

大黄廑虫丸中基于血小板P2Y₁及P2Y₁₂受体作用的抗血小板聚集活性成分筛选*

陈莉, 周坚**, 季文君, 潘尔卓, 顾晓红

(苏州市药品检验检测研究中心 苏州 215104)

摘要:目的 结合分子对接和血小板聚集实验对大黄廑虫丸中基于血小板P2Y₁及P2Y₁₂受体作用的抗血小板聚集活性成分进行初步筛选。方法 以P2Y₁及P2Y₁₂受体作为靶受体,分别与大黄廑虫丸中9种主要成分(大黄酚、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素、黄芩苷、苦杏仁苷、芍药苷和甘草酸)进行分子对接,计算结合能并分析分子间作用力,与P2Y₁及P2Y₁₂受体自带活性配体进行比较。随后以腺苷-5'-二磷酸钠(ADP)为诱导剂,观察大黄廑虫丸中9种主要成分在同一浓度下对血小板聚集的作用,以此初步验证分子对接的结果。结果 分子对接结果显示,甘草酸、黄芩苷和大黄酸与P2Y₁受体结合能较低,结合位置与自带配体较相似;大黄酸、大黄酚、大黄素、大黄素甲醚和芦荟大黄素与P2Y₁₂受体结合能相对较低,结合位置与自带配体相对较相似。ADP诱导的血小板聚集实验中,2 nmol·L⁻¹的大黄酸和芦荟大黄素与空白组相比具有显著的抑制作用,聚集率分别为41.3%和73.1%,抑制率为51.2%和13.5%。结论 结合分子对接和血小板聚集实验结果,推测大黄酸和芦荟大黄素可能是大黄廑虫丸中基于P2Y₁及P2Y₁₂受体通路的抑制血小板聚集的主要活性成分。

关键词: 大黄廑虫丸 P2Y₁ P2Y₁₂ 血小板聚集

doi: 10.11842/wst.20210906009 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

血小板聚集是血栓形成过程中的重要步骤,一方面血小板的聚集会释放大量的促凝物质,如血栓烷A₂、血管内皮细胞表达组织因子等,级联放大凝血过程,引起血流的改变,产生血流淤滞,损伤血管内皮,形成早期血栓;另一方面血小板聚集还会刺激单核细胞、血管内皮细胞表达组织因子等,启动其他凝血反应,促进血栓的进一步形成^[1-2]。

P2Y₁和P2Y₁₂是血小板膜上的G蛋白偶联受体,当人体的凝血系统受到内外源因素刺激被激活后,就会释放ADP,ADP随后与P2Y₁受体结合,引发钙离子水平升高,促进血小板凝聚,继而ADP又与P2Y₁₂受体结合,使其阻止腺苷酸环化酶的作用,降低细胞内环磷腺苷的水平,加速血小板继续聚集。因此,P2Y₁

和P2Y₁₂已成为抗血小板聚集作用药物开发和筛选的重要靶点^[3-4]。

大黄廑虫丸是根据汉代著名医学家张仲景所著的《金匮要略》中的名方所制的,由大黄、廑虫、水蛭、虻虫、蛭螭、桃仁、干漆、黄芩、杏仁、生地黄、芍药、甘草12味药物组成,具有“活血化瘀,清热润燥,滋阴养血”之功效,现在主要用于活血破瘀,通经消癥^[5]。现已有大量的临床应用结果显示,大黄廑虫丸在治疗急性期脑梗死、抑制动脉血栓形成和抗动脉粥样硬化等疾病中显示出较好的抗凝血、抑制血小板活化相关因子的表达、改善血小板功能和血液流变等的疗效^[6-9]。但是其作为由多味药配伍而成的制剂,成分的丰富性和复杂性在带来该复方制剂功效多样性这一优点的

收稿日期:2021-09-06

修回日期:2021-09-24

* 江苏省市场监督管理局科技计划项目(KJ21125066):胶体金免疫分析技术用于中药中松香酸非法添加检测方法的开发与应用,负责人:周坚。

** 通讯作者:周坚,本科,主任中药师,主要研究方向:药品质量安全研究。

同时,也给出成分与药效活性的关联以及成分发挥药效的机制探索带来了挑战,给大黄廑虫丸这一经典名方的现代化研究及其治疗疾病的中医药理论的丰富和发展带来了难度。

因此本文尝试从抑制血小板聚集这一抗血栓作用的常见途径之一作为切入点,以血小板膜上的P2Y1和P2Y12为具体靶点,对大黄廑虫丸中9种含量较高的特征性成分(大黄酚、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素、黄芩苷、苦杏仁苷、芍药苷和甘草酸)^[10-11]进行分子对接,筛选大黄廑虫丸中基于血小板P2Y1和P2Y12通路的潜在抗血小板聚集的成分,并对这些成分进行抗血小板聚集作用的实验确证,将大黄廑虫丸的活性成分与活血破瘀药效活性进行关联,为大黄廑虫丸这一经典名方在活血破瘀方面的临床应用及其机制探索提供现代科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

