

基于 UHPLC-QTOF-MS/MS 和分子对接筛选紫菀中润肠通便的效应成分

吴浩¹, 黄蓓蓓¹, 贾志鑫¹, 刘洁¹, 陈奕君^{2*}, 肖红斌^{1*}

1. 北京中医药大学, 北京 100029

2. 广州中医药大学, 广东 广州 510006

摘要: 目的 通过 UHPLC-QTOF-MS/MS 和分子对接技术阐明紫菀 *Aster tataricus* 中润肠通便作用的效应成分。方法 采用 UHPLC-QTOF-MS/MS 技术分析体内肠道内容物的成分, 再利用 SYBYL-X 2.0 与 Discovery Studio 4.0 分子对接软件研究肠道内容物成分与 M2 受体、M3 受体、蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 蛋白的相互作用, 明确各成分与靶标蛋白的结合强度。结果 体内肠道内容物中共鉴定出 28 个紫菀中的化学成分, 有 10 个成分均可与 M2 受体、M3 受体及 PKC 蛋白分子对接较好, 其中 astin J 与 3 种靶标蛋白结合的平均打分值最高, 这些成分均以非共价键方式与靶标蛋白结合, 产生氢键、范德华力、经典作用力等相互作用。结论 紫菀中的 astin J、asterin F、asterin A、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C、绿原酸、槲皮素、山柰酚和木犀草素共 10 个成分可能是通过调节 M 受体及其下游信号通路 PKC 蛋白的表达发挥润肠通便的作用。

关键词: 紫菀; 肠内容物; 靶标蛋白; 分子对接; 通便; astin J; asterin F; asterin A; 异绿原酸 A; 异绿原酸 B; 异绿原酸 C; 绿原酸; 槲皮素; 山柰酚; 木犀草素

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)05-1377-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.05.004

Screening effective components of laxative activity in *Aster tataricus* by UHPLC-QTOF-MS/MS and molecular docking

WU Hao¹, HUANG Bei-bei¹, JIA Zhi-xin¹, LIU Jie¹, CHEN Yi-jun², XIAO Hong-bin¹

1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: **Objective** To elucidate the effective components of laxative activity of Ziwan (*Aster tataricus*) by UHPLC-QTOF-MS/MS and molecular docking techniques. **Methods** UHPLC-QTOF-MS/MS technology was used to analyze the components of intestinal contents *in vivo*, and SYBYL-X 2.0 and Discovery Studio 4.0 molecular docking software were used to study the interaction of intestinal contents with M2 receptor, M3 receptor and PKC proteins. The binding strength of each component to the target protein was determined. **Results** A total of 28 chemical constituents were identified in the intestinal contents of *A. tataricus*, and 10 of them were well docked to the M2 receptor, M3 receptor and PKC proteins. Astin J had the highest average score for binding to the three target proteins, and all of them were non-covalently bound to the target proteins, to generate hydrogen bonds, van der Waals forces, classical forces and other interactions. **Conclusion** Astin J, asterin F, asterin A, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid C, chlorogenic acid, quercetin, kaempferol and luteolin of *A. tataricus* may play a role in laxative activity by regulating the expression of M receptor and PKC proteins in the signaling pathway.

Key words: *Aster tataricus* L. f.; intestinal contents; target protein; molecular docking; laxative; astin J; asterin F; asterin A; isochlorogenic acid A; isochlorogenic acid B; isochlorogenic acid C; chlorogenic acid; quercetin; kaempferol; luteolin

收稿日期: 2022-09-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81774155); 国家自然科学基金项目 (81803703); 国家中医药传承创新项目 (ZYYCXTD-C-202201); 北京中医药大学创新创业项目 (2020-JYB-XSCXCY-089)

作者简介: 吴浩 (1995—), 男, 硕士, 研究方向为中药药效物质基础与作用机制。Tel: 17862954633 E-mail: wuhao920817@163.com

*通信作者: 陈奕君, 博士, 助理研究员。Tel: (020)39358083 E-mail: cheniyijun@gzucm.edu.cn

肖红斌, 博士, 教授。Tel: (010)64286490 E-mail: hbxiao69@163.com

随着生物学和计算机科学等现代科学技术的发展,分子对接已成为药物靶点和药效成分筛选有力的工具,其原理就是利用计算机科学技术的相应的计算方法模拟分子的空间结构和分子间的相互作用力,通过研究分子间的空间作用力,寻找配体与受体活性位点的最佳结合方式的过程,在药物的研发中发挥着越来越重要的作用^[1-2]。同时,得益于超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱联用技术(UHPLC-Q-TOF-MS/MS)的发展及其高分辨率、高灵敏度、高选择性等优势,可通过优化超高效液相色谱的色谱柱、流动相、洗脱条件等方式,结合四极杆飞行时间质谱中全面的数据采集方法及数据后处理分析策略,例如前体离子扫描,关键产物离子鉴别等,实现中药单味药、复方提取物及体内微量成分的准确高效全面的识别,为中药(复方)成分及其代谢产物的分析及鉴定提供了有效的助力^[3-4]。

紫菀为菊科(Compositae)多年生草本植物紫菀 *Aster tataricus* L. f. 的干燥根及根茎,别名青菀、返魂草、小辫等,生长于海拔 400~2000 m 的山坡湿地、低山草地及沼泽地等;在我国分布十分广泛,主产于山西、河北、东北、内蒙古东部等地区,也分布在朝鲜、日本等国。紫菀具有宣通肺气、润肠通便的功效,在临床上常配伍薏苡仁、桔梗、杏仁、枳壳、葶苈子等使用治疗术后便秘、肠痈等。现代药理学研究表明,紫菀还具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化活性、化痰止咳平喘等作用^[5-19]。前期研究发现紫菀润肠通便的作用机制与细胞膜上的 M 受体及钙离子通道有关^[20],但是对于紫菀中发挥作用的确切效应成分尚不清楚,需要进一步深入的研究。因此,本研究将通过 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术分析给药紫菀后的肠道内容物成分,针对与调节肠道的运动及平滑肌的收缩相关的 M2、M3 受体蛋白和其下游信号通路中的蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 蛋白,采用分子对接技术筛选与受体蛋白结合性较好的中药单体成分,进而阐明紫菀中润肠通便的效应成分,为后期的深入研究以及新药开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

