

基于分子对接及分子动力学模拟的中药来源 II 型 5 α -还原酶抑制剂筛选

刘小赞¹, 潘敬灵¹, 梁玉婷¹, 叶连宝², 唐春萍¹, 沈志滨^{1,2,3*}

1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 广东省局精准药物递药制剂工程技术研究中心, 广东 广州 510006

3. 广东省化妆品工程技术研究中心, 广东 广州 510006

摘要: **目的** 基于分子对接及分子动力学模拟方法从中药活性成分中寻找潜在的 II 型 5 α -还原酶(5 α R2)抑制剂。**方法** 采用分子对接方法对中药来源的 26 种单体成分进行对接, 根据对接结果, 对与蛋白结合较强的化合物进行分子动力学模拟, 采用 MM/PBSA 方法计算体系的结合自由能; 通过体外微量酶反应体系进行生物活性验证。**结果** 26 种单体成分与 5 α R2 具有不同程度的结合能, 其中女贞苷、红花黄色素和扁柏双黄酮的结合能较低, 结合能力强; 分子动力学模拟结果与对接结果相一致(结合能力: 女贞苷-蛋白>红花黄色素-蛋白>扁柏双黄酮-蛋白); 活性实验结果显示 3 种成分对 5 α R2 具有一定的抑制作用, 女贞苷半数抑制浓度(IC₅₀)值为(42.12±3.83) μ mol/L, 红黄黄色素 IC₅₀ 值为(69.06±6.35) μ mol/L, 扁柏双黄酮 IC₅₀ 值为(191.28±5.90) μ mol/L。**结论** 筛选的 26 个单体成分中, 女贞苷、红花黄色素和扁柏双黄酮具有预防和治疗雄激素依赖性疾病新药研发的潜力, 为探索新型 5 α R2 抑制剂提供参考。

关键词: II 型 5 α -还原酶; 分子对接; 分子动力学模拟; 中药活性成分; 女贞苷; 红花黄色素; 扁柏双黄酮

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)10-2819-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.10.024

Screening of type II 5 α -reductase inhibitors from traditional Chinese medicine based on molecular docking and molecular dynamics simulation technology

LIU Xiao-yun¹, PAN Jing-ling¹, LIANG Yu-ting¹, YE Lian-bao², TANG Chun-ping¹, SHEN Zhi-bin^{1,2,3}

1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Guangdong Provincial Engineering Center of Topical Precise Drug Delivery System, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

3. Guangdong Cosmetics Engineering & Technology Research Center, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: **Objective** To screen the potential type II 5 α -reductase inhibitors from active ingredients of traditional Chinese medicine (TCM) based on molecular docking and molecular dynamics (MD) simulation technology. **Methods** The molecular docking was used to screen 26 monomer compositions from TCM. Based on the docking results, MD was performed to evaluate the binding strength of compounds with protein. The binding free energy of the system was calculated using the MM/PBSA method. The *in vitro* micro-reaction system was used to investigate biological activity. **Results** The binding energies of 26 monomer compositions from TCM to type II 5 α -Reductase were different. Among them, ligustroflavone, safflower yellow and hinokiflavone have low binding energies to type II 5 α -reductase, and their binding abilities were strong. The molecular dynamics simulation results are consistent with the docking results (binding capacity: ligustroflavone-protein > safflower yellow-protein > hinokiflavone-protein). The three components ligustroflavone, safflower yellow and hinokiflavone have a certain inhibitory activity on type II 5 α -reductase with the IC₅₀ value of (42.12 ± 3.83), (69.06 ± 6.35), and (191.28 ± 5.90) μ mol/L, respectively. **Conclusion** Among the screened 26 monomer compositions, ligustroflavone, safflower yellow and hinokiflavone have the potential to be used in the study of treatment and prevention of androgen-dependent diseases, which provides a reference for further exploration and discovery of type II 5 α -reductase inhibitors.

收稿日期: 2020-02-22

基金项目: 广东省科技厅应用研发专项(2015B020234009); 国家重点研发计划“中医药现代化”重点专项项目(2018YFC1707100)

作者简介: 刘小赞(1993—), 女, 2017级硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础及作用机制。E-mail: 734956460@qq.com

*通信作者 沈志滨(1964—), 女, 教授, 博士, 研究方向为中药药效物质基础及新药研发。E-mail: szb8113@126.com

Key words: type II 5 α -reductase; molecular docking; molecular dynamics simulation; active ingredient of traditional Chinese medicine; ligustroflavone; safflower yellow; hinokiflavone

5 α -还原酶(5 α -reductase, 5 α R)是一种位于微粒体上,依赖还原型辅酶 II(NADPH)催化还原类固醇激素的膜蛋白酶。包括 I 型(5 α R1)和 II 型(5 α R2)2 种同工酶,5 α R1 主要分布在人体中雄激素非依赖性器官,例如肝脏和脑中;5 α R2 则大量存在于毛囊毛根鞘、前列腺、附睾等雄激素依赖性器官中^[1]。在人体内,5 α R 是催化睾酮(testosterone, T)为活性更强的二氢睾酮(dihydrotestosterone, DHT)的关键酶,高水平 DHT 易引起雄激素依赖型疾病^[2],例如前列腺增生、多毛症、雄激素源性脱发、痤疮等。通过抑制 5 α R 来降低雄激素水平已成为治疗良性前列腺增生、雄激素性脱发等雄激素依赖型疾病的重要方法^[3]。目前临床主要使用如非那雄胺、度他雄胺等甾体类药物,但此类药物均存在较强的不良反应,如勃起功能障碍、性功能异常、性欲降低、男性乳房女性化等^[4],因此从中药中寻找结构新颖、高活性而副作用少的新型 5 α R 抑制剂尤为必要,近年来,通过药效筛选,已从多种植物中发现黄酮类、萜类、甾体类等成分具有抑制 5 α R 活性^[5-6]。

