

## ·论著·

## 血必净辐射防护作用机制的计算机模拟研究

龙伟 吴红英 张晓东 周则卫 沈秀 王浩 李德冠 孟爱民 刘培勋

**【摘要】 目的** 研究中药复方血必净辐射防护作用的可能机制。**方法** 通过计算机模拟技术——分子对接的方法将血必净化学成分分子与凝血酶、纤溶酶原激活物抑制物 1、血栓素 A2 受体、凝血因子 IXa 等 4 个重要凝血靶点进行对接, 分析对接结果, 评价作用效应。**结果** 血必净对凝血酶、纤溶酶原激活物抑制物 1、血栓素 A2 受体和凝血因子 IXa 等凝血靶点均具有一定的拮抗作用, 其中对凝血酶的作用最为显著。**结论** 血必净辐射防护作用的产生很可能与凝血靶点的拮抗相关。

**【关键词】** 辐射防护; 分子作用机制; 计算机模拟; 血必净; 分子对接

**Computational study for mechanisms of radiation protection effects of Xuebijing** LONG Wei, WU Hong-ying, ZHANG Xiao-dong, ZHOU Ze-wei, SHEN Xiu, WANG Hao, LI De-guan, MENG Ai-min, LIU Pei-xun. Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China

Corresponding author: LIU Pei-xun, Email: liupeixun@irm-cams.ac.cn

**【Abstract】 Objective** To explore the related mechanisms of Xuebijing anti-radiation effects. **Methods** The chemical molecules in Xuebijing were docked into four blood coagulation targets: thrombin, plasminogen activator inhibitor type 1, thromboxane A2 receptor and blood coagulation factor IXa by molecular docking technology respectively, and then the docking results were analyzed and the effect of the mechanisms was evaluated. **Results** The chemical molecules in Xuebijing had interactions with all four blood coagulation targets, especially for thrombin. **Conclusion** The related mechanism of Xuebijing anti-radiation effect is probably resulted from the antagonism effect towards blood coagulation targets.

**【Key words】** Radiation protection; Molecular mechanisms of action; Computer simulation; Xuebijing; Molecular docking

辐射防护药物一般是指能抑制辐射损伤的原始阶段, 保护生物敏感分子, 或在照射后早期使用能减轻辐射损伤的发展, 促进损伤恢复的药物。从 20 世纪 60 年代开始, 我国的辐射防护药物研究已经扩展到中草药方面, 近年来, 研究者们不断发现具有抗辐射作用的中草药及中药复方<sup>[1]</sup>。

中药血必净注射液是在中医药理论指导下, 从 36 组中药复方中筛选组方而成。该药由红花、丹参、赤芍、川芎、当归五味中药组成, 临床上用于治疗呼吸系统和泌尿系统炎症及多器官功能障碍综

合征等多种疾病<sup>[2]</sup>。在前期的研究工作中, 我们发现血必净对辐射损伤具有一定的保护作用<sup>[3]</sup>, 但相关机制尚未阐明。本文拟通过计算机模拟技术, 利用血必净化学成分分子与相关靶点的分子对接来探讨其辐射防护作用的可能机制。

根据最新的研究报道, 抗凝血机制对辐射防护作用的产生具有重要作用<sup>[4]</sup>, 而血必净的主要功效即是活血化瘀。因此本试验将通过血必净化学成分分子对凝血酶(thrombin)、纤溶酶原激活物抑制物 1(plasminogen activator inhibitor type 1, PAI-1)、血栓素 A2 受体(thromboxane A2 receptor, TXA2R)和凝血因子 IXa 等 4 个重要凝血靶点的分子对接研究, 分析血必净辐射防护作用的可能机制。

## 1 研究方法

结合中国科学院上海有机化学研究所的化学专

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2013.05.001

基金项目: 国家自然科学基金(81202153, 81072237, 81102873); 教育部博士点新教师基金(20121106120042); 中国医学科学院放射医学研究所学科发展基金(SF1227, SZ1337); 天津市自然科学基金(12JCQNJC09100)

