

· 基础研究 ·

抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的
中药化学成分虚拟筛选[△]雷蕾¹, 杨策¹, 亢力¹, 邢雁辉¹, 武红莉², 王忠^{2*}

1. 中国中医科学院 中药信息研究所, 北京 100700; 2. 中国中医科学院 中医临床基础医学研究所, 北京 100700

[摘要] 目的: 从已有报道具有抗菌和抑菌作用的中药所包含化学成分中筛选出可能具有抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的前药。方法: 从252篇文献中收集抗菌或者抑菌作用中药283味, 包含化学成分6193个。使用化合物ADME的性质和Lipinski规则进行了初步筛选, 得到了907个候选化合物。选择青霉素结合蛋白2a(PBP2a): 蛋白3D结构(PDB ID: 3ZG0, 2.60 Å), 应用Discovery Studio 4.5(DS4.5)软件的CDOCKER模块进行分子对接, 再以原配体打分为参考开展系统筛选研究, 筛选出具有新药开发前景的化合物。结果: 在PBP2a蛋白的变构位点, 对接良好的候选物共计66个; 在活性位点, 对接良好的候选物共计6个; 在变构位点和活性位点对接均良好的候选物有2个。结论: 本研究筛选出的70个化合物的来源中药均有抗菌或抑菌作用的报道, 但是这些化合物至今为止还未进行过抗MRSA方面的研究, 笔者希望这个结果能为新药研发提供参考。

[关键词] 抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 中药; 化学成分; 虚拟筛选

[中图分类号] R284; **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)01-0035-07

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190611001

Virtual Screening of Chemical Compounds against MRSA

LEI Lei¹, YANG Ce¹, KANG Li¹, XING Yan-hui¹, WU Hong-li², WANG Zhong^{2*}

1. Institute of Information on Traditional Chinese Medicine, Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700, China;

2. Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

[Abstract] **Objective:** To select anti-MRSA prodrugs from the chemical components contained in traditional Chinese medicines with antibacterial and bacteriostatic effects. **Methods:** 283 Chinese herbs with antibacterial or bacteriostatic effects were collected from 252 articles, and they included 6193 chemical components. A preliminary screening was performed using the properties of the compound's ADME and the Lipinski rule, and 907 candidates were obtained. Select PBP2a protein 3D structure (PDB ID: 3ZG0, 2.60 Å), the CDOCKER module of Discovery Studio 4.5 (DS4.5) software for molecular docking was applied to carry out screening research with reference to the original ligand, and finally screened out new prodrugs. **Results:** 66 docking candidates were available at the allosteric site of the PBP2a protein. At the active site, 6 candidates were docked well. 2 candidates that were well docked at both the allosteric site and the active site. **Conclusion:** The Chinese herbs containing 70 compounds screened in this study has been reported to have antibacterial or antibacterial effects. However, these compounds have not been studied in anti-MRSA, and we hope that this result can provide reference for the development of new drugs.

[Keywords] MRSA; TCM; chemical compounds; virtual screening

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant staphylococcus aureus, MRSA)是多药耐药性感染的最常见原因之一, 具有显著的发病率和病死率, 已成为医院感染和社区获得性感染的重要病原菌之

—^[1]。随着MRSA对所有种类的抗生素逐渐产生耐药性, 它变得越来越难以控制。因此, 笔者们一直在寻找新的药物来对抗MRSA。

中医药是我国医学瑰宝, 随着中医药现代化发

[△] [基金项目] 中国中医科学院基本科研业务费自主选题项目(ZZ110324); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(Z0547)

* [通信作者] 王忠, 研究员, 研究方向: 中药临床药理及疗效评价; E-mail: zhonw@vip.sina.com

展,越来越多的中药化学成分被分离出来,为新药开发提供了宝贵的资源。已经有很多从天然产物中开发出新药的例子,例如青蒿素的开发^[2]和长春碱的开发^[3]。然而,传统生物测定筛选的成本高昂。近年来,分子对接方法已成为计算机辅助药物研究领域的一项重要技术。它是通过受体的特征以及受体和药物分子之间的相互作用方式来进行药物筛选的方法,可以有效地在进行传统生物学测定之前进行虚拟筛选,从而降低新药开发的成本,并提高命中率。

本研究收集了文献中有抗菌或者抑菌报道的中药以及中药包含的化学成分,希望筛选出可能具有抗 MRSA 的化合物。因此,使用分子对接的方法对 283 味中药中包含的 6193 个化学成分与常见 MRSA 抑制靶标青霉素结合蛋白 2a(PBP2a)进行了分子对接,得到的研究结果希望能给新药开发人员以有价值的参考。

