

基于双靶点表面等离子体共振传感器的中药抗新冠病毒活性成分筛选研究

马荟琳[#], 张颖[#], 戚敏钰, 姚一青, 王璇, 王冬尧*, 曹岩*

(海军军医大学药理学系, 上海 200433)

摘要: 新型冠状病毒感染 (coronavirus disease-2019, COVID-19) 给全球公共卫生防控和临床诊疗系统带来了巨大的挑战, 开发有效的抗病毒药物是当前药学研究的一项重要任务。中医药在抗击新冠疫情中发挥了重要作用, 中药中含有的化学成分众多、结构类型多样, 是寻找抗新型冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 活性先导化合物的天然宝库。本研究根据中药多成分、多靶点的作用特征, 针对新冠病毒入侵细胞过程中两种关键蛋白S蛋白受体结合域 (S protein receptor binding domain, SRBD) 和血管紧张素转换酶2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2), 构建了一种新型的双靶点表面等离子体共振 (surface plasmon resonance, SPR) 传感器, 对6种中药的活性成分进行筛选鉴定, 最终从葛根中发现黄豆苷能够与SRBD和ACE2结合。通过SPR亲和力实验测定黄豆苷与ACE2结合的 K_D 为 $5.18 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 竞争性ELISA结合实验表明, 黄豆苷能够抑制SRBD与ACE2的结合, $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄豆苷的抑制率为38.6%; 分子对接实验进一步证实黄豆苷在SRBD-ACE2复合物结合区域附近有最佳结合。本研究表明, 双靶点SPR筛选系统的结果准、效率高, 特别适合复杂药物体系的筛选和中药药效物质的研究, 为探究中药活性成分抗新冠病毒作用机制研究提供药效物质基础, 并为抗新冠病毒药物开发提供先导化合物来源。

关键词: 新冠病毒; 中药; 活性成分; 筛选; 表面等离子共振

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)05-1181-07

Screening of anti-SARS-CoV-2 ligands from Chinese herbs based on a dual-target surface plasmon resonance biosensor

MA Hui-lin[#], ZHANG Ying[#], QI Min-yu, YAO Yi-qing, WANG Xuan, WANG Dong-yao*, CAO Yan*

(Faculty of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: The epidemic of COVID-19 has brought great challenges to the global public health prevention and control system combined with clinical diagnosis and treatment system, and it makes the development of effective antiviral drugs an important task in current pharmaceutical research. Traditional Chinese medicine (TCM) has played an important role in the prevention and control of COVID-19. Due to its numerous chemical components and various structural types, TCM becomes a natural library for searching for lead compounds against SARS-CoV-2. In this study, a novel dual-target surface plasmon resonance (SPR) biosensor was developed for S protein receptor binding domain (SRBD) and angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) which are two key proteins in the process of SARS-CoV-2 invading cells according to characteristics of synergistic effects of multiple components

收稿日期: 2022-10-30; 修回日期: 2023-01-28.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82174092); 上海市自然科学基金资助项目 (21ZR1483000, 22ZR1476900); 上海市浦江人才计划 (21PJD083); 海军军医大学大学生创新实践能力计划 (MS2021041).

[#]共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-21-81871331, E-mail: caoyan@smmu.edu.cn;

Tel: 86-21-81871266, E-mail: wangdy1@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1140

and comprehensive regulation of multiple targets of TCM. The SPR biosensor was applied to screen and identify active components from six TCMs, and daidzin from *Puerariae Lobatae Radix* was identified to bind with SRBD and ACE2. The affinity constant (K_D) of daidzin and ACE2 was $5.18 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ through the SPR affinity assay. Competitive ELISA assay showed that daidzin could inhibit the binding of SRBD and ACE2, and the inhibition rate of daidzin ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was 38.6%. Molecular docking experiments further confirmed that daidzin had the best binding near the binding region of SRBD-ACE2 complex. This study shows that the dual-target SPR screening system is accurate and efficient, and is particularly suitable for screening of complex drug systems and effective substances study of TCM. It provides a material basis for exploring the mechanism of TCM active constituents against SARS-CoV-2, and provides a source of lead compounds for the development of anti-SARS-CoV-2 drugs.