作者单位: 300192 天津, 中国医学科学院放射医学研究所, 天津市分子核医学重点实验室

通信作者: 刘培勋(Email: liupeixun@irm-cams.ac.cn)

业数据库其子库中药与有效成分数据库和 Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases 两个数据库,检索血必净组方的五味中药红花、赤芍、川芎、丹参、当归的化学成分,通过文献调研对数据进行补缺,并附加每个化学成分的现有生物活性资料,建立血必净的化学成分数据库。该数据库依五味组方药材分5个子库存储,并可相互贯通整合为一个总数据库。数据库分别以 Excel、SDF、ISIS/Base 的 DB 格式呈现。

血必净化学成分分子库按前所述构建形成后,将凝血酶、PAI-1、TXA2R、凝血因子 IXa 等4个凝血靶点的三维晶体结构导入药物设计与分子模拟计算平台 Schrodinger 软件,同时一并导入血必净复方化学成分分子,然后进行相关处理,应用 Glide 模块进行分子对接。在做分子对接之前,对蛋白进行处理以及结构优化,主要包括:删除非活性区水分子、处理重金属原子、去除二硫键、加氢、调整键序,然后选用 OPLS\_2005 力场进行结构优化及能量最小化处理至均方根偏差为 3 nm 以减少蛋白空间结构的冲突;应用 receptor grid generation 面板生成活性口袋,具体参数设置为:以配体为中心生成格点,蛋白和配体间的库伦和范德华力的范围分别设定为 1.0 和 0.8;每个配体对接 10 次。对接过程中,首先采用标准精度剔除结合效应较差的化合物分子,最后再采用高精度对剩余化合物分子进行精确对接。记录评价得分 G-score、结合能、氢键指标数据,按照得分高低进行排序,分析血必净化学成分分子与上述凝血靶点的相互结合效应,将与相应靶点的对接打分高于默认设定阈值的分子认为是与该靶点有作用的分子,计入该靶点的作用分子数中。

2 结果

从表 1 的数据可以看出,血必净的化学成分分子与凝血相关的4个靶点均有结合,其中对凝血酶的抑制作用最为明显,作用分子数高达 228 个。最新的研究报道表明,血栓调节蛋白-活化蛋白 C 通路对抗辐射作用的形成具有十分重要的意义,而这条通路中最关键的蛋白就是凝血酶<sup>[2]</sup>,本试验结果与文献的报道相符。表 2 列出了血必净组方中分别与4个凝血靶点结合最好的前10个化学成分分子。

表 1 血必净化学成分分别与 4 个凝血靶点作用的分子数(个)

	凝血酶	PAI-1	TXA2R	凝血因子 IXa
作用分子数	228	106	49	18

注:表中,PAI-1 为纤溶酶原激活物抑制物 1;TXA2R 为血栓素 A2 受体。

表 2 血必净组方中分别与 4 个凝血靶点结合最好的前 10 个化学成分分子及其对接打分

靶点	化合物名称	对接打分
凝血酶	safflomin A	-9.55947
	benzoylpaconiflorin	-8.98629
	salvianic acid B	-8.89587
	carchamin	-8.17504
	eugen II n	-8.13382
	salvianolic acid B	-7.97676
	salvianolic acid A	-7.92382
	salvianolic acid E	-7.78798
	dimethyl lithospermate	-7.65638
	paeonoside	-7.64049
PAI-1	salvianic acid B	-7.24315
	salvianolic acid E	-6.7435
	carchamin	-6.63881
	tryptophane	-6.54324
	lithospermic acid B	-6.32423
	d-catechin	-6.29305
	safflomin A	-6.14559
	salvianolic acid B	-6.00132
	pedunculagin	-5.98935
	gallic acid	-5.94195
TXA2R	ellagic acid	-6.55247
	4-ethylresorcinol	-6.33959
	mudanpioside	-6.27409
	brefeldin A	-6.05755
	danshexinkum C	-6.00599
	tryptophane	-6.00462
	6'-O-galloyl desbenzoylpaconiflorin	-5.9425
	safflomin A	-5.92165
	3-alpha-hydroxytanshinone II A	-5.87777
	formyltanshinone	-5.86372
凝血因子 IXa	salvianolic acid E	-9.11387
	salvianolic acid C	-8.0678
	dimethyl lithospermate	-8.03158
	salvianolic acid D	-7.98577
	safflomin A	-7.91449
	lithospermic acid B	-7.88946
	2,4-dihydroxyacetophenone	-7.82539
	salvianolic acid A	-7.71201
	salvianolic acid B	-7.65496
	salvianic acid C	-7.63959

