

符合中医药的整体观,并具有高效、灵敏、实时、在线等特点,且能获得定性定量的数据,对中药量效关系及药效物质基础研究提供了新的技术平台,具有一定的应用前景。

参考文献:

- [1] 周传佩,刘义,沈雪松,等.热分析技术在药物研究中的应用[J].分析科学学报,2001,17(5):430
- [2] 代春美,肖小河,王迪,等.微量热法对不同生长年份黄连品质的评价[J].中草药,2006,37(2):205-209
- [3] 赵艳玲,王伽伯,肖小河.微量热法研究板蓝根的生物热力学特征[J].中草药,2007,38(2):193-196
- [4] 孔维军,赵艳玲,山丽梅,等.微量热法研究黄连与吴茱萸分煎后配伍时的药性差异[J].中草药,2009,40(12):1893-1897
- [5] 万德光,彭成.四川道地中药材志[M].成都:四川出版集团,2005
- [6] 孔维军,赵艳玲,山丽梅,等.左金丸及类方 HPLC 指纹图谱与生物热活性指纹的“谱-效”关系研究[J].化学学报,2008,66(32):2533-2538
- [7] 余惠旻,肖小河,刘塔斯,等.中药四性的生物热动力学研究——生晒参和红参药性的微量热学比较[J].中国中药杂志,2002,27(5):393
- [8] 鄢丹,肖小河,金城,等.微量热法研究黄连中小檗碱类生物碱对金黄色葡萄球菌生长代谢的影响[J].中国科学,2008,38(6):487-491
- [9] Kong W J, Wang J B, Jin C, et al. Effect of emodin on [WTBX] *Candida albicans* [WTBZ] growth investigated by microcalorimetry combined with chemometric analysis [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 83: 1183
- [10] Fan D L, Xiao X H, Ma X J. Calorimetric study of the effect of protoberberine alkaloids in *Coptis chinensis* Franch. on [WTBX] *Staphylococcus aureus* [WTBZ] growth [J]. *Thermochimica Acta*, 2008, 480: 49-52
- [11] Zheng D, Liu Y, Zhang Y, et al. Microcalorimetric investigation of the toxic action of Cr (VI) on the metabolism of [WTBX] *Tetrahymena thermophila* [WTBZ] BF5 during growth [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2006, 22: 121
- [12] 沈雪松,刘义.氟喹诺酮类药物对大肠杆菌抑制作用的量效关系的热化学研究[J].化学学报,2000,58(11):1463-1466
- [13] 马建凤,刘华钢,朱丹.中药体外抑菌研究的方法学进展[J].药物评价研究,2010,33(1):39-42

黄芩中黄酮类成分活性作用的虚拟评价

商倩^{1,2},刘巍²,徐为人^{2*},刘鹏²,刘冰妮²,韩英梅²,汤立达²

(1 天津医科大学基础医学院,天津 300070; 2 天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室,天津 300193)

摘要:目的 利用理论对接方法研究黄芩中黄酮类化合物的潜在作用机制。方法 选取黄芩中 8 个黄酮类化合物(包括苷元及其苷),收集现有靶标的晶体结构,利用 Schrödinger 软件进行计算,以分级标准评价选择性。结果 文献报道黄芩黄酮类化合物药理作用共 26 种,其中与苷元及其苷类化合物对接结果相符的个数分别为 9 个和 25 个。表明苷元及其苷类化合物的靶标选择性与虚拟评价有差异,苷类化合物的结果与文献更接近。结论 说明虚拟评价技术对于中药复杂作用系统的研究具有较大的实用性,苷元与苷类化合物体内作用效果相似,而体内代谢是药物虚拟评价过程中非常重要的影响因素。

关键词:黄芩;黄酮类化合物;虚拟评价

中图分类号:R285.51 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2010)07-1139-04

Virtual evaluation on activities of flavonoids from *Scutellaria baicalensis*

SHANG Qian^{1,2}, LIU Wei², XU Wei-ren², LIU Peng², LIU Bing-ni², HAN Ying-mei², TANG Li-da²

(1. Basic Medical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Abstract: Objective To explore the investigation method of complicated Chinese materia medica (CMM), the potential action mechanisms of flavonoids from *Scutellaria baicalensis* were studied by docking calculation. **Methods** In total, eight flavonoids (aglycones and their glycosides) from [WTBX] *S. baicalensis* [WTBZ] were selected as ligand. The crystalline structures of targets related to common diseases were used as the receptors for calculation. The calculations were conducted with Schrödinger software package. The grading standard of selectivity was developed according to G-score between ligands and re-

