

麸炒僵蚕汤剂的多肽成分表征及抗 GAT - 1 活性肽的虚拟筛选*

黄雅阳¹, 刘亚雄^{2**}, 萧晓彤¹, 罗卓雅^{2**}, 杨志业²

(1. 广州医科大学药学院, 广州 511436; 2. 广东省药品检验所 国家药品监督管理局药品快速检验技术重点实验室
广东省生物医药科技协同创新中心, 广州 510663)

摘要 **目的:**分析麸炒僵蚕汤剂的多肽组成,并虚拟筛选具有 GAT - 1 结合活性的抗癫痫多肽。**方法:**利用基于微升流速液相色谱 - 质谱联用 (μ LC - MS/MS) 的多肽组学技术,对麸炒僵蚕汤剂的多肽成分进行广泛鉴定,通过生物信息学和计算机模拟虚拟筛选潜在的抗癫痫活性肽,包括生物活性预测、血脑屏障通透性预测、毒性预测和分子对接,最后,利用分子动力学模拟分析多肽和靶蛋白的相互作用。**结果:**从麸炒僵蚕汤剂中共鉴定得到 384 条多肽,从中虚拟筛选出 19 条结合亲和力高于对照药物的潜在抗癫痫活性多肽,其中,多肽 FDHFDFDAF 的结合亲和力最高,其次是 EHYAWGIK,2 条多肽主要通过氢键、疏水和静电相互作用与 GAT - 1 结合,分子动力学模拟研究验证了 FDHFDFDAF 和 EHYAWGIK 与 GAT - 1 的结合稳定性。**结论:**基于多肽组学和计算机虚拟筛选技术有利于快速发现动物药的活性多肽成分,本研究对麸炒僵蚕汤剂抗癫痫活性多肽的研究有着重要参考价值,同时为动物药多肽成分研究提供新思路。

关键词:微升流速液相色谱 - 质谱联用;麸炒僵蚕;GAT - 1;癫痫;活性肽;多肽组学;虚拟筛选

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)08 - 1356 - 09

doi: 10. 16155/j. 0254 - 1793. 2024 - 0169

Characterization of peptide components of bran - fried *Bombyx batryticatus* decoction and virtual screening of anti - GAT - 1 active peptides*

HUANG Ya - yang¹, LIU Ya - xiong^{2**}, XIAO Xiao - tong¹,
LUO Zhuo - ya^{2**}, YANG Zhi - ye²

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China; 2. Guangdong Institute for Drug Control, NMPA Key Laboratory of Rapid Drug Inspection Technology, Guangdong Biomedical Technology Collaborative Innovation Center, Guangzhou 510663, China)

Abstract **Objective:** To analyze the peptide components of bran - fried *Bombyx batryticatus* decoction and virtually screen anti - epileptic peptides with GAT - 1 binding activity. **Methods:** The peptide compounds in bran - fried *Bombyx batryticatus* decoction were extensively identified by micro - flow liquid chromatography - tandem mass spectrometry (μ LC - MS/MS) technology. Potential anti - epileptic peptides were screened through bioinformatics and in silico simulations, including bioactivity prediction, blood - brain barrier permeability prediction, toxicity prediction, and molecular docking. Finally, molecular dynamics simulations were employed to

* 广东省科技厅科技计划项目(2021B1111610005);广东省自然科学基金面上项目(2022A1515011850);广东省中医药局科研项目(20221056)

** 通信作者 刘亚雄 Tel:(020)32447981;E-mail:liuyaxiong@gdidec.org.cn

罗卓雅 Tel:(020)32447981;E-mail:lzyGDIDC@163.com

第一作者 Tel:17722886248;E-mail:huang_ya_yang@163.com

analyze the interactions between peptides and the target protein. **Results:** A total of 384 peptides were identified from bran-fried *Bombyx batryticatus* decoction, and 19 peptides with higher binding affinities to GAT-1 than that of the control drug were screened as potential anti-epileptic peptides. The FDHFDFAF exhibited the highest binding affinity, followed by the EHYAWGIK. Two peptides primarily interacted with GAT-1 through hydrogen bonds, hydrophobic, and electrostatic interactions. Molecular dynamics simulations confirmed the binding stability of FDHFDFAF and EHYAWGIK to GAT-1. **Conclusion:** Peptidomics and in silico virtual screening techniques facilitate the rapid discovery of active peptide components in animal-derived traditional Chinese medicine. This study has significant reference value for researching anti-epileptic peptides in bran-fried *Bombyx batryticatus* decoction, and provides new insights for the study of peptide components in animal-derived traditional Chinese medicine.

Keywords: μ LC-MS/MS; bran-fried *Bombyx batryticatus*; GAT-1; epilepsy; active peptide; peptidomics; virtual screening

僵蚕 *Bombyx batryticatus* *Bombyx mori* Linnaeus 是家蚕 *Bombyx mori* L. 幼虫感染病原白僵菌 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill 诱发白僵病后而致死的干燥虫体,已经作为一种动物类中药被载入 2020 年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)^[1]。僵蚕临床上常炮制后使用,即麸炒僵蚕,麸炒后的僵蚕可以起到矫味和降低毒性的作用,其成方制剂在临床上已广泛用于治疗癫痫等疾病^[2]。然而,尽管麸炒僵蚕有着明显的药效,但对其抗癫痫药效物质和药理作用机制的认识仍然不足^[3],阻碍其临床推广以及现代化发展。

多肽是动物药药效物质基础的重要组成部分^[4],多肽组学技术是分析生物组织或细胞内源性肽的组成和特征的方法^[5],基于质谱的多肽组学技术为动物类中药的多肽成分分析提供了便捷方法。同时,基于计算机模拟的虚拟筛选技术有助于加快生物活性物质的发现进程^[6-7],具有重要的应用价值。