新西兰兔(苏州高新区镇湖实验动物科技有限公司),Sorvall ST 16R离心机(赛默飞世尔科技(中国)有限公司),Coatron M4半自动血凝仪(德国TECO(德高)有限公司),柠檬酸三钠(国药集团化学试剂有限公司,批号:20150629),大黄酚、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素、黄芩苷、苦杏仁苷和芍药苷(中国食品药品检定研究院,批号分别为:110796-201922、110756-201913、110757-201607、110758-201817、110795-202011、110715-202122、110820-201808、110736-202044),甘草酸(阿拉丁,批号:1405-86-3),腺苷-5'-二磷酸钠盐(ADP, sigma公司,批号:SLCB5611)。

1.2 软件及参数

使用Scripps研究所Olson实验室开发的AutoDock Tools软件进行蛋白质受体的结构预处理,使用Cambridge Soft公司开发的ChemBio Office 2012软件包中的ChemBio Draw和ChemBio 3D组件进行配体化合物分子结构的准备,采用Scripps研究所Oleg博士开发的AutoDock Vina软件进行分子对接的计算机模拟及计算,使用DeLano Scientific LLC公司的PyMol v0.99软件进行受体和化合物配体三维结构的展示,使用European Bioinformatics Institute开发的Ligplus程序进行分子间中氢键和疏水作用的分析,使用BIOVIA

公司开发的Discovery Studio 3.5分子间进行 π 相互作用的分析。

1.3 P2Y1和P2Y12受体蛋白及小分子配体的准备

选取血小板膜上的P2Y1和P2Y12这两个G蛋白偶联受体作为靶蛋白,在RCSB PDB数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载靶蛋白对应的蛋白晶体结构。对蛋白晶体进行前处理,包括删除溶剂分子、去除金属离子以及非相关的蛋白质构象,定义该蛋白为受体,并设置结合口袋的参数,使受体分子包含在结合口袋中。然后使用AutoDock Tools软件对蛋白质进行加氢和加电荷,最后生成pdbqt文件作为受体文件备用。

进行分子对接筛选的候选小分子配体,本文选择了大黄廑虫丸中9种主要成分(大黄酚、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素、黄芩苷、苦杏仁苷、芍药苷和甘草酸)进行对接。这些小分子配体的准备步骤包括:首先根据名称在传统中药数据库(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Data base and Analysis Platform,TCMSP)^[12]中找到化合物的结构,使用ChemBio draw软件将这些化合物的结构转换为mol2格式,使用ChemBio 3D软件的MM2力场最小化功能对化合物的结构进行能量最优化处理,将这些化合物的二维结构转化为三维结构,随后使用Autodock Tools软件对这些化合物的三维结构进行加氢、计算所带电荷,最后保存为pdbqt文件作为分子对接的配体分子数据库。同时选用P2Y1和P2Y12受体文件中自带的配体MRS 25000和AZJ作为分子对接的对照配体,其准备方法同其他候选的小分子配体。

1.4 对接参数及分子对接

分子对接采用AutoDock Vina软件进行,该软件使用快速梯度优化构象搜索算法和简单的评分函数,根据Lamarckian遗传算法寻找小分子与配体蛋白的最佳结合构象,并计算配体和受体间的结合能,结合能越小,配体和受体间的相互作用越强。具体对接参数设置如下:采用AutoDock Tools软件调整P2Y1和P2Y12受体的结合盒子(Grid Box)的中心以及大小,使受体分子能完全包含在Grid Box中,具体的Grid Box参数如下:P2Y1(4xmw)的中心坐标为x=27.589、y=-6.278、z=-13.036,Grid Box的大小为size x=56、size y=70、size z=100;P2Y12(4ntj)的中心坐标为x=20.376、y=-77.279、z=-32.660,盒子为size x=58、size y=84、size z=

78。同时设置 AutoDock Vina 运行参数: num_modes=20、energy_range=4、exhaustiveness=100,其他均为默认值进行分子对接,计算不同化合物与 P2Y1 和 P2Y12 受体结合的最小结合能。