本课题组前期进行了大量中药提取物及其活性成分对 5 α R2 抑制活性的预试验,本研究根据前期预试验结果选取 26 个化学成分,采用分子对接与分子动力学模拟技术筛选具有潜在 5 α R2 抑制活性的化合物,并采用体外微量酶反应体系进行实验验证,以期克服 5 α R 抑制活性研究中存在的盲目性、工作量大等难点,为发现高效、天然的 5 α R2 抑制剂及中药活性成分在治疗和预防雄激素依赖型疾病的研究和应用奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司);色谱柱[COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 柱(250 mm×2.6 mm, 5 μ m)]; TGL-16 型高速低温离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); SB-1200 型恒温水浴锅(上海爱朗仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

红花黄色素(质量分数 98%,批号 AF8030707),成都埃法生物科技有限公司;扁柏双黄酮(质量分数 98%,批号 PS011271)、女贞苷(质量分数 98%,

批号 PS000716),成都普思生物科技股份有限公司;睾酮(T,质量分数>98%,批号 G1820042),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;NADPH(质量分数>98%,批号 C10526802)、二硫苏糖醇(DTT,质量分数>98%,批号 C10182317)、苯甲基磺酰氟(PMSF,质量分数>98%,批号 C10090911),上海麦克林生化科技有限公司;甲醇为色谱纯;其余试剂均为分析纯,水为去离子水。

1.3 动物

SD 大鼠,9 周龄,体质量 260~280 g,SPF 级,雄性,由广东省动物中心提供,合格证号 SCXK(粤)2018-0002,饲养于广东药科大学动物实验中心[SPF 级,合格证号 SYXK(粤)2017-0125]。

2 方法

2.1 小分子数据库的建立

实验室在前期工作中对 20 种中药进行了 5 α R2 抑制活性筛选研究,结果显示,侧柏叶、女贞子、白鲜皮、木香、麦冬、红花、苦参、透骨草、人参具有较好的抑制活性,本实验在此基础上,结合相关中药成分研究文献报道^[7-16],从中药提取物中选取 26 种市面上可购买到的化学成分,通过 ChemBioDraw 14.0 画出其 2D 结构图,构建二维数据库,采用 LigPrep 模块进行配体准备,pH 值设置为 7.0 $\pm$ 2.0,互变异构体状态由 Epik 程序确定,其余参数均为默认设置,使用 MacroModel 程序在 OPLS2005 力场下对分子进行优化。

2.2 5 α R2 结构的同源建模

由于 5 α R2 蛋白晶体结构未知,参考文献报道^[17]通过同源建模方法获取受体蛋白 3D 晶体结构。选用序列同源性最高的蛋白作为模版使用 MODELLER 9.23 软件进行同源建模,蛋白的优化由 Schrodinger 软件中 Protein preparation Wizard 程序在 OPLS-2005 力场下完成。

2.3 分子对接

对接程序根据 Schrodinger Glide 2015-2 中 Maestro 10.2 执行。使用 Receptor Grid Generation 程序确定对接区域,以默认框大小设置 Grid,对具有部分原子电荷小于或等于 0.25 的蛋白质原子的范德华半径进行 1.0 的缩放,Grid 文件设置完成后采用 Glide XP(高精度模式的 Glide 算法)对接方案,

将 26 个配体依次对接到受体蛋白活性口袋中,对接过程中,5 α R2 蛋白构象固定,配体构象灵活可变。按公式计算 Glide 评分(综合, *G-score*)^[18]。

$$G\text{-score} = 0.065 \times \text{vdW} + 0.130 \times \text{Coul} + \text{Lipo} + \text{Hbond} + \text{Metal} + \text{BuryP} + \text{RotB} + \text{Site}$$

vdW: 分子间作用能评分; Coul: 库伦作用能评分; Lipo: 亲脂性评分; Hbond: 氢键评分; Metal: 金属配位键评分; BuryP: 隐藏极性基团罚分; RotB: 旋转键能罚分; Site: 蛋白质活性位点极性相互作用评分

2.4 分子动力学模拟

使用 GROMACS 5.1.1 进行分子动力学模拟^[19]。化合物拓扑文件由 Acpype (<http://bio2byte.be/acpype/>) 产生。5 α R2 蛋白的拓扑由 PDB2GMX 工具获得,水模型为 SPC/E 溶剂模型,钠离子中和系统电荷,使系统呈电中性。采用周期性边界的方式进行模拟,首先在 300 K 的温度下对蛋白和小分子配体复合物进行 1 000 步的能量最小化,接着对优化后的体系分别进行 100 ps 的 NVT 系综平衡和 100 ps 的 NPT 系综平衡,在此过程中对于体系位置进行限制,最后整个系统温度保持在 300 K 进行 50 ns 的动力学模拟,时间间隔为 2 fs,每隔 10 ps 保存 1 次坐标轨迹文件。从 30~50 ns 稳定的动力学轨迹中提取 150 帧动力学轨迹文件,使用 MM/PBSA 方