* 收稿日期:2010-03-10

基金项目:科技部支撑项目(2007BA141B01);天津市应用基础与前沿技术项目(07TCZDJC05300)

作者简介:商倩(1983—),女,天津人,硕士研究生,研究方向为新药设计与筛选。E-mail: dtsmalau@hotmail.com

* 通讯作者 徐为人 Tel: (022) 23003529 E-mail: xwrtj@yahoo.com.cn

ceptors. **Results** The total number of reported pharmacologic actions was 26. Among all effects in literatures, nine of them can be deduced from the docking calculation of aglycone. Form of glycosides with grade + +, 25 reported effects can be estimated from calculation. Apparently, the target selectivity of aglycones and their glycosides were different from the virtual evaluation. The virtual evaluation results of glycosides were more close to the reported effects. **Conclusion** The proposed virtual evaluation method seems an effective way to investigate the complicated system of CMM. It suggests that aglycones may be effective as the form of glucoside [WTBX] in vivo[WTBZ], and metabolism is a very important factor for virtual evaluation.

Key words: *Scutellaria baicalensis*[WTBZ] Georgi; flavonoids; virtual evaluation

黄芩是一味常用的中药,具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎的功能,常用于湿温、暑瘟胸闷呕恶、湿热痞满、泻痢、黄疸、肺热咳嗽、高热烦渴、血热吐衄、痈肿疮毒、胎动不安^[1,2],还具有抗菌^[3]等药理活性。其主要成分为黄酮类化合物。中药的药效物质基础和作用机制复杂,给中药现代化带来了很大的障碍,本课题组旨在利用理论方法帮助阐明中药相关的作用机制^[4-7]。本研究利用理论方法系统地研究了黄芩黄酮类成分可能结合的靶标,为阐明其作用机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 配体的准备和处理:选取黄芩中 8 个黄酮类成分^[8],其中苷元包括:木蝴蝶素、黄芩苷元、汉黄芩素、二氢木蝴蝶素 A、圣草酚;苷包括:二氢黄芩素、汉黄芩苷、5,6-二羟基-7-O-葡萄糖苷黄酮。在 Schrödinger 2008 软件中构建 8 个黄酮类成分分子,并采用 OPLS_2005 力场对小分子进行优化后,用于对接计算^[9]。在计算分子特征符的过程中,将优化好的分子以 MMF94 力场计算电荷,再计算各参数。

1.2 靶点的准备和处理:利用 bioinformatics and drug design group (BIDD) Therapeutic target database (TTD) (<http://xin.cz3.nus.edu.sg/group/cjttd/ttd.asp>) 收集 160 个与疾病及相应药理作用有关的靶点,并在 RCSB 蛋白数据库 (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>) 搜索晶体结构^[10]。根据作用机制将晶体结构进行分类:G 蛋白偶联受体、酪氨酸激酶受体、离子通道受体、细胞因子及其受体、细胞核受体、氧化还原酶类、激酶类、转移酶类、水解酶类、合成酶类、其余酶类、功能蛋白类等。使用 Schrödinger 软件的 Protein Preparation Wizard 模块对蛋白质进行去水,去掉某些共结晶的小分子和与活性中心不相关的金属离子,以及去掉相同亚单位等,并采用 OPLS_2005 力场进行优化及加氢处理^[10,11]。

1.3 对接方法:利用 Schrödinger 软件中的 Glide 对接模块进行计算,分子对接的过程就是寻找配体与受体结合在受体活性位点处的低能构象的过程^[9],以 G-score 作为对接结果的评价得分,以 Glide 默认的标准方法进行对接。

1.4 评价方法:测试配体与各受体对接后的得分 (Glide score, GS),减去非特异对接得分预测值 (G_{ns}) 后的差值,采用文献的研究标准^[11]设定分级为“+++”:差值 < -4.5,表示可能存在强选择性作用;“++”: -4.5 ≤ 差值 < -3.0,表示可能存在选择性的作用;“+”: -3.0 ≤ 差值 < -1.5,表示可能存在非选择性的作用。

2 结果

根据差值分级得到的选择性分级判断结果见表 1、2,列出了理论上存在选择性及选择性较好的靶标。

表 1 黄酮苷元类与靶标选择作用分级的结果
Table 1 Grading of selective effect between flavonoid aglycones and targets

