于 HCV 的治疗具有现实意义。黄褐毛忍冬 60% 醇提物具有较强的抗 HCV 蛋白酶活性,其有效部位单独或与其他药物复配,可用于研制治疗丙型肝炎药物的原料药^[15]。分子对接和实验结果发现其主要成分木犀草素和异绿原酸 A 显示较好的抗 HCV 的作用,为从中药和民族药中开发丙型肝炎非肽类药物提供依据。

参考文献

- [1] 高燕菁. 抗丙型肝炎病毒常用药物[J]. 临床药物治疗杂志, 2021, 19(12): 12-5.
- [2] 陈铎之, 郝小江. 治疗丙型肝炎药物的研究进展[J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2021, 30(5): 419-35.
- [3] 田 姍, 郝竟琳, 韩 杰, 等. 国内丙型肝炎治疗药物的临床应用[J]. 首都食品与医药, 2017, 24(8): 70-2.
- [4] Mehrbod P, Hudy D, Shyntum D, et al. Quercetin as a natural therapeutic candidate for the treatment of influenza virus[J]. Bio-molecules, 2021, 11(1): 10-38.
- [5] 周 枝, 刘 畅, 俸婷婷, 等. 黄褐毛忍冬对大鼠急性肺损伤模型的抗炎机制研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(20): 4978-83.
- [6] 刘巧洲. 黄褐毛忍冬的抗炎作用研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2019.
- [7] 汪兴财. UPLC-HRMS 数据分析新方法及其在甘草中的应用研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2020.
- [8] Liu Q, Wei Y, Hao Y J, et al. Synthesis and evaluation of acylated derivatives of Hederagenin as inhibitors of HIV-1 and HCV NS3/4A proteases[J]. Nat Prod Commun, 2022, 17(1): 1-9.
- [9] 龚含情. 抗病毒药物与蛋白的相互作用及分子模拟[D]. 上海: 上海师范大学, 2019.
- [10] 林廷龙, 葛 渝, 刘志海. HPLC 法测定黄褐毛忍冬中绿原酸的含量[J]. 中国药事, 2008, 22(3): 228-9, 239.
- [11] 杨占南, 林丽娇, 何磊磊, 等. 黄褐毛忍冬中酚酸类化合物含量及其抗氧化活性相关性[J]. 现代食品科技, 2012, 28(9): 1128-30.
- [12] 范红梅, 刘志海, 任国文, 等. HPLC 测定黄褐毛忍冬中木犀草苷的含量[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(16): 37-9.
- [13] 赵 薇, 罗 艳, 杨 柳, 等. 高效液相色谱法同时测定灰毡毛忍冬中 5 种皂苷的含量[J]. 海峡药学, 2019, 31(11): 41-4.
- [14] 浦 滔. 丙型肝炎病毒对人二倍体细胞的感染性分析[D]. 北京: 北京协和医学院, 2020.
- [15] 何 云. 黔产金银花和山银花抗炎、免疫和保肝作用药效学对比研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2019.

Study on anti-hepatitis C virus NS3/4A protease activity of *Lonicera fulvotomentosa* based on fluorescence method and molecular docking

Yang Xin¹, Xiao Junwei², Tang Tingting², Wei Ying², Chen Ying², Xiang Liangshan², Zhou Ying²

(¹School of Basic Medicine, ²College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025)

Abstract Objective To study anti-hepatitis C virus NS3/4A protease activity of *Lonicera fulvotomentosa* based on fluorescence method and molecular docking. **Methods** The activity of HCV NS3/4A protease inhibition of *L. fulvotomentosa* extracts was tested by fluorescence method. The binding of the main active ingredients to HCV NS3/4A virus protease was analyzed based on molecular docking. **Results** The water extract and alcohol extract of *L. fulvotomentosa* had a good inhibitory effect on the activity of HCV NS3/4A protease with IC₅₀ of 0.005-0.019 mg/ml. Based on molecular coupling and interaction analysis, it was found that chlorogenic acid, isochlorogenic acid A, cyanoside and luteolin combined well with HCV NS3/4A protease, forming multiple hydrogen bonds. **Conclusion** The active components of *L. fulvotomentosa* against HCV NS3/4A protease activity were isochlorogenic acid A and luteolin.

Key words *Lonicera fulvotomentosa*; HCV NS3/4A protease; activity determination; molecular docking