法计算体系稳定后的结合自由能。

2.5 5 α R2 抑制活性验证

参考文献方法^[20],取雄性 SD 大鼠 10 只,禁食不禁水 12 h 后脱颈处死,取出腹侧前列腺及附睾称质量并在冰台上剪碎,用预冷的匀浆液 [20 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 5.5)、1 mmol/L DTT、1 mmol/L PMSF] 在玻璃匀浆器中制成 1:5 匀浆液 (g/mL),离心后合并上清液得 5 α R2 粗酶。以 T 为底物,加入 5 α R2 粗酶和 NADPH 组成酶反应体系,体系组成见表 1,37 °C 孵育 1 h 后加入 2.5 mL 二氯甲烷终止反应,混匀,离心 15 min (5 000 r/min),取有机层旋干后,加入甲醇溶解定容至 1 mL,用 0.22 μ m 滤膜滤过,采用高效液相色谱法 [色谱条件:色谱柱 COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 柱温为 30 °C; 流动相为甲醇-水 (70:30); 体积流量 1 mL/min; 进样量为 20 μ L; 检测器为紫外检测器,检测波长 242 nm] 检测 T 消耗量。5 α R2 活性以 60 min 内每毫克酶液转化 T 的量 [μ mol/(L $\cdot$ mg $\cdot$ h)] 表示;按公式计算化合物对 5 α R2 的抑制率。实验重复 3 次,采用 SPSS 23.0 软件对化合物浓度的对数和抑制率的关系进行线性分析。

抑制率=(对照组 T 浓度的变化值-受试药物组 T 浓度的变化值)/对照组 T 浓度的变化值

表 1 5 α R2 反应体系

Table 1 Reaction system of 5 α R2

组别	磷酸缓冲液 (pH 5.5)/ μ L	5 α R2 粗酶液/ μ L	T(0.7 mmol $\cdot$ L ⁻¹)/ μ L	50%乙醇/ μ L	系列浓度 受试药物/ μ L	NADPH (1 mg $\cdot$ mL ⁻¹)/ μ L
对照	300	500	50	50	0	100
受试药物	300	500	50	0	50	100

2.6 统计分析方法

采用 SPSS 23.0 软件进行分析。各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,若方差齐性采用 LSD 法进行检验,方差不齐时采用 Dunnett T3 法检验。

3 结果

3.1 同源建模结果

以 3CMF 蛋白为模版在 MODELLER 产生的 5 个同源模型 (GA341 score: 0.122 794; GA341 score: 0.257 079; GA341 score: 0.113 738; GA341 score: 0.125 828; GA341 score: 0.110 722),选择 GA341 score 最高的模型进行优化,Ramachandran plot 如图 1 所示,该模型 96.7%的残基处于合理范围内,说

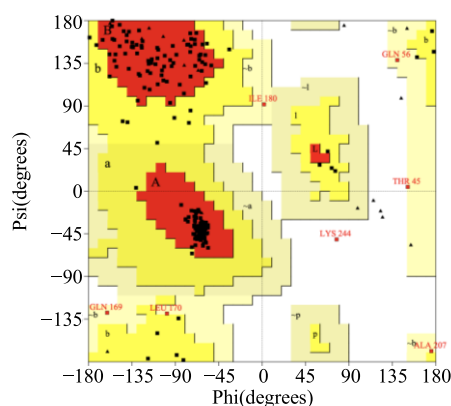


图 1 最优模型拉式图

Fig. 1 Ramachandran plot of final model

明所构建的蛋白结构可靠合理, 经优化后的模型如图 2 所示, 用于分子对接。

3.2 化合物与 5αR2 蛋白分子对接结果

将 26 个单体化合物与 5αR2 蛋白进行对接, 对接结果见表 2。在 Glide 对接中, 打分 *G*-score 均为负值, 其绝对值的大小说明配体与受体结合的作用力, 绝对值越大, 结合能力越强, 对接效果越好。非那雄胺的打分结果为-25.573 kJ/mol, 26 个单体化合物中, *G*-score 高于非那雄胺的有 3 个化合物, 分别为女贞苷、红花黄色素、扁柏双黄酮。