1 资料与方法

1.1 平台和软件

本研究所有工作均在 Microsoft Windows 2007 操作系统中完成,采用 Accelrys 公司的 Discovery Studio 4.5(DS4.5)软件。参数设置除特殊指明,均为默认值。本研究使用的是 CDOCKER 程序,是基于 CHARMM 的柔性对接程序,采用 soft-core potentials 以及 optional grid representation 将配体分子与受体活性位点进行对接。首先采用动力学的方法随机搜索小分子构象,随后采用模拟退火的方法将各个构象在受体活性位点区域进行优化,从而使对接结果更加准确。分子的吸收、分布、代谢、排泄、毒性(ADMET)计算也是使用 DS4.5 完成的。

1.2 受体的准备

PBP2a 的 3D 结构(PDB ID: 3ZG0, 2.60 Å)从 Protein Data Bank 网站下载(<https://www.rcsb.org/>)。MRSA 具有多重耐药性,其产生机制是 PBP2 改变的结果,高度耐药性是由于原有的 PBP2 与 PBP3 之间产生一种新的 PBP2'(即 PBP2a),低、中度耐药是 PBP2 的产量增多或与甲氧西林等亲和力下降所致。

PBP2a 晶体学研究给出了抑制剂与蛋白在变构位点和活性位点相互作用的信息,变构结合域位于距离 dd-转氨酶活性位点 60 Å 的位置。当配体在变构

位点占用时,多残留构象变化在活性位点达到顶峰,从而允许抑制剂进入^[4]。3ZG0 是蛋白与 2 个分子的 ceftaroline(头孢洛林)共结晶体,配体 ceftaroline(ID: 1W8)成功触发了 PBP2a 构象变化,使蛋白的活性部位可以与另一个 ceftaroline 分子(ID: AI8)结合。ceftaroline 是 FDA 批准的抗 MRSA β -内酰胺抗生素。目前 3ZG0 已经用于抗 MRSA 药物的虚拟筛选^[5,6]。

本研究受体的准备和结合口袋的定义为删除水分子、原配体分子及其非相关的蛋白质构象,经 clean protein 工具处理,再加 CHARMM 力场进行能量优化,定义蛋白为受体,以它的原配体位置为中心,选择半径 0.50 nm 范围的残基为活性残基,将其定义 sphere 球,此范围内的空腔为结合口袋,最后保存备用。

1.3 配体数据的组建

检索中国生物医学文献数据库(SinoMed)、中国期刊全文数据库(CNKI),万方数据库和维普数据库。检索词有:“抑菌”“抗菌”“药理作用”。时间限制为 1949 年 1 月—2017 年 12 月。纳入标准:采集对中药或者中药提取物的药理作用进行研究的文献。排除标准:排除文献研究、综述、非药理实验文献、理论探讨、临床研究、单体成分药理实验报道以及重复报道的文献。数据由人工摘录的方式从文献中收集与中药、中药提取物和药理作用相关的信息。在本研究中,中药提取物统一为中药名称,例如黄芩乙醇提取物规范统一为黄芩,栀子提取物统一为栀子。最后,根据计算系统生物学实验室 TCMSP(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>),检索出化学成分。

因为中药常水煎口服,在体内需经吸收(absorption)、分布(distribution)、代谢(metabolism)以及排泄(excretion)过程,这个过程简称 ADME。为了预测化合物 ADME 的性质,本研究以口服生物利用度(OB \geq 30%)和类药性(DL \geq 0.18)为条件筛选化合物。将化合物的 mol2 格式文件导入 DS4.5 中,首先依据 Lipinski 规则进行筛选,然后使用 small molecules-prepare ligand 进一步将配体产生三维结构,加氢,产生异构体等。最后使用 small molecules-minimize ligands,加 CHARMM 力场进行能量最小化,保存为分子对接的配体分子集。

1.4 对接方法可信性验证

含有原配体的蛋白晶体复合结构,将原配体抽

离,然后按设定的参数对接回其结合口袋,计算对接后最高打分的构象与原配体结构的均方根偏差值(RMSD),一般 $RMSD \leq 0.20 \text{ nm}^{[7]}$ 则认为该对接方法可行,说明该套参数能较好地重现此配体与受体的结合模式。