Key words: SARS-CoV-2; traditional Chinese medicine; active ingredient; screening; surface plasmon resonance

新型冠状病毒感染 (coronavirus disease-2019, COVID-19) 给全球公共卫生防控和临床诊疗系统带来了巨大的挑战, 随着我国新型冠状病毒感染防控进入全新阶段, 开发有效的抗病毒药物是当前药学研究的一项重要任务。我国传统中医药以其整体治疗观、独特的临床疗效、较少的毒副作用及其多成分、多靶点的药效特征^[1], 自古以来在抵御瘟疫方面一直发挥着重要作用^[2]。在此次抗击新冠的战役中, 中医药也同样战功卓越, 许多中药都表现出了显著的抗新冠病毒作用^[3,4]。中药中含有的化学成分众多、结构类型多样, 是寻找抗新冠病毒活性先导化合物的天然宝库。

新型冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 进入宿主细胞是病毒传染性和发病机制的重要决定因素^[5]。为了进入宿主细胞, SARS-CoV-2 首先结合到细胞表面受体上进行病毒附着, 随后进入核内体, 最终使病毒与溶酶体膜融合^[6]。SARS-CoV-2 表面的刺突蛋白 (spike glycoprotein, S protein) 是病毒表面的主要抗原成分, 其 S 蛋白受体结合域 (S protein receptor binding domain, SRBD) 可特异性识别宿主的血管紧张素转换酶 2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2) 并结合^[7]。ACE2 是一种负调控因子, 具有维持肾素-血管紧张素系统稳定状态的能力, 对所有器官的生理或病理都至关重要^[8]。ACE2 在 0.6% 肺细胞中表达, 在 1.4% 肺泡 II 型细胞中表达, 可作为 SARS-CoV-2 的结合靶点^[9]。因此, SRBD 和 ACE2 是抗新冠病毒药物的重要靶点^[10], 寻找能够分别或同时作用在 SRBD 和 ACE2 靶点的活性成分, 从而阻断病毒进入宿主细胞的关键环节, 在预防和治疗 COVID-19 中具有广阔的应用前景。

表面等离子体共振 (surface plasmon resonance, SPR) 是一种生物传感分析技术, 其可以用于研究中药活性成分与靶点在分子水平上的相互作用关系^[11]。SPR 技术的实时性、超高灵敏度、高专一性、可以同时

测定动力学常数和解离平衡常数等特点, 使其成为了中药活性成分靶点发现和验证的利器, 在中药活性成分的表征鉴定、分子靶标的筛选、候选药物分子的改造及药物质量控制等方面都发挥着重要的作用。如屠鹏飞课题组^[12]将苏木酮 A 改造成一个活性分子探针, 从神经小胶质细胞中垂钓到其抗炎靶点蛋白为肌苷-5'-单磷酸脱氢酶 2 (IMPDH2), 然后利用 SPR 分析确认了苏木酮 A 与靶点蛋白 IMPDH2 之间的亲和力, K_D 为 $3.944 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。郑蓉课题组^[13]应用 SPR 技术从中药有效成分中筛选新型冠状病毒的主要蛋白酶 3CLpro 的抑制剂, 最终得到表没食子儿茶素没食子酸酯与 3CLpro 之间具有良好的相互作用, K_D 为 $6.17 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

现有的 SPR 中药活性成分筛选和验证方法主要是基于单靶点进行, 虽然可以直接从混合物中寻找与靶点直接作用的活性成分, 筛选效率较高, 但从中药的多成分、多靶点作用角度看, 其筛选过程并不符合中药作用的整体性特征。为此, 本研究构建了一种新型的双靶点 SPR 传感器, 针对中药多成分、多靶点的作用特征, 同时对 SARS-CoV-2 入侵细胞过程中两种关键蛋白 SRBD 和 ACE2 的配体进行筛选, 从分子水平探讨中药的抗病毒活性成分及防治 COVID-19 的作用机制, 为发现抗新冠病毒的化合物提供方法参考。