癫痫发作与突触间隙中 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)的失衡有关^[8-9]。GABA 是中枢神经系统中 1 种抑制性神经递质,主要通过 GABA 转运体 1(γ -aminobutyric acid transport-1, GAT-1)从突触间隙循环进入细胞^[10]。当抑制 GAT-1 转运 GABA 时,会使突触间隙中的 GABA 含量增多,从而使 GABA 持续减弱神经冲动,减少癫痫发作,因此,几十年来, GAT-1 一直被认为是治疗癫痫的药物靶点^[11-12]。目前, GAT-1 抑制剂噻加宾(Tiagabine)已被批准用于癫痫的辅助治疗。既往研究表明,僵蚕提取物可通过调控 GABA 信号通路保护癫痫细胞模型^[13]。

本研究首先利用基于微升流速 LC-MS/MS (μ LC-MS/MS)的多肽组学技术,系统地表征麸炒

僵蚕汤剂的多肽成分;随后利用生物信息学方法和分子对接技术,从麸炒僵蚕多肽中筛选能与癫痫治疗密切相关的靶点蛋白 GAT-1 结合的潜在生物活性肽;最后利用分子对接和分子动力学模拟分析了多肽与靶点蛋白的相互作用。本研究为动物类中药生物活性肽的发现提供了 1 种快速有效的方法。

1 仪器与试剂

麸炒僵蚕药材来自华润三九医药股份有限公司,经检测符合《中国药典》标准,乙腈(质谱级)和甲酸(质谱级)购自 Merck 公司,蒸馏水购自屈臣氏公司,3 kDa 超滤离心管购自 Millipore 公司,牛血清白蛋白胰蛋白酶酶切对照品购自 Thermo 公司。

VANQUISH 超高效液相色谱仪和 Q Exactive 四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱仪(Thermo 公司),MS1003S 万分之一分析天平(METTLER TOLEDO 公司),X1R 高速低温离心机(Thermo 公司),KQ-500DE 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),MS 3 digital 涡旋振荡器(IKA 公司)。

多肽生物活性预测软件 PeptideRanker (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>),血脑屏障通透性预测软件 BBPpred (<http://bbppred.xialab.info/#>),多肽毒性预测软件 ToxIBTL (<https://server.wei-group.net/ToxIBTL/Server.html>),分子对接软件 HADDOCK 2.4 (<https://wenmr.science.uu.nl/haddock2.4/>),分子动力学模拟软件 Discovery Studio 2024。

2 方法

2.1 麸炒僵蚕汤剂的准备

按照《医疗机构中药煎药室管理规范》制备麸炒僵蚕汤剂:取麸炒僵蚕药材 1 g,置于圆底烧瓶,加 10

倍量的水浸泡 1 h, 加热使微沸 20 min, 冷却后取上清液, 药渣再加 8 倍量的水, 加热使微沸 15 min, 同样取上清液, 合并 2 次提取液, 定容至 10 mL, 即得麸炒僵蚕汤剂多肽粗提液, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 转移至 3 kDa 的超滤管, 14 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 取下层多肽溶液进行 $\mu\text{LC} - \text{MS}/\text{MS}$ 分析。

2.2 色谱条件

捕集柱为 Waters nanoEase M/Z Symmetry C_{18} (300 $\mu\text{m} \times 50 \text{ mm}$, 5 μm), 分析柱为 Waters ACQUITY UPLC Peptide CSH C_{18} (150 $\text{mm} \times 1.0 \text{ mm}$, 1.7 μm), 流动相为 0.1% 甲酸 - 0.4% 乙酸 - 水 (A) 和 0.1% 甲酸 - 0.4% 乙酸 - 乙腈 (B), 线性梯度洗脱 (0 ~ 1 min, 1% B; 1 ~ 75 min, 1% B \rightarrow 35% B; 75 ~ 80 min, 35% B \rightarrow 50% B; 80 ~ 80.1 min, 50% B \rightarrow 99% B; 80.1 ~ 85 min, 99% B; 85 ~ 85.1 min, 99% B \rightarrow 1% B; 85.1 ~ 100 min, 1% B), 流速 0.05 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 55 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积 20 μL 。用牛血清白蛋白胰蛋白酶酶切对照品 (BSA tryptic digest standard) 对仪器进行性能评估, 保证检测体系的稳定性。

2.3 质谱条件

采用高能电喷雾离子源 (HESI), 喷雾电压 3.80 kV, 毛细管温度 320 $^{\circ}\text{C}$; 管状透镜电压 50.0 V, 辅助气加热温度 157 $^{\circ}\text{C}$, 鞘气流速 31 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 辅助气流速 10 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。扫描类型为全扫描/数据依赖二级质谱扫描 (Full MS/dd - MS²), 正离子模式。Full MS 参数: 分辨率 35 000, 自动增益控制目标离子数 (AGC target) 3.0×10^6 , 最大离子注入时间 (IT) 110 ms, 扫描范围 m/z 200 ~ 2 000。dd - MS² 参数: 分辨率 17 500, AGC target 为 1.0×10^5 , IT 为 100 ms, 循环次数 (loop count) 12, 隔离窗口 (isolation window) 2.0 m/z , 归一化碰撞能量 (NCE) 28%, 强度阈值 (intensity threshold) 为 1.0×10^4 , 选择电荷 1 ~ 7, 开启动态排除 25.0 s。