1.5 配体分子与受体靶点对接参数

将上述配体和受体导入 DS4.5,调用 CDOCKER 对接模块,参数均为默认值。

变构位点结合口袋的位置是 $X = 9.965744$, $Y = 52.253615$, $Z = 23.244846$,结合口袋的半径为 11.520969 \AA 。

活性位点结合口袋的位置是 $X = -35.986667$, $Y = 44.388051$, $Z = 66.823564$,结合口袋的半径为 12.883887 \AA 。

1.6 结果处理

对接完成后,以原配体的对接 interaction energy 为参考,值高于原配体的予以保留,得到潜在有活性的化合物。

2 结果

2.1 抑菌抗菌中药统计

本研究共检索出 252 篇文献,一共出现 283 味中药,其中频次在前 10 位的见表 1。

表 1 文献检索频次在前 10 位的抑菌抗菌中药

序号	中药名称	出现频次
1	黄连	39
2	黄芩	24
3	大黄	22
4	五倍子	18
5	丁香	17
6	黄柏	15
7	连翘	14
8	金银花	13
9	虎杖	13
10	鱼腥草	11

2.2 化学成分统计

在 283 味中药中包含了 6193 个化学成分,以 $OB \geq 30\%$ 和类药性 $DL \geq 0.18$ 为条件筛选出化合物 1137 个。进一步使用 Lipinski 规则筛选出 907 个化合物。Lipinski 规则,即类药五原则(rule of five),其内容如下:1 个小分子药物中要具备以下性质:分

子量 < 500 ; 氢键给体数目 < 5 ; 氢键受体数目 < 10 ; 脂水分分配系数 < 5 ; 可旋转键的数量不超过 10 个。

2.3 可行性验证结果

选取 3ZG0 含有原配体的复合结构晶体,将原配体抽离,再对接回其结合口袋,计算对接后构象与原配体结构的 RMSD 值, $< 0.2 \text{ nm}$ 说明该对接方法、所选用的晶体结构及参数的设定可行。

2.4 变构部位分子对接

将原配体 ceftaroline 对接回变构部位结合口袋,得到 interaction energy 为 -54.89 。完成对接后,能量低于它的化合物有 66 个,结合能最低的 10 个化合物见表 2。

2.5 活性部位分子对接

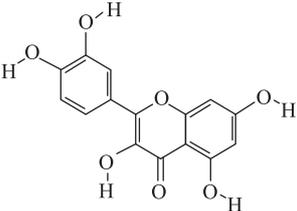
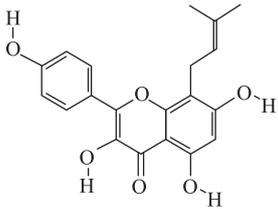
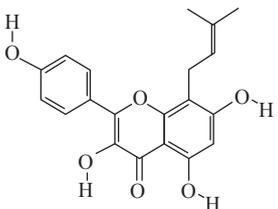
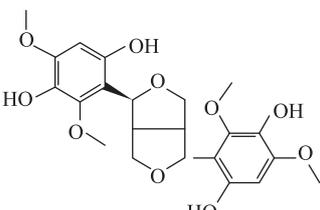
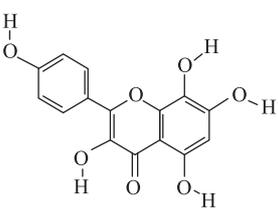
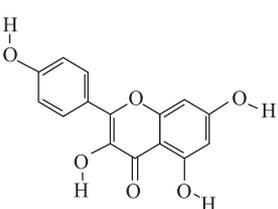
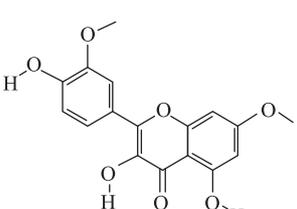
将原配体 ceftaroline 对接回活性部位结合口袋,得到 interaction energy 为 -68.65 ,能量低于它的化合物有 6 个,见表 3。

2.6 作用模式分析

为了研究突变体结构与活性化合物的结合亲和力,进行了作用模式的分析。变构位点在整个对接过程中至关重要,必须先有 1 个分子与变构位点结合,触发 PBP2a 构象变化,使蛋白的活性部位可以与另 1 个分子结合,从而达到抗 MRSA 的作用。实际上,PBP2a 表现出耐药性,是因为在 PBP2a 的变构位点(146 位和 150 位)上发生了 2 个氨基酸的变化,这 2 个氨基酸的变化对头孢类药物产生了抗药性,导致了头孢类药物耐药 MRSA 菌株的增加^[4]。本研究发现了 23 个化合物与 146 位氨基酸残基可以通过氢键和范德华力结合。而在 3ZG0 活性位点上,6 个化合物除了范德华力和氢键外,还通过盐桥、 $\pi\pi$ 相互作用等与周围的蛋白质残基相结合。