1.5 血小板聚集试验

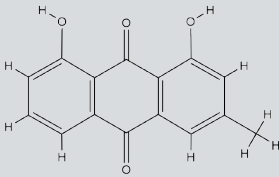
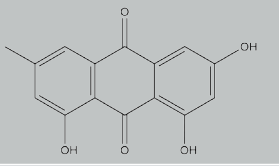
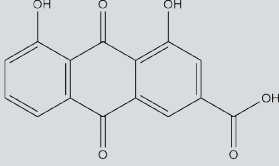
血小板聚集实验参照文献方法进行^[13],健康的新西兰兔,心脏取血,置于含有 3.8% 枸橼酸钠(体积比 1:9)的试管中,混匀后 180 g 离心 10 min,吸取上层的富血小板血浆(PRP)静置备用,将下层血浆继续 1800 g 离心 20 min,再次取上层的血浆,即为贫血小板血浆(PPP)。向 PRP 中加入用 PPP 以调整血小板的数量约为 3.5×10^8 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。PRP 和 PPP 均需要静置保存在 18–25℃ 环境下。测定时先用 PPP 样本进行透光度调零,将所得 180 μL PRP 与 20 μL 空白溶剂或不同的化合物在 37℃ 下孵育 3 min,再将待检测的比色管放入经过调零后的检测通道内,最后加入诱导剂 ADP ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 终浓度)立即进行血小板聚集的检测,记录聚集率,并计算抑制率。小分子配体的终浓度均为 $2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,化合物先用 DMSO 溶解后再用生理盐水稀释至所需浓度。通过 SPSS 16.0 进行统计学分析,使用单因素方差分析比较各组结果是否有差异,统计结果以均值 $\pm$ 标准差的形式表示,以 $P < 0.05$ 判断具有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 对接结果分析

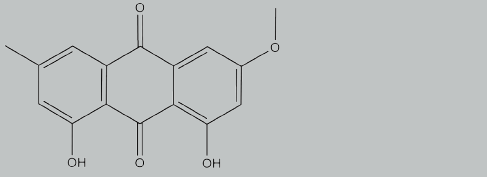
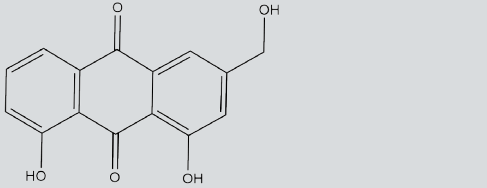
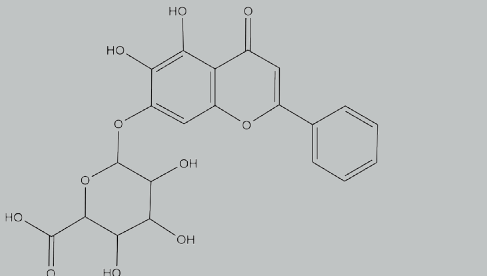
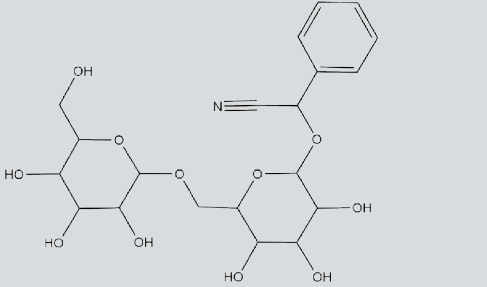
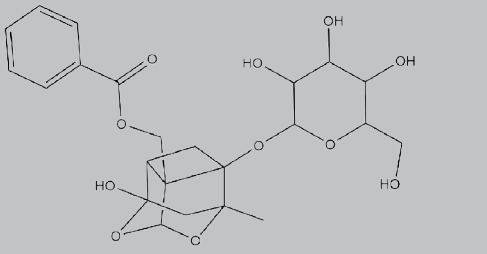
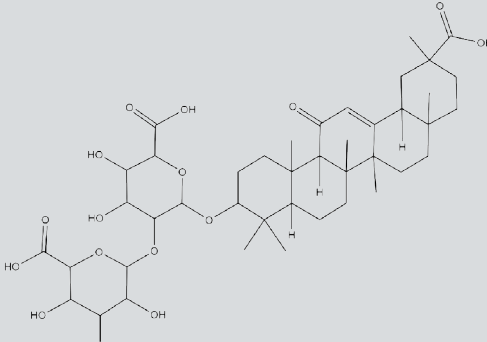
分别分析大黄廑虫丸中大黄酚、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素、黄芩苷、苦杏仁苷、芍药苷和甘草酸这 9 种成分、以及 P2Y1 受体与自带配体 MRS 2500 和 P2Y12 与自带配体 AZJ 的相互作用情况,并计算各成分或自带配体分别与 P2Y1 和 P2Y12 受体的结合能。P2Y1 和 P2Y12 受体与大黄廑虫丸中的 9 种成分及其自带配体的结合能计算结果见表 1。与 P2Y1 进行分子对接的大黄廑虫丸 9 种成分中,结合能较低的化合物为甘草酸、黄芩苷和大黄酸,其结合能分别 $-10.6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、 $-9.7 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $-9.1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,P2Y1 自带配体 MRS 2500 与 P2Y1 受体的结合能为 $-9.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,结果显示,甘草酸和黄芩苷与 P2Y1 受体自带配体的结合能大致相当;与 P2Y12 进行分子对接的大黄廑虫丸 9 种成分中,结合能较低的化合物为大黄酸、大黄酚、大黄素、大黄素甲醚和芦荟大黄素,其结合能除大黄酸为 $-9.7 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 之外,其余化合物均为 $-9.1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,P2Y12 自带配体 AZJ 与 P2Y12 受体的结合能为 $-10.2 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,结果提示大黄酸、大黄酚、大黄素、大黄素甲醚和芦荟大黄素与 P2Y12 受体的结合能力尚可,但并未优于其自带配体。

