

基于 HDAC3/8 分子互作技术的类叶牡丹抗类风湿性关节炎有效部位活性成分分析

赵诗雨¹, 笔雪艳², 杨炳友¹, 匡海学¹, 王秋红³, 吕邵娃^{1*}

1. 黑龙江中医药大学北药基础与应用研究重点实验室, 黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150000
2. 黑龙江省食品药品检验检测所, 黑龙江 哈尔滨 150000
3. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510000

摘要: 目的 筛选类叶牡丹 *Caulophyllum robustum* 抗类风湿性关节炎(RA)有效部位中具有抑制 HDAC3/8 活性的成分。方法 通过 AutoDock 计算机虚拟对接得到类叶牡丹活性成分与 HDAC3/8 对接结合能, 再通过荧光检测方法进行结合生物活性验证。最后采用 Biacore T200 分子相互作用分析系统, 构建偶联 HDAC 受体的分子芯片, 将较优活性成分与靶蛋白进行分子对接, 考察成分与靶标的亲和性。结果 葎草皂苷 H、葎草皂苷 G、葎草皂苷 D 和 leonticin D 与 HDAC3/8 均无结合能, 常春藤皂苷元、刺囊酸和齐墩果酸与 HDAC3/8 的虚拟对接结果最好, 且抑制 HDAC3/8 生物活性最佳。偶联 HDAC 受体的分子芯片后, 具有结合趋势的活性成分中与靶蛋白亲和性最佳的成分是常春藤皂苷元。结论 实验证明类叶牡丹抗 RA 有效部位中具有 HDAC 抑制活性的化学成分, 其中与 HDAC3/8 结合最好的是常春藤皂苷元。

关键词: 类叶牡丹; 组蛋白去乙酰化酶; 分子对接; 葎草皂苷 H; 葎草皂苷 G; 常春藤皂苷元; 刺囊酸; 齐墩果酸

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)08-2117-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.08.019

Analysis of active components of *Caulophyllum robustum* against rheumatoid arthritis based on HDAC3/8 molecular interaction technology

ZHAO Shi-yu¹, BI Xue-yan², YANG Bing-you¹, KUANG Hai-xue¹, WANG Qiu-hong³, LV Shao-wa¹

1. Key Laboratory of Basic and Applied Research of Northern Medicine, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Basic Research on Pharmacodynamic Substances of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine, Harbin 150000, China
2. Heilongjiang Provincial Food and Drug Inspection and Testing Institute, Harbin 150000, China
3. College of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510000, China

Abstract: **Objective** To screen for components that inhibit HDAC3/8 activity in the effective part of the *Caulophyllum robustum* against rheumatoid arthritis (RA). **Methods** The binding energy of the active component of the *C. robustum* with HDAC3/8 was obtained by virtual docking with AutoDock computer, and the binding activity was verified by fluorescence detection. Finally, the Biacore T200 molecular interaction analysis system was used to construct a molecular chip coupled with HDAC receptor, and the optimal active component was molecularly docked with the target protein to investigate the affinity of the component with the target. **Results** Cauloside H, Cauloside G, Cauloside D, and Leonticin D have no binding energy to HDAC3/8. The virtual docking results of hederagenin, echinocystic acid and oleanolic acid and HDAC3/8 are the best, and the biological activity of HDAC3/8 is best. After coupling the molecular chip of the HDAC receptor, the component with the best affinity for the target protein in the binding tendency is hederagenin. **Conclusion** The experimental results showed that the active constituents of the *C. robustum* have the chemical component of HDAC inhibitory activity, and the best combination with HDAC3/8 is hederagenin.

Key words: *Caulophyllum robustum* Maxim.; histone deacetylase (HDAC); molecular docking;; cauloside H; cauloside G; hederagenin; echinocystic acid; oleanolic acid

收稿日期: 2019-12-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81373929); 校基金新药临床前研究基金项目(2018xy04)

作者简介: 赵诗雨(1996—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事新药研究与开发。Tel: (0451)87266916 E-mail: 1921004800@qq.com

*通信作者 吕邵娃, 教授, 硕士生导师, 主要从事新药研究与开发。Tel: (0451)87266916 E-mail: lswa5599@hotmail.com