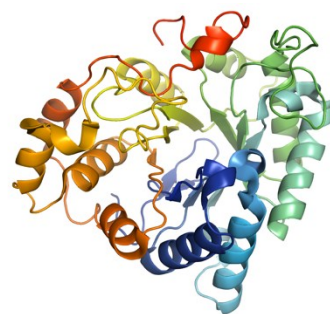


图 2 5αR2 蛋白 3D 模型结构图

Fig. 2 3D structure of 5αR2 model

表 2 化合物与 5αR2 蛋白对接打分结果

Table 2 Docking scores of compounds docking with 5αR2

化合物	中药归属	化合物类型	<i>G</i> -score/(kJ·mol ⁻¹)	排名
女贞苷	女贞子	环烯醚萜类	-30.204	1
红花黄色素	红花	黄酮类	-29.966	2
扁柏双黄酮	侧柏叶	黄酮类	-27.807	3
特女贞苷	女贞子	环烯醚萜类	-25.535	4
穗花双黄酮	侧柏叶	黄酮类	-24.978	5
羟基红花黄色素	红花	黄酮类	-24.907	6
杨梅素	侧柏叶、红花	黄酮类	-24.794	7
人参皂苷	人参	皂苷类	-24.660	8
木犀草素	白鲜皮	黄酮类	-24.221	9
香叶木素	透骨草	黄酮类	-23.832	10
苦参碱	苦参	生物碱类	-23.050	11
木香烯内酯	木香	倍半萜类	-22.493	12
山柰酚	侧柏叶、红花	黄酮类	-22.410	13
槲皮素	侧柏叶、红花	黄酮类	-22.062	14
甲基麦冬黄酮	麦冬	高异黄酮类	-21.820	15
汉黄芩素	白鲜皮	黄酮类	-21.569	16
枞酮	白鲜皮	倍半萜类	-21.548	17
阿魏酸	透骨草	酚酸类	-20.723	18
麦冬高异黄酮	麦冬	高异黄酮类	-19.104	19
孕烯醇酮	木香	甾体类	-18.569	20
委陵菜酸	女贞子	三萜类	-15.280	21
齐墩果酸	女贞子	三萜类	-13.845	22
熊果酸	女贞子	三萜类	-12.527	23
白桦脂醇	木香	三萜类	-11.732	24
山楂酸	女贞子	三萜类	-11.150	25
亚油酸	红花	脂肪酸类	-8.025	26
非那雄胺	—	4-氮杂甾体化合物	-25.573	—

3.3 化合物与 5αR2 蛋白对接模式分析

根据对接打分结果, 选取打分结果较高的 3 种

化合物 (结合能力: 女贞苷-蛋白>红花黄色素-蛋白>扁柏双黄酮-蛋白), 做出化合物与蛋白的结合

模式图,可直观观察活性化合物与靶点的结合模式以及周围氨基酸残基的相互作用,结果见图 3。

女贞苷、红花黄色素和扁柏双黄酮与受体蛋白对接时占据了由残基 Arg233、Ala117、Leu226、

Ile112、Thr120、Asn122、Pro108、Glu57、Trp201、Phe61、Arg227、Pro106、Asn160、Glu197、Asn193、Phe194、Asn102、Arg105、Thr95、Phe92 等形成的活性口袋。化合物与受体蛋白对接作用分析见表 3。