表 1 小分子配体与 P2Y1 和 P2Y12 受体的结合能

配体	结构示意图	P2Y1 (4xnw, $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)	P2Y12 (4ntj, $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)
大黄酚(Crysophanol)		-8.9	-9.1
大黄素(Emodin)		-8.8	-9.1
大黄酸(Rhein)		-9.1	-9.7

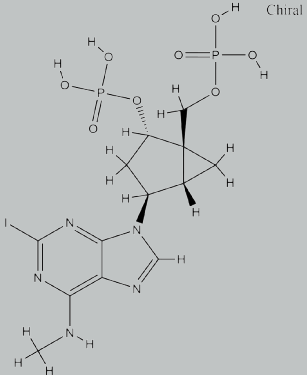
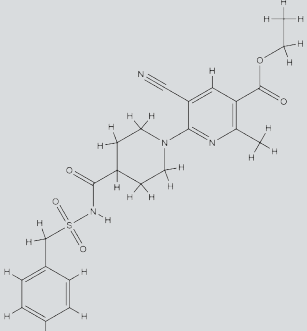
下转续表

续表

配体	结构示意图	P2Y ₁ (4xnw, kcal·mol ⁻¹)	P2Y ₁₂ (4ntj, kcal·mol ⁻¹)
大黄素甲醚(Physcion)		-8.6	-9.1
芦荟大黄素(Aloe emodin)		-8.9	-9.1
黄芩苷(Baicalin)		-9.7	-9.0
苦杏仁苷(Amygdalin)		-9	-8.7
芍药苷(Paeoniflorin)		-9.0	-8.1
甘草酸(Glycyrrhizic acid)		-10.6	-8.3

下转续表

续表

配体	结构示意图	P2Y ₁ (4xnw, kcal·mol ⁻¹)	P2Y ₁₂ (4ntj, kcal·mol ⁻¹)
MRS2500		-9.5	/
AZJ		/	-10.2

化合物与受体靶点间的结合能力,主要受到化合物配体与受体靶点间相互作用的驱动,这种相互作用力主要包括了疏水作用、氢键的相互作用以及空间位阻等影响因素。因此分析各小分子配体与靶蛋白受体的相互作用模式,得到这些配体与各靶蛋白受体的相互作用的情况,包括氢键的作用, $\pi-\pi$ 相互作用和疏水作用,能更加有助于筛选作用效果更好的配体。对各化合物配体与 P2Y₁ 和 P2Y₁₂ 受体结合后,结合能最低的结合模式的分子间作用分析结果见表 2。

最后从表 1 和表 2 中筛选得到 P2Y₁ 和 P2Y₁₂ 配体结合能最低且结合位置与其自带配体较类似的化合物各 1 个(即甘草酸和大黄酸)作为最具潜力的候选化合物,分析其与靶蛋白对接的构象图(见图 1)。构象图显示,甘草酸与 P2Y₁ 受体主要结合在以 Tyr110、Arg195、Arg287、Tyr303 和 Arg310 等形成的结合口袋中(图 1 左),大黄酸与 P2Y₁₂ 受体主要结合在以 Tyr105、Tyr109、Val190、和 Asn191 等形成的结合口袋中(图 1 右)。

2.2 化合物对血小板聚集的抑制作用

为了对上述分子对接的结果进行验证,采用 ADP 诱导的体外血小板聚集试验对大黄蛰虫丸中的 9 种成

分的作用进行了初步的实验验证。如果化合物具有抑制血小板聚集的作用,相对于空白组而言,经不同化合物孵育后的给药组的血小板最大聚集率会下降,以此可以计算不同化合物对血小板聚集的抑制率[抑制率=(空白组聚集率-给药组聚集率)/空白组聚集率 $\times 100\%$],以评价他们对血小板聚集过程的抑制能力。在血小板聚集的实验结果中(图 2),大黄酸(2 nmol·L⁻¹)对 ADP 诱导的血小板聚集具有较好抑制作用,聚集率为 41.3%,抑制率为 51.2%,与空白组相比具有显著性差异。芦荟大黄素在 2 nmol·L⁻¹ 时对 ADP 诱导的血小板聚集也具有一定的抑制作用,与空白组相比有显著性差异,但抑制作用较弱,为 13.5%。而大黄酚、大黄素、大黄素甲醚、黄芩苷、苦杏仁苷、芍药苷和甘草酸在 2 nmol·L⁻¹ 时对 ADP 诱导的体外血小板聚集的作用与空白组相比均无显著性差异,抑制率均小于 10%。