注:表中,PAI-1 为纤溶酶原激活物抑制物 1;TXA2R 为血栓素 A2 受体。

### 3 讨论

#### 3.1 分子对接

分子对接就是从已知两个分子的单体结构出发,找到它们之间的“最佳”结合模式。分子对接的基本理论思想最早起源于100年前E. Fisher的“锁和钥匙模型”。E. Fisher认为,“锁和钥匙”互补识别的首要条件是它们在空间形状上的互相匹配。当然分子对接比“锁和钥匙”模型复杂得多。受体和配体分子的构象是变化的。1958年Koshland<sup>[9]</sup>提出的分子识别过程中的诱导匹配概念,指出受体分子和配体分子在结合过程中,受体(或配体)分子将采取能与配体(或受体)分子最佳结合的构象,互相适应对方,从而达到更完美的匹配。分子对接不仅要满足空间形状的匹配,还要满足能量的匹配。受体和配体能否结合以及结合的强度最终是由形成复合物过程中的结合自由能的变化值决定的。一般而言,分子结合时需要满足以下互补匹配规则:①几何形状互补匹配,即复合物具有较大的接触面积;②静电相互作用互补匹配,正负电荷相对应;③复合物界面包含尽可能多的氢键、盐桥;④疏水相互作用互补匹配。受体与配体复合物的结构能提供受体-配体相互作用信息,比单纯受体结构更有利于受体和配体功能的研究。但复合物结构的获得受许多实验因素的制约,而分子对接方法模拟配体与受体相互作用形成复合物的情况,既能给出可视的直观图形结构,也能给出有价值的数值结果,如复合物的结构参量、能量和两分子之间相互作用能等。分子对接结果为研究受体与配体的相互作用、生物大分子的修饰和基于结构的药物设计提供了结构基础。

分子对接方法按照对接过程中对受体和配体的处理不同可以分为3类<sup>[6-11]</sup>:①刚性受体与刚性配体对接;②刚性受体与柔性配体对接;③柔性受体与柔性配体对接。早期的对接研究中将受体和配体均作为刚性处理,但这与受体-配体的相互作用的实际情况有偏差。受体结构的微小变化对配体有重要影响,在对接过程中有必要松弛受体的活性部位,固定受体可能导致错误的结论,但在多数情况下用第2类对接程序和动力学模拟相结合能得到理想的结果。将配体和受体都看成柔性的进行分子对接来搜索受体-配体复合物结构是最理

