

绵马贯众中间苯三酚类化合物抗流感病毒的活性筛选

刘 畅¹, 闫艳韬¹, 王 娟¹, 包 蕾², 胡京红³, 崔晓兰², 高增平^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100029

3. 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029

摘要: **目的** 基于绵马贯众中间苯三酚类成分寻找具有良好抗流感病毒活性的化合物。**方法** 将 25 个绵马贯众中间苯三酚类化合物与 12 种流感病毒神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 进行分子对接, 通过评价结合能、结合模式及发生相互作用的重要氨基酸等指标进行虚拟筛选。通过神经氨酸酶抑制实验验证其中 4 个候选化合物体外抑制 NA 的活性, 在此基础上, 采用犬肾 MDCK 细胞通过细胞病变 (CPE) 法对候选化合物 M22 的抗病毒活性进行进一步的验证。**结果** 通过分子对接筛选出 5 个与 NA 有较好结合能力的候选化合物; NA 抑制实验结果表明候选化合物中 M22 对 NA 抑制作用最显著; CPE 实验结果表明 M22 对多种流感病毒毒株均具有较好的抑制作用。**结论** 绵马贯众中候选化合物 M22 具有较好的抗流感病毒作用, 为开发新的抗流感病毒药物的深入研究奠定了基础。

关键词: 绵马贯众; 间苯三酚; 流感病毒; 分子对接; 神经氨酸酶

中图分类号: R284; R914.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)02-0305-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.02.007

Screening on phloroglucinols of anti-influenza virus activity from *Dryopteris crassirhizoma*

LIU Chang¹, YAN Yan-tao¹, WANG Juan¹, BAO Lei², HU Jing-hong³, CUI Xiao-lan², GAO Zeng-ping¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100029, China

3. School of Basic Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To find the most active phloroglucinol compound on influenza virus from *Dryopteris crassirhizoma*. **Methods** Twenty-five phloroglucinols from *D. crassirhizoma* were docked into 12 kinds neuraminidase (NA) for molecular docking. The binding energies, the combination of compound and neuraminidase and the interaction with the important amino acid residues were used for virtual screening. The inhibitory effect *in vitro* of four candidate compounds on NA was tested by NA inhibition assay, on this basis, M22 was evaluated for its antiviral activity on MDCK cells via CPE assay. **Results** Virtual screening suggested that five candidates had strong binding abilities with NA. NA inhibition assay showed that M22 have the strongest activity against NA of all candidates. CPE assays demonstrated that M22 exhibited inhibitory activity on various influenza virus. **Conclusion** M22 from *D. crassirhizoma* have significant inhibitory efficacy on influenza virus. The results provide us with useful information for the development of novel anti-influenza drugs.

Key words: *Dryopteris crassirhizoma* Nakai; phloroglucinols; influenza virus; molecular docking; neuraminidase

流感病毒为正黏病毒科带有节段、单股负链 RNA 基因组的包膜病毒, 分为甲 (A)、乙 (B)、丙 (C) 3 型, 其中甲型流感病毒宿主范围较广, 在传播过程中易发生变异, 对人类的健康造成极大的

威胁^[1-3]。神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 是流感病毒表面的一种包膜糖蛋白, 在流感病毒的传播过程中有重要作用^[4]。NA 活性位点在 A、B 型流感病毒中均高度保守, 设计研发 NA 抑制剂类药物可

收稿日期: 2017-10-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31270400)

作者简介: 刘 畅 (1994—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药有效物质基础及质量控制研究。E-mail: liuchang_mm@163.com

*通信作者 高增平 (1965—), 女, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药有效物质基础及质量研究。E-mail: gaozp@bucm.edu.cn

以同时治疗 A、B 型流感,这使得 NA 成为抗流感病毒药物研究中的理想靶点^[5-6]。NA 抑制剂主要是通过抑制 NA 的活性,阻断流感病毒复制和感染过程而达到控制流感的作用。目前已获批上市的有效抗流感病毒药物奥司他韦、扎那米韦、帕拉米韦等均为 NA 抑制剂,但这类药物价格较昂贵、使用不便、已产生耐药性^[7-8]。因此,寻找新的 NA 抑制剂具有重要意义。

绵马贯众为鳞毛蕨科植物粗茎鳞毛蕨 *Dryopteris crassirhizoma* Nakai 的干燥根茎和叶柄残基,味苦,性微寒,有小毒,归肝、胃经,具有清热解毒、驱虫的功效,用于虫积腹痛、疮疡^[9]。现代药理研究表明其具有抗病毒、抗炎、抗菌、抗肿瘤、抗疟等作用^[10-12]。杨关林等^[13]观察到绵马贯众提取物的最大无毒剂量抗甲型流感病毒 A/FM1/H1N1 株的作用优于金银花、苦参、黄芩和连翘。有研究表明绵马贯众中间苯三酚类化合物是其抗流感病毒的有效成分^[14]。通过查阅国内外文献共检索到 25 个已从绵马贯众中分离得到的间苯三酚类化合物,以 12 个不同亚型、类型的流感病毒 NA 为靶点,采用分子对接技术对 25 个间苯三酚类化合物抗流感病毒作用进行探索,进而通过抗 NA 活性实验筛选出候选化合物中抗流感病毒效果最显著的单体,并采用犬肾 MDCK 细胞通过细胞病变(CPE)法对该单体的抗病毒活性进行进一步的验证,为寻找新的流感病毒 NA 抑制剂奠定基础。