配体	++
木蝴蝶素	磷酸二酯酶、雌激素受体
黄芩苷元	促分裂原活化蛋白激酶 8、乙酰胆碱酯酶、磷酸二酯酶、雌激素受体
汉黄芩素	促分裂原活化蛋白激酶 8、乙酰胆碱酯酶、磷酸二酯酶
二氢木蝴蝶素 A	促分裂原活化蛋白激酶 14、磷酸二酯酶、雌激素受体
圣草酚	羊毛固醇合酶、促分裂原活化蛋白激酶 14、乙酰胆碱酯酶、磷酸二酯酶、醛糖还原酶、肿瘤坏死因子 α-转化酶、酪氨酸激酶、转移生长因子受体、抗利尿激素受体、雌激素受体、视黄酸受体

文献报道,黄芩黄酮类化合物及其苷具有抗氧化、保护免疫系统、抗肿瘤、解热、镇痛、抗炎、抗风湿性关节炎、防治庆大霉素肾毒性、抗变态反应、镇静、保护神经细胞、增加脑组织血液供给、保护脑损伤、降压、降低血脂水平、抗心律失常、利胆保肝、减轻红细胞生成抑制、防治白内障、抗病毒、抗菌、抑制菌株回复突变(弱)、抗真菌、利尿、保护内皮细胞、抗凝血和抗血栓形成等药理作用^[12]。但文献中并无涉及黄酮类化合物及其苷之间的作用差异。

根据靶标和疾病的关系^[13],理论上苷类化合物

对于勃起机能障碍、癌症、Chagas 病、高胆固醇血症、利什曼原虫感染、非特异性骨质疏松、弓形虫感染、骨骼机能紊乱、非特异性心血管疾病、非特异性病毒感染、肺结核、心衰、哮喘、炎症、糖尿病、自身免

疫病、抑郁症、阿尔茨海默病、缺氧缺血性脑病、运动神经元疾病及其并发症有特异性治疗作用。从对接得到的可能存在选择性作用的靶标来看, 黄酮苷类化合物对高胆固醇血症、癌症、非特异性心血管

表 2 黄酮苷类与靶标选择作用分级的结果

Table 2 Grading of selective effect between flavonoid glycosides and targets

配 体	+	++
5, 6-二羟基-7-O-葡萄糖苷黄酮	羊毛固醇合酶、细胞分裂蛋白激酶 2、促分裂原活化蛋白激酶、3-磷酸次黄嘌呤核苷酸依赖的蛋白激酶 1、胸苷酸激酶、甘氨酸 N-14 酰转移酶、成纤维细胞生长因子受体 2 型、胰岛素受体、表皮生长因子受体、酪氨酸激酶、肝细胞生长因子受体、抗利尿激素受体、细胞核受体、原癌基因、磷蛋白样区域复合物、磷酸二酯酶	促分裂原活化蛋白激酶激酶 1、磷酸二酯酶
汉黄芩苷	羊毛固醇合酶、促分裂原活化蛋白激酶 8、3-磷酸次黄嘌呤核苷酸依赖的蛋白激酶-1、腺苷酸环化酶、92 000 IV 型胶原酶、 β -分泌酶、二磷酸甲羟戊酸脱羧酶、血管紧张素转化酶、环氧化物水解酶 2、乙酰胆碱酯酶、M-相诱导磷酸酶 1、胱门蛋白酶-1 和 3、甘氨酸 N-14 酰转移酶、酪蛋白激酶 II α 链、表皮生长因子受体、转移生长因子受体、肝细胞生长因子受体、谷氨酸[盐]受体 5、抗利尿激素受体、细胞核受体、青霉素结合蛋白、过氧化物酶体增生激活受体、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶、磷蛋白样区域复合物、细胞核受体共活化物 1、黏液素	焦磷酸法尼酰合成酶、细胞分裂蛋白激酶 2、丝氨酸苏氨酸蛋白磷酸酶、双特异性促分裂原活化蛋白激酶激酶 4、胸苷酸激酶、腺苷酸环化酶、DNA 拓扑异构酶、磷酸二酯酶、磷脂酶 A2、正磷酸葡萄糖基转移酶 (肌肉形式)、胰岛素受体、表皮生长因子受体、酪氨酸激酶、ephrin receptor、多药耐药蛋白
二氢黄芩苷	丝氨酸苏氨酸蛋白磷酸酶、促分裂原活化蛋白激酶激酶 14、92 000 IV 型胶原酶、 β -分泌酶、二磷酸甲羟戊酸脱羧酶、血管紧张素转化酶、磷酸二酯酶、磷脂酶 A2、M-相诱导磷酸酶 1、细胞色素 P ₄₅₀ 、胰岛素样生长因子受体、肝细胞生长因子受体、转移生长因子受体、肝细胞生长因子受体、转移生长因子受体、肝细胞生长因子受体、谷氨酸[盐]受体、脂肪酸结合蛋白、过氧化物酶体增生激活受体、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶、母亲 DPP 同源物 9、黏液素	焦磷酸法尼酰合成酶、细胞分裂蛋白激酶 2、双特异性促分裂原活化蛋白激酶、促分裂原活化蛋白激酶、胸苷酸激酶、腺苷酸环化酶、 β -分泌酶、DNA 拓扑异构酶、磷酸二酯酶、胰岛素受体、表皮生长因子受体、酪氨酸激酶、ephrin receptor、多药耐药蛋白