3 讨论

中药复方制剂是在中医理论指导下由两味或以上药物配伍而成的^[14],其成分的丰富性和复杂性在带来功效多样性的同时,也给其药效物质基础的确定与

表2 化合物与 P2Y1 和 P2Y12 受体的分子间作用力

配体	P2Y1 (4xnw)			P2Y12 (4ntj)		
	H 键	π 相互作用	疏水作用	H 键	π 相互作用	疏水作用
大黄酚 (Crysophanol)	Tyr111, Arg128, Cys202, Asp204, Thr205, Arg310,	Arg195, Arg310	Tyr110, Thr115, Arg195, Thr201, Arg287	Asn159, His187, Cys194	Tyr105	Val102, Tyr105, Phe106, Tyr109, Ser156, Val190, Asn191
大黄素 (Emodin)	Tyr111, Arg128, Asp204, Thr205, Thr206, Arg287, Tyr303	Arg195, Arg310	Tyr110, Thr115, Cys202, Tyr203, Arg310	Tyr109, His187, Cys194, Gln195, Arg256	Tyr105, Arg256	Val102, Tyr105, Ser156, Asn159, Val190, Asn191, Phe252
大黄酸 (Rhein)	Asp204, Arg310, Arg128, Cys202, Try111, Tyr303	Arg195, Arg310	Tyr110, Thr115, Tyr203, Arg287,	Tyr105, Tyr109, Val190, Asn191	Tyr105	Tyr105, Tyr109, Val190, Asn191
大黄素甲醚 (Physcion)	Try111, Arg128, Cys202, Asp204, Thr205, Tyr303, Arg310	Arg195, Arg310	Gln50, Tyr110, Thr115, Tyr203, Arg287	Tyr109, His187, Cys194, Gln195	Tyr105, Arg256	Gln98, Ser101, Val102, Try105, Asn159, Val190, Phe252, Arg256
芦荟大黄素 (Aloeemodin)	Tyr111, Arg, 128, Cys202, Asp204, Thr205, Arg310	Arg195, Arg310	Tyr110, Thr115, Arg195, Thr201, Tyr203, Arg287	Val102, Ser156, His187, Cys194	Tyr105	Tyr105, Phe106, Tyr109, Asn159, Val190, Asn191
黄芩苷 (Baicalin)	Lys46, Tyr110, Tyr111, Thr115, Arg128, Arg195, Thr201, Cys202, Asp204, Arg287, Arg301, Tyr303, Gln307,	Arg287	Leu44, Gln291, Tyr203, Asn283,	Tyr109, Asn191, Gln195, Arg256, Lys280	Tyr105	Val102, Tyr105, Ser156, Asn159, Val190, Cys194
苦杏仁苷 (Amygdalin)	Tyr203, Thr201, Lys196, Arg195, Tyr303, Lys46, Arg310, Asp204, Thr205, Tyr306, Asn283	Arg287	Leu44	Tyr109, Gln195, Asn191, Tyr259	Tyr105, Lys280	Tyr105, Cys194, Phe252, Ala255, Arg256, Thr260, Lys280
芍药苷 (Paeoniflorin)	Tye110, Arg128, Arg195, Thr201, Cys202, Asp204, Thr205, Asn283	Arg287	Leu44, Arg287, Gln291, Asn299, Tyr303	Ser83, Cys97, Gln98, Tyr105, Lys280	Lys80, Phe104	Tyr32, Thr76, Lys80, Ser101, Phe104, Leu284, Ser288
甘草酸 (Glycyrrhizic acid)	Leu44, Lys46, Tyr303, Gln307, Arg310, Tyr306, Asp1047, Phe1049, Glu1050,	/	Thr45, Arg195, Lys196, Thr201, Cys202, Tyr203, Arg287,	Ser57, Arg122, Lys125, Pro129, Lys131, Thr132, Cys302, Lys303	/	Phe59, Phe130, Val234, Val238, Leu301, Arg306
MRS2500	Asn283	Arg287	Leu44, Lys46, Tyr110, Tyr111, Thr115, Arg195, Thr201, Arg287, Arg310, Tyr303, Gln307	/		
AZJ	/			Tyr109, Lys280	Try259, Lys280, Tyr105	Try105, Val190, Asn191, Phe252, Arg256, Tyr259, Leu276, Val279, Thr283

作用机制的探索带来了挑战。而中药复方制剂成分-药效活性间的关联研究却是中医药现代化研究的关键领域之一,是中药安全性、有效性和质量控制的基础^[15]。大黄廑虫丸作为《金匱要略》中的经典名方已在临床使用多年,大量临床相关研究都已提示其具有抗凝血等的相关作用^[6-9],但在大黄廑虫丸复杂的组分中,究竟是哪个或哪些组分发挥了抗凝血的相关作用