1 材料

1.1 研究应用软件

绘图软件:ChemDraw Ultra 8.0、Chem3D Ultra 8.0。对接软件:AutoDock Vina、AutoDock Tools 1.5.6、LigPlot+和 PyMOL。

1.2 药物、试剂、细胞与病毒

无水氯化钙、氢氧化钠、冰醋酸(北京化工厂);甘氨酸(Biotech 公司);2-*N*-吗啡林-乙磺酸(MES, Sigma 公司);病毒株 H1N1 (A/California/04/2009)、H5N1 (A/Anhui/1/2005) 购自北京 Sino Biological Inc.公司;磷酸奥司他韦胶囊(罗氏制药有限公司;产品批号 B3018,分装批号 SH0050);MUNANA [2'-(4-methylumbelliferyl)- α -*N*-acetylneuraminic acid sodium salt hydrate, Sigma 公司];MDCK 细胞(北纳创联生物技术有限公司);甲型 H1N1 流感病毒(FM1 株、PR8 株、2009 株)、甲型 H3N2 流感病毒(美国 ATCC 菌毒种保藏中心);DMEM 培养基、胎

牛血清、胰酶(美国 Gibco 公司);双抗、PBS(美国 HyClone 公司);DMSO(Biosharp 生物科技有限公司);间苯三酚类化合物为本实验室从绵马贯众中分离制备。

1.3 仪器

MS300 磁力搅拌器(上海般特仪器有限公司);恒温培养箱(上海建恒仪器有限公司);超净工作台(北京昌平长城空气净化工程公司);分析天平、数字式酸度计(德国赛多利斯股份公司);SpectraMax M3 荧光酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);移液器(德国 Eppendorf 股份公司);黑色底透 96 孔板(美国 Costar 公司)。CO₂ 培养箱、A2 型生物安全柜(美国 Thermo 公司);洁净工作台(美国 Airtech 公司);Eppendorf 离心机(德国 Eppendorf 公司);倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 间苯三酚类化合物抗流感病毒的虚拟筛选

2.1.1 配体准备 25 个绵马贯众间苯三酚类单体化合物(M1~M25),见表 1。应用 ChemDraw 准备结构,以 Autodock Tools 对小分子配体进行处理,保存为 pdbqt 文件备用。

2.1.2 受体处理 在 PDB 数据库下载复合有已知活性化合物(原配体)的 NA 为靶蛋白受体,共 12 个,包括 9 个 NA 亚型(N1~N9),见表 2。用 UCSF Chimera 及 MGL Tools 1.5.6 软件对蛋白质晶体结构进行处理,对蛋白质进行去水、加极性氢、加电荷、修改电荷,生成 pdbqt 文件备用。

2.1.3 分子对接的参数确定 利用 MGL Tools 软件建立格点能量图参数文件。根据原配体的坐标文件设置 Grid Box 中心坐标,设置盒子大小使预对接的分子在其最伸展的状态下也能在盒子内转动,且能包括原配体与受体相互作用的所有氨基酸,其他参数均为默认值,生成格点文件备用。

2.1.4 分子对接 利用 AutoDock Vina 进行对接计算,对接参数均为默认值,其过程是寻找配体与受体在活性位点结合处结合能较低的构象。利用 Ligplus 软件观察间苯三酚类化合物与 NA 中相互作用的氨基酸残基,在 PyMOL 软件中观察二者相互作用的三维结构模式。

2.2 候选化合物抗流感病毒的体外筛选

2.2.1 NA 活性测定 选取 H1N1 (A/California/04/2009) 及 H5N1 (A/Anhui/1/2005) 2 种病毒株,采用经典的底物荧光法进行酶活性测定。实验设置对

表 1 绵马贯众中 25 个间苯三酚类化合物
Table 1 25 phloroglucinols from *D. crassirhizoma*

编号	名称	编号	名称
M1	picraquassioside D	M14	黄绵马酸 PB (flavaspidic acid PB)
M2	dryopteraside	M15	绵马素 AB (aspidin AB)
M3	3-methyl-butrylphloroglucinol	M16	aemulin BB
M4	绵马酚 (aspidinol-B)	M17	methylene-bis-methylphlorobutyrophenone
M5	香鳞毛蕨素 (dryofragin)	M18	绵马酸 ABA (filixic acid ABA)
M6	phloropyron BB	M19	绵马酸 ABP (filixic acid ABP)
M7	白绵马素 AA (albaspidin AA)	M20	绵马酸 ABB (filixic acid ABB)
M8	白绵马素 AB (albaspidin AB)	M21	三环绵马酸 ABB (trisflavaspidic acid ABB)
M9	白绵马素 AP (albaspidin AP)	M22	绵马贯众素 ABBA (dryocrassin ABBA)
M10	白绵马素 PB (albaspidin PB)	M23	penta-albaspidin ABBBA
M11	白绵马素 PP (albaspidin PP)	M24	绵马贯众素 ABBP (dryocrassin ABBP)
M12	黄绵马酸 AB (flavaspidic acid AB)	M25	nortrisflavaspidic acid ABB
M13	异黄绵马酸 AB (norflavaspidic acid AB)		