2.4 数据库检索

序列数据库从 uniprot 中下载 (2023 年 11 月 26 日), 包含僵蚕基源动物家蚕 (*Bombyx batryticatus*) 和白僵菌 (*Beauveria bassiana*); 使用 pFind 软件对数据进行多肽鉴定, 参数设置: 母离子和碎片离子质量偏差分别为 10 ppm 和 0.02, 无酶切, 甲硫氨酸 (M) 氧化为可修饰, 肽水平的错误发现率 (false discovery rate, FDR) < 1%, 蛋白质水平的 FDR < 1%。

2.5 多肽的初步筛选

鉴定从麸炒僵蚕汤剂中得到的多肽, 首先, 利用

PeptideRanker (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>) 工具进行生物活性预测, 选择活性评分高于 0.5 的多肽; 然后, 利用 BBPPred^[14] (<http://bbppred.xialab.info/#>) 工具进行血脑屏障透过性预测, 选择可能性值高于 0.5 的多肽; 最后, 应用 ToxIBTL^[15] (<https://server.wei-group.net/ToxIBTL/Server.html>) 工具进行毒性预测, 选择毒性概率小于 0.5 的多肽。具有生物活性、血脑屏障透过性且无毒的多肽被挑选进行下一步的分子对接。

2.6 分子对接

2.6.1 配体分子准备

使用 Discovery Studio 2024 (DS) 软件, 为每条候选多肽生成 3 种不同的构象, 右手 α 螺旋 (ϕ : -57° ; ψ : -47°)、聚脯氨酸 II (ϕ : -78° ; ψ : 149°) 和扩展构象 (ϕ : -139° ; ψ : -135°), 这 3 种构象代表了 PDB 数据库中大多数的多肽构象^[16]。选择 GAT-1 蛋白抑制剂噻加宾作为阳性对照配体, 从 Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库下载噻加宾的 sdf 结构文件, 导入 DS 软件进行结构优化, 首先应用 “Prepare Ligand” 程序对配体进行预处理, 包括三维结构生成、加氢和配体质子化, 再应用 “Full Minimization” 程序进行 CHARMM 力场最小化优化结构。

2.6.2 受体蛋白准备

从 PDB 数据库下载 GAT-1 晶体复合物结构 (ID: 7Y7Z), 原配体分子为抑制剂噻加宾。导入 DS 软件, 应用 “Clean Protein” 程序对蛋白文件进行规范, 再使用 “Prepare Protein” 程序进行结构优化, 包括加氢、除水、质子化、添加 CHARMM 力场等, 并删除原配体。

2.6.3 HADDOCK 分子对接

使用 HADDOCK 网站进行分子对接分析^[17]。提取蛋白晶体中的配体以构建活性位点, 选择配体周围 5 \AA 范围内的残基, 即以残基 59、60、61、62、63、64、65、66、136、140、236、294、295、296、297、300、302、303、306、395、396、399 和 400 为活性残基, 关闭自动定义被动残基; 多肽所有氨基酸设为被动残基和完全柔性, 多肽的 N 端和 C 端离子化带电。随机排除分区数 (number of partitions for random exclusion) 为 1.142 9, 刚体对接结构数量 (number of structures for rigid body docking) 为 3 000, 半柔性改进的结构数量 (number of structures for semi-flexible refinement)、显式溶剂改进的结构数量 (number of structures for the explicit solvent refinement) 和分析的结构数量 (number of structures to ana-

lyze)均设为 400,其他参数按照“Peptide”模式的默认值。对照药物噻加宾的分子对接采用上述相同的蛋白活性残基,噻加宾设为活性位点和完全柔性,蛋白与配体均关闭自动定义被动残基,其他参数按照“Ligand”模式默认值。选择 HADDOCK 分数最低的结构作为该复合物的最终结合构象。

2.7 分子动力学模拟

将目标多肽与受体蛋白复合物进一步利用 DS 软件进行分子动力学模拟。首先,复合物进行“Prepare protein”预处理并施加 CHARMM 力场;然后,添加显性溶剂水盒子模型,复合物距离水盒子周期性边界 15 Å,并加入 Na⁺ 和 Cl⁻ 至体系 NaCl 浓度为 0.145 mol · L⁻¹;随后,体系能量优化至梯度容差 < 0.1 kcal · (mol · Å)⁻¹,并升温 100 ps 至目标温度 310 K (36.85 °C),平衡 1 ns;最后,进行 40 ns 的 CHARMM 分子动力学模拟,

时间间隔为 2 fs,每 100 ps 保存一次能量和坐标文件。模拟完成后,以第一帧为参照分析轨迹,并计算主链的均方根差 (root mean square deviation, RMSD) 和均方根波动 (root mean square fluctuation, RMSF),以评估复合物的结合稳定性,并与无配体蛋白和噻加宾-受体蛋白复合物的模拟结果进行比较。

3 结果

3.1 麸炒僵蚕多肽的鉴定

采用 μLC-MS/MS 分析,总离子流色谱图 (total ion current, TIC) 如图 1 所示,共鉴定得到 384 条高可信度的多肽序列,其中,112 条多肽鉴定自白僵菌蛋白序列,272 条多肽来自家蚕。麸炒僵蚕汤剂多肽的相对分子质量主要范围为 1 000 ~ 2 000 (占比 81.51%),长度主要为 9 ~ 20 个氨基酸 (占比 83.33%) (图 2)。