本研究中使用的动物方案由北京中医药大学动物伦理审查委员会(批准号 No.4-2018010103-10045)基于伦理程序和科学护理对其进行审核和批准。SD 大鼠(180~220 g)购自北京维通利华动物科技有

限公司。所有的动物均被饲养在恒温(25±2)℃,相对湿度(50±10)%和 12 h 光/暗周期的环境下。

乙腈, LC/MS 级, Fisher 公司; 甲醇, LC/MS 级, Fisher 公司; 甲酸, LC/MS 级, Sigma 公司; 去离子水, Milli-Q 水净化系统自制; 对照品均购自成都瑞芬思生物科技有限公司, 色谱纯, 质量分数 98% 以上。

紫菀药材购自北京同仁堂药业有限公司, 经北京中医药大学王学勇教授鉴定为紫菀 *A. tataricus* L. f. 的干燥根及根茎, 药材(CMAT-AT-201904)存放在北京中医药大学中医药研究院中药分析与转化研究中心。

1.2 样品的制备

1.2.1 紫菀药材提取液的制备 紫菀药材 200 g, 料液比 1:10, 50% 的乙醇回流提取 2 次, 煮沸后, 保持微沸 1.5 h, 用 200 目滤布滤过, 合并续滤液, 用旋转蒸发仪(温度 60℃、转速 45 r/min)旋蒸至无醇味, 得质量浓度为 0.8 g/mL (生药量) 的紫菀提取液。

1.2.2 肠道内容物供试品溶液的制备 SD 大鼠, 3 只, 禁食 18 h 后, ig 0.8 g/mL 的紫菀提取液, 30 min 后, 水合氯醛麻醉, 取出整段小肠, 将肠内容物放入 15 mL 离心管中, 涡旋 5 min 混匀, 超声处理 15 min, 高速离心 15 min (12 000 r/min、4℃), 取上清液; 加入 4 倍量乙腈沉蛋白, 涡旋 5 min 后, 高速离心 15 min (12 000 r/min、4℃), 取上清液, 过 0.22 μm 微孔滤膜; 用真空旋转浓缩仪浓缩至干, 50% 的甲醇 200 μL 复溶, 涡旋 5 min 后, 高速离心 15 min (12 000 r/min、4℃), 取上清液, 稀释 10 倍检测。

1.3 样品分析

液相色谱条件: 样品的分离采用 ACQUITY UPLC® HSS T3 柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm, Waters 公司), 柱温箱设定为 30℃, 检测波长设定为 220、254、275、315 和 360 nm; 流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱: 0~1 min, 5%B; 1~5 min, 5%~15%B; 5~15 min, 15%~30%B; 15~23 min, 30%~75%B; 23~25 min, 75%~95%B, 进样体积为 2 μL, 体积流量为 0.4 mL/min。

质谱条件: 电喷雾离子源(ESI), 正负离子模式检测, 详细的质谱参数如表 1 所示。

1.4 分子对接

1.4.1 小分子配体的准备 小分子配体是基于“1.3”

表 1 正、负离子模式下的质谱参数

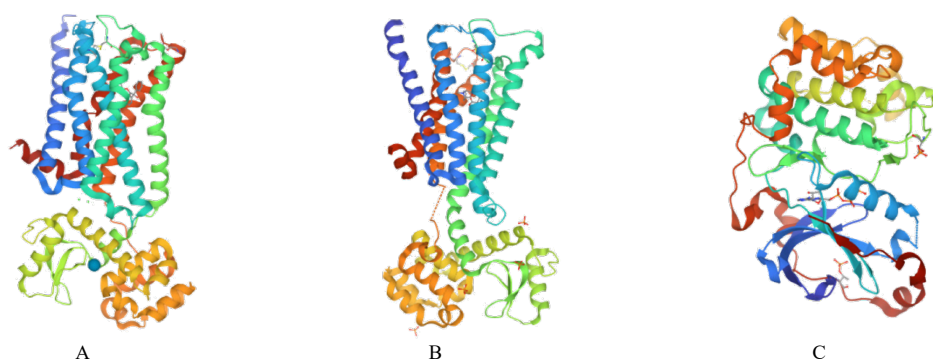
Table 1 Mass spectrum parameters in positive and negative ion modes

参数	MS	MS/MS
扫描范围 (m/z)	100~1700	50~1500
毛细管电压/V	4000/3500	4000/3500
干燥气温度/℃	230	230
干燥气体积流量/(L·min ⁻¹)	15	15
鞘气温度/℃	300	300
鞘气体积流量/(L·min ⁻¹)	12	12
雾化气压力/kPa	344.75	344.75
碰撞能量/V	0/15	10、20、40
采样频率/s	1.00	0.25

项中鉴定的肠道内容物的化学成分,通过 TCMSp、Chempider、Pubchem 等网站查找并下载化合物的结构式,保存为 mol 格式。然后利用 Chemdraw 14.0 软件优化小分子配体的结构,采用 MM2 力场进行能量最小化,保存为 pdb 格式。

1.4.2 受体的准备 通过 PDB 蛋白数据库下载蛋白的三维结构图,保存为 pdb 格式,分辨率为 0.3 nm,如图 1 所示,为 M2 受体、M3 受体和 PKC 蛋白的三维结构图。