表 2 与流感疾病相关的 NA 靶蛋白受体
Table 2 NA target proteins associated with influenza treatment

PDB 编号	靶蛋白 (NA) 受体	原配体
3CL0	N1 NA (H274Y)	奥司他韦
3CL2	N1 NA (N294S)	奥司他韦
4GZT	N2 NA	奥司他韦
4HZW	N3 NA	拉那米韦
3TI8	N5 NA	拉那米韦
3SAN	N5 NA	扎那米韦
4QN6	N6 NA	拉那米韦
2CML	N6 NA	扎那米韦
4QN7	N7 NA	奥司他韦
2HT8	N8 NA	奥司他韦
4MWQ	N9 NA	奥司他韦
4MWR	N9 NA	扎那米韦

照组、模型组、奥司他韦（阳性对照）组、间苯三酚类化合物组，每组设 5 个重复孔。各组反应体系所加试剂见表 3。抑制率=(模型荧光数值-待测样品荧光数值)/(模型荧光数值-空白荧光数值)。利用 GraphPad Prism 软件拟合曲线，得到各药物的半数抑

制浓度 (IC₅₀) 值。

2.2.2 M22 对 MDCK 细胞的毒性实验 将药物粉末用 DMSO 溶液和细胞维持液 (DMEM+胎牛血清) 完全溶解，溶解后进行稀释，加到 MDCK 96 孔细胞培养板中，100 μL/孔，每个稀释度药液做 4 个复孔；同时设细胞对照组和空白组，细胞对照组每孔 100 μL DMEM 加入至长成单层的 MDCK 细胞 96 孔培养板中，共 4 个复孔；空白组每孔 100 μL 无血清 DMEM 加入至无细胞 96 孔培养板中，共 4 个复孔。将培养板置 CO₂ 培养箱中培养，每日于倒置显微镜下观察细胞病变情况，确定细胞不出现明显病变的最低稀释倍数（最大无毒浓度），按 Reed-Muench 法计算 50%细胞毒性浓度 (TC₅₀) 和最大无毒浓度 (TC₀)。

2.2.3 M22 对 MDCK 细胞的体外抗病毒作用(CPE 法) 将药物粉末用 DMSO 溶液和细胞维持液完全溶解，溶解后稀释到 400 μg/mL 作为初始质量浓度备用。取培养板，倒掉培养液，冲洗，分别接种 100 TCID₅₀ 的流感病毒 FM-1 株、PR8 株、2009 株和 H3N2

表 3 NA 活性测定方法
Table 3 Fluorometric assay of NA activity

组别	NA/μL	奥司他韦/μL	待测样品/μL	MES 缓冲液/μL	底物/μL	终止液/μL
对照	—	—	—	80	20	100
模型	30	—	—	50	20	100
阳性对照	30	50	—	—	20	100
给药	30	—	50	—	20	100

株, 稀释度为 10^{-2} , 100 μL /孔, 置 CO_2 培养箱中吸附 1 h 后, 弃去病毒液, 再分别加入 1:2~1:128 倍比稀释的 M22 药液, 100 μL /孔; 同时设正常细胞对照和病毒对照, 正常细胞对照每孔加入 100 μL DMEM 至长成单层的 MDCK 细胞 96 孔培养板中, 共 4 个复孔; 病毒对照每孔加入 100 μL DMEM 至接种各流感病毒的 MDCK 细胞 96 孔培养板中, 共 4 个复孔。置 CO_2 培养箱中培养, 每日于倒置显微镜下观察细胞病变情况, 当病毒对照组细胞病变为“++++”时记录实验结果。按 Reed-Muench 法计算 IC_{50} 值和治疗指数 (TI), $\text{TI} = \text{TC}_{50}/\text{IC}_{50}$ 。