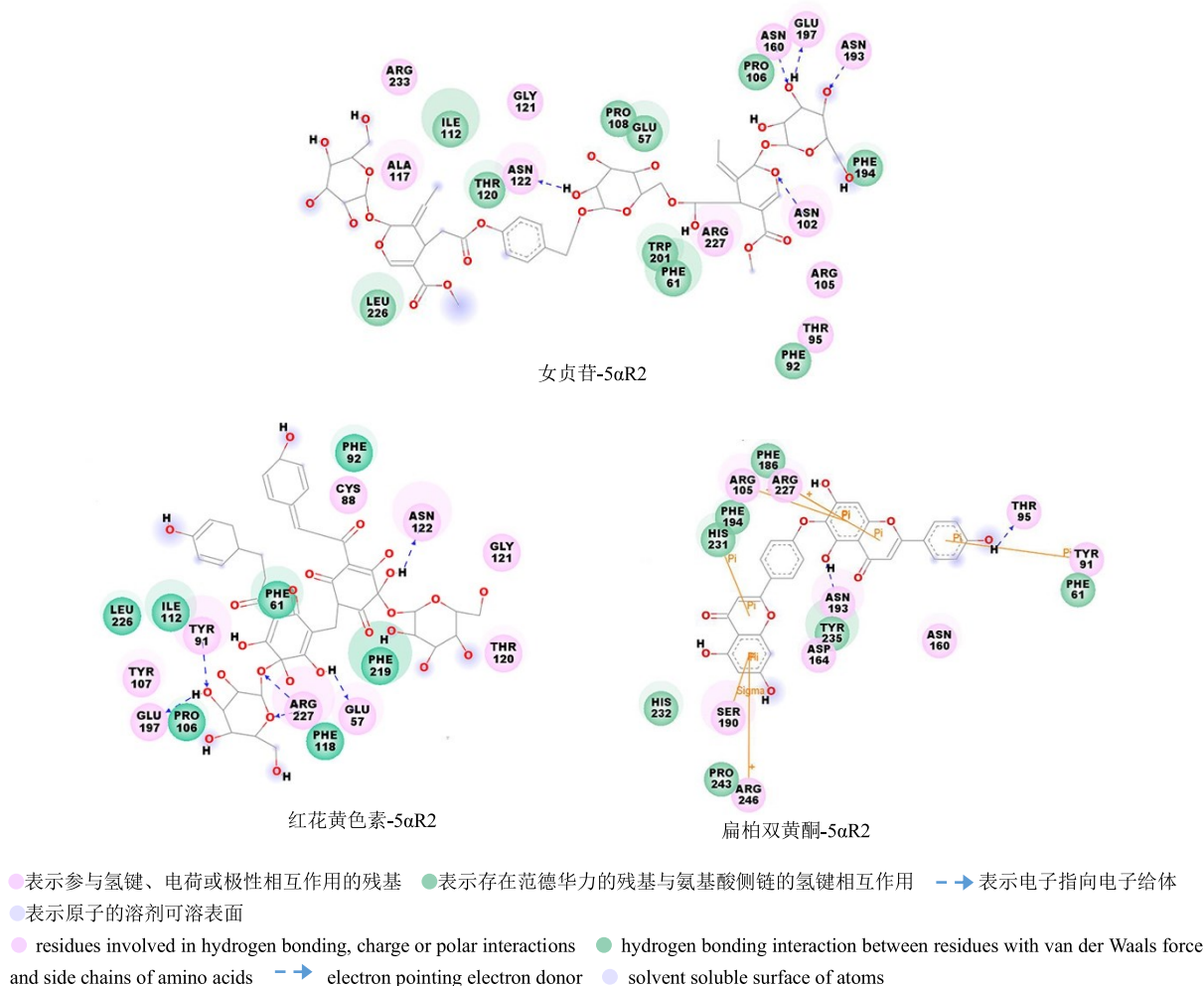


图 3 蛋白与不同配体的结合模式图

Fig. 3 Binding mode of protein and different ligands

表 3 化合物与 5αR2 蛋白对接作用分析

Table 3 Docking effect analysis of compounds and type II 5α-reductase protein

化合物	G-score/ (kJ·mol ⁻¹)	氢键作用	疏水作用
女贞苷	-30.204	Glu197、Asn122、Asn102、Asn160、Asn193	Phe194、Phe92、Phe61、Trp201、Ile112、Leu226、Ala117
红花黄色素	-29.966	Glu197、Asn122、Glu57、Tyr91、Arg227	Phe92、Phe61、Phe219、Phe118、Ile112、Leu226
扁柏双黄酮	-27.807	Thr95、Asn193	Phe61、Phe186、Phe194

女贞苷和红花黄色素与蛋白结合模式相似,均与 5 个氨基酸以氢键作用结合,在结合位点上亦有部分重合,女贞苷和红花黄色素都通过分子中的 -OH 与氨基酸 Glu197、Asn122 中的 O 形成氢键作

用;除此之外女贞苷可以与 Asn102、Asn160、Asn193 通过分子中的 O 与氨基酸上的 H 形成氢键作用;红花黄色素可以与 Glu57、Tyr91、Arg227 通过分子中的 H 或 O 与氨基酸中的 O 或 H 形成氢键,而在疏

水作用中,女贞苷和红花黄色素在结合位点上有 4 个氨基酸重合,分别为 Phe92、Phe61、Ile112、Leu226,除此之外女贞苷与 Phe194、Trp201、Ala117 通过疏水作用相结合,红花黄色素与 Phe219、Phe118 通过疏水作用相结合,女贞苷在疏水作用结合的氨基酸较红花黄色素多,这是女贞苷与蛋白质结合较强的原因之一。

扁柏双黄酮在结合位点上仅与女贞苷有部分重合,在与蛋白质结合过程中进行 2 个氢键作用和 3 个疏水作用,但仍具有较强的结合能力,这与分子中的苯环结构和联苯结构与蛋白结构中氨基酸 Tyr91、Arg105、Arg227、Trp95、Ser190、Arg246 形成多个 π - π 键有关。

在与蛋白质结合过程中,女贞苷与红花黄色素主要通过形成较多的氢键作用和疏水作用与之相结合,这是二者与蛋白结合作用较强的原因,而扁柏

双黄酮除氢键作用和疏水作用外还通过分子结构中的苯环和联苯结构与氨基酸形成 π - π 堆积作用,这或许是 3 种化合物抑制活性产生差异的原因之一。

3.4 分子动力学模拟结果

选取女贞苷、红花黄色素、扁柏双黄酮进行 50 ns 的分子动力学模拟,通过计算模拟轨迹 50 ns 时间内的均方根偏差值(RMSD)检验体系稳定性。结果如图 4 所示,女贞苷体系、红花黄色素体系和扁柏双黄酮体系在 20 ns 之后,其 RMSD 值均基本不变,基本达到了平衡状态;所有体系 RMSD 波动值都稳定在 0.2 nm 以下,分子动力学模拟体系均达平衡。模拟结果可用于进一步分析。

本研究通过计算化合物与受体蛋白复合物氨基酸骨架原子在动力学模拟过程中的均方根波动值(RMSF),分析 5 α R2 与 3 种化合物中骨架氨基酸在模拟过程中的波动性。结果见图 5。