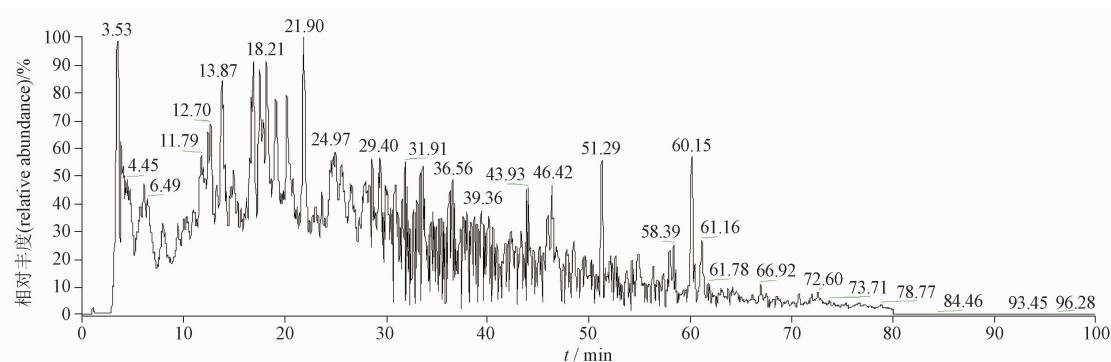


图 1 麸炒僵蚕汤剂多肽样品的总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion current chromatogram of the peptide sample of bran-fried *Bombyx batryticatus* decoction

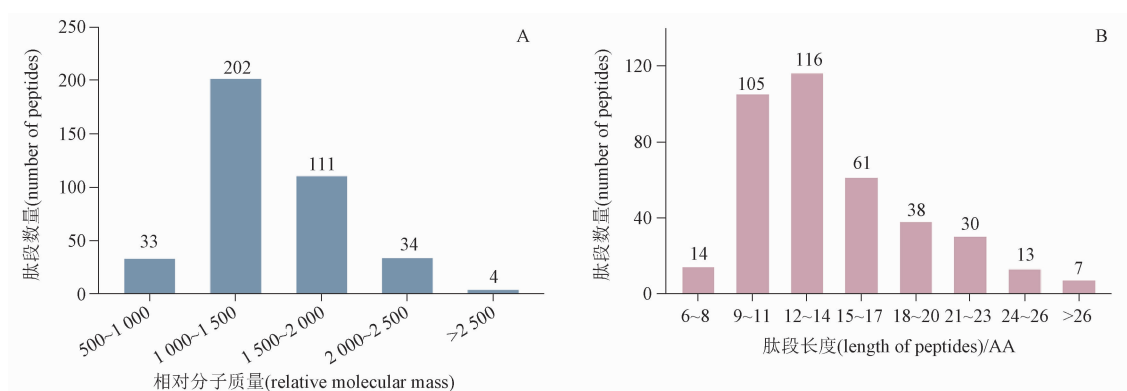


图 2 麸炒僵蚕汤剂的多肽相对分子质量 (A) 和肽段长度 (B) 分布

Fig. 2 Distribution of peptide relative molecular mass (A) and peptide length (B) of the bran-fried *Bombyx batryticatus* decoction

3.2 潜在活性多肽筛选

多肽活性、血脑屏障通透性和毒性预测结果见表 1。在鉴定的 384 条麸炒僵蚕多肽中,共筛选出

105 条活性多肽,其中 20 条具有血脑屏障通透性,进一步筛选出 19 条无毒多肽。将这 19 条多肽与癫痫相关治疗靶点蛋白 GAT-1 进行分子对接分析。

表 1 多肽生物活性、血脑屏障通透性和毒性预测结果

Tab. 1 Results of biological activity, blood – brain barrier permeability and toxicity prediction of peptides

编号 (No.)	肽段序列 (sequence of peptides)	Peptideranker 分数 (Peptideranker score)	BBPpred 分数 (BBPpred score)	ToxIBTL 分数 (ToxIBTL score)
1	FDHFDFDAF	0.928 378	0.776 434	2.11E – 37
2	EHYAWGIK	0.505 231	0.656 983	5.13E – 05
3	TDYPPLGRFAVR	0.595 257	0.520 742	1.66E – 17
4	TGPNLHGLFGR	0.715 478	0.527 883	4.01E – 17
5	DPDWIIQGL	0.874 649	0.555 630	1.07E – 07
6	GYPFDRPIDMA	0.770 226	0.556 179	8.52E – 16
7	KYENDVLFF	0.593 086	0.881 704	3.40E – 08
8	AGAGAGSGAGAGY	0.518 538	0.601 538	7.25E – 35
9	AGAGYGAGAGGY	0.547 863	0.776 981	1.93E – 21
10	VIVSPVRTGML	0.513 123	0.645 221	2.53E – 24
11	AGAGAGAGAGYG	0.574 380	0.592 948	1.30E – 29
12	SSDASVARLF	0.630 919	0.519 144	1.24E – 15
13	DMPEPVGPIAIL	0.532 587	0.543 729	4.96E – 24
14	AGAGAGAGYGAGAGAGYGAGY	0.853 083	0.740 499	4.32E – 30
15	AGAGAGSGAGAGSGAGAGY	0.686 617	0.569 124	3.62E – 24
16	AGSGAGAGSGAGAGSGAGAGSGAGY	0.709 182	0.594 214	5.51E – 28
17	AGAGSGAGAGSGAGAGSGAGY	0.702 189	0.577 591	1.75E – 36
18	AGSGAGAGSGAGAGSGAGY	0.648 656	0.561 638	1.24E – 24
19	AGAGSGAGAGSGAGAGSGAGAGY	0.675 282	0.589 259	5.02E – 18