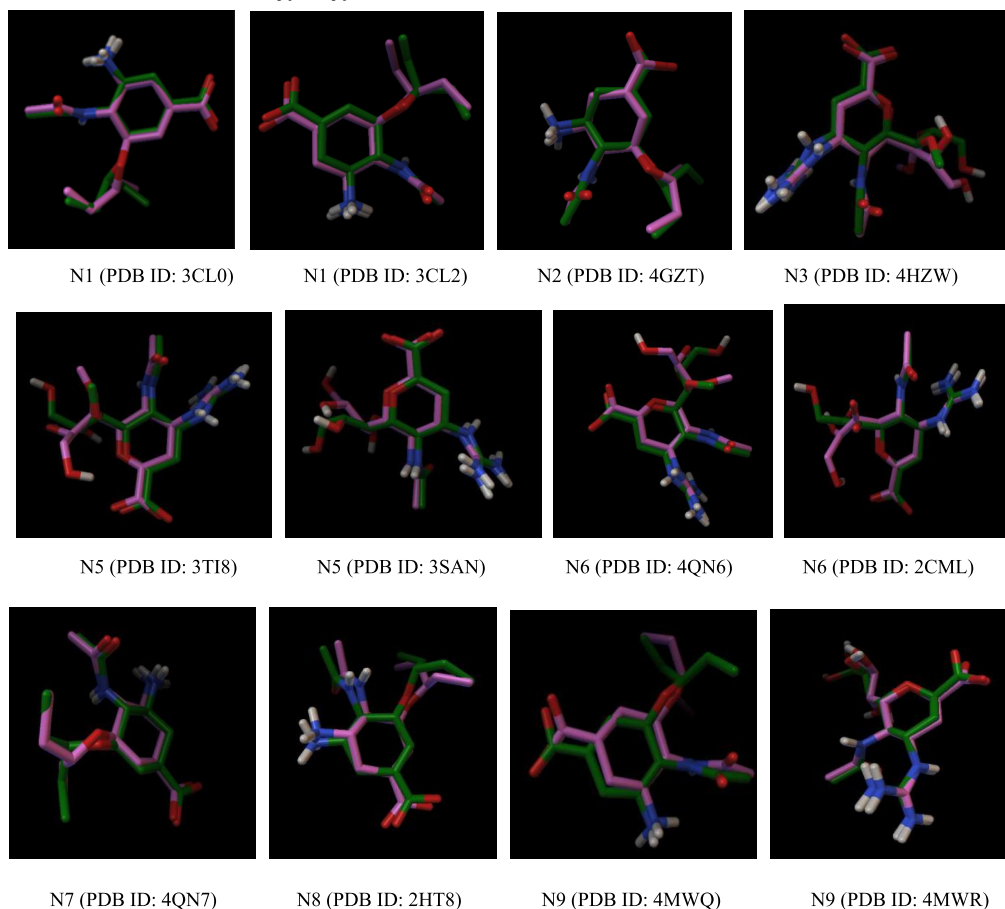


图 1 对接后的配体分子与原配体分子的构象叠合图

Fig. 1 Conformational mapping of docking ligand molecules with original ligand molecules

间的空间匹配和能量匹配, 空间匹配是分子间发生相互作用的基础, 能量匹配是分子间保持稳定结合的基础, 因此结合能是筛选活性分子的关键^[15-16]。分子对接后, 一般会选择结合能较低、构象聚类较好的分子为最有优势的化合物。对接结果表明, 25 个间苯三酚类单体化合物与各类型 NA 的结合能均较低 ($-6.8 \sim -9.3 \text{ kcal/mol}$), 提示它们对各类型、亚型的 NA 均具有一定的抑制作用。打分结果排名

3 结果与分析

3.1 间苯三酚类化合物抗流感病毒的虚拟筛选结果

3.1.1 实验条件准确性验证 使用 UCSF Chimera 软件将晶体结构中的原配体构象提取出来, 然后利用 AutoDock Vina 将配体分子对接回处理好的受体蛋白活性口袋中, 对接后的配体分子与原配体分子的均方根偏差 (RMSD) $< 0.2 \text{ nm}$, 且对接前后与 NA 发生作用的氨基酸残基能较好地保持一致, 则证明该方法能较好地重复出受体 NA 与原配体结合的构象, 具体结果见图 1。

3.1.2 结果分析 分子对接过程涉及配体与受体之

前 5 的化合物 (绵马贯众间苯三酚类多环化合物) 与各 NA 靶蛋白的对接结果见表 4。

有研究者根据 NA 蛋白各亚型晶体结构将其分为 2 类, 第 1 类有 N1、N4、N5、N8; 第 2 类有 N2、N3、N6、N7、N9 等, 这 2 类神经氨酸酶结构的不同之处主要体现在 150-loop (147~152 位氨基酸残基) 和 150-cavity。在第 1 类的晶体结构中, 150-loop 呈开放状态, 这使其活性中心可以延伸到

表 4 间苯三酚类化合物与 NA 作用的结合能值 ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)
Table 4 Binding energies between phloroglucinols and NA ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)

化合物	3CL0	3CL2	4GZT	4HZW	3TI8	3SAN
奥司他韦	-7.1	-6.9	-6.3	—	—	—
扎那米韦	—	—	—	—	—	-8.3
拉那米韦	—	—	—	-7.9	-8.5	—
M18	-8.0	-8.0	-8.2	-8.2	-8.2	-8.0
M19	-7.8	-7.7	-7.9	-8.2	-8.2	-8.1
M20	-7.8	-7.7	-7.8	-8.0	-8.0	-8.0
M22	-8.3	-7.6	-7.8	-8.4	-8.4	-8.3
M24	-7.9	-7.8	-8.2	-8.6	-8.7	-8.4
化合物	4QN6	2CML	4QN7	2HT8	4MWQ	4MWR
奥司他韦	—	—	-6.9	-6.9	-7.0	—
扎那米韦	—	-8.1	—	—	—	-8.5
拉那米韦	-8.2	—	—	—	—	—
M18	-8.1	-8.2	-7.9	-7.4	-8.2	-8.3
M19	-8.5	-8.3	-8.0	-7.6	-8.4	-8.9
M20	-8.4	-8.4	-7.9	-7.7	-8.1	-8.7
M22	-8.3	-8.8	-8.6	-7.8	-9.0	-9.3
M24	-8.3	-8.2	-7.9	-7.3	-8.4	-9.1