1.4.3 分子对接 运用 SYBYL-X 2.0 软件将处理过的小分子配体与蛋白进行对接,首先是设置文件保存路径,接着导入对接的待测配体小分子,再导



A-M2 受体蛋白 (PDB 编码: 3UON) B-M3 受体蛋白 (PDB 编码: 4DAJ) C-PKC 蛋白 (PDB 编码: 3A8W)
A-M2 receptor protein (PDB code: 3UON) B-M3 receptor protein (PDB: 4DAJ) C-PKC protein (PDB code: 3A8W)

图 1 靶标蛋白的三维结构图

Fig. 1 Three-dimensional structure diagram of target protein

出待测配体小分子,选中所有的化合物,文件格式修改为 SLN 格式,然后是处理靶标蛋白,提取靶标蛋白中与待测配体小分子相似的配体,同时移除配体外的其他配体及水分子,最后蛋白和待测配体小分子均处理完成后进行对接。

1.4.4 作图分析 首先,运用 SYBYL-X 2.0 软件做图分析,可以得到受体-配体三维结合模式图及配体与氨基酸残基形成的氢键作用力图;然后,运用 Discovery Studio 4.0 软件进行相关做图处理与分析,可以得到二维配体与氨基酸残基形成的所有作用力图;最后,分析图中配体与氨基酸残基结合作用力的大小。

2 结果

2.1 肠道内容物成分的鉴定

数据使用 Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis B.07.00 软件处理系统进行分析,在一级和二级质谱图中可获得总离子总离子流图 (total ion chromatogram, TIC)、提取离子流图 (extracted ion

chromatogram, EIC)、DAD 色谱图、母离子及二级碎片离子等信息,并在此基础上通过与文献报道的紫菀药材成分及对照品进行比对,在根据特征碎片离子 (如肽类的关键产物离子 m/z 106.064 9,有机酸类的关键产物离子 m/z 191.055 6,黄酮类的关键产物离子 m/z 153.018 0)、保留时间和 $\text{clog } P$ 值等辅助鉴定,进而推导并确认待核查化合物的名称及结构^[21]。利用上述分析方法,共鉴定出 28 个化学成分,包括 14 个肽类化合物,8 个有机酸类化合物,3 个黄酮类化合物和 3 个香豆素类化合物 (图 2 和表 2)。图 3 为 28 个化学成分的结构式。

2.2 分子对接结果

在本实验中,配体和受体的结合稳定性主要是基于 Total Score 打分函数,Total Score 函数考虑了极性作用、疏水作用、焓和溶剂化等因素,TotalScore 打分值越高结合性越好^[22]。根据文献报道,本研究对接结果选择 Total Score 值大于 5 的化合物作为候