材料与方法

仪器 Biacore T200 相互作用分析仪 (美国 GE Healthcare 公司); Agilent 1290 超高效液相色谱仪、Agilent 6538 UHD 飞行时间质谱仪 (美国 Agilent 公司); Milli-Q A10 超纯水制备仪 (美国 Millipore 公司); 微量离心机 (美国 Thermo 公司); AG-285 型十万分之一天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); Synergy 4 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司)。

药物及试剂 葛根 (*Puerariae Lobatae Radix*, PLR)、甘草 (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, GRR)、青

连翘 (*Forsythiae Fructus*, FF)、柴胡 (*Bupleuri Radix*, BR)、桔梗 (*Platycodonis Radix*, PR)、金银花 (*Lonicerae Japonicae Flos*, LJF) 购自中国长海医院; 质谱纯甲醇、乙腈、甲酸购自美国 Merck 公司; CM5 芯片、1-乙基-3-(二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺 [3-(ethyliminomethyleneamino)-*N,N*-dimethyl-propan-1-amine, EDC]、*N*-羧基琥珀酰亚胺 (*N*-hydroxy succinimide, NHS)、乙醇胺、醋酸盐缓冲液、NaOH、PBS 缓冲液购自美国 Cytiva 公司; 二甲基亚砜 (DMSO) 购自美国 Sigma 公司; ELISA 通用试剂盒购自博奥龙公司; SRBD 蛋白、ACE2 蛋白、ACE2 抗体购自义翘神州公司; 甘草查尔酮 D (licochalcone D)、异甘草素 (isoliquiritigenin)、黄豆苷 (daidzin) 购自上海同田公司。

中药提取液的制备 将中药原药材分别粉碎后过 40 目筛, 按照 1 g/10 mL (药材/提取液) 的比例, 加入 80% 乙醇溶液, 超声 30 min 后过滤, 取过滤液 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液即为中药提取液, 4 °C 保存备用。

SRBD 和 ACE2 双靶点芯片的构建 将 SRBD 和 ACE2 纯化蛋白粉末分别溶于去离子水中配制成 1 mg·mL⁻¹ 母液, 采用 Biacore T200 分别检测不同缓冲液 pH (4.0~5.5)、蛋白浓度 (10~100 μg·mL⁻¹) 条件下 SRBD 和 ACE2 在 CM5 芯片上的响应值, 确定最佳蛋白偶联条件分别为: SRBD, 20 μg·mL⁻¹, pH 4.0; ACE2, 50 μg·mL⁻¹, pH 4.0。将 CM5 芯片的 1、3 通道作为参比通道, 2、4 通道作为检测通道。先用 EDC/NHS 活化芯片表面羧基, 然后通过羧基氨基缩合反应将 SRBD 蛋白偶联到 2 通道上, ACE2 蛋白偶联到 4 通道上, 最后用乙醇胺封闭未结合的羧基。

双靶点芯片活性和特异性验证 将 ACE2 蛋白母液分别用 PBS 稀释至 2、20 和 200 μg·mL⁻¹ 溶液, 以溶剂作为空白对照。由低浓度到高浓度依次进样, 观察其在 SRBD 通道上响应值以判断芯片上的蛋白是否具有活性; 以 SRBD 蛋白作阴性对照, 按上述方法稀释成相应浓度溶液, 由低浓度到高浓度依次进样, 观察其在 SRBD 通道上响应值以判断芯片上蛋白的特异性。以 SRBD 为阳性对照, 以 ACE2 蛋白为阴性对照, 按照上述相同方法验证 ACE2 通道的活性和特异性。