150-cavity; 而在第 2 类的晶体结构中, 150-loop 是闭合的, 故其活性中心与 150-cavity 不连续^[17]。

从这些化合物与 NA 活性口袋的结合模式图看, 单环与双环的间苯三酚类化合物只能单独与活性口袋或 150-cavity 的氨基酸作用, 而多环(三环、四环)的间苯三酚类化合物可同时嵌入第 1 类 NA (N1、N5、N8) 的活性口袋和 150-cavity 内(图 2), 大部分间苯三酚类化合物可以进入第 2 类 NA 的活性口袋。五环化合物的大部分结构都暴露在活性口袋外侧, 可能是由于多环化合物侧链的增加和结构的立体性, 导致化合物不能完全进入活性口袋, 露在活性口袋外侧的化合物与非活性位点形成疏水作用, 减弱了此类化合物与活性位点的结合而呈现出较低的抑制活性。因此推测间苯三酚类化合物抗 NA 活性强弱顺序为四环>三环>双环>五环>单环。

NA 活性口袋的框架是由 18 个保守的氨基酸残基构成, 其影响整个水解糖苷键的催化过程, 并具有维持酶活性中心空间构象的作用^[18]。分子对接筛选的活性化合物应与蛋白质活性口袋中的关键氨基酸形成氢键, 并与周围的其他氨基酸相互作用, 且形成的氢键数量越多, 距离越短, 相互作用越紧密, 对降低结合能贡献越大。由于多环(三环、四环)

间苯三酚既能嵌入 NA 活性口袋又能伸入 150-cavity, 推测其抑制流感病毒 NA 活性高于单、双环化合物, 对这些化合物与活性口袋内发生氢键和疏水键作用的氨基酸残基进行分析, 结果发现 M18、M19、M20、M22 和 M24 可以与 N1、N2、N3、N5、N8 类型 NA 活性口袋中的重要氨基酸残基 ARG118、ARG292、ARG371、GLU119、GLU227、ARG152、ASP151 发生氢键或疏水作用, 且形成的氢键距离较短, 推测 M18、M19、M20、M22 和 M24 具有较好的潜在抗流感病毒 NA 的活性。以 M22 为例展示其与 NA (3CL0) 的作用情况, 见图 3。结合能最低的化合物与 N1、N2、N3、N5、N8 中重要氨基酸残基的相互作用情况见表 5。

对该类化合物抗病毒作用进行构效关系分析, 综合考虑了不同环数间苯三酚类化合物与各类型、亚型 NA 的结合能、三维结合模式及发生作用的重要氨基酸残基, 绵马贯众间苯三酚类多环(三环、四环)化合物具有更强的抗流感病毒活性, 其中 M18、M19、M20、M22 和 M24 为最终筛选出的 5 个具有潜在抗不同类型流感病毒的间苯三酚类候选化合物。

3.2 候选化合物抗流感病毒的体外筛选结果

3.2.1 候选化合物对流感病毒 NA 的活性 选取 4

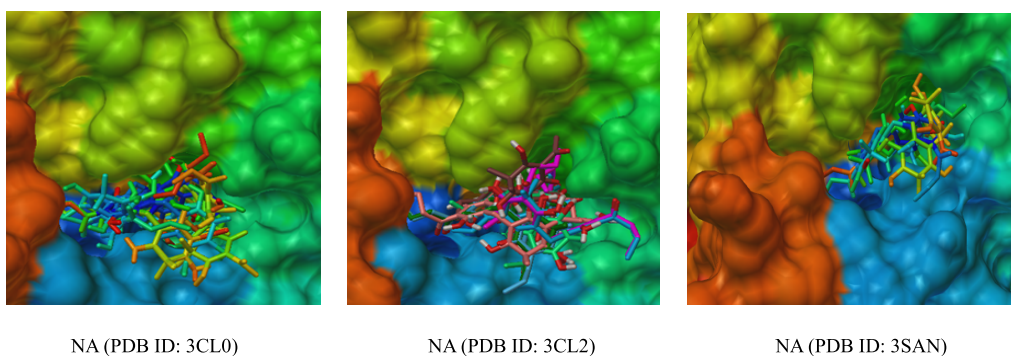


图 2 三环、四环间苯三酚类化合物与 NA 的三维结合模式图

Fig. 2 Binding modes of trimeric and tetrameric phloroglucinols in active site of NA