类叶牡丹 *Caulophyllum robustum* Maxim. 为小檗科(Berberidaceae)红毛七属 *Caulophyllum* Maxim. 植物, 味苦、辛, 性温, 具有抗炎、抑菌、镇痛等作用^[1]。前期研究确定了类叶牡丹有效部位对肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 诱导的人类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)成纤维滑膜细胞(MH7A)模型具有很好的抗炎效果^[2], 类叶牡丹有效部位中的主要成分是总皂苷和总生物碱, 实验发现其可以有效降低胶原诱导性关节炎(CIA)关节炎指数^[3]。组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)抑制剂可以通过调节细胞组蛋白的乙酰化水平而调控基因的表达, 进而调节染色质与染色质相关的结合蛋白来调控染色质的基因表达^[4], 促使细胞周期阻滞、诱导细胞凋亡, 从而有效控制病理进程。最新研究显示, HDAC 抑制剂对 RA 的患者有抗炎作用, HDAC 是治疗 RA 和 TNF- α 驱动的自身免疫性疾病的潜在治疗靶标^[5]。目前研究发现的人体内存在 18 种 HDAC 中, 与抗炎关系最为密切的是 HDAC3 和 HDAC8。本实验选择利用 AutoDock 4.2.6 分子对接筛选以及生物活性检测的方法, 从类叶牡丹抗 RA 有效部位成分中筛选出具有 HDAC 抑制作用的活性成分, 再采用 Biacore T200 分子相互作用分析系统验证活性成分与靶蛋白结构的亲和力 K_D 。以期将 HDAC 与类叶牡丹联系起来, 为寻找新的类叶牡丹治疗 RA 的靶标奠定基础。

1 材料

1.1 药品与试剂

Biacore T200、CM5 芯片(批号 29-1049-88)、氨基偶联试剂盒(批号 BR-1000-50)、10 x PBS-P+缓冲液(批号 28-9950-84)、均购自美国 GE 公司; HDAC3(批号 NBPI1-99605)购自美国 Novus 公司; HDAC8(批号 CF-4359-DA-050)购自美国 R&D 公司; Spectra Max 型酶标仪购自美国 PerkinElmer 公司; 荧光 96 孔板购自美国 Costar 公司; DL-CJ-2N 型超净工作台购自北京东联哈尔仪器制造有限公司; HH-S4 型恒温水浴锅购自郑州长城科工贸有限公司; HDAC8 Inhibitor Fluorometric Screening Assay Kit 和 HDAC3 Inhibitor Fluorometric Screening Assay Kit 均购自美国 BioVision 公司(批号 K368-100 和 K363-100); 葎严仙皂苷 C、葎严仙皂苷 D、葎严仙皂苷 G、葎严仙皂苷 H、leonticin D 和葎严仙碱 B 均为本实验室自制, 经 HPLC 等相关波谱证实质量分数 $\geq 98\%$; 对照品 *N*-甲基金雀花碱(批号

486-86-2、质量分数 $\geq 98\%$)、常春藤皂苷元(批号 465-99-6、质量分数 $\geq 98\%$)、木兰花碱(批号 4681-18-1、质量分数 $\geq 98\%$)和刺囊酸(批号 510-30-5、质量分数 $\geq 98\%$)购自上海源叶生物科技有限公司; 齐墩果酸(批号 508-02-1、质量分数 $\geq 98\%$)购自 MCE 公司。

1.2 平台与软件

本研究所有工作均在 Microsoft Windows XP Professional 操作系统中完成, 采用 Chem Bio Office 2004 程序中的 Chem Bio Draw 模块以及 Chem3D 模块(美国剑桥公司), Auto Dock Tools 4.2.6 (Scripps 研究所 Olson 实验室)以及 PyMOL 2.3.1 (DeLano Scientific LLC 公司), 分子可视化程序 VMD (visual molecular dynamics) 1.9.3 (伊利诺伊州立大学香槟分校 UIUC 研发)。参数设置除非特殊指明, 均为默认值。后期 Biacore T200 分子间相互作用分析技术实验与北京大学医学院天然药物及仿生药物国家重点实验室合作。

2 方法

2.1 分子对接

2.1.1 大分子蛋白数据库的建立 选用与抗炎关系最为密切的 HDAC3 和 HDAC8, 均从 PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)中搜索并下载, 保留其 PDB 格式文件。在网址中获得大分子的基本信息, HDAC3 的 PDB 编号为 4A69, HDAC8 的 PDB 编号为 5FCW, 均为人类 A、B 链, 突变均为 0, 通过 VMD 1.9.3 构建其 3D 模型。将 HDAC 的结构删掉配体和多余的水分子, 保存成为 protein.pdb, 作为分子对接的受体结构。

2.1.2 待筛选小分子库的建立 在中国知网(CNKI)中找到所有待筛选小分子的化学结构式, 通过 ChemBioDraw 画出其 2D 构架图, 构建二维结构数据库, 转换至 Chem3D 模块获得小分子的三维结构图及每个小分子的 pdb 格式文件。将小分子的 pdb 格式进行加氢、电荷、质子化状态确认, 最后保存 ligand.pdb 作为分子对接的配体结构。

2.1.3 大分子蛋白与小分子对接过程 运行 Auto Dock Tools 4.2.6 打开 ligand.pdb, 构建 ligand.pdbqt 文件, 该文件中包含了配体结构中的原子信息和可旋转键的信息等。通过 Grid Box 设置对接的盒子大小, 保存设置后保存其 gpf 文件。运行 Docking-Lamrckian GA, 选择拉马克遗传算法作为对接算法, 保存成为 protein_ligand.dpf 文件, dpf 文件中包