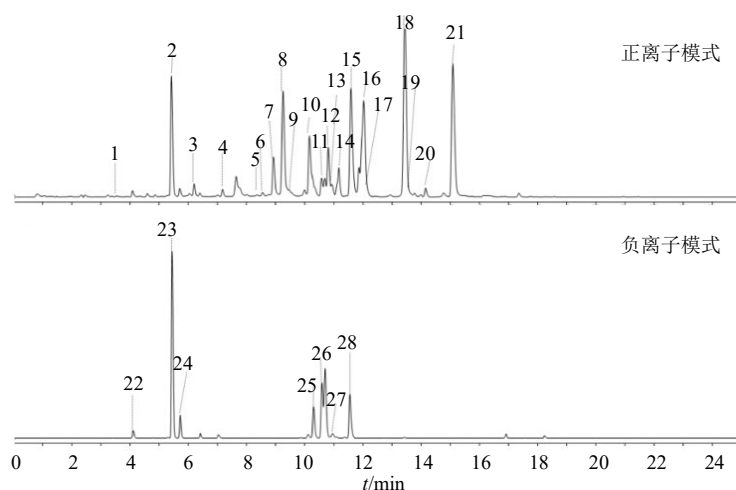


图 2 正、负离子模式下的提取离子流图

Fig. 2 Extraction ion current diagram in positive and negative ion modes

表 2 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 鉴定的体内肠道内容物成分

Table 2 Components of intestinal contents identified by UHPLC-Q-TOF-MS/MS

编号	t_R/min	分子式	实测值 (m/z)	碎片离子	化合物名称
1	3.563	$C_6H_6O_3$	127.039 2 [+]	109.028 7, 81.034 3, 53.039 5	焦性没食子酸
2	5.435	$C_9H_6O_3$	163.039 4 [+]	119.049 5, 107.050 6, 91.054 7, 77.039	7-羟基香豆素
3	6.213	$C_{25}H_{35}N_5O_7$	518.260 9 [+]	490.264 9, 286.139 8, 199.107 9, 171.112 7	asterin F
4	7.183	$C_{25}H_{32}ClN_5O_8$	566.200 7 [+]	548.192 8, 318.085 1, 300.075 7, 232.097 7	astin L
5	8.326	$C_{10}H_8O_4$	193.049 5 [+]	178.027 2, 150.031 0, 133.030 0, 122.037 7	异东茛菪内脂
6	8.574	$C_{10}H_8O_4$	193.050 0 [+]	178.027 2, 137.062 5, 133.029 6, 122.035 9	东茛菪内酯*
7	8.930	$C_{25}H_{32}ClN_5O_7$	550.207 1 [+]	532.197 8, 447.149 0, 302.092 4, 215.059 6	astin H
8	9.253	$C_{25}H_{35}N_5O_6$	502.266 9 [+]	474.273 5, 270.146 1, 183.114 9, 155.119 2	astinG
9	9.502	$C_{15}H_{10}O_7$	303.049 9 [+]	285.040 5, 257.047 8, 229.050 8, 153.019 3	槲皮素*
10	10.164	$C_{25}H_{32}ClN_5O_7$	550.207 2 [+]	465.156 1, 447.146 0, 318.086 1, 300.075 8	astin E
11	10.363	$C_{25}H_{34}ClN_5O_7$	552.221 3 [+]	524.230 0, 449.160 1, 320.102 1, 106.065 9	astin I
12	10.810	$C_{15}H_{10}O_6$	287.055 0 [+]	269.044 5, 185.062 1, 153.017 9	木犀草素
13	10.819	$C_{15}H_{10}O_6$	287.055 9 [+]	269.044 5, 153.017 9, 121.028 9	山柰酚*
14	11.166	$C_{25}H_{33}N_5O_8$	532.240 7 [+]	514.233 3, 338.174 0, 264.099 5, 235.110 1	asterin A
15	11.581	$C_{25}H_{34}ClN_5O_6$	536.227 9 [+]	508.236 0, 451.177 5, 304.108 1, 106.066 0	astin F
16	12.020	$C_{25}H_{32}ClN_5O_6$	534.211 9 [+]	506.219 9, 449.160 4	astinD
17	12.078	$C_{25}H_{33}Cl_2N_5O_8$	602.177 8 [+]	584.170 8, 336.053 5, 232.098 4, 106.066 1	astin K
18	13.428	$C_{25}H_{33}Cl_2N_5O_7$	586.184 1 [+]	558.191 6, 336.053 2	astin A
19	13.436	$C_{25}H_{33}Cl_2N_5O_7$	586.181 6 [+]	558.191 6, 106.066 2	astin B
20	14.157	$C_{25}H_{33}N_5O_7$	516.249 0 [+]	498.237 3, 338.173 1, 235.109 7, 179.083 3	astin J
21	15.084	$C_{25}H_{33}Cl_2N_5O_6$	570.188 2 [+]	485.139 0, 338.069 1, 251.037 1, 106.066 1	astin C
22	4.110	$C_{16}H_{18}O_9$	353.087 5 [-]	191.060 6, 179.039 7, 135.048 6	1-咖啡酰奎宁酸
23	5.436	$C_{16}H_{18}O_9$	353.087 2 [-]	191.062 6, 93.037 5	绿原酸*
24	5.726	$C_{16}H_{18}O_9$	353.086 6 [-]	191.061 5, 173.050 0, 93.037 4	隐绿原酸
25	10.297	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515.117 5 [-]	353.093 3, 335.081 4, 191.060 8, 179.039 3	异绿原酸 B*
26	10.596	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515.116 6 [-]	353.093 6, 335.082 4, 191.061 5, 179.039 7	异绿原酸 C*
27	10.952	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515.116 0 [-]	353.093 4, 335.081 5, 191.061 5, 161.028 3	洋蓟素
28	11.540	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515.117 2 [-]	353.093 2, 335.081 6, 191.061 2, 161.028 2	异绿原酸 A*