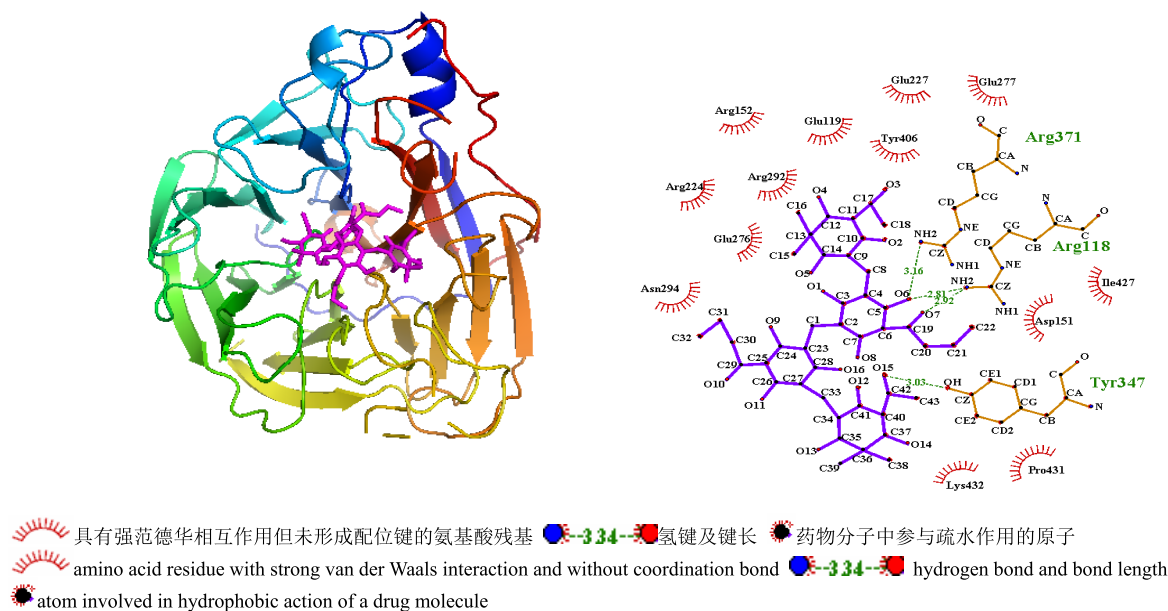


图 3 M22 与 NA (3CL0) 相互作用的三维图及二维平面图

Fig. 3 Three- and two-dimensiongraphics of binding modes of M22 with key residues of NA (3CL0)

个候选化合物 (图 4) 对 H1N1 及 H5N1 流感病毒 NA 均有不同程度的抑制作用 (表 6), 其中 M22 的抑制作用最为显著, 对 H1N1 及 H5N1 的 IC_{50} 值分别为 (26.73 ± 0.57) 、 $(18.59 \pm 4.53) \mu\text{mol/L}$ 。

3.2.2 M22 对 MDCK 细胞毒性 M22 对 MDCK 细胞的 TC_{50} 为 $223 \mu\text{g/mL}$, TC_0 为 $200 \mu\text{g/mL}$ 。

3.2.3 M22 对流感病毒的抑制作用 CPE 法实验结果表明 M22 对流感病毒各株感染细胞均具有较好的治疗作用 (表 7)。

4 讨论

目前已经发现的 NA 抑制剂主要包括唾液酸类、环己烯类、苯甲酸类、呋喃类、环戊烷类及吡咯烷类, 这 6 类抑制剂的母核结构虽然不同, 但具有类似的药效团, 都含有 1 个羧基、1 个碱基及 1 个疏水性基团^[19]。根据 Stoll 等^[20]提出的 NA 活性

位点的模型, NA 可以分为 5 个部分 (S1~S5): S1 为一正电性区域, 由 3 个精氨酸残基 (Arg118、Arg292、Arg371) 组成, 能够与酸性基团 (如羧基、磷酸基) 形成强的静电作用, 是酶活性中心最重要的口袋; S2 是一负电性区域, 主要由 2 个谷氨酸残基 (Glu119 和 Glu227) 组成, 能够与碱性基团 (如氨基、胍基) 形成氢键作用, 也为一个很重要的口袋; S3 为一疏水区, 由 Ile222、Trp178 和 Arg152 的疏水侧链组成, 能够与疏水基团 (如烷基) 作用; S4 也为一个疏水区, 由 Ile222、Ala246 和 Arg224 的疏水侧链组成; S5 是一个极性可变区, 由 Glu276 和 Ala246 组成, 既可以与碱性基团通过氢键相互作用, 又可以与疏水基团作用。奥司他韦属于环己烯类 NA 抑制剂, 其结构中的 $-\text{COO}^-$ 、 $-\text{NH}_3^+$ 、 $-\text{NHAc}$ 和 $-\text{OCH}_2\text{Et}_2$ 这 4 个基团与 NA 活性位点的氨基酸残