以及是通过哪些机制发挥的作用,暂未有明确的文献报道。因此本文通过分子对接的虚拟筛选以及血小板聚集的初步试验将大黄廑虫丸中的9种主要成分与抑制ADP诱导的血小板聚集这一功效进行了关联性筛选,得到了大黄酸和芦荟大黄素与P2Y1和P2Y12受体介导的血小板聚集间联系,初步确定了与抑制P2Y1和P2Y12受体介导的血小板聚集这一功效相关

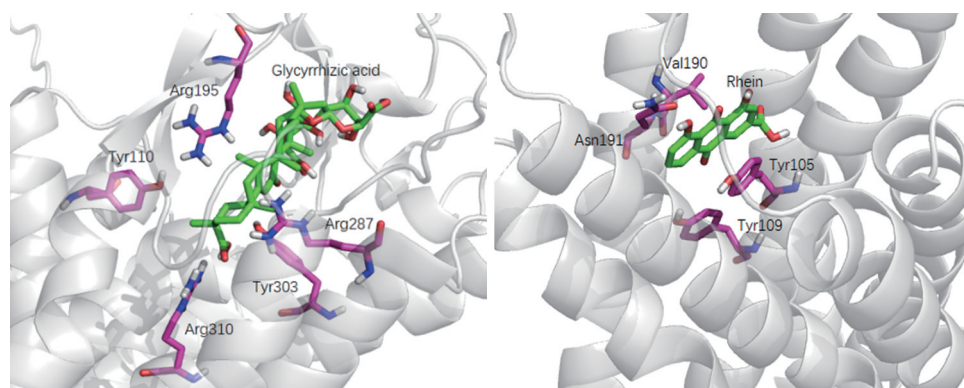


图1 化合物与受体对接的构象图(左:甘草酸与P2Y1受体;右:大黄酸与P2Y12)

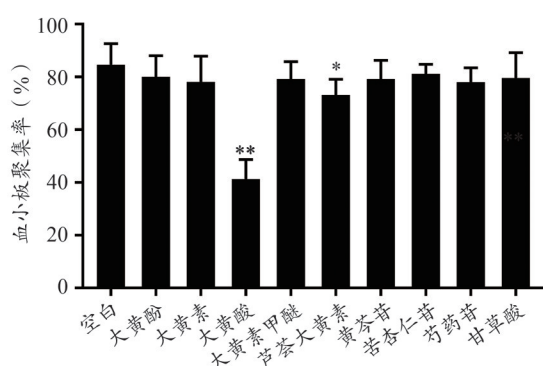


图2 化合物对血小板聚集的抑制作用(Mean ± SD, n=5)

注:与空白组比较,** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs Blank。

的大黄廬虫丸中的相关功效成分,为大黄廬虫丸这一经典名方的功效物质基础研究提供了新的理论和实验依据,有利于进一步明确其“临床疗效-活性成分-作用机制”间的关联,以指导和拓展大黄廬虫丸这一经典名方的临床应用。

本文首先采用分子对接的方法对大黄廬虫丸中具有潜在抗血小板聚集作用的成分进行了筛选。此次分子对接中选用的受体为P2Y受体家族中的P2Y1和P2Y12受体。P2Y1和P2Y12受体是P2Y受体家族中主要分布在血小板细胞膜上是一类受体,与血小板聚集密切相关^[16-17]。在凝血过程中,P2Y1跨膜受体首先被ADP激活,触发细胞内钙动员,引起血小板变形,发生快速可逆的血小板聚集。随后P2Y12受体会继续激活后引发更为强烈持久的血小板聚集。另外P2Y1和P2Y12受体的激活还可增强其他不同机制的血小板活化作用,从而达到凝血和止血的目的。由于P2Y1和P2Y12受体在血小板活化和聚集中发挥的重要作用,因此本文选择了这两个受体进行抗血小板聚集化合物的筛选。而分子对接中选用的分子配体

则是已有文献报道的大黄廬虫丸中大黄酚、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素、黄芩苷、苦杏仁苷、芍药苷和甘草酸这9种含量较高特征性成分^[10-11]。

随后,为了更好的寻找与P2Y1和P2Y12两种受体的自带配体结合方式更为相似的小分子配体,本文对各小分子配体与P2Y1和P2Y12受体的分子间相互作用进行了分析。结果显示,在与P2Y1受体的分子对接的9种成分中,甘草酸、黄芩苷和大黄素的结合位置和分子间作用力与P2Y1受体自带配体MRS 2500较为接近,主要结合在以Tyr110、Arg195、Arg287、Tyr303和Arg310等形成的结合口袋中,说明甘草酸、黄芩苷和大黄酸具有较大的通过抑制P2Y1的活性减少血小板聚集的潜力。

在P2Y12受体与大黄廬虫丸中9种含量较高特征性成分的分子对接结果中,仅大黄酸与P2Y12受体的结合能与自带配体AZJ的结合能较为接近,且结合口袋较为相似,在由Tyr105、Tyr109、Val190、和Asn191等形成的结合口袋中进行结合,其余结合位置与其自带配体AZJ的结合位点存在差距,说明与其他主要成分相比,大黄酸通过抑制P2Y12抑制血小板活性的潜力稍高。