含了分子对接的信息,默认对接的构象数为 10 个,进行手动修改对接的构象数目为 50 个(ga_run 50)。运行 AutoGrid 4.2.6 和 AutoDock 4.2.6 程序。运行 AutoGrid4 程序,得到对接中所有原子的信息;运行 Auto Dock4 程序进行对接,对接的结果文件保存在 dlg 文件中,得到对接评分。Auto Dock 4.2.6 软件可以给出大分子蛋白和小分子不同结合位点的结合能,能量值越低,说明结合能越好。得到结合能数据后,选取对接最优几种小分子模型进行 PyMOL 2.3.1 渲染作图。

2.2 HDAC3/8 抑制生物活性验证

称取分子对接结果中具有结合活性的小分子对照样品,用 1 mL DMSO 溶解成 1 mmol/L 母液。取母液适量,分别配成 500、50、5 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 4 种浓度溶液待用。用试剂盒中的 buffer 将各浓度的待测小分子溶液稀释至 4 倍浓度,同时按照要求配制曲古柳菌素(trichostatin A, TSA)阳性对照溶液。严格按照说明进行操作,设置空白对照(不含 HDAC 和待测样品)以及酶对照(含有 HDAC,不含待测样品)。用酶标仪进行荧光强度检测。 R_{EG} 、 R_{S} 、 R_{EC} 分别代表空白孔、待测样品或 TSA 阳性对照孔、酶对照孔的荧光强度。计算不同浓度不同待测样品的 HDAC3 和 HDAC8 的抑制率。

$$\text{抑制率} = (R_{\text{EC}} - R_{\text{S}}) / (R_{\text{EC}} - R_{\text{EG}})$$

2.3 CM5 芯片配体偶联

将 HDAC3/8 均用醋酸钠 pH 5.5、5.0、4.5 和 4.0 分别稀释到 10 $\mu\text{g/mL}$,各准备 100 μL ,通过预

富集实验,确定 pH 4.5 为最佳偶联条件。采用氨基偶联法将 HDAC3 和 HDAC8 分别偶联到 CM5 芯片上,用 pH 4.5 的醋酸钠将 HDAC3/8 分别稀释至 10 $\mu\text{g/mL}$,200 μL 进行正式偶联操作。芯片表面用 0.2 mol/L EDC 和 50 mmol/L NHS 以 1:1 比例配制的混合液活化,连续进样 7 min 后进 HDAC3/8,最后用 1 mol/L 乙醇胺盐酸(pH 8.5)封闭进样 7 min,封闭活化的芯片表面。

2.4 样品检测

按要求配制运行缓冲液、溶液校正曲线和小分子样品准备。选用前期具有结合活性的小分子,每个小分子最少 5 个浓度进样,选用多循环检测,获得最终蛋白与小分子的亲和力常数(K_{D})值,得到类叶牡丹有效部位中与 HDAC3/8 亲和力最佳的小分子成分。

3 结果

3.1 基于分子对接获得的结合能与结合位点

3.1.1 HDAC3 通过 AutoDock 4.2.6 计算出结合能后,在 go_run50 中选取最优结合能。结果(表 1)可见常春藤皂苷元在 17 位点的最优结合能最低,为 -33.41 kJ/mol;刺囊酸在 12 位点的最优结合能最低,为 -26.21 kJ/mol;齐墩果酸在 7 位点的结合能最低,为 -24.33 kJ/mol;TSA 阳性对照在 10 位点的结合能最低,为 -28.30 kJ/mol。葎草皂苷 H、葎草皂苷 G、葎草皂苷 D 和 leonticin D 与 HDAC3 无结合能,后期这 4 种成分将不再验证与 HDAC3 的生物活性结合能力。

表 1 不同位点 HDAC3-小分子的结合能

Table 1 Binding energies of HDAC3-small molecule at different binding sites

小分子	可旋转键/个	非极性氢/个	芳香碳/个	最佳位点	对接能量/(kJ·mol ⁻¹)
葎草皂苷 C	14	56	0	4	-11.18
N-甲基雀花碱	0	16	7	10	-19.30
葎草皂苷 B	4	26	6	5	-20.52
齐墩果酸	3	46	0	7	-24.33
葎草皂苷 H	31	79	0	7	23.99
葎草皂苷 G	30	80	0	9	16.11
刺囊酸	4	45	0	12	-26.21
葎草皂苷 D	20	20	20	10	0.71
leonticin D	25	25	25	6	10.72
木兰花碱	4	4	4	4	-18.38
常春藤皂苷元	3	3	3	17	-33.41
TSA	2	7	6	10	-28.30

3.1.2 HDAC8 通过 AutoDock 4.2.6 计算出结合能后, 在 go_run50 中选取最优结合能。结果 (表 2) 可见常春藤皂苷元在 14 位点的最优结合能最低, 为 -30.40 kJ/mol; 刺囊酸在 16 位点的最优结合能最低, 为 -27.80 kJ/mol; 齐墩果酸在 18 位点的结合能