3.3 分子对接

分子对接结果(表 2)显示,19 条多肽的 HADDOCK 分数均低于对照药物噶加宾,表明它们与 GAT – 1 的结合亲和力都比较高,其中 FDHFDFDAF 的分数最低,为 189.0,其次为 EHYAWGIK。进一步分析这 2 条多肽与 GAT – 1 的相互作用模式,结果(图 3、表 3)表明,噶加宾主要通过氢键和疏水相互作用与 GAT – 1 结合,此外,噶加宾的噶吩环还与残基 CYS 399 的硫原子产生相互作用。多肽由于含有更多的官能团,与 GAT – 1 产生更多的相互作用,主要包括氢键、疏水、静电和范德华力等。活性多肽的高结合亲和力可能归因于它们能与靶蛋白产生更多有利的相互作用,使得结合更加稳定。此外,FDHFDFDAF 与 SER 295、LEU 306 和 CYS 399 产生氢键或疏水相互作用,而 EHYAWGIK 与 LEU 64、GLY 65、SER 295 和 LEU 306 产生氢键或疏水相互作用,这与噶加宾和 GAT – 1 的相互作用一致。

3.4 分子动力学模拟

基于分子对接的结果,挑选 HADDOCK 分数最低的 2 条多肽 FDHFDFDAF 和 EHYAWGIK 进一步进行分子动力学模拟试验,并以无配体蛋白和噶

表 2 多肽与 GAT – 1 蛋白分子对接结果

Tab. 2 Results of molecular docking between peptides and the GAT – 1 protein

编号 (No.)	肽段或对照药物 (peptides or control drug)	HADDOCK 分数 (HADDOCK score)
1	FDHFDFDAF	-189.0 +/- -1.2
2	EHYAWGIK	-164.1 +/- -12.4
3	TDYPPLGRFAVR	-162.4 +/- -5.9
4	TGPNLHGLFGR	-137.9 +/- -4.7
5	DPDWIIQGL	-131.0 +/- -2.6
6	GYPFDRPIDMA	-130.3 +/- -7.4
7	KYENDVLFF	-128.5 +/- -11.9
8	AGAGAGSGAGAGY	-112.7 +/- -3.0
11	AGAGAGAGAGYG	-101.6 +/- -5.3
12	SSDASVARLF	-96.9 +/- -11.9
13	DMPEPVGPIAIL	-91.9 +/- -7.7
14	AGAGAGAGYGAGAGAGYGAGY	-90.8 +/- -9.3
15	AGAGAGSGAGAGSGAGAGY	-88.9 +/- -8.0
16	AGSGAGAGSGAGAGSGAGAGSGAGY	-88.2 +/- -4.2
17	AGAGSGAGAGSGAGAGSGAGY	-86.9 +/- -4.7
18	AGSGAGAGSGAGAGSGAGY	-85.7 +/- -2.5
19	AGAGSGAGAGSGAGAGSGAGAGY	-79.2 +/- -5.4
20	噶加宾(Tiagabine)	-43.7 +/- -0.8