想的,但是全柔性的计算将耗费大量计算机时。分子对接方法除能获得受体-配体复合物结构外,还能对受体与配体的相互作用能进行计算,初步评价受体与配体之间的结合能。

#### 3.2 关于凝血靶点

##### 3.2.1 凝血酶

凝血酶是一类重要的丝氨酸蛋白酶,是凝血级联反应中的关键酶<sup>[12]</sup>,具有将可溶性的纤维蛋白原转变为不溶性的纤维蛋白,并激活相关凝血因子如V、Ⅷ、Ⅺ和Ⅻ等的作用,具体过程为:将纤维蛋白原裂解为纤维蛋白;联接纤维蛋白形成凝血块;刺激血小板的凝聚;通过瀑布效应的自动扩增来产生另外的活性凝血酶。凝血酶是开发抗凝血药物及脓毒症的重要靶点。人源凝血酶是由2个 $\beta$ 卷筒结构、1个催化三联体中心(Ser195、His57、Asp102)和1个位于两结构域之间的与底物结合的沟槽组成的;凝血酶的活性口袋分为3部分:特异性口袋、近端疏水性口袋和末端口袋,主要由一些疏水性残基构成。凝血酶抑制剂作用的发挥主要是通过阻断凝血酶催化纤溶酶原以及血小板凝聚的功能得以实现的;除了直接抑制凝血酶的活性之外,另外一个途径是开发凝血酶受体阻断剂。凝血酶可以通过与细胞表面的凝血酶受体结合来激活血小板、血管平滑肌细胞等。由于凝血酶受体阻断剂不影响纤维蛋白原-纤维蛋白途径,因此在完成特定的生物学作用时引起出血的可能性很小。目前已经开发的凝血酶受体阻断剂主要包括3类:多肽类阻断剂、多肽模拟物阻断剂和非肽类受体阻断剂。

##### 3.2.2 PAI-1

现代医学和生物研究成果表明:血液中血纤维蛋白的凝结和溶解作用之间的平衡在凝血系统中起着关键性作用<sup>[13]</sup>。其中血纤维蛋白溶酶是血液中凝块消除、恢复血流的主要因素,而血栓的形成和消除关键在于组织型纤溶酶原激活剂和PAI-1间的平衡。如何调节这两者间的相对平衡,是开发新型溶血栓药物必须要面对的问题。临床和实验数据显示,血浆中PAI-1是一个非常危险的因子,它的活性升高会降低血纤维蛋白降解作用,从而引发一系列的心血管疾病,如心肌梗死、冠状动脉血栓形成等<sup>[14]</sup>。故基于此靶点开发的药物与其他抗凝血和抗血小板凝聚类药不同,它的优点是会增加出血的危险;此外,由于血纤维蛋白溶酶系统参与细胞侵袭和癌症扩散过程,抑

制 PAI-1 活性将有益于防止细胞侵袭和癌症扩散。综上所述, PAI-1 是一个非常重要的靶点。

### 3.2.3 TXA2R

血栓素 A2 是血栓素合成酶催化前列腺素内过氧化物酶同分异构化的产物, 血栓素 A2 与 TXA2R 结合后, 具有强烈的血小板聚集、血管及支气管平滑肌收缩功能, 在脑梗死、心绞痛、外周血管疾病等疾病的病理生理过程中均起了比较重要的作用。血栓素 A2 及其前体前列腺素 H2 在血小板中表现出相似的药理学特性, 故认为二者共用相同的受体, 故 TXA2R 又称为血栓素 A2/前列腺素 H2 受体。人源 TXA2R 为 G 蛋白偶联受体<sup>[14]</sup>, 其中氨基端在胞外区, 羧基端在胞内, 共有 7 个跨膜区、3 个细胞外袢和 3 个细胞内袢。由单基因所编码, 其羧基端二者择一地连接成两个变异体, 二者的差异仅在于该受体第 328 位精氨酸以后至羧基端尾的一级氨基酸序列不同。

### 3.2.4 凝血因子 IXa

损伤释放的组织因子与血液中的凝血因子 VII 结合形成复合物, 直接激活因子 X 转变成因子 Xa; 或间接激活因子 IX 形成因子 IXa, 再激活因子 X 形成因子 Xa。因子 Xa 与因子 V 一起, 在血小板表面  $Ca^{2+}$  的参与下激活凝血酶原(因子 II)变成凝血酶, 凝血酶将血栓形成的原料纤维蛋白原(因子 I)转变为纤维蛋白。理论上, 抑制 IXa 因子效应与 Xa 因子相似, 如阻断凝血反应放大的早期阶段、对动脉与静脉血栓均有效等。由于大多数 Xa 因子是由包含了 IXa 因子在内的内源性 tenase 复合物产生的, 因此, 靶向 IXa 因子也有可能成为抗凝药物研发的一条有效途径<sup>[15]</sup>。