表 5 间苯三酚类化合物与 NA 分子对接结果

Table 5 Molecular docking results of phloroglucinols with NA

靶蛋白	化合物	化合物与氨基酸残基间氢键				强范德华相互作用的残基
		化合物原子	氨基酸残基	原子	距离/nm	
3CL0	M22	C ₁₉ =O	ARG118	NH ₂	0.292	TYR406, GLU277, GLU227, GLU119, ARG152, ARG292, ARG224, GLU276, ASN294, LYS432, PRO431, ASP151, ILE427
		C ₄₂ =O	TYR347	OH	0.303	
		C ₅ -OH	ARG371	NH ₂	0.316	
			ARG118	NH ₂	0.281	
3CL2	M25	C ₂ -OH	ARG292	NH ₂	0.288	TYR406, SER294, ALA346, GLU276, ARG224, GLU277, GLU227, ASP151, ILE222, GLU119, SER179, ARG118, ARG152, TRP178
		C ₄ -OH	SER246	OG	0.312	
		C ₁₈ =O	ARG292	NH ₁	0.292	
			ARG292	NH ₂	0.325	
			ARG371	NH ₁	0.306	
		C ₃₀ =O	SER246	OG	0.292	
		C ₆ -OH	TYR347	OH	0.273	
4GZT	M24	C ₂ -O ₁₅	ARG292	NH ₁	0.321	ALA246, ILE222, ARG224, TRP178, GLU277, ILE427, ARG403, THR439, TYR406, ARG150, GLY151, VAL149 ARG430
			ARG292	NH ₂	0.280	
		C ₂ -O ₁₅	HIS347	ND ₁	0.309	
		C ₂ -O ₁₅	ASN294	ND ₂	0.322	
		C ₉ -O ₁	ARG371	NH ₁	0.301	
		C ₁₆ -O ₂	ARG371	NH ₂	0.331	
		C ₁₈ -O ₄	GLU432	OE ₁	0.270	
		C ₁₈ -O ₄	LYS431	N	0.259	
		C ₄₂ -O ₁₃	ARG152	NH ₁	0.205	
		C ₁₅ =O	ARG152	NH ₂	0.281	
4HZW	M24	C ₅ -OH	ARG118	NH ₂	0.296	ILE222, GLU276, ARG224, TRP178, SER179, GLU227, SER246, ASP151, ARG430, ILE427, VAL149, PRO431, TYR347, TYR406, ARG292
		C ₂₈ =O	ARG152	NH ₂	0.280	
		C ₂₃ -OH	ARG152	NH ₁	0.299	
			ARG152	NH ₂	0.303	
		C ₃₀ =O	ARG118	NH ₂	0.318	
3TI8	M24	C ₄ -O ₁₆	ARG118	NH ₁	0.317	GLU227, GLU119, ASP151, TYR406, GLU277, GLU276, ARG292, ASN294, PRO431, LYS432, ILE427
		C ₁₁ =O	ARG152	NH ₁	0.274	
			ARG152	NH ₂	0.327	
		C ₁₈ -O ₄	GLU277	OE ₂	0.302	
		C ₂₂ -O ₅	GLU276	OE ₂	0.309	
		C ₂₉ -O ₁₁	ARG371	NH ₁	0.318	
		C ₂₉ -O ₁₁	ARG371	NH ₂	0.302	
2HT8	M22	C ₄₂ -O ₁₃	TYR347B	OH	0.308	GLU119, GLU227, TYR406, GLU277, GLU276, ARG224, ARG292, ALA246, GLU432, ASP151, ILE427, PRO431, TYR347
		C ₅ -O ₆	ARG118	NH ₁	0.289	
		C ₅ -O ₆	ARG118	NH ₂	0.307	
		C ₅ -O ₆	ARG371	NH ₂	0.306	

基相互作用,可分别占据酶活性位点的 S1、S2 和 S3 口袋;绵马贯众中间苯三酚类化合物结构中的羰基和羟基以负离子形式与 NA 活性位点 S1 区中 3 个带正电的精氨酸 (ARG118、ARG292、ARG371) 结合,形成较强的氢键作用,虚拟筛选结果提示其与奥司他韦活性相近。虽然 NA 抑制剂包括大量结构,但高活性的很少,因为抑制剂只有在其母核以及取代基完全符合 NA 活性位点要求的情况下,才

能够与酶紧密结合,发挥强的抑制作用。绵马贯众中间苯三酚类化合物作为一类天然产物,虽然在结构上不完全符合经典抑制剂的药效团特征,其对流感病毒 NA 的抑制活性弱于阳性药奥司他韦,但是其结构骨架不同于已上市 NA 抑制剂,有望解决当前流感病毒耐药性问题。

本实验采用分子对接技术对已从绵马贯众中分离得到的 25 个间苯三酚类化合物进行了抗流感病

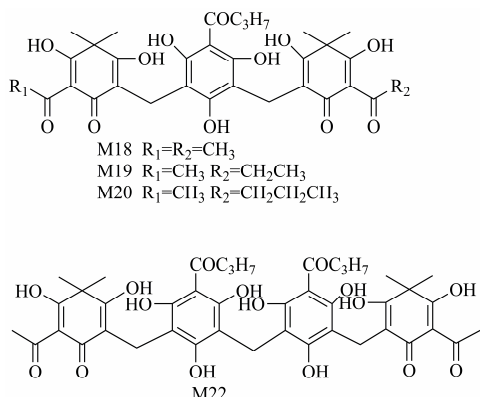


图4 化合物 M18、M19、M20、M22 的化学结构

Fig. 4 Structure of compounds M18, M19, M20, and M22

表6 间苯三酚类化合物对 NA 的抑制活性

Table 6 Inhibition effects of phloroglucinols on NA

化合物	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)	
	H1N1	H5N1
M18	36.39±3.68	29.57±2.48
M19	55.97±1.43	48.47±4.79
M20	89.51±5.55	96.58±7.67
M22	26.73±0.57	18.59±4.53
奥司他韦*	21.65±6.81	4.62±0.77