疾病、肥胖症、糖尿病及其并发症、肺结核、真菌性疾病等 52 种疾病可能具有治疗作用。除抗氧化作用以外, 其余药理作用均能通过计算得到。黄酮苷元类化合物只得到++ 级靶标, 且比苷类化合物少。苷元类化合物可用于治疗脑损伤、癌症、非特异性心血管疾病、神经变性疾病、非特异性骨质疏松症、绝经后综合症、缺氧缺血性脑病、勃起机能障碍、非特异性 Crohn's 病、胰岛素抵抗、肥胖症、血管损伤应答、神经性疼痛、糖尿病及其并发症、非特异性痛经、肝硬化、肾病综合征。其中, 保护脑损伤、抗肿瘤、降压、降低血脂水平、抗心律失常、增加脑组织血液供给、保护神经细胞、利尿、保护内皮细胞作用与文献报道相符。

文献报道黄芩黄酮类化合物及其苷的药理作用共有 26 种, 苷元和苷类通过计算分别推测出其中的 9 种和 25 种, 表明黄酮类化合物及其苷的虚拟评价结果明显不同, 苷类化合物的结果更接近于文献报道的作用。文献报道苷元与苷的临床作用并无太大

差别, 表明这两类化合物体内作用有效性相当, 而药物在体内的代谢是导致两类化合物体内药理作用与虚拟评价存在差异的主要因素。

计算结果还发现文献未提到的黄酮苷元类化合物所涉及到的疾病, 包括失聪、肝硬化、肥胖症、勃起机能障碍、非特异性骨质疏松症、非特异性痛经、肾病综合征。黄酮苷类化合物包括血管发生、癫痫、青光眼、局部缺血性肾损伤、血管损伤应答、阿尔茨海默病、运动神经元疾病及其并发症、哮喘、皮肤病、肺结核、寄生虫病、多器官衰竭。提示黄酮类化合物有可能用于相应疾病的治疗, 还需要实验上进一步的研究和探索。

3 结论

黄酮类化合物具有多成分、多靶点的作用特点, 并且广泛分布于中药中。本研究选择了黄芩中部分黄酮类化合物比较系统地研究了其可能的作用, 计算结果表明多个成分作用于一个靶标, 一个成分作用于多个靶标的情况, 与中药的治病理念有类似的

地方。从虚拟评价结果来看,黄酮苷类化合物的结果更接近于文献报道,表明药物在体内的代谢是导致虚拟评价存在差异的主要因素,提示在可能的情况下尽量考虑代谢的因素。尽管虚拟评价预测出的其他作用还需要进一步的研究和探索,虚拟评价的技术对中药复杂作用系统的研究显示了较大的实用性。

参考文献:

- [1] 中国药典 [M]. 2005.
- [2] Shang Q, Liu W, Xu W R, *et al.* Virtual evaluation on the activities of flavonoids from [WTBX] *Scutellaria baicalensis* [WTBZ] Georgi [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(2): 142-146
- [3] 路俊仙, 崔璐, 张才波, 等. 不同种质黄芩体外抑菌作用的研究 [J]. *现代药物与临床*, 2009, 24(6): 364-366.
- [4] 王晶晶, 刘巍, 徐为人, 等. 黄酮苷类与表皮生长因子受体结合模式的理论研究 [J]. *中草药*, 2009, 40(3): 420-423
- [5] 刘鹏, 王晶晶, 徐为人, 等. 黄酮苷元类与表皮生长因子受体结合模式的理论研究 [J]. *药物评价研究*, 2009, 32(1): 48-53
- [6] 裴媛, 谭初兵, 徐为人, 等. 当归苯酞类和萜类成分作用的虚拟评价 [J]. *中草药*, 2010, 41(6): 938-941.
- [7] 刘巍, 邢洁, 徐为人, 等. 查尔酮类衍生物活性作用的虚拟评价 [J]. *药物评价研究*, 2009, 32(2): 110-116
- [8] 周家驹, 谢桂荣, 严新建. *中药原植物化学成分手册* [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004
- [9] Friesner R A, Banks J L, Murphy R B, *et al.* Glide: A new method for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy [J]. *Med Chem*, 2004, 47(7): 1739-1749
- [10] Wang R, Fang X, Lu Y, *et al.* The PDB bind database: collection of binding affinities for protein-ligand complexes with known three dimensional structures [J]. *Med Chem*, 2004, 47(2): 2977-2980
- [11] 邢洁, 徐为人, 刘鹏, 等. 槲皮素和地黄环烯醚萜类成分抗炎作用的虚拟评价 [J]. *中草药*, 2009, 40(6): 930-935
- [12] 关晓燕, 杨洁. 黄芩药理研究概况 [J]. *中医药信息*, 2006, 23(4): 21-23
- [13] 符海霞, 刘鹏, 王玉丽, 等. 槲皮素环烯醚萜类成分活性作用的虚拟评价 [J]. *中草药*, 2009, 40(5): 767-771.

苦荞麦黄酮对人食管癌细胞 EC9706 增殖的影响

闫斐艳, 崔晓东, 李玉英, 王转花*

(山西大学生物技术研究所 化学生物学和分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006)

摘要:目的 研究苦荞麦黄酮在体外对 EC9706 细胞增殖的影响。方法 MTT 法观察苦荞麦黄酮对 EC9706 细胞的毒性, 荧光染色法观察细胞核的改变, 流式细胞术观察细胞周期和细胞内活性氧水平, Western blotting 分析凋亡蛋白表达。结果 苦荞麦黄酮明显抑制 EC9706 细胞的增殖, 其抑制率与药物浓度和作用时间呈正相关。经 DAPI 染色, 电镜观察细胞核, 可见多个凋亡小体的形成。流式细胞仪检测发现, 苦荞麦黄酮使细胞发生 G₂/M 期周期停滞, 细胞内活性氧水平明显增加, 且呈浓度依赖效应。Western blotting 分析表明, 苦荞麦黄酮能上调细胞内的促凋亡蛋白 Bax, 并下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量。结论 苦荞麦黄酮对人食管癌细胞株 EC9706 增殖具有明显的抑制作用, 使细胞发生周期阻滞, 并能通过调节活性氧水平及改变凋亡蛋白的表达量诱导其发生凋亡。

关键词: 苦荞麦; 黄酮; 人食管癌细胞 EC9706; 细胞增殖

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)07-1142-04

苦荞麦 *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. 属于双子叶蓼科荞麦属作物, 在我国种植广泛, 是一种药食两用植物^[1]。《本草纲目》记载苦荞麦能够: “降气宽肠, 磨积滞, 清热毒风痛”。现代研究结果表明, 苦荞麦具有防治心脑血管疾病、糖尿病, 抗菌, 抗炎, 抗乙肝表面抗原等作用^[2]。近年来, 苦荞麦的抗癌作用也越来越为研究者所关注^[3]。苦荞麦中含有

丰富的黄酮, 黄酮类化合物的抗肿瘤作用已成为人们研究的热点之一, 其研究主要表现在对细胞的增殖抑制、诱导凋亡、阻断周期和调控蛋白表达等方面^[4~6]。前期研究初步表明, 苦荞麦黄酮可抑制白血病细胞株 HL-60 的生长并诱导其凋亡^[7]。本实验拟研究苦荞麦黄酮在体外对人食管癌 EC9706 细胞增殖的影响, 为新一代抗肿瘤药物的研发提供实

* 收稿日期: 2009-10-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30870525, 30671084); 山西省自然科学基金资助项目 (2007011077)

作者简介: 闫斐艳 (1983—), 女, 山西临汾人, 硕士研究生。研究方向: 蛋白质化学与工程。

Tel: (0351) 7019371 E-mail: yz2003529@163.com

* 通讯作者 王转花 Tel: (0351) 7019371 E-mail: Zhw ang@sxu.edu.cn