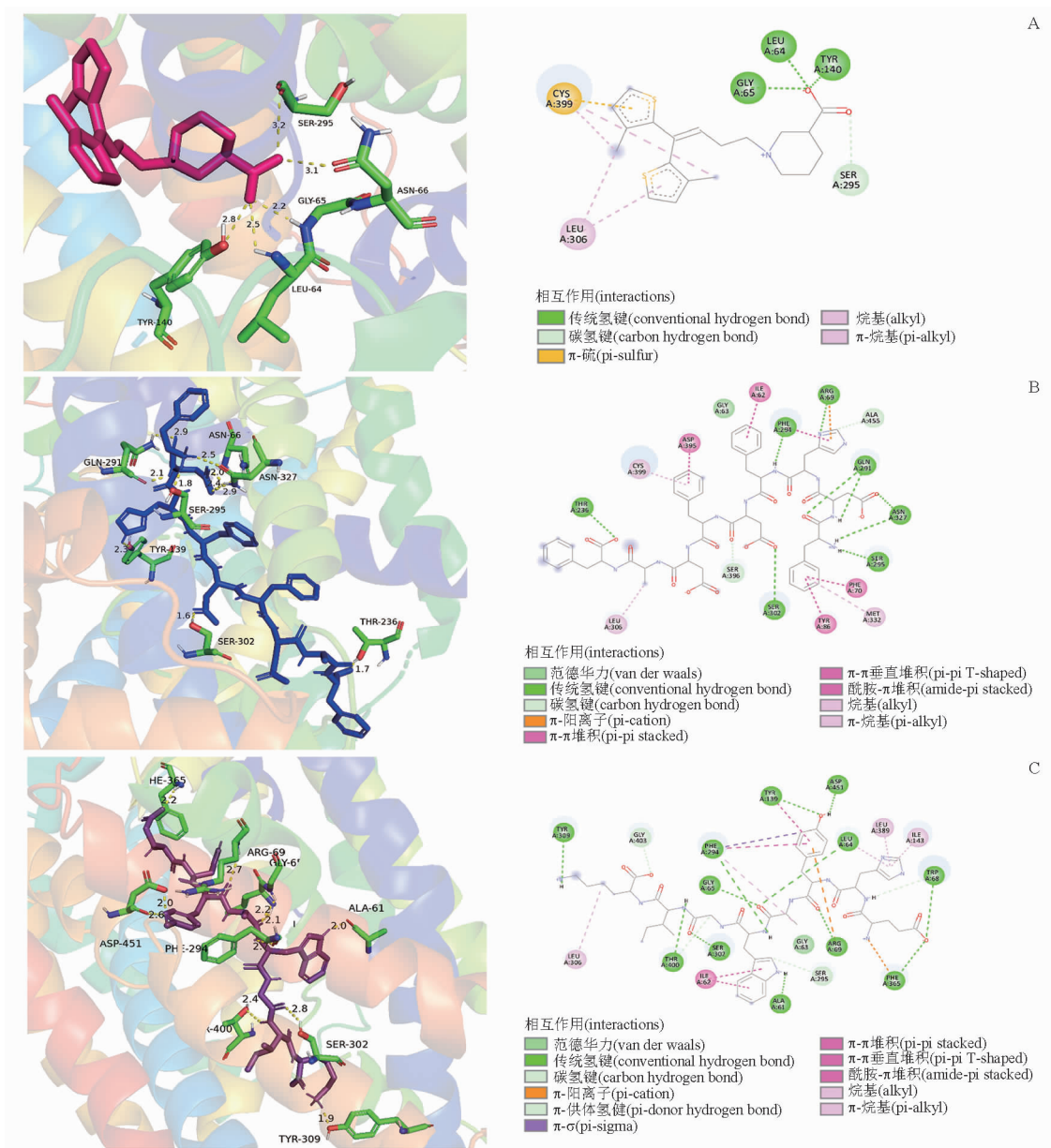


图3 GAT-1与噻加宾(A)、FDHFDFAF(B)和EHYAWGIK(C)的相互作用模式

Fig. 3 Binding patterns of the GAT-1 with Tiagabine(A), FDHFDFAF(B) and EHYAWGIK(C)

表3 复合物相互作用类型及残基位点

Tab. 3 Types and residue sites of interactions for complexes

复合物 (complexes)	氢键相互作用 (hydrogen bond interaction)	疏水相互作用 (hydrophobic interaction)	静电相互作用 (electrostatic interaction)	其他 (others)
GAT-1 + 噻加宾(Tiagabine)	LEU 64, GLY 65, TYR 140, SER 295	LEU 306, CYS 399		CYS 399
GAT-1 + FDHFDFAF	ARG 69, THR 236, GLN 291, PHE 294, SER 295*, SER 302, ASN 327, SER 396, ALA 455	ILE 62, PHE 70, TYR 86, PHE 294, LEU 306*, MET 332, ASP 395, CYS 399*	ARG 69	GLY 63
GAT-1 + EHYAWGIK	ALA 61, LEU64*, GLY 65*, TRP 68, AGR 69, TYR 139, PHE 294, SER 295*, SER 302, TYR 309, PHE 365, THR 400, GLY 403, ASP 451	ILE 62, TYR 139, ILE 143, PHE 294, LEU 306*, LEU 389	ARG 69, PHE 365	GLY 63

注(note): *表示与噻加宾相同的相互作用残基(* represents the same interacting residues as Tiagabine)

加宾-靶蛋白复合物作为对照,通过计算主链的 RMSD 和 RMSF,进行轨迹分析。

RMSD 表示某一时刻相对于参考构象的结构偏差,可以反映模拟体系的稳定情况^[18], RMSD 波动小,说明结构偏差小,体系达到稳定。如图 4-A 所示,在模拟过程中,所有复合物轨迹的 RMSD 在

0~20 ns 或 0~25 ns 上升,随后波动减小,而无配体蛋白则在 0~10 ns 上升,随后趋于稳定。复合物或蛋白轨迹的 RMSD 在前期上升可能是由于体系经过升温后温度尚未达到均衡,导致复合物构象的变化,所有体系最终稳定在 2.0~4.0 Å,表明所有系统都达到了平衡,构象处于稳定状态。

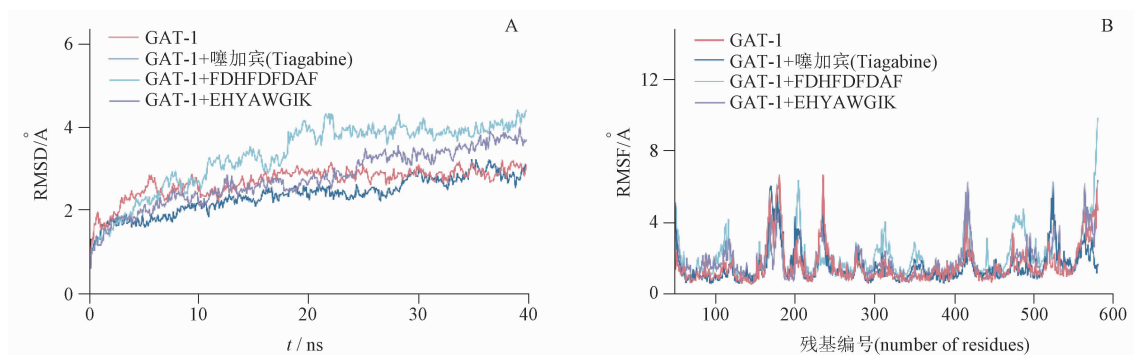


图 4 分子动力学模拟轨迹的 RMSD (A) 和 RMSF (B) 分析

Fig. 4 Analyses of RMSDs (A) and RMSFs (B) of molecular dynamics simulation trajectories

RMSF 指模拟时间内,某一原子相对于参考构象的结构变化^[19],反映了原子的自由度。如图 4-B 所示,所有体系的大多数氨基酸残基 RMSF < 3 Å,表明各体系的蛋白在模拟过程中结构相对稳定,柔性变化在合理范围内^[20]。为研究活

性位点残基在模拟期间的稳定性,选择对照药物噻加宾周围 4 Å 的残基,并计算这些残基在各体系中的 RMSF,结果见表 4。在所有系统中,这些残基的 RMSF 均 < 3 Å,表明活性口袋在肽结合后保持稳定。