*表示化合物与对照品比对

*indicates that the compounds were compared with the control substance

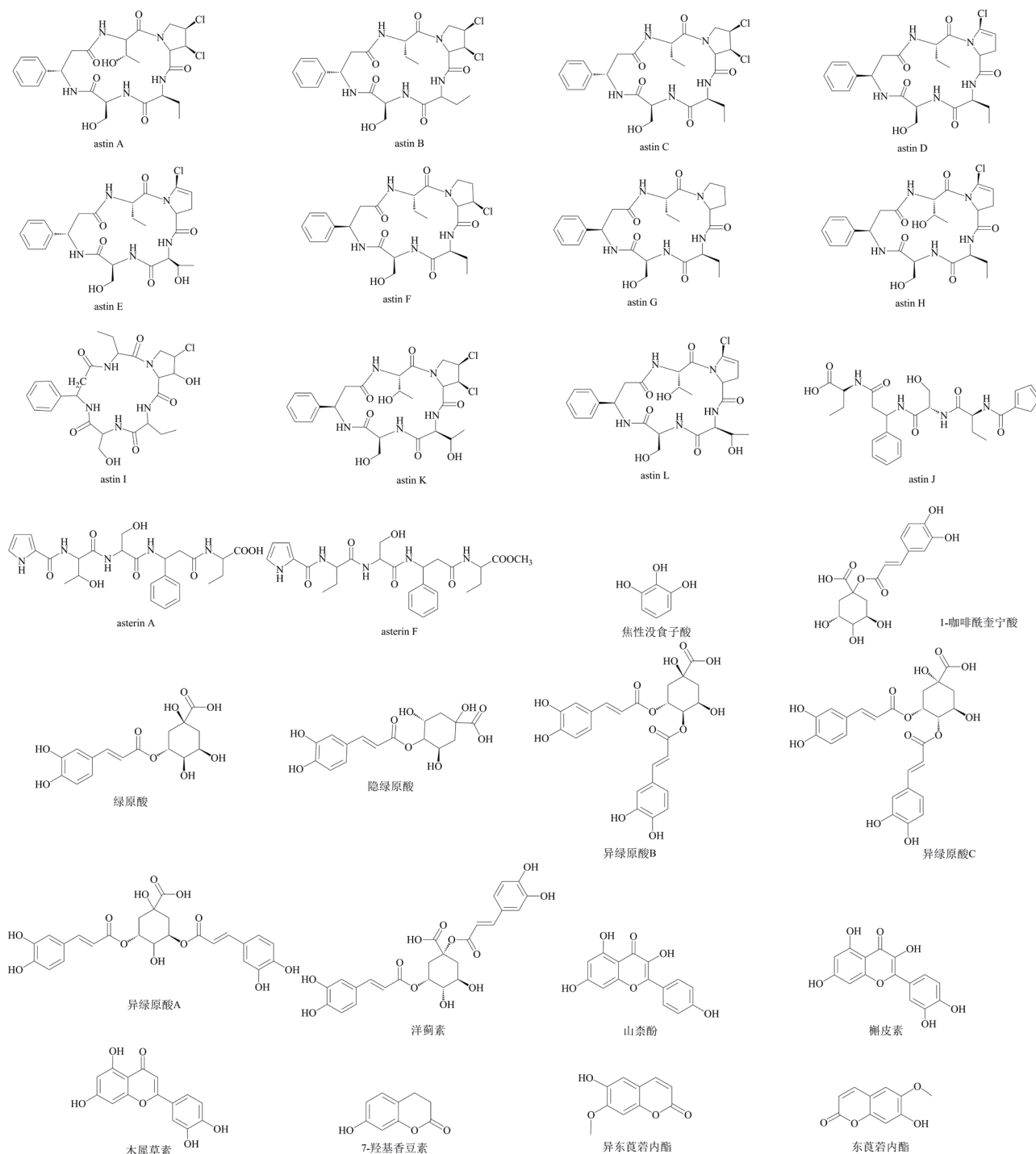


图 3 大鼠 ig 紫菀提取液后肠道内容物中化合物分子结构式

Fig. 3 Molecular structure formula of compounds in intestinal contents of rats after ig *A. tataricus*

选的活性成分，进行分子作用力的分析。

2.2.1 M2 受体与配体小分子的分子对接结果 分子对接结果如表 3 所示，有 11 个化合物表现出良好的结合活性，Total Score 值均大于 5，其中异绿原酸 C 的 Total Score 值最高，为 8.077 8，其次为 astin J 和山柰酚。图 4 分别为异绿原酸 C、astin J、山柰

酚与 M2 受体分子对接结合模式图及与氨基酸残基的相互作用图。根据图 4 中 3D 和 2D 结合模式图，进一步分析了这些化合物与蛋白质的作用关系发现，异绿原酸 C 与 M2 受体的 10 个氨基酸形成范德华力，与 13 个氨基酸形成静电相互作用，并与 108 号和 404 天冬酰胺及 426 号酪氨酸形成 3 个氢

表 3 配体与蛋白的分子对接整体打分值

Table 3 Total score of ligand and protein with molecular docking

排名	化合物	Total Score 值			
		M2	M3	PKC	平均值
1	焦性没食子酸	4.044 6	3.570 1	4.261 1	3.958 6
2	7-羟基香豆素	5.041 6	5.066 3	4.598 5	4.902 1
3	asterin F	7.163 6	9.650 8	9.202 6	8.672 3
4	astin L	-6.858 5	-1.085 8	7.941 8	-0.000 8
5	异东茛菪内酯	4.365 6	4.105 2	4.690 9	4.387 2
6	东茛菪内酯	4.632 0	4.560 7	4.598 5	4.597 0
7	astin H	-4.584 3	3.729 9	9.083 7	2.743 1
8	astinG	-3.787 1	4.957 9	9.408 8	3.526 5
9	槲皮素	7.095 5	5.076 9	5.895 0	6.022 4
10	astin E	-3.787 1	4.957 9	9.408 8	3.526 5
11	astin I	-8.652 2	1.626 0	5.999 6	-0.342 2
12	木犀草素	6.642 6	5.187 2	5.845 1	5.891 6
13	山柰酚	7.540 3	5.266 4	5.002 3	5.936 3
14	asterin A	5.137 0	7.942 9	8.453 0	7.177 6
15	astin F	-7.932 4	1.626 0	6.474 3	0.055 9
16	astinD	-3.861 9	0.315 0	5.476 8	0.643 3
17	astin K	-10.517 5	-0.728 9	6.025 0	-1.740 4
18	astin A	-6.018 7	0.940 5	5.576 9	0.166 2
19	astin B	-11.927 1	0.795 9	4.762 2	-2.123 0
20	astin J	7.735 1	8.244 8	13.162 6	9.714 1
21	astin C	-0.258 1	3.866 2	7.462 4	3.690 1
22	1-咖啡酰奎宁酸	2.939 9	5.574 1	8.221 4	5.578 4
23	绿原酸	7.110 3	5.583 3	5.499 9	6.064 5
24	隐绿原酸	3.868 7	6.817 9	6.818 5	5.835 0
25	异绿原酸 B	5.842 3	8.242 9	8.554 1	7.546 4
26	异绿原酸 C	8.077 8	7.687 3	9.741 2	8.502 1
27	洋茴素	4.849 7	1.885 3	9.130 6	5.288 5
28	异绿原酸 A	5.815 1	7.250 2	8.891 8	7.319 0

键; 山柰酚与 M2 受体的 4 个氨基酸形成范德华力, 与 12 个氨基酸形成静电相互作用, 与 104 号和 426 号酪氨酸、404 号天冬酰胺、429 号半胱氨酸形成 4 个氢键。化合物异绿原酸 C 与 M2 受体的相互作用力总数比山柰酚多 6 个, 说明异绿原酸 C 与 M2 受体的结合性强于山柰酚, 与表 3 中打分值结果一致。

2.2.2 M3 受体与配体小分子的分子对接结果 如表 3 所示, 与 M3 受体分子对接的结果中 Total Score 大于 5 的有 13 个化合物, Total Score 值排名前 3 的分别为 asterin F、astin J 和异绿原酸 B。图 5 分别为 asterin F、astin J、异绿原酸 B 与 M3 受体分子对接结合模式图及与氨基酸残基的相互作用图, 从图中可知, asterin F 与 M3 受体的 13 个氨基酸形成范德

德华力, 与 11 个氨基酸形成静电相互作用, 与 148 号酪氨酸、152 号天冬酰胺、238 号丙氨酸、503 号色氨酸和 507 号天冬酰胺形成 6 个氢键作用, 并且与 503 号色氨酸形成 $\sigma-\pi$ 超共轭和 529 号酪氨酸形成 $\pi-\pi$ 共轭效应; 异绿原酸 B 与 M3 受体的 12 个氨基酸形成范德华力, 与 11 个氨基酸形成静电相互作用, 与 222 号异亮氨酸、426 号天冬酰胺、506 号酪氨酸和 532 号半胱氨酸形成 4 个氢键, 并且与 506 号酪氨酸形成 $\pi-\pi$ 共轭效应。化合物 asterin F 和异绿原酸 B 与 M3 受体结合过程中都形成了共轭效应, asterin F 与 M3 受体的相互作用力数总数大于异绿原酸 B, 因此, Total Score 值更大, 结合力更强。