由上可知, 我们选择的 4 个蛋白是凝血机制中非常重要的药物靶点, 对研究血必净辐射防护作用的形成在凝血机制方面的表现十分必要。

## 3.3 血必净与凝血靶点

Geiger 等<sup>[4]</sup>在研究中发现, 血栓调节蛋白-活化蛋白 C 的抗凝信号通路对防护辐射损伤具有十分重要的意义, 血栓调节蛋白与活化蛋白 C 的分别给药都能对小鼠产生显著的辐射防护效应。在这条信号通路中, 血栓调节蛋白通过与凝血酶结合, 降低凝血酶的凝血活性, 加强其激活蛋白 C 的活性, 从而产生抗凝作用, 由此可以看出, 凝血酶是这条通路中的关键分子。如前所述, 凝血酶是凝血

级联反应中的关键酶, 具有将可溶性的纤维蛋白原转变为不溶性的纤维蛋白, 并激活相关凝血因子如 V、VIII、XI 和 XII 等的作用, 在凝血机制中扮演着十分重要的角色。我们通过对血必净化学成分与凝血靶点的分子对接, 发现血必净对凝血酶、PAI-1、TXA2R、凝血因子 IXa 等凝血靶点均具有一定的拮抗作用, 其中对凝血酶的作用最为显著, 这表明血必净辐射防护作用的产生可能与凝血靶点的拮抗相关, 而凝血酶的拮抗很可能是其关键。

## 参 考 文 献

- [1] 戴昌世, 王秉伋. 抗辐射药物研究. 北京: 军事医学科学院出版社, 2003: 111-113.
- [2] 马世堂, 刘培勋, 龙伟, 等. 血必净抗炎作用药效物质基础和靶点作用效应. 物理化学学报, 2009, 25(10): 2080-2086.
- [3] 常建辉. P38 抑制剂 SB203580 及血必净注射液对小鼠肠道辐射损伤的保护作用研究. 北京: 北京协和医学院, 2011.
- [4] Geiger H, Pawar SA, Kerschen EJ, et al. Pharmacological targeting of the thrombomodulin-activated protein C pathway mitigates radiation toxicity. Nat Med, 2012, 18(7): 1123-1129.
- [5] Koshland DE. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. Proc Natl Acad Sci USA, 1958, 44(2): 98-104.
- [6] Blundell TL, Sibanda BL, Sternberg MJ, et al. Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules. Nature, 1987, 326(6111): 347-352.
- [7] Jiang F, Kim SH. "Soft docking": matching of molecular surface cubes. J Mol Biol, 1991, 219(1): 79-102.
- [8] Goodsell DS, Olson AJ. Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing. Proteins, 1990, 8(3): 195-202.
- [9] Kuntz ID. Structure-based strategies for drug design and discovery. Science, 1992, 257(5073): 1078-1082.
- [10] Duan Y, Kollman PA. Pathways to a protein folding intermediate observed in a 1-microsecond simulation in aqueous solution. Science, 1998, 282(5389): 740-744.
- [11] Zhong Q, Jiang Q, Moore PB, et al. Molecular dynamics simulation of a synthetic ion channel. Biophys J, 1998, 74(1): 3-10.
- [12] Di Cera E. Thrombin. Mol Aspects Med, 2008, 29(4): 203-254.
- [13] Gorlatova NV, Cale JM, Elokda H, et al. Mechanism of inactivation of plasminogen activator inhibitor-1 by a small molecule inhibitor. J Biol Chem, 2007, 282(12): 9288-9296.
- [14] Radomski M. The biological role of thromboxane A2 in the process of hemostasis and thrombosis; pharmacology and perspectives of therapeutic use of thromboxane synthetase inhibitors and receptor PGH2/TXA2 antagonists. Acta Physiol Pol, 1985, 36(3): 153-164.
- [15] Vijaykumar D, Sprengeler PA, Shaghafi M, et al. Discovery of novel hydroxy pyrazole based factor IXa inhibitor. Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16(10): 2796-2799.

(收稿日期: 2012-09-24)