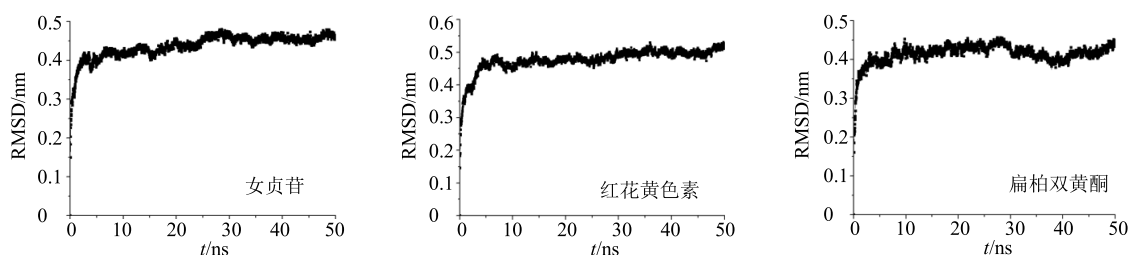


图 4 5 α R2 的氨基酸骨架原子随时间变化的 RMSD 值

Fig. 4 RMSD between amino acid skeleton atoms from type II 5 α -reductase during simulation

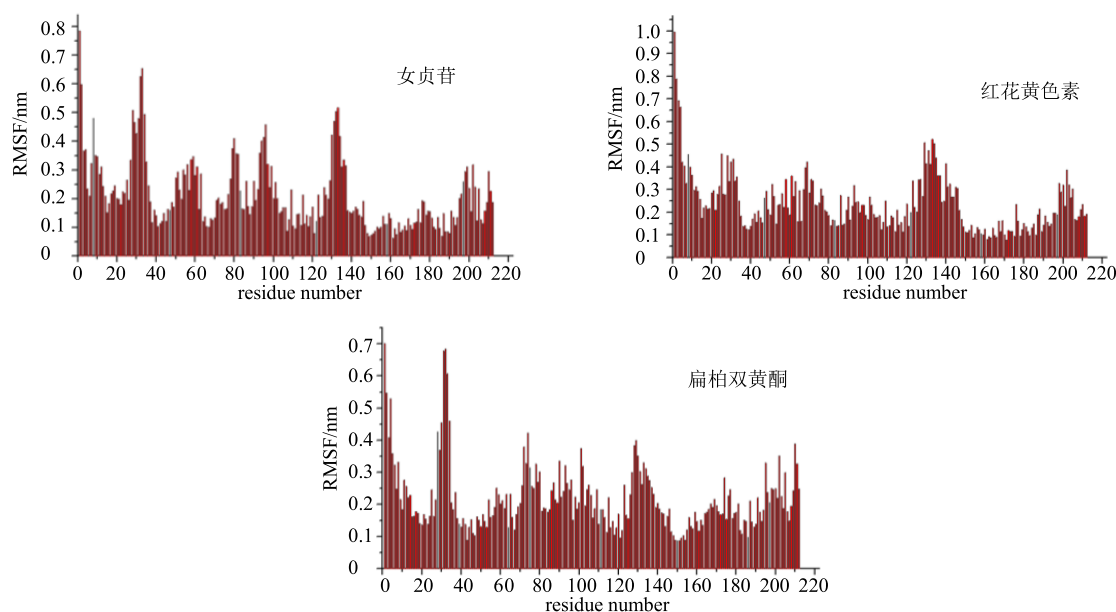


图 5 配体-蛋白复合物氨基酸骨架原子的 RMSF 值波动图

Fig. 5 Hydrophobic binding diagram of ligand-protein complex and fluctuation of RMSF of amino acid skeleton atoms

3 个体系的氨基酸波动变化趋势大致相似,女贞苷-5 α R2 体系和红花黄色素-5 α R2 体系在氨基酸 40~57、80~95、100~125、140~195 出现了较低的波动性 (RMSF<0.2 nm), 扁柏双黄酮-5 α R2 体系在氨基酸 40~70、80~98、100~125、145~155、180~190 出现了较低的波动性 (RMSF<0.2 nm), 3 个体系中 RMSF 波动较小的氨基酸与关键氨基酸相吻合, 这可能与化合物和 5 α R2 之间产生了较为稳定的氢键、疏水作用或 π - π 堆积作用有关, 将化合物与结合口袋周围的氨基酸相互连接在一起, 形成较为稳定的复合物有关。3 种化合物与 5 α R2 结合后使关键氨基酸更加稳定, 有利于配体和受体的相互作用。

进一步研究女贞苷、红花黄色素、扁柏双黄酮

与 5 α R2 受体之间的结合亲和力差异, 采用 MM/PBSA 方法计算 3 种化合物与 5 α R2 受体复合物的结合自由能, 分析了 3 种化合物与 5 α R2 受体结合的作用。结果如表 4 所示, 范德华力和静电势能最有利于 3 种化合物与 5 α R2 受体结合, 表面溶剂化作用也有利于结合, 但与范德华力和静电势能的数值相比作用较弱, 而极性溶剂化作用不利于体系结合。红花黄色素和扁柏双黄酮在与蛋白质结合过程中由于溶剂中的极性相互作用很大程度上抵消了静电势能, 所以体系的非极性相互作用更有利于配体和受体的结合, 其中范德华力起主导作用; 而女贞苷与蛋白结合过程中非极性相互作用和静电势能均有利于配体与受体的结合, 这也是 3 者与 5 α R2 蛋白结合自由能具有差异的关键因素。