最低, 为 -28.64 kJ/mol; TSA 阳性对照在 3 位点的结合能最低, 为 -27.76 kJ/mol。葎草皂苷 H、葎草皂苷 G、葎草皂苷 D 和 leonticin D 与 HDAC8 无结合能, 后期这 4 种成分将不再验证与 HDAC8 的生物活性结合能力。

表 2 不同位点 HDAC8-小分子的结合能

Table 2 Binding energies of HDAC8-small molecule at different binding sites

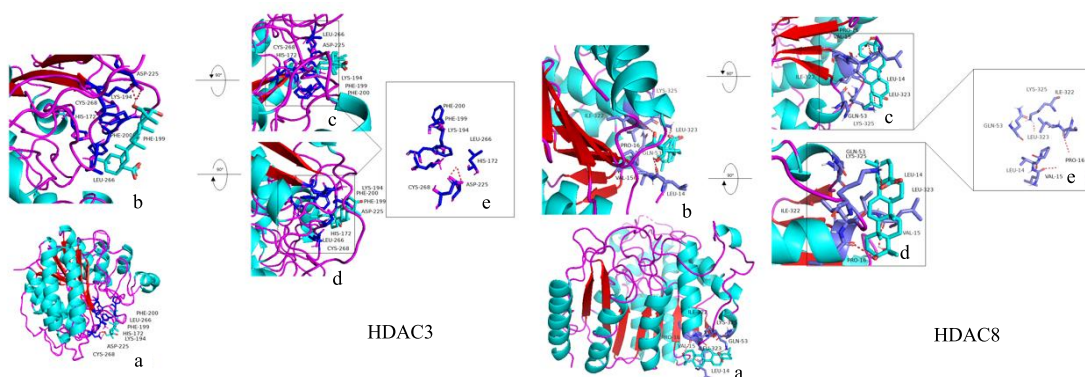
小分子	可旋转键/个	非极性氢/个	芳香碳/个	最佳位点	对接能量/(kJ·mol ⁻¹)
葎草皂苷 C	14	56	0	10	-9.42
N-甲基金雀花碱	0	0	0	16	-19.43
葎草皂苷 B	4	26	6	6	-20.14
齐墩果酸	3	46	0	18	-28.64
葎草皂苷 H	31	79	0	2	26.59
葎草皂苷 G	30	80	0	14	14.40
刺囊酸	4	45	0	16	-27.80
葎草皂苷 D	20	20	20	18	2.09
leonticin D	25	25	25	8	7.87
木兰花碱	4	22	0	13	-22.19
常春藤皂苷元	3	3	3	14	-30.40
TSA	2	7	6	3	-27.76

3.2 最低结合能小分子与 HDAC3/8 对接结合模型分析

根据 HDAC3/8 对接结果, 对接结合能最低, 即对接最佳的小分子为常春藤皂苷元, 其次刺囊酸和齐墩果酸对接结果也较好。对这 3 种结合能最佳成分通过 PyMOL 2.3.1 渲染作图, 得到图 1~3。图中所有 a 部分黄色虚线代表范德华力, 红色 Sheet 表示 β -折叠, 浅蓝色 Helix 为 α -螺旋, 紫色 Loop 为无规卷曲。图 1~3-b~e 中品红色虚线代表氢键, 电荷或极性相互作用, 活性位点氨基酸残基均用黄色二级结构表示, 图中绿色部分为小分子的二维结构。

根据 PyMOL 2.3.1 渲染图分析, 小分子常春藤皂苷元与 HDAC3 在活性位点 ASP-225 和 CYS-268 处具有氢键作用, 形成 2 个氢键, 且相互作用较强。其中与氨基酸 LEU-266、PHE-199 和 PHE-200 形成非极性疏水性结合, 对接过程中相关氨基酸共 7 种, 分别为 LEU-266、PHE-199、HIS-172、PHE-200、LYS-194、ASP-225 和 CYS-268。与 H33DAC8 在活性位点 LEU-323、PRO-16、VAL-15 和 VAL-15 处具有氢键作用, 形成 3 个氢键, 且相互作用较强。其中与氨基酸 LEU-323、PRO-16 和 LEU-14 形成非