表 4 配体周围 4 Å 内的蛋白残基及其 RMSF

Tab. 4 Protein residues within 4 Å around the ligand and their RMSF values

蛋白残基 (protein residue)	RMSF/Å			
	GAT-1	GAT-1 + 噻加宾 (Tiagabine)	GAT-1 + FDHFDFAF	GAT-1 + EHYAWGIK
GLY 59	1.17	1.22	1.45	1.20
TYR 60	1.59	1.60	2.35	1.72
ALA 61	1.22	0.88	1.34	1.05
GLY 63	0.78	0.67	0.82	1.36
LEU 64	0.86	0.78	0.89	2.00
GLY 65	0.94	0.80	0.83	1.50
ASN 66	1.06	1.04	1.04	1.41
TYR 140	0.97	1.14	1.02	1.15
SER 295	0.91	0.68	1.46	1.19
SER 302	1.25	1.55	2.49	1.44
LEU 303	1.25	1.50	2.73	1.51
LEU 306	1.28	1.37	2.54	1.73
ASP 395	1.15	1.06	1.17	1.81
SER 396	0.94	0.96	0.87	1.32
CYS 399	1.16	0.87	1.03	1.48
THR 400	1.07	0.90	0.89	1.27

4 讨论

动物类中药富含具有治疗作用的蛋白质和多肽,如动物毒素^[21-22]、抗菌肽^[23]和抗血栓肽^[24]。蛋白多肽类成分是麸炒僵蚕重要的药效成分,研究发现,富含蛋白多肽类物质的僵蚕提取物具有显著的抗癫痫活性,其通过 PI3K/Akt 信号通路发挥抗氧化和抗凋亡作用^[25-26]。因此,活性肽的研究是动物药药效物质研究中的重要部分。

与植物药丰富的小分子次生代谢产物相比,动物药中的蛋白多肽类大分子化合物分析难度较大^[27],基于质谱的多肽组学技术为多肽成分的鉴定提供更高效的方法,质谱的高灵敏度可在非常低的浓度水平上检测和鉴定多肽。多肽组学技术的发展使动物药中的多肽类成分受到众多学者的关注^[28-31],但是多肽的生物活性还需要进一步的研究。传统活性物质研究包括分离纯化、结构鉴定和活性测定等过程,耗时费力,而基于计算机模拟的虚拟筛选技术被证实提高了活性肽发现的效率。如廖倩等^[32]从美洲大蠊多肽中虚拟筛选出具有促创面修复的活性多肽,并进一步通过细胞实验验证了多肽的活性;华羽彤等^[33]同样采用虚拟筛选结合实验验证,从宽体金线蛭多肽库中鉴定得到抗凝活性多肽 QNTVGLDDFFSSYER。将多肽组学技术应用于动物药物质基础研究,能全面地检测和分析药用动物的多肽组成,与计算机虚拟筛选技术相结合,是探究动物药生物活性肽及其药效作用机制的有效方法。

本研究从麸炒僵蚕汤剂中分离出相对分子质量 < 3 000 的多肽组分,采用基于 μ LC-MS/MS 的多肽组学技术鉴定得到 384 条多肽序列,利用生物信息学方法预测多肽的生物活性、血脑屏障通透性和毒性,初步筛选出 19 条潜在活性多肽,分子对接结果显示 19 条多肽均能与 GAT-1 有效结合,进一步对结合亲和力最高的 2 条多肽 FDHFDFAF 和 EHYAWGIK 进行分子动力学模拟研究,结果显示 2 条多肽均能与靶蛋白稳定结合,为麸炒僵蚕抗癫痫生物活性肽的研究提供了科学依据。

参考文献

[1] 中华人民共和国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020:392
ChP 2020. Vol I [S]. 2020:392

[2] 姜秋, 王玲娜, 刘燕, 等. 僵蚕的炮制历史沿革、化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(12):3269
JIANG Q, WANG LN, LIU Y, et al. Research progress on pro-

cessing historical evolution, chemical constituents, and pharmacological action of *Bombyx batryticatus* [J]. China J Chin Mater Med, 2023, 48(12):3269

- [3] HU M, YU Z, WANG J, et al. Traditional uses, origins, chemistry and pharmacology of *Bombyx batryticatus*: a review [J]. Molecules, 2017, 22(10):1779
- [4] TANG X, GUO J, CHEN L, et al. Application for proteomics analysis technology in studying animal-derived traditional Chinese medicine: a review [J]. J Pharm Biomed, 2020, 191:113609
- [5] HELLINGER R, SIGURDSSON A, WU W, et al. Peptidomics [J]. Nat Rev Methods Primers, 2023, 3(1):25
- [6] TRIPATHI NM, BANDYOPADHYAY A. High throughput virtual screening (HTVS) of peptide library: technological advancement in ligand discovery [J]. Eur J Med Chem, 2022, 243:114766
- [7] 矫建, 贺建华, 鹿麟, 等. 利用高分辨质谱结合生物信息学分析预测注射用心肌肽中的生物活性肽 [J]. 药物分析杂志, 2023, 43(5):764
JIAO J, HE JH, LU L, et al. Prediction of bioactive peptides from cardiomyopeptide for injection using high-resolution mass spectrometry in combination with bioinformatics analyses [J]. Chin J Pharm Anal, 2023, 43(5):764
- [8] JOHNSON EL. Seizures and epilepsy [J]. Med Clin North Am, 2019, 103(2):309
- [9] MOTIWALA Z, ADURI NG, SHAYE H, et al. Structural basis of GABA reuptake inhibition [J]. Nature, 2022, 606(7915):820
- [10] BENARROCH E. What is the role of GABA transporters in seizures? [J]. Neurology, 2021, 97(12):580
- [11] CAI K, WANG J, EISSMAN J, et al. A missense mutation in SLC6A1 associated with lennox-gastaut syndrome impairs GABA transporter 1 protein trafficking and function [J]. Exp Neurol, 2019, 320:112973
- [12] ZHU A, HUANG J, KONG F, et al. Molecular basis for substrate recognition and transport of human GABA transporter GAT1 [J]. Nat Struct Mol Biol, 2023, 30(7):1012
- [13] HE L, HU M, LI R, et al. The effect of protein-rich extract from *Bombyx batryticatus* against glutamate-damaged PC12 cells via regulating γ -aminobutyric acid signaling pathway [J]. Molecules, 2020, 25(3):553
- [14] DAI R, ZHANG W, TANG W, et al. BBPpred: sequence-based prediction of blood-brain barrier peptides with feature representation learning and logistic regression [J]. J Chem Inf Model, 2021, 61(1):525
- [15] WEI L, YE X, SAKURAI T, et al. ToxBTL: prediction of peptide toxicity based on information bottleneck and transfer learning [J]. Bioinformatics, 2022, 38(6):1514
- [16] TRELLET M, MELQUIOND AS, BONVIN AM. A unified conformational selection and induced fit approach to protein-peptide docking [J]. PLoS One, 2013, 8(3):e58769
- [17] VAN ZUNDERTGCP, RODRIGUES PGLM, TRELLET M, et al. The HADDOCK2.2 web server: user-friendly integrative modeling