另外,大黄酚、大黄素、大黄素甲醚、芦荟大黄素和大黄酸等主要来源于大黄的单体成分,因结构较为类似,与P2Y1和P2Y12受体结合时,其结合位点以及与受体相互作用的分子间作用力也较为相似,与P2Y1受体主要结合在以Tyr110、Tyr111、Thr115、Arg128、Arg195、Cys202、Asp204、Arg287和Arg310等残基形成的结合口袋中;与P2Y12受体结合主要结合在Tyr105、Tyr109、Asn159和Asn191等残基形成的结合口袋中,因此结合能也较为接近。

在对大黄廬虫丸中大黄酚、大黄素、大黄酸、大黄

素甲醚、芦荟大黄素、黄芩苷、苦杏仁苷、芍药苷和甘草酸这9种含量较高的特征性成分的抗血小板聚集的验证实验中,由于部分化合物水溶性较差,为保证化合物能够全部溶解,实验采用了 $2\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 这一终浓度进行试验。结果显示仅大黄酸对ADP诱导的血小板聚集有较好的抑制作用,抑制率接近50%,这一结果与上述采用分子对接进行的虚拟筛选结果基本一致。而甘草酸和黄芩苷虽在分子对接中与P2Y₁的结合口袋与MRS 2500有一定的相似,但是在血小板聚集中对ADP诱导的血小板聚集却无明显的抑制作用,推测产生此现象可能有以下三种原因,其一可能是甘草酸和黄芩苷对血小板的抑制作用的机制不仅仅为对P2Y₁的作用,还存在其他的作用通路,比如对血小板膜糖蛋白PAC-1(GP II b/III a复合物)相关通路的抑制作用^[18],并且依赖其他通路产生的对血小板活化的抑制作用可能发挥着更主要的作用,因此在本文选用ADP诱导的血小板聚集模型中未能观察到;其二可能是化合物对P2Y₁或P2Y₁₂受体发挥药理作用可能还涉及其他未知机制,在本文的分子对接中未加入这些机制;其三,还可能是本次实验所使用的甘草酸和黄芩苷的浓度未能达到发挥作用的浓度,上述这些因素都有可能造成甘草酸和黄芩苷分子对接模拟结果与血小板聚集得实际实验结果不一致。此外,在甘草酸与P2Y₁₂受体的分子对接中,其结合位置与自带配体

AZJ的结合位置相比差异却较大,且结合能与自带配体相比较,可以推断其与P2Y₁₂受体的作用方式与P2Y₁₂自带配体AZJ的相差较大,也可能是导致甘草酸分子对接模拟结果与血小板聚集的实验结果不一致的可能原因。因此本文还存在一些不足之处,比如在对大黄蟾虫丸中主要成分的抗血小板作用的验证,仅采用了一个诱导剂和一个浓度进行了体外的初步验证,因此为更加细致的阐述这些成分抑制血小板作用的药效及机制,还需要在后续的实验中选择不同验证模型以及不同的浓度进行更为详细的验证及机制探索。

综上所述,本文将分子对接应用到大黄蟾虫丸主要成分的抗血小板聚集的虚拟筛选,选用血小板膜上的P2Y₁和P2Y₁₂受体为抗血小板聚集的靶点,从大黄蟾虫丸已有文献报道的9种单体成分中,筛选得到与P2Y₁受体结合能较低的为甘草酸、黄芩苷和大黄酸,与P2Y₁₂受体结合较好的为大黄酸、大黄酚、大黄素、大黄素甲醚和芦荟大黄素,并且这些化合物与P2Y₁和P2Y₁₂受体自带配体的结合位点相似度较高。后续经血小板聚集实验的验证结果证实,终浓度为 $2\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的大黄酸对ADP诱导的血小板聚集与空白组相比具有显著的抑制作用。同时芦荟大黄素也具有一定的抑制作用。由此推测,大黄酸和芦荟大黄素可能是大黄蟾虫丸中基于P2Y₁及P2Y₁₂受体通路的抑制血小板聚集的主要活性成分。