极性疏水性结合, 对接过程中相关氨基酸共 7 种, 分别为 ILE-322、GLN-53、LEU-323、PRO-16、LYS-325、LEU-14 和 VAL-15。小分子刺囊酸与 HDAC3 在活性位点 ASP-93 和 ALA-20 处具有氢键作用, 形成 2 个氢键, 且相互作用较强。其中与氨基酸 PRO-23、GLY-21、ALA-20 和 GLY-19 形成非极性疏水性结合, 对接过程中相关氨基酸共 9 种, 分别为 ASP-93、ASP-92、TYR-18、PRO-23、GLY-21、ALA-20、GLY-19、VAL-96 和 HIS-22。与 HDAC8 在活性位点 ILE-322、GLN-53 和 LYS-325 处具有氢键作用, 形成 3 个氢键, 且相互作用较强。其中与氨基酸 LEU-323、PRO-16 和 LEU-14 形成非极性疏水性结合, 对接过程中相关氨基酸共 7 种, 分别为 ILE-322、GLN-53、LEU-323、PRO-16、LYS-325、LEU-14 和 VAL-15。小分子齐墩果酸与 HDAC3 在活性位点处无氢键作用, 其中与氨基酸 LEU-37、VAL-47 和 PHE-48 形成非极性疏水性结合, 对接过程中相关氨基酸共 6 种, 分别为 LEU-37、TYR-42、VAL-47、PHE-48、TYR-9 和 LYS-49。与 HDAC8 在活性位点 LYS-325、LEU-323 和 ILE-322 处具有氢键作用, 形成 3 个氢键, 且相互作用较强。其中与氨基酸 LEU-323、PRO-16 和 LEU-14 形成非极



a-最可能的结合位点 b-结合模型 c-在组合模型基础上旋转 90° d-显示在组合模型基础上旋转 90° e-活性位点周围的关键氨基酸残基, 下同
a-The most possible binding pose b-Binding model c-Rotate 90° on the combined model d-Rotate 90° display under the combined model e-key amino acid residues around active sites, same as below

图 1 HDAC3/8 和常春藤皂苷元的对接模式

Fig. 1 Binding pattern of HDAC3/8 and hederagenin

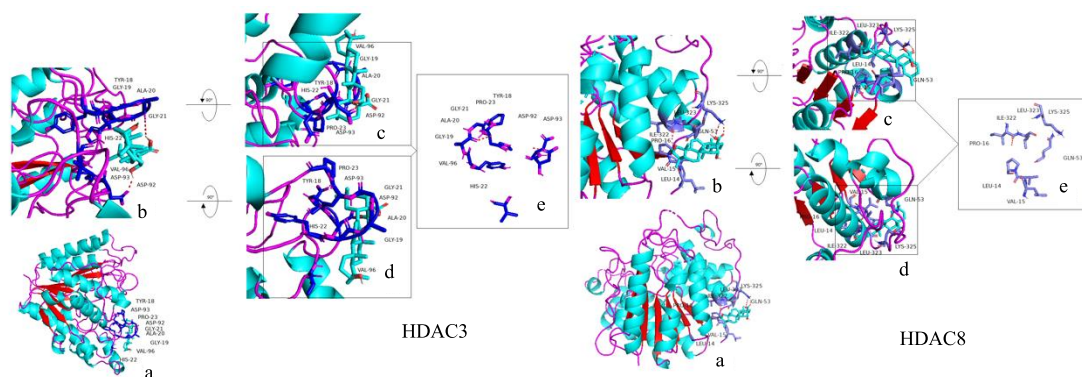


图 2 HDAC3/8 和刺囊酸的对接模式

Fig. 2 Binding pattern of HDAC3/8 and echinocystic acid

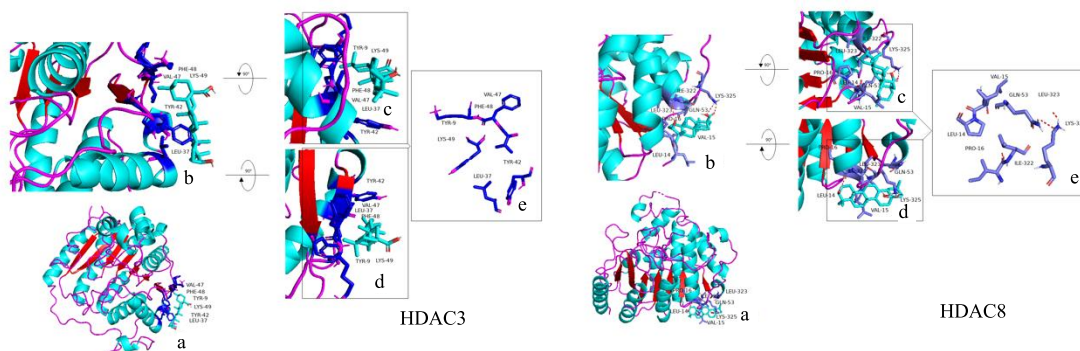


图 3 HDAC3/8 和齐墩果酸的对接模式

Fig. 3 Binding pattern of HDAC3/8 and oleanolic acid

性疏水性结合, 对接过程中相关氨基酸共 7 种, 分别为 ILE-322、GLN-53、LEU-323、PRO-16、LYS-325、LEU-14 和 VAL-15。

3.3 HDAC3/8 抑制生物活性的验证

根据分子对接结果, 选取与 HDAC3/8 呈现结

合活性的小分子进行生物活性验证, 见表 3。结果发现 TSA 阳性对照呈现很好的抑制效果, 对 HDAC3 抑制率可达到 89.00%, 对 HDAC8 的抑制率可达到 99.50%。同时根据结果可以看出分子对接结果良好的小分子, 在生物活性验证中, 仍呈现出