2.2.3 PKC 蛋白与配体小分子的分子对接结果

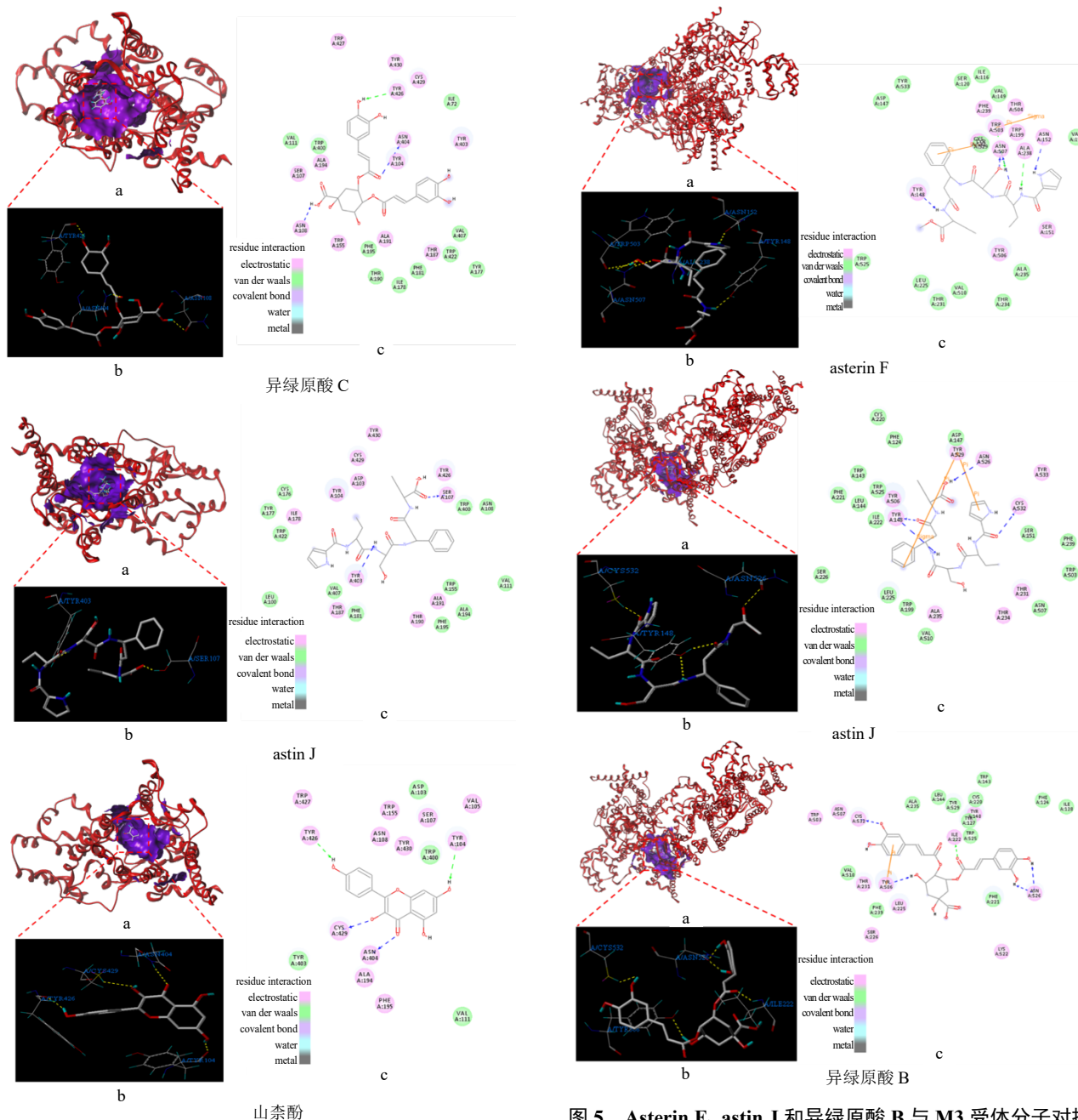


图 4 异绿原酸 C、astin J 和山柰酚与 M2 受体分子对接结合模式及与氨基酸残基的相互作用

Fig. 4 Molecular docking binding pattern diagram and interaction diagram of amino acid residues of isochlorogenic acid C, astin J and kaempferol with M2 receptor

如表 3 所示, 与 PKC 蛋白分子对接的结果中 Total Score 值大于 5 的有 23 个化合物, Total Score 值排

图 5 Asterin F、astin J 和异绿原酸 B 与 M3 受体分子对接结合模式及与氨基酸残基的相互作用

Fig. 5 Molecular docking binding pattern diagram and interaction diagram of amino acid residues of asterin F, astin J and isochlorogenic acid B with M3 receptor

名前 3 的分别为 astin J、异绿原酸 C 和 astin E。根据图 6 可得, astin J 与 PKC 的 10 个氨基酸形成范德华力, 与 13 个氨基酸形成静电相互作用, 与 253 号精氨酸、256 号酪氨酸、257 号丙氨酸、289 号色氨酸、293 号谷氨酸、371 号赖氨酸和 387 号天冬氨酸形成 9 个氢键; Astin E 与 PKC 的 6 个氨基酸形成范德华力, 与 11 个氨基酸形成静电相互作用, 与氨基酸残基形成 7 个氢键。在与 PKC 蛋白对接中发