参考文献

- Yeung J, Li W J, Holinstat M. Platelet signaling and disease: Targeted therapy for thrombosis and other related diseases. *Pharmacological Reviews*, 2018, 70(3): 526-548.
- Hensch N R, Karim Z A, Pineda J, et al. P2Y₁₂ antibody inhibits platelet activity and protects against thrombogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 493(2): 1069-1074.
- Vaduganathan M, Bhatt D L. Simultaneous platelet P2Y₁₂ and P2Y₁ ADP receptor blockade: Are two better than one?. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2016, 36(3): 427-428.
- von Kügelgen I. Pharmacology of P2Y receptors. *Brain Research Bulletin*, 2019, 151: 12-24.
- 李德辉,郭娜,范焕芳,等. 大黄蟾虫丸抗肿瘤作用研究进展. *中国老年学杂志*, 2018, 38(6): 1524-1526.
- 王之利,马奎军,何道胜. 大黄蟾虫丸治疗急性期脑梗死疗效及对血小板CD62P与细胞因子的影响. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30(21): 2336-2339.
- 王东生,陈方平,贺石林,等. 大黄蟾虫丸血浆药理学与血清药理学作用的比较研究. *血栓与止血学*, 2005, 11(1): 5-8.
- 姬媛媛,刘俊田,苟伟,等. 大黄蟾虫丸抗实验性动脉粥样硬化的拆方研究. *中国中药杂志*, 2006, 31(22): 1886-1890.
- 吕小燕,刘强,苏娟萍,等. 大黄丸对免疫性肝纤维化大鼠血流变及微循环的影响. *中华中医药学刊*, 2012, 30(4): 867-869.
- 张桂平,王东旭. HPLC-PDA法同时测定大黄蟾虫丸中6种成分的含量. *中国药房*, 2019, 30(1): 54-58.
- 陈广通,张琳,李玉琴,等. HPLC测定大黄蟾虫丸中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚的含量. *中国现代中药*, 2010, 12(12): 20-22.
- Ru J L, Li P, Wang J N, et al. TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines. *Journal of Cheminformatics*, 2014, 6: 13.
- 陈鹏宇,姚云峰,张莹,等. 中药爵床抗血小板聚集的活性物质及作用机制研究. *中南药学*, 2021, 19(3): 390-396.
- 孙建宁,孙文燕,董世芬. 基于临床用药特点的中药复方新药药效

- 评价思路与方法探讨. 中国中药杂志, 2017, 42(5): 852-855.
- 15 刘建勋, 孙明谦, 任钧国, 等. 中药复方功效物质基础的研究思路与方法. 世界科学技术-中医药现代化, 2018, 20(4): 473-478.
- 16 Gachet C, Hechler B. Platelet purinergic receptors in thrombosis and inflammation. *Hämostaseologie*, 2020, 40(2): 145-152.
- 17 Burnstock G. Purinergic signalling: Therapeutic developments. *Frontiers in Pharmacology*, 2017, 8: 661.
- 18 崔巍, 吕希莹, 王硕仁, 牛福玲, 张壮, 闫颜芳. 黄芩苷与缺血/再灌 ECV304 细胞共培养上清对血小板活化功能的影响. 中医临床杂志, 2005, 17(1): 1-3.

Screening of Anti-platelet Aggregation Active Components Based on Platelet P2Y1 and P2Y12 Receptors in Da Huang Zhe Chong Pill

Chen Li, Zhou Jian, Ji Wenjun, Pan Erzhao, Gu Xiaohong
(Suzhou Institute for Drug Control, Suzhou 215104, China)

Abstract: Objective Screen the anti-platelet aggregation active components based on platelet P2Y1 and P2Y12 receptor in Da Huang Zhe Chong Pill by combining molecular docking and platelet aggregation experiment. Methods P2Y1 and P2Y12 receptors were used as target receptors for molecular docking with 9 main components (Chrysophanol, Emodin, Rhein, Physcion, Aloe emodin, Baicalin, Amygdalin, Paeoniflorin and Glycyrrhizic acid) of Da Huang Zhe Chong Pill, respectively. The binding energy was calculated and the intermolecular interaction was analyzed, and compared with the active ligands of P2Y1 and P2Y12 receptors. Then, ADP was used as inducer to observe the effects of 9 main components in Da Huang Zhe Chong Pill on platelet aggregation at the same concentration, so as to preliminarily verify the results of molecular docking. Results The molecular docking results showed that Glycyrrhizic acid, Baicalin And Rhein had low binding energy with P2Y1 receptor, and the binding position was similar to the self-contained ligand. The binding energy of Rhein, Chrysophanol, Emodin, Physcion and Aloe emodin with P2Y12 receptor was relatively low, and the binding position was relatively similar to the self-contained ligand. In ADP induced platelet aggregation experiment, $2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Glycyrrhizic acid, Rhein and Aloe emodin had significant inhibitory effects compared with the blank group. The aggregation percentage were 41.3%, 45.2% and 73.1%, and the inhibition percentage were 51.2%, 46.6% and 13.5%, respectively. Conclusion Combined with the results of molecular docking and platelet aggregation experiment, it is speculated that Glycyrrhizic acid, Rhein and Aloe emodin may be main the active components of Da Huang Zhe Chong Pill to inhibit platelet aggregation based on P2Y1 and P2Y12 receptor pathway.

Keywords: Da Huang Zhe Chong Pill, P2Y1, P2Y12, Platelet aggregation

(责任编辑: 刘玥辰, 审稿人: 王瑀、张志华)