表 3 有效成分在不同浓度下对 HDAC3 和 HDAC8 的抑制率

Table 3 Inhibition rate of active constituents to HDAC3 and HDAC8 at different concentrations

小分子	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	抑制率/%		小分子	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	抑制率/%	
		HDAC3	HDAC8			HDAC3	HDAC8
TSA	10	89.00	99.50	齐墩果酸	5	31.70	40.72
葎严仙皂苷 C	500	41.26	30.04		0.5	29.85	33.00
	50	45.89	36.77	刺囊酸	500	43.45	57.88
	5	42.66	4.76		50	39.46	49.72
	0.5	45.81	-1.62		5	35.72	42.36
					0.5	29.68	36.11
N-甲基金雀花碱	500	47.71	37.84	木兰花碱	500	39.58	27.37
	50	42.40	25.98		50	20.10	18.25
	5	34.67	14.53		5	-100.26	18.23
	0.5	11.68	-7.94		0.5	-72.96	12.83
				常春藤皂苷元	500	74.57	57.37
葎严仙碱 B	500	-0.06	10.32		50	61.43	54.64
	50	-61.01	-2.78		5	60.82	52.55
	5	-45.11	-9.56		0.5	60.77	45.84
	0.5	-42.64	-12.76				
齐墩果酸	500	58.85	51.58				
	50	40.64	46.28				

不同程度良好的抑制 HDAC3/8 活性，常春藤皂苷元、刺囊酸和齐墩果酸生物活性验证结果仍为最佳。

3.4 基于 Biacore T200 分子互作技术得到小分子成分与 HDAC3/8 亲和力

实验结果表明，最佳偶联 pH 值为 4.5，HDAC3 在 CM5 芯片表面最终偶联量为 10 949 RU，HDAC8 在 CM5 芯片表面最终偶联量为 17 174 RU。TSA 作为阳性对照，结果显示其与 HDAC3/8 均有亲和性。小分子成分互作结果显示（图 4、5），仅刺囊酸、常春藤皂苷元和齐墩果酸、阳性对照 TSA 与 HDAC3 相互作用得到亲和力值，而 N-甲基金雀花碱、葎严仙碱 B、木兰花碱和葎严仙皂苷 C 与 HDAC3 几乎无结合；刺囊酸、常春藤皂苷元、齐墩果酸、葎严仙碱 B 和阳性对照 TSA 与 HDAC8 相互作用得到亲和力值，而 N-甲基金雀花碱、木兰花碱和葎严仙皂苷 C 与 HDAC3 几乎无结合。刺囊酸与 HDAC3 的 K_D 为 19.14 $\mu\text{mol/L}$ ，与 HDAC8 的 K_D 为 14.58 $\mu\text{mol/L}$ 。常春藤皂苷元与 HDAC3 的 K_D 为 2.96 $\mu\text{mol/L}$ ，与 HDAC8 的 K_D 为 0.94 $\mu\text{mol/L}$ 。齐墩果酸与 HDAC3 的 K_D 为 75.37 $\mu\text{mol/L}$ ，与 HDAC8 的 K_D 为 72.90 $\mu\text{mol/L}$ 。葎严仙碱 B 与 HDAC8 的 K_D 为 10.78 $\mu\text{mol/L}$ 。阳性对照 TSA 与 HDAC3 的 K_D 为 62.09 $\mu\text{mol/L}$ ，与 HDAC8 的 K_D 为

60.55 $\mu\text{mol/L}$ 。

4 讨论

分子相互作用是生命体的普遍主题，生命体内广泛存在各种蛋白-蛋白/多肽、蛋白-核酸、核酸和核酸、蛋白-磷脂、蛋白-小分子、病毒和蛋白相互作用。表面等离子共振（surface plasmon resonance, SPR）技术是美国、日本药典唯一认可的分子互作分析技术。Biacore 可以实时监控分子相互结合、解离的过程，是基于 SPR 原理的一项新技术。它无需对研究对象进行标记，并具有实时监测分子相互作用、不受样品颜色和浊度影响和样品用量很少等特点。本实验通过动力学的方法获得结合速率（ K_a ）和解离速率（ K_d ），进而计算其结合能常数（ $K_D = K_d/K_a$ ）^[6]。分子对接技术作为现在计算机模拟技术中非常重要的方法，已经得到了广泛的应用。它不仅可以减少新药研发过程中的盲目性，提高效率，减少研发所消耗的时间，还可以在大数据很多的时候，给出后期研究的大方向^[7]。基于荧光的 BioVision 的 HDAC3/8 抑制剂筛选，其原理是通过乙酰化含有乙酰化赖氨酸侧链的 HDAC 底物，再和赖氨酸 Developer 反应，脱乙酰化并裂解底物 [Arg-His-Lys-Lys (Ac)-AFC] 以释放 AFC 分子，再通过荧光法检测（ $E_x/E_m = 380/500 \text{ nm}$ ）。检测得到的荧光强弱反