本研究发现,不论是变构部位还是活性部位,lupiwighteone 和 syringaresinol diglucoside_qt 都能以较为稳定的构象与 3ZG0 结合。syringaresinol diglucoside_qt 是 syringaresinol diglucoside 的去糖基的代谢产物,可以认为是肠道菌水解产物。也就是说,lupiwighteone 和 syringaresinol diglucoside_qt 就像一把钥匙,1 个分子可以先与变构位点结合,触发 PBP2a 构象变化,使蛋白的活性部位可以与另 1 个分子结合,从而达到抗 MRSA 的作用。

表2 变构部位结合能最低的10个化合物

ID	结合能	化合物英文名称	分子结构	来源
MOL000354	-79.86	isorhamnetin		白果, 白头翁, 柴胡, 垂盆草, 甘草, 高良姜, 枸骨叶, 金荞麦, 菊花, 青蒿, 山豆根, 山楂叶, 射干, 吴茱萸, 益母草, 银杏叶
MOL003542	-79.12	8-isopentenyl-kaempferol		苦参, 石菖蒲, 淫羊藿
MOL005195	-78.01	syringaresinol diglucoside_qt		女贞子
MOL002823	-77.21	herbacetin		胡黄连, 瓦松
MOL000422	-76.94	kaempferol		八角莲, 白果, 白芍, 败酱草, 半边莲, 篇蓄, 柴胡, 地榆, 丁香, 杜仲, 儿茶, 凤眼草, 甘草, 高良姜, 枸骨叶, 贯众, 红花, 金银花, 菊花, 雷公藤, 连翘, 蓼大青叶, 罗汉果, 马齿苋, 牡丹皮, 牛蒡子, 女贞子, 青蒿, 人参, 人参叶, 桑叶, 山豆根, 山楂叶, 石菖蒲, 石榴皮, 石韦, 瓦松, 乌梅, 夏枯草, 仙鹤草, 香薷, 益母草, 淫羊藿, 银杏叶, 鱼腥草, 知母, 栀子
MOL000737	-76.67	morin		夏枯草, 香薷
MOL000351	-73.93	rhamnazin		半枝莲, 射干

续表 2

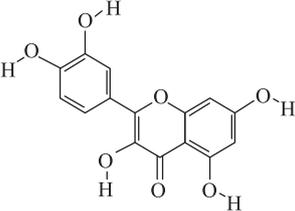
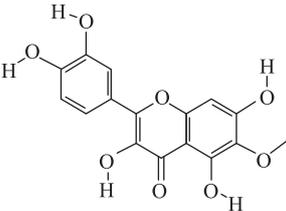
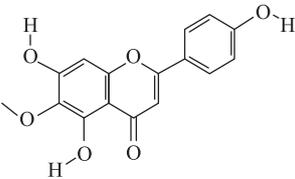
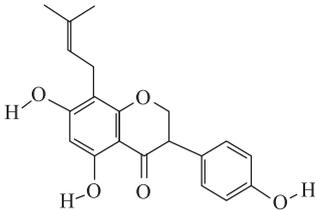
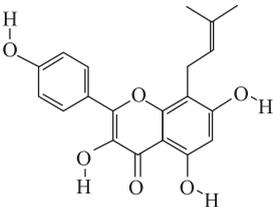
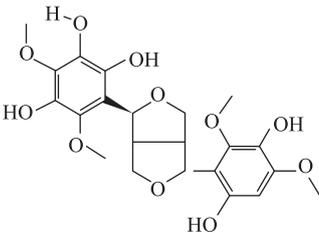
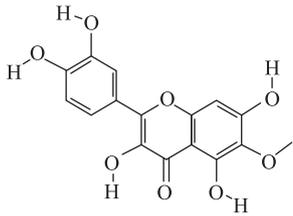
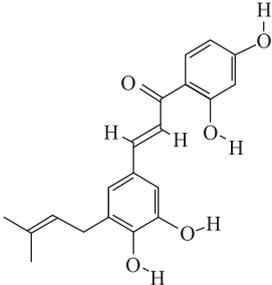
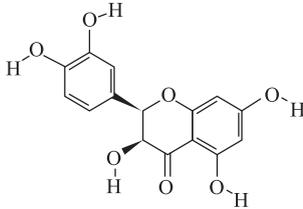
ID	结合能	化合物英文名称	分子结构	来源
MOL000098	-71.53	quercetin		艾叶, 八角莲, 白果, 白花蛇舌草, 白藜, 白鲜皮, 败酱草, 半边莲, 半枝莲, 北沙参, 篇蓄, 柴胡, 车前子, 垂盆草, 地榆, 丁香, 杜仲, 儿茶, 凤眼草, 甘草, 高良姜, 枸骨叶, 广藿香, 海藻, 红花, 虎杖, 花椒, 黄柏, 黄连, 金莲花, 金荞麦, 金银花, 菊花, 苦参, 连翘, 龙葵, 芦荟, 马齿苋, 牡丹皮, 女贞子, 青果, 青蒿, 人参叶, 桑寄生, 桑叶, 山豆根, 山楂叶, 石榴皮, 石韦, 瓦松, 乌梅, 吴茱萸, 夏枯草, 仙鹤草, 香薷, 野菊花, 益母草, 淫羊藿, 银杏叶, 鱼腥草, 栀子
MOL004112	-70.79	patuletin		青蒿
MOL001735	-70.04	dinatin		车前子, 射干, 车前草, 半枝莲, 板蓝根