- of biomolecular complexes[J]. *J Mol Biol*, 2016, 428(4):720
- [18] NAMBIAR MP, ASHWANIKUMAR N, ANOOP A, *et al.* Binding energy analysis and molecular dynamic simulation studies of the designed orally active, non-toxic GABARAP modulators[J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2023, 41(13):6394
- [19] DASH RC, WEN J, ZAINO AM, *et al.* Structure-based virtual screening identifies an 8-hydroxyquinoline as a small molecule GLII inhibitor[J]. *Mol Ther: Oncolytics*, 2021, 20:265
- [20] 杨艺璠, 宋秀庆, 高志明, 等. 基于虚拟筛选和分子动力学模拟发现新型 ULK1 抑制剂[J]. *化学通报*, 2024, 87(1):92
- YANG YF, SONG XQ, GAO ZM, *et al.* Discovery of novel ULK1 inhibitors based on virtual screening and molecular dynamics simulation[J]. *Chemistry*, 2024, 87(1):92
- [21] CHAN YS, CHEUNG RCF, XIA L, *et al.* Snake venom toxins: toxicity and medicinal applications[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(14):6165
- [22] BORDON KDCF, COLOGNA CT, FORNARI-BALDO EC, *et al.* From animal poisons and venoms to medicines: achievements, challenges and perspectives in drug discovery[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:1132
- [23] ALI SM, SIDDIQUI R, ONG S, *et al.* Identification and characterization of antibacterial compound(s) of cockroaches (*Periplaneta americana*)[J]. *Appl Microbiol Biot*, 2017, 101(1):253
- [24] CHEN H, CHENG S, FAN F, *et al.* Identification and molecular mechanism of antithrombotic peptides from oyster proteins released in simulated gastro-intestinal digestion[J]. *Food Funct*, 2019, 10(9):5426
- [25] HU M, LIU Y, HE L, *et al.* Antiepileptic effects of protein-rich extract from *Bombyx batryticatus* on mice and its protective effects against H₂O₂-induced oxidative damage in PC12 cells via regulating PI3K/Akt signaling pathways[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, doi:10.1155/2019/7897584
- [26] HU M, MENG X, WANG P, *et al.* Purification, identification and neuroprotective effects of proteins from *Bombyx batryticatus* in Glu-stimulated PC12 cells[J]. *Separations*, 2022, 9(9):236
- [27] 宋华英, 董萍, 贺梦媛, 等. 生物评价技术在动物类中药质量评价中的应用进展[J]. *药物分析杂志*, 2023, 43(2):186
- SONG HY, DONG P, HE MY, *et al.* Research of bioassay in quality evaluation of animal traditional Chinese medicine[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43(2):186
- [28] LIU Z, TONG X, SU Y, *et al.* In-depth profiles of bioactive large molecules in saliva secretions of leeches determined by combining salivary gland proteome and transcriptome data[J]. *J Proteomics*, 2019, 200:153
- [29] LIU R, HUANG Q, DUAN JA, *et al.* Peptidome characterization of the antipyretic fraction of *Bubali cornu* aqueous extract by nano liquid chromatography with orbitrap mass spectrometry detection[J]. *J Sep Sci*, 2017, 40(2):587
- [30] BAI Y, ZHAO Q, HE M, *et al.* Extensive characterization and differential analysis of endogenous peptides from *Bombyx batryticatus* using mass spectrometric approach[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 163:78
- [31] LIAO J, GAO M, DING Y, *et al.* Characterization of the natural peptidome of four leeches by integrated proteogenomics and pseudotargeted peptidomics[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2023, 415(14):2795
- [32] 廖倩, 庞兰, 石金凤, 等. 基于多肽组学的美洲大蠊肽类组分分析及促创面修复活性多肽筛选[J]. *中草药*, 2022, 53(7):2085
- LIAO Q, PANG L, SHI JF, *et al.* Analysis of peptide components of *Periplaneta americana* based on peptomics and screening of peptides for promoting wound repair[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(7):2085
- [33] 华羽彤, 李尹, 董瑞娟, 等. 基于分子模拟技术筛选宽体金线蛭抗凝活性肽[J]. *中国现代中药*, 2023, 25(9):1940
- HUA YT, LI Y, DONG RJ, *et al.* An anticoagulant peptide screened from *Whitmania pigra* Whitman based on molecular simulation[J]. *Mod Chin Med*, 2023, 25(9):1940

(本文于2024年3月14日收到)