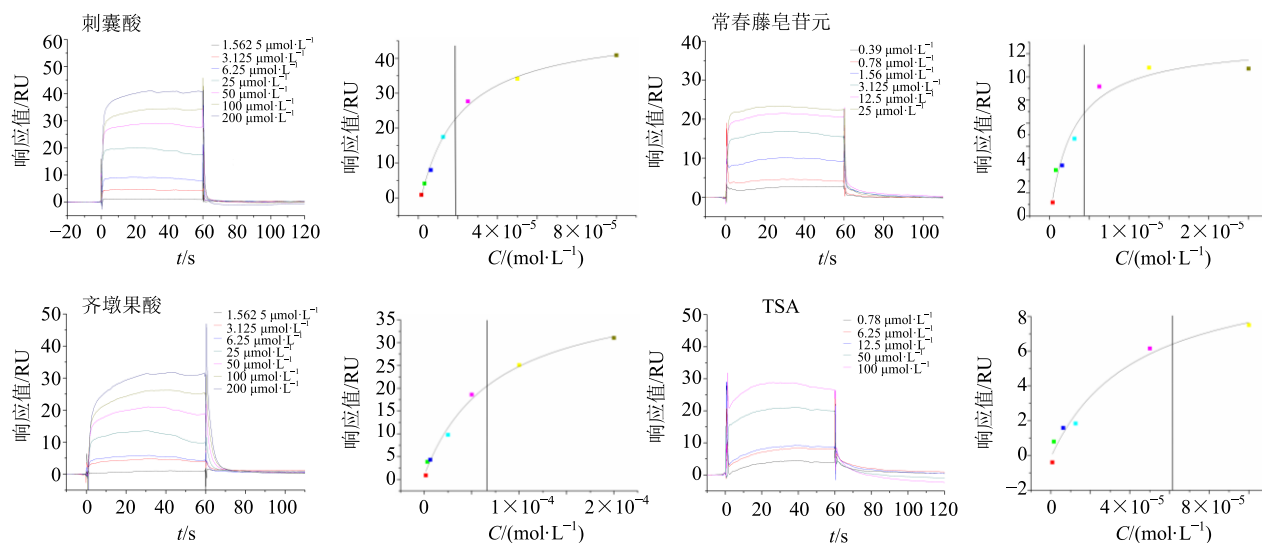


图 4 刺囊酸、常春藤皂苷元、齐墩果酸、阳性对照 TSA 与 HDAC3 的亲合力

Fig. 4 Echinocystic acid, hederagenin, oleanolic acid, positive control TSA and HDAC3 affinity