表 3 活性部位结合能低于原配体的化合物

ID	结合能	化合物英文名称	分子结构	来源
MOL003656	-78.40	lupiwighteone		甘草, 山豆根
MOL003542	-74.40	8-isopentenyl-kaempferol		苦参, 石菖蒲, 淫羊藿
MOL005195	-72.53	syringaresinol diglucoside_ qt		女贞子

续表 3

ID	结合能	化合物英文名称	分子结构	来源
MOL004112	-69.53	patuletin		青蒿
MOL004898	-69.42	(E)-3-[3,4-dihydroxy-5-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]-1-(2,4-dihydroxyphenyl)prop-2-en-1-one		甘草
MOL004576	-68.68	taxifolin		桂枝, 女贞子

3 讨论

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌对目前所有广谱抗生素都表现出耐药性,对公众构成严重威胁。在中药抗耐药菌的研究中,田应彪等^[8]观察了五倍子、黄连、黄柏等16种中药水煎液对MRSA和MSSA体外抑菌作用,黄文玉等^[9]发现了大蒜、马齿苋、野菊花等27种清热解毒中药对葡萄球菌耐药菌株的作用,谢大泽等^[10]报道了黄连等中药对淋菌耐药菌株体外抗菌活性的研究工作。中药逐渐在耐药菌的研究中崭露头角,因此本研究希望可以从具有抗菌抑菌作用的中药中寻找抗MRSA的候选物,进而为新药开发提供参考。

为了能够尽可能地筛选出候选物,在进行虚拟筛选之前,本研究就使用化合物的ADME的性质和Lipinski规则进行了初步筛选。这一方面可以减少分子对接的计算量,另一方面可以保证最后得到的化合物会有更好的药代动力学性质,在生物体内代谢过程中会有更高的生物利用度,因而也更有可能是口服药物。摒除了那些不适合成为药物的分子,缩小筛选的范围,并降低药物

研发成本。

PBP2a蛋白结构很特殊,它有一个变构位点,一个活性位点。变构位点就像一扇门,打开了它,活性位点才能有效结合药物分子。本研究发现了66个可以与变构位点良好结合的中药化学成分,它们都可以作为钥匙打开第一扇门。同时发现了6个可以与活性位点良好结合的成分。值得一提的是,不论是变构部位还是活性部位,来自甘草和山豆根的lupiwighteone和来自女贞子的syringaresinol diglucoside_qt都能以较为稳定的构象与3ZG0结合。也就意味着lupiwighteone和syringaresinol diglucoside_qt有可能像上市药物ceftaroline一样,以2个分子的形式与PBP2a蛋白相结合,从而达到抗MRSA的目的。

参考文献

- [1] EDWARDS B, ANDINI R, ESPOSITO S, et al. Treatment options for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection; where are we now[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2014, 2(3):133-40.
- [2] 刘春朝,王玉春,欧阳藩,等.青蒿素研究进展[J].化学进展,1999,11(1):41.