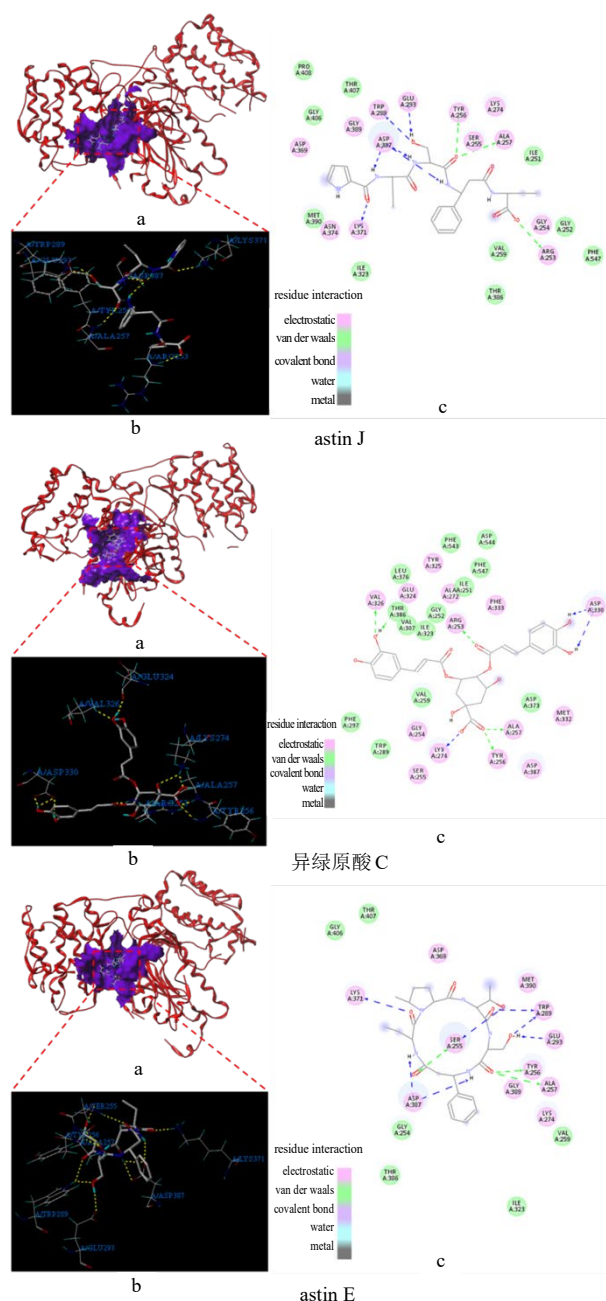


图6 Astin J、异绿原酸 C 和 astin E 与 PKC 蛋白分子对接结合模式及与氨基酸残基的相互作用

Fig. 6 Molecular docking binding pattern diagram and interaction diagram of amino acid residues of astin J, isochlorogenic acid C and astin E with PKC protein

现, astin J、异绿原酸 C 和 astin E 与 PKC 蛋白的氢键作用力较多, Total Score 打分值更高。

3 讨论

便秘是一种常见的消化系统疾病, 便秘的调节与分布在肠道上的神经递质与其受体密切相关, 肠道上分布有多种神经递质, 如 Ach、NE、5-HT 等,

这些神经递质释放后, 通过突触间隙, 直接与其特异性受体结合发挥生理效应, 进而调节肠道的运动和分泌^[23-25]。目前认为, 与 Ach 结合的 M 受体和 Ca^{2+} 通道在便秘的发生中起主要的作用, M 受体分为 M1、M2、M3、M4、M5 5 个亚型, 但是研究发现 M2 和 M3 受体亚型在调节肠道的运动及平滑肌的收缩中起着更重要的作用^[26], 同时, PKC 蛋白作为 Ca^{2+} 通道调控机制的下游蛋白, 其可被细胞质中的 Ca^{2+} 激活, 从而发挥调控肠道运动的作用^[27]。前期研究也发现紫菀润肠通便的作用机制与细胞膜上的 M 受体及 Ca^{2+} 通道相关^[20], 但是对于紫菀中润肠通便的效应物质尚不明确, 因此, 本研究采用 M 受体中与调节肠道的运动及平滑肌的收缩密切相关的 M2、M3 受体亚型蛋白和 Ca^{2+} 依赖性的 PKC 蛋白作为靶标蛋白, 通过分子对接技术与给药紫菀后的肠道内容物成分进行对接, 筛选出紫菀中润肠通便的活性成分。结果表明, 肠道内容物中含有 28 个紫菀中的化学成分, 经分子对接筛选出 astin J、asterin F、asterin A、异绿原酸 C、异绿原酸 A、异绿原酸 B、绿原酸、槲皮素、山柰酚和木犀草素共 10 个成分均可与 M2 受体、M3 受体及 PKC 蛋白体现出良好的分子对接活性, 其中 astin J 与 3 种靶标蛋白的 Total Score 值的平均值最高, 且以上 10 种活性成分与 3 种靶蛋白的对接区域和内源性配体的结合位置基本相同。目前, 已有文献报道槲皮素通过调节 M 受体及其下游信号 PKC 蛋白的表达发挥治疗洛哌丁胺所致的便秘^[28], 在本研究筛选出的 10 个活性成分中, 有 7 个成分与 3 种靶标蛋白结合的平均打分值强于槲皮素, 这也保证了实验结果的可靠性。因此, 推测以上 10 个潜在的化合物可能是治疗便秘的最主要的活性成分, 这也契合了中药多成分、多靶点、多途径的作用特点, 但是对于这些成分确切的治疗效果还需要进一步用细胞或动物实验进行验证。同时, 本实验为进一步研究紫菀通便的活性提供一定的理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 苏博源, 刘岩, 薛彦宇, 等. 基于反向分子对接的凹叶木兰和中缅木莲抗肿瘤活性研究 [J]. 计算机与应用化学, 2019, 36(4): 337-344.
- [2] 韩洪翠, 张艳玲, 路芳, 等. 基于分子对接结合靶标 mRNA 表达的交流丸镇静催眠药效物质及机制研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(3): 57-62.
- [3] Wang H P, Chen C, Liu Y, *et al.* Identification of the