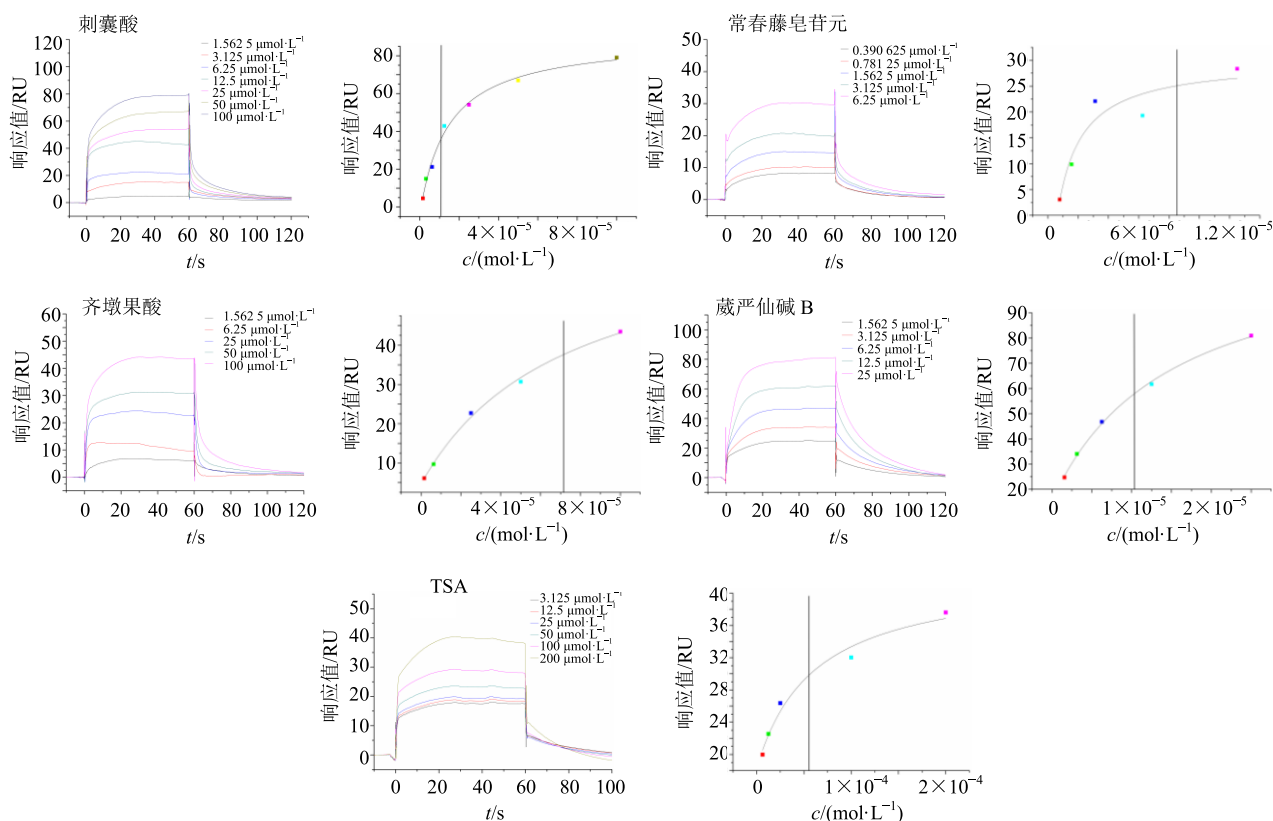


图 5 刺囊酸、常春藤皂苷元、齐墩果酸、葸麻仙碱 B 和阳性对照 TSA 与 HDAC8 的亲合力

Fig. 5 Echinocystic acid, hederagenin, oleanolic acid, caulophylline B and positive control TSA with HDAC8 affinity

应出 HDAC 的活性，在 HDAC 抑制剂的存在下，产生的荧光越弱，代表 HDAC 抑制剂对 HDAC 活性的抑制能力越强。

本实验研究，欲从类叶牡丹抗 RA 有效成分中找出具有 HDAC 抑制作用的成分，进而将类叶牡丹

治疗 RA 的研究与 HDAC 靶标联系起来。首先，我们通过计算机虚拟对接的方法，将 11 种类叶牡丹有效成分分别与 HDAC3/8 进行虚拟对接，实验发现葸麻仙皂苷 H、葸麻仙皂苷 G、葸麻仙皂苷 D 和 leonticin D 与 HDAC3/8 均无结合能。剩余的 7 种有

效成分中,常春藤皂苷元、刺囊酸和齐墩果酸与 HDAC3/8 的虚拟对接和生物活性抑制结果最好。研究进一步借助 Biacore T200 进行分子间相互作用分析,分析结果发现葎严仙皂苷 C 与 HDAC3/8 动力学结合较弱, *N*-甲基金雀花碱和木兰花碱与 HDAC3/8 几乎无动力学结合,葎严仙碱 B 仅与 HDAC8 有较弱的动力学结合。计算机虚拟筛选生物活性验证的结果与 Biacore T200 分子互作技术得到的结果相同,说明了实验结果的可靠性。最终结合效果最好的三种成分均为皂苷元结构,而所有基于这些皂苷元连糖键的三萜皂苷类成分在与 HDAC3/8 结合时,都受到了限制。实验结果可见,常春藤皂苷元是类叶牡丹抗 RA 有效成分中,与 HDAC3/8 联系最密切的成分,为进一步探究其基于 HDAC 靶标抗 RA 提供了实验依据,为寻找到新的抗 RA 靶标奠定了实验思路。

参考文献

- [1] Wang Q H, Lv S W, Guo Y Y, *et al.* Pharmacological effect of *Caulophyllum robustum* on collagen-induced arthritis and regulation of nitric oxide, NF- κ B, and proinflammatory cytokines *in vivo* and *in vitro* [J]. *Evid Based Compl Alternat Med*, 2017, 2017(1): 1-12.
- [2] 吕邵娃, 崔 杰, 段继新, 等. 类叶牡丹提取物对 TNF- α 诱导的人类风湿性关节炎成纤维滑膜细胞因子的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2018, 29(2): 143-148.
- [3] 吕春艳, 吕邵娃, 郭玉岩, 等. 类叶牡丹总皂苷与总生物碱组分配伍治疗类风湿性关节炎的配伍增效机制研究 [J]. *河北中医药学报*, 2018, 33(4): 5-9.
- [4] Padavattan S, Thiruselvam V, Shinagawa T, *et al.* Structural analyses of the nucleosome complexes with human testis-specific histone variants, hTh2a and hTh2b [J]. *Biophysical Chem*, 2017, 221: 41-48.
- [5] Angiolilli C, Kabala P A, Grabiec A M, *et al.* Histone deacetylase 3 regulates the inflammatory gene expression programme of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Annals Rheumatic Dis*, 2017, 76(1): 277-285.
- [6] Ren X M, Li D F, Jiang S, *et al.* Structural basis of specific recognition of non-reducing terminal *N*-acetylglucosamine by an *Agrocybe aegerita* Lectin [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0129608.
- [7] 党院霞, 梁丹灵, 周欣欣, 等. 基于分子对接技术的桑白皮总黄酮对高脂血症并高尿酸血症大鼠肾保护作用研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(5): 148-154.