(下转第46页)

- 牧,2017(19):59-60.
- [14] 卢林,段彬伍. 旋光法测定大米淀粉含量的改进研究[J]. 中国稻米,2011,17(1):25-27.
- [15] 冀会方. 鸭胆子生物肽的分离纯化及其对人乳腺癌细胞 MCF-7 作用机制研究[D]. 北京:北京中医药大学,2017.
- [16] KRIZKOVA S, DOSTALOVA S, MICHALEK P, et al. SDS-PAGE as a Tool for hydrodynamic diameter-dependent separation of quantum dots[J]. Chromatographia, 2015, 78(11/12):785-793.
- [17] LI L L, LI B, JI H F, et al. Immunomodulatory activity of small molecular (≤ 3 kDa) Coix glutelin enzymatic hydrolysate[J]. CYTA-J FOOD, 2017, 15(1):1-8.
- [18] 文博,谭谦. 皮肤黑色素瘤一线治疗研究进展[J]. 东南大学学报(医学版), 2018, 37(3):524-529.
- [19] 任宇,刘宝瑞,邹征云. 晚期恶性黑色素瘤的靶向及免疫治疗研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(12):1970-1974.
- [20] 周诗,胡慧媛,郝丽英. 多肽类药物在心血管疾病中作用的研究进展[J]. 生理科学进展, 2017, 48(6):428-434.
- [21] KANNAN A, HETTIARACHCHY N S, LAY J O, et al. Human cancer cell proliferation inhibition by a pentapeptide isolated and characterized from rice bran[J]. Peptides, 2010, 31(9):1629-1634.
- [22] WANG L, ZHANG J, YUAN Q, et al. Separation and purification of anti-tumor peptide from rapeseed (*Brassica campestris* L.) and the effect on cell apoptosis[J]. Food & Function, 2016, 7(5):2239-2248.
- [23] WANG Y K, HE H LU, WANG G F, et al. Oyster (*Crassostrea gigas*) hydrolysates produced on a plant scale have antitumor activity and immunostimulating effects in BALB/c mice[J]. Marine Drugs, 2010, 8(2):255-268.
- [24] SU L, XU G, SHEN J, et al. Anticancer bioactive peptide suppresses human gastric cancer growth through modulation of apoptosis and the cell cycle[J]. ONCOL REP, 2010, 23(1):3.
- [25] 孙向阳,罗小明,王琳萍. 甘肃不同产地甘肃黄芩解热、抗炎的研究[J]. 中医研究, 2018, 31(7):70-73.
- [26] 刘英,崔秀明,杨野,等. 不同产地三七茎叶的质量评价[J]. 中国医药工业杂志, 2015, 46(7):701-703.
- [27] 罗宇东,谭安蕾,陆施衡,等. 壮药藤苦参中强心苷的含量测定及不同产地、采收季节对药材含量的影响[J]. 中国当代医药, 2018, 25(12):14-17.
- [28] 卢聪,鲍勇刚,赵树民,等. 不同产地人参蛋白差异研究[J]. 中国现代中药, 2015, 17(1):6-10, 14.

(收稿日期: 2019-04-09 编辑: 谢睿)

(上接第40页)

- [3] 董梅. 长春碱类抗肿瘤药物研究新进展[J]. 国外医学肿瘤学分册, 1998, 25(3):144-146.
- [4] OTERO L H, ROJAS-ALTUVE A, LLARRULL L I, et al. How allosteric control of Staphylococcus aureus penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(42):16808-16813.
- [5] LAVANYA P, RAMAIAH S, ANBARASU A. A Molecular Docking and Dynamics Study to Screen Potent Anti-Staphylococcal Compounds Against Ceftaroline Resistant MRSA[J]. J Cell Biochem, 2016, 117(2):542-548.
- [6] RANI N, VIJAYAKUMAR S, LAKSHMI P T V, et al. Allosteric site-mediated active site inhibition of PBP2a using Quercetin 3-O-rutinoside and its combination[J]. J Biomol Struct Dyn, 2016, 34(8):19.
- [7] RAO S N, HEAD M S, KULKARNI A, et al. Validation Studies of the site-directed docking program LibDock[J]. J Chem Inform Mod, 2007, 47(6):2159-2171.
- [8] 田应彪,陈泽慧,杨名慧,等. 16种中药水煎液对MRSA和MSSA体外抑菌试验观察[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(11):897-899.
- [9] 黄文玉,周丽敏,唐敏,等. 27种清热解毒中药对葡萄球菌耐药菌株的实验研究[J]. 山东中医杂志, 1991, 10(3):40-41.
- [10] 谢大泽,湛学军,舒向荣,等. 黄连等中药对淋菌耐药菌株体外抗菌活性的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(10):2193-2195, 2322.

(收稿日期: 2019-06-11 编辑: 谢睿)