*阳性对照, 浓度单位为 nmol·L⁻¹*Positive control; Concentration unit nmol·L⁻¹

表7 M22 对流感病毒的抑制作用

Table 7 Inhibition effects of M22 on influenza virus

病毒	IC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)	TI
FM1 株	17.86	12.49
PR8 株	31.76	7.02
2009 株	35.65	6.25
H3N2	71.13	3.13

毒 NA 活性筛选, 得到 5 个具有良好活性的候选化合物, 然后通过 NA 抑制实验及 CPE 法进行体外活性验证, 结果表明 M22 的抗病毒作用最强, 且其对多种流感病毒毒株均有抑制活性, 为利用中药绵马贯众开发新的抗流感病毒药物提供了依据。

参考文献

- [1] Jeong H J, Ryu Y B, Park S J, *et al.* Neuraminidase inhibitory activities of flavonols isolated from *Rhodiola rosea* roots and their *in vitro* anti-influenza viral activities [J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17(19): 6816-6823.
- [2] Trifonov V, Khiabani H, Rabadan R. Geographic dependence, surveillance, and origins of the 2009 influenza A (H1N1) virus [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(2): 115-119.
- [3] 刘盛林. 多变的流感病毒 [J]. 阴山学刊: 自然科学版,

2017, 31(2): 58-59.

- [4] 陈宝龙, 邓旭, 曾光尧, 等. 神经氨酸酶抑制剂抗流感病毒的研究进展 [J]. *中国药理学杂志*, 2015, 50(1): 7-14.
- [5] White M R, Crouch E, Hartshorn M. *et al.* Cooperative anti-influenza activities of respiratory innate immune proteins and neuraminidase inhibitor [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 288(5): 831-840.
- [6] Govorkova E A, Fang H B, Tan M, *et al.* Neuraminidase inhibitor-rimantadine combinations exert additive and synergistic anti-influenza virus effects in MDCK cells [J]. *Antimicrob Agents Chemothe*, 2004, 48(12): 4855-4863.
- [7] Hampson A W. Vaccines for pandemic influenza. The history of our current vaccines, their limitations and the requirements to deal with a pandemic threat [J]. *Ann Acad Med Singapore*, 2008, 37(6): 510-517.
- [8] Kieny M P, Fukuda K. The pandemic influenza vaccine challenge [J]. *Vaccine*, 2008, 26(14): D3-D4.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [10] Lee H B, Kim J C, Lee S M. Antibacterial activity of two phloroglucinols, flavaspidic acids AB and PB, from *Dryopteris crassirhizoma* [J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(5): 655-659.
- [11] Chen J X, Zeng Z L, Fang B H, *et al.* Analysis of chemical constituents of the anti-avian influenza virus site of *Dryopteris crassirhizoma* by HPLC-ESI/APCI-MS [J]. *J Instr Anal*, 2008, 27(6): 623-626.
- [12] Lee S M, Na M K, An R B, *et al.* Antioxidant activity of two phloroglucinol derivatives from *Dryopteris crassirhizoma* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26(9): 1353-1356.
- [13] 杨关林, 张杨, 南春红, 等. 绵马贯众等五味中药抗甲型流感病毒 FM1 株的实验研究 [J]. *实用中医内科杂志*, 2010, 24(7): 3-4.
- [14] 陈建新, 曾振灵, 方炳虎, 等. 绵马贯众抗禽流感病毒活性部位的高效液相色谱-质谱法分析 [J]. *分析测试学报*, 2008, 27(6): 623-626.
- [15] Chen K, Li T, Cao T. Tribe-PSO: A novel global optimization algorithm and its application in molecular docking [J]. *Chemometr Intell Lab Syst*, 2006, 82(1/2): 248-259.
- [16] Ajay, Murcko M A. Computational methods to predict binding free energy in ligand-receptor complexes [J]. *J Med Chem*, 1995, 38(26): 4953-4967.
- [17] Russell R J, Haire L F, Stevens D J, *et al.* The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design [J]. *Nature*, 2006, 443(7107): 45-49.
- [18] White M R, Crouch E, Hartshorn M, *et al.* Cooperative anti-influenza activities of respiratory innate immune proteins and neuraminidase inhibitor [J]. *Am J Physiol-Lung C*, 2005, 288(5): 831-840.
- [19] Liu Y, Zhang J, Xu W. Recent progress in rational drug design of neuraminidase inhibitors [J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14(27): 2872-2891.
- [20] Stoll V, Stewart K D, Maring C J, *et al.* Influenza neuraminidase inhibitors: Structure-based design of a novel inhibitor series [J]. *Biochemistry*, 2003, 42(3): 718-727.