- chemical constituents of Chinese medicine Yi-Xin-Shu capsule by molecular feature orientated precursor ion selection and tandem mass spectrometry structure elucidation [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38(21): 3687-3695.
- [4] Sun Y P, Li L, Liao M, *et al.* A systematic data acquisition and mining strategy for chemical profiling of *Aster tataricus* rhizoma (Ziwan) by UHPLC-Q-TOF-MS and the corresponding anti-depressive activity screening [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 154: 216-226.
- [5] Du H, Zhang M, Yao K J, *et al.* Protective effect of *Aster tataricus* extract on retinal damage on the virtue of its antioxidant and anti-inflammatory effect in diabetic rat [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2017, 89: 617-622.
- [6] 王芳, 任刚, 潘玲玲, 等. 紫菀酮基于 NF- κ B 信号通路的体外抗炎机制研究 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(4): 1430-1433.
- [7] Chen Y J, Dong J J, Liu J, *et al.* Network pharmacology-based investigation of protective mechanism of *Aster tataricus* on lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(3): 543.
- [8] 范玲, 王鑫, 朱晓静, 等. 紫菀化学成分及药理作用研究进展 [J]. 吉林中医药, 2019, 39(2): 269-273.
- [9] Zhou W B, Zeng G Z, Xu H M, *et al.* Astataricusones A—D and astataricusol A, five new anti-HBV shionane-type triterpenes from *Aster tataricus* L. F [J]. *Molecules*, 2013, 18(12): 14585-14596.
- [10] Zhou W B, Zeng G Z, Xu H M, *et al.* Astershionones A—F, six new anti-HBV shionane-type triterpenes from *Aster tataricus* [J]. *Fitoterapia*, 2014, 93: 98-104.
- [11] 张应鹏, 张海雷, 杨云裳, 等. 紫菀提取物不同极性部位体外抗氧化活性研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(11): 2799-2800.
- [12] Yu P, Cheng S, Xiang J, *et al.* Expectorant, antitussive, anti-inflammatory activities and compositional analysis of *Aster tataricus* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 164: 328-333.
- [13] Liu M, Wang Y P, Liu Y H, *et al.* Bioactive peptides derived from traditional Chinese medicine and traditional Chinese food: A review [J]. *Food Res Int*, 2016, 89(Pt 1): 63-73.
- [14] Su X D, Jang H J, Li H X, *et al.* Identification of potential inflammatory inhibitors from *Aster tataricus* [J]. *Bioorg Chem*, 2019, 92: 103208.
- [15] Schafhauser T, Jahn L, Kirchner N, *et al.* Antitumor astins originate from the fungal endophyte *Cyanodermella asteris* living within the medicinal plant *Aster tataricus* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(52): 26909-26917.
- [16] Rho J, Seo C S, Park H S, *et al.* *Asteris Radix* et Rhizoma suppresses testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in rats by regulating apoptosis and inflammation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 255: 112779.
- [17] 彭文静, 辛蕊华, 刘艳, 等. 紫菀乙醇提取物对豚鼠离体气管平滑肌收缩功能的影响 [J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(6): 1572-1578.
- [18] Wang L, Li M D, Cao P P, *et al.* Astin B, a cyclic pentapeptide from *Aster tataricus*, induces apoptosis and autophagy in human hepatic L-02 cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2014, 223: 1-9.
- [19] Chen Y J, Wu H, Li Y T, *et al.* *Aster tataricus* attenuates asthma efficiently by simultaneously inhibiting tracheal ring contraction and inflammation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 110616.
- [20] Wu H, Chen Y J, Huang B B, *et al.* *Aster tataricus* alleviates constipation by antagonizing the binding of acetylcholine to muscarinic receptor and inhibiting Ca²⁺ influx [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2021, 133: 111005.
- [21] 陈奕君, 吴浩, 魏紫奕, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 的紫菀药材全成分解析 [J]. 药学报, 2019, 54(9): 1645-1654.
- [22] 赵丹, 干作飞, 涂文通. 基于奥司他韦衍生物的抗流感病毒 H7N9 的分子对接 [J]. 广东化工, 2016, 43(18): 35-38.
- [23] 姜迎娅, 陈忠. 动物肠道主要神经递质及其受体分布与功能的研究进展 [J]. 家畜生态学报, 2013, 34(9): 1-7.
- [24] 李晓丽, 吴博威. 5-羟色胺 4 受体激动剂的促肠道动力作用研究 [J]. 中国药物与临床, 2018, 18(8): 1279-1281.
- [25] 肖洪贺, 张明波, 郭周全, 等. 茯苓抑制小肠收缩的作用机制 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(9): 1478-1484.
- [26] 王斌, 程峰涛. M 受体亚型和胃肠道平滑肌功能 [J]. 中国病理生理杂志, 2001, 17(11): 1093-1096.
- [27] Naghdi F, Gholamnezhad Z, Boskabady M H, *et al.* Muscarinic receptors, nitric oxide formation and cyclooxygenase pathway involved in tracheal smooth muscle relaxant effect of hydro-ethanolic extract of *Lavandula angustifolia* flowers [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2018, 102: 1221-1228.
- [28] Kim J E, Lee M R, Park J J, *et al.* Quercetin promotes gastrointestinal motility and mucin secretion in loperamide-induced constipation of SD rats through regulation of the mAChRs downstream signal [J]. *Pharmaceut Biol*, 2018, 56(1): 309-317.

[责任编辑 王文倩]