表 4 3 种化合物与 5 α R2 蛋白的结合自由能

Table 4 Binding energy of three compounds with type II 5 α -reductase protein

化合物	范德华力/(kJ·mol ⁻¹)	静电势能/(kJ·mol ⁻¹)	极性溶剂化作用/ (kJ·mol ⁻¹)	表面溶剂化作用/ (kJ·mol ⁻¹)	结合自由能/ (kJ·mol ⁻¹)
女贞苷	-403.317±30.031	-922.865±44.556	590.506±36.006	-42.637±1.456	-778.314±33.694
红花黄色素	-372.900± 9.039	-222.559±11.008	160.469± 9.696	-17.913±0.684	-452.904±15.078
扁柏双黄酮	-317.926±18.359	-216.255±22.323	238.982±15.234	-25.876±0.971	-321.075±22.156

结合自由能数值越小, 表示结合所需能量越低, 越有利于配体与蛋白的结合。通过比较 3 种化合物与 5 α R2 蛋白的结合能, 可得出蛋白配体结合强弱关系如下: 女贞苷-蛋白>红花黄色素-蛋白>扁柏双黄酮-蛋白, 此结果与对接结果一致。

3.5 5 α R2 抑制活性验证

根据上述结果, 选取女贞苷、红花黄色素和扁柏双黄酮进行生物活性验证。结果见表 5, 随着浓度的增加, 3 种化合物对 5 α R2 活性的抑制率随之提高, 说明 3 种化合物对酶的抑制活性在一定浓度范围内呈现明显的量效关系。通过对比半数抑制浓度 (IC₅₀) 值可知抑制活性大小关系为女贞苷>红花黄色素>扁柏双黄酮, 此结果与分子对接和分子动力学模拟得出结论相吻合, 说明通过分子对接及分子动力学模拟能够快速筛选出具有潜在抑制 5 α R2 活性的单体成分, 且在生物活性验证实验中均呈现一定程度的抑制活性。

4 讨论

本研究基于分子对接和分子动力学模拟技术, 筛选与 5 α R2 对接稳定的中药活性成分, 并采用体外微量酶反应体系对单体成分进行活性验证。结果

发现女贞苷、红花黄色素和扁柏双黄酮与 5 α R2 的对接结果优于其他中药来源分子, 女贞苷和红花黄色素主要通过分子中的-OH 和-O-与 5 α R2 中的氨基酸形成氢键和疏水作用, 扁柏双黄酮除氢键和疏水作用外, 分子中的苯环和联苯结构与 5 α R2 中的氨基酸形成 π - π 堆积作用, 产生较强的结合作用; 分子动力学模拟结果表明 3 者与 5 α R2 均能较稳定的结合, 体系结合强弱与分子对接结果一致; 在体外实验中 3 者呈现出不同程度抑制 5 α R2 的作用。

女贞苷是女贞子中的环烯醚萜类化合物, 具有抗氧化作用^[21]和潜在治疗骨质疏松的作用^[22], 目前还未见报道其对 5 α R2 的抑制作用。红花黄色素是中药红花中的黄酮类化合物, 具有抗凝血、抗血栓、抗氧化、免疫调节及抗肿瘤等作用^[23-24]。有学者^[25]研究发现红花提取物对 5 α R1 及 5 α R2 具有一定的抑制作用。结合本研究结果推测红花黄色素可能是红花提取物抑制 5 α R2 的主要活性成分一。扁柏双黄酮是中药侧柏叶中的黄酮类成分, 有研究发现, 侧柏叶中的黄酮成分可激活毛母细胞、促进血液循环、改善毛囊发育和生长的作用^[26-27]; 也有学者^[19]研究结果表明侧柏叶提取物具有较好的 5 α R2 抑制活性。

表 5 化合物体外对 5 α R2 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 5 Inhibitory effect on type II 5 α -reductase enzymatic activity *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	C/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	酶活力/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	抑制率/%	IC ₅₀ /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照	0	206.16 $\pm$ 6.17	—	0
女贞苷	10	151.64 $\pm$ 3.05***	26.39 $\pm$ 1.48	42.12 $\pm$ 3.83
	20	142.98 $\pm$ 5.60***	30.59 $\pm$ 2.72	
	40	98.32 $\pm$ 2.66***	52.27 $\pm$ 1.29	
	80	88.37 $\pm$ 10.01***	57.10 $\pm$ 4.86	
	160	40.71 $\pm$ 4.16***	80.24 $\pm$ 2.02	
红花黄色素	20	153.10 $\pm$ 4.82***	25.68 $\pm$ 2.34	69.06 $\pm$ 6.35
	40	141.73 $\pm$ 6.84***	31.20 $\pm$ 3.32	
	80	91.24 $\pm$ 1.63***	55.71 $\pm$ 0.79	
	160	84.50 $\pm$ 4.08***	58.98 $\pm$ 1.98	
	320	68.25 $\pm$ 16.60***	66.87 $\pm$ 8.06	
扁柏双黄酮	20	168.69 $\pm$ 4.61***	18.11 $\pm$ 2.24	191.28 $\pm$ 5.90
	40	151.64 $\pm$ 4.99***	26.39 $\pm$ 2.42	
	80	152.98 $\pm$ 7.15***	30.59 $\pm$ 3.47	
	160	98.32 $\pm$ 4.45***	52.27 $\pm$ 2.16	
	320	85.04 $\pm$ 10.75***	58.72 $\pm$ 5.22	

与对照组比较: *** $P < 0.001$ *** $P < 0.001$ vs control group

结合本研究结果推测扁柏双黄酮可能是侧柏叶提取物抑制 5 α R2 的主要活性成分一。

综上所述, 分子对接及分子动力学模拟技术不仅可应用于筛选具有潜在抑制 5 α R2 活性的中药活性成分和先导化合物, 还可以应用于中药药效物质基础的研究, 从分子水平揭示配体与受体的结合方式。本研究筛选出 3 种体外具有较好抑制 5 α R2 活性的中药活性成分, 分别为女贞苷、红花黄色素和扁柏双黄酮, 这些化合物在体内对 5 α R2 活性的影响和具体作用机制仍在进一步研究中。

志谢: 兰州大学药物化学研究所给予的软件平台和技术支持。

参考文献

- [1] Inui S, Itami S. Androgen actions on the human hair follicle: Perspectives [J]. *Exper Dermatol*, 2013, 22(3): 168-171.
- [2] 潘继升, 王永晨, 蔡丽敏. 5 α -还原酶在相关疾病中的作用 [J]. *医学综述*, 2011, 17(17): 2571-2573.
- [3] 刘 本, 常忆凌, 陈科力. 5 α 还原酶作为天然药物筛选靶的研究进展 [J]. *药物生物技术*, 2006, 13(6): 468-470.

- [4] Banday A H, Shameem S A, Jeelani S. Steroidal pyrazolines and pyrazoles as potential 5 α -reductase inhibitors: Synthesis and biological evaluation [J]. *Steroids*, 2014, doi: 10.1016/j.steroids.2014.09.004
- [5] 李永辉, 杨义芳, 孔德云. 植物中抑制 5 α -还原酶的活性成分研究进展 [J]. *中草药*, 2006, 47(11): 1740-1744.
- [6] 唐青涛. 中草药来源的 5 α -还原酶抑制剂的研究进展 [J]. *华西药学杂志*, 2016, 31(5): 544-547.
- [7] 张兴辉. 女贞子水溶性活性成分的研究及其质量评价 [D]. 上海: 第二军医大学, 2002.
- [8] 姜 斐. 女贞子化学成分的提取分离鉴定及活性研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2010.
- [9] 陈兴芬. 侧柏叶化学成分提取及活性功能研究 [D]. 南京: 南京师范大学, 2011.
- [10] 赵青青. 中药白鲜皮中化学成分的分离与结构鉴定 [D]. 西安: 西北大学, 2015.
- [11] 张 婷. 藏木香和云木香化学成分及生物活性研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2011.
- [12] 马海波. 麦冬化学成分的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [13] 何 蕾. 红花提取物生物活性成分的研究 [D]. 兰州: 兰州理工大学, 2016.
- [14] 张玉婷. 人参提取物化学成分及质量研究 [D]. 北京: 中国食品药品检定研究院, 2013.

- [15] 张 翊, 马 悦, 高慧敏, 等. 苦参化学成分研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(4): 205-214.
- [16] 关 键. 透骨草化学成分及药理活性研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2012.
- [17] 王寅磊, 卢 轩, 曹洪玉, 等. 荨麻属化合物抗良性前列腺增生活性受体分子对接及其药代动力学性质研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(18): 2104-2108.
- [18] Alonso H, Bliznyuk A A, Gready J E, *et al.* Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design [J]. *Med Res Rev*, 2006, 26(5): 531-568.
- [19] Davood A, Harchegani A B, Khamesipour A, *et al.* Molecular dynamics simulation and docking studies of selenocyanate derivatives as anti-leishmanial agents [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2016, 19(10): 847-854.
- [20] Zhang B, Zhang R W, Yin X Q, *et al.* Inhibitory activities of some traditional Chinese herbs against testosterone 5 α -reductase and effects of *Cacumen platycladi* on hair re-growth in testosterone-treated mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 177: 1-9.
- [21] 李 阳. 女贞子中裂环环烯醚萜苷类成分的研究 [D]. 西安: 西北大学, 2007.
- [22] 战 美, 周家杰, 吴琪聪, 等. 女贞子成分抗骨质疏松的潜在作用靶点虚拟筛选 [J]. 世界中医药, 2017, 12(7): 1693-1697.
- [23] 刘世军, 唐志书, 崔春利, 等. 中药红花化学成分的研究进展 [J]. 河南中医, 2017, 37(1): 168-171.
- [24] 陈 燕, 郑寒松, 高 举. 红花黄色素调控 p38MAPK 信号通路保护大鼠糖尿病视网膜神经节细胞的实验研究 [J]. 中草药, 2019, 50(11): 2639-2644.
- [25] 邓桂球, 张 蓓, 孔秀娟, 等. 红花提取物对 I 型及 II 型 5 α -还原酶的抑制活性研究 [J]. 中国药业, 2015, 24(14): 17-20.
- [26] 陈兴芬, 单承莺, 马世宏, 等. 侧柏叶化学成分、生理活性及防脱发功能研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2010, 29(3): 1-5.
- [27] 赵永光, 赵 莹, 张建平, 等. 侧柏叶总黄酮在功能性洗发香波中的应用研究 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(24): 10295-10296.