中药 SPR 筛选 中药 SPR 筛选参考文献^[14]方法, 简要步骤如下: 将 6 种中药提取液分别用 PBS 稀释 500 倍至 0.2 mg·mL⁻¹ (生药浓度), 注入到 Biacore T200 系统进行分析, 对中药提取液进行初筛。选择响应较高的中药进行下步筛选, 将中药提取液分别进样, 采用 Biacore T200“进样和回收程序”回收结合成分, 合并每种中药的回收液。

UPLC-QTOF-MS 分析 回收样品经氮气吹干后, 用 100 μL 乙腈复溶, 12 000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 保留上清液作为回收液。中药提取液经乙腈稀释至 10 mg·mL⁻¹ 作为中药稀释液。使用 Agilent 1290 液相色谱系统对回收液和中药提取液样品进行分析。色谱柱型号为 BEH C18 柱 (2.1 mm×100 mm, 2.5 μm), 柱温为 25 °C, 进样体积为 5 μL。流动相由 0.1% 甲酸 (v/v) (A) 和乙腈 (B) 组成, 使用梯度洗脱程序, 具体梯度如下: 0~2 min: 5% B, 2~17 min: 5%~95% B, 17~19 min: 95% B。流速为 3.5 mL·min⁻¹。使用 Agilent 6538 UHD 飞行时间质谱仪对分离的化合物进行检测。使用全扫描模式。ESI 源的条件如下: 离子检测范围为 100~1 000 *m/z*; 干燥气为 10 L·min⁻¹; 温度为 350 °C; 雾化气压为 35 psig; 毛细管电压为 4 000 V; 碎片器电压为 120 V。使用 Agilent MassHunter B.06.00 软件对色谱数据进行处理与分析。

SPR 亲和力实验 精密称定中药成分对照品, 配制成 100 mmol·L⁻¹ DMSO 溶液, 作母液备用。用含 5% DMSO 的 PBS 溶液将母液按 2 倍梯度稀释。以 30 μL·min⁻¹ 的流速进样至 Biacore T200 系统中。样品与蛋白的结合时间与解离时间均为 120 s。使用 Biacore T200 分析软件对数据进行处理, 计算样品的亲和力。

ELISA 实验 采用方阵滴定法, 将 SRBD 蛋白从 2 μg·mL⁻¹ 开始, 用包被液 2 倍逐级稀释后进行包被; 将 ACE2 蛋白从 1 μg·mL⁻¹ 开始, 用样品稀释液 3 倍逐级稀释, 确定最佳包被浓度及 ACE2 饱和浓度。将黄豆苷对照品稀释为含 ACE2 0.1 μg·mL⁻¹、4% DMSO (v/v) 的不同浓度溶液 (0.2、2 和 20 μmol·L⁻¹)。在 SRBD 包被的 96 孔板中依次加入上述溶液 100 μL, 同时设置 ACE2 对照孔和空白对照孔, 每个浓度设置 5 个复孔, 37 °C 反应 1 h。洗板后每孔加入 100 μL ACE2 抗体 (1 μg·mL⁻¹), 37 °C 反应 1 h。洗板后每孔加入 100 μL 生物素标记二抗, 37 °C 反应 1 h。洗板后每孔加入 100 μL 亲和素-HRP, 37 °C 反应 1 h。加入 TMB 显色液, 15 min 后终止反应。用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值, 计算化合物的抑制率。

分子对接实验 SRBD 和 ACE2 结合复合物晶体结构下载自蛋白质数据库 (Protein Data Bank, PDB), PDB ID 为 7DQA。对接前删去配体与水分子。所有化合物的化学结构都用 Discovery Studio 3.0 (DS 3.0) 软件进行优化, 并保存为 mol2 格式。对接的结合位点定义于 SRBD 与 ACE2 结合区域内, 位点的半径为 10 Å。采用 CDOCKER 模块进行分子对接。保留评分前 100 的构象, 簇半径设置为 0.5 Å, 其他选项均保留

默认设置,根据 CDOCKER 结合能评价最优构象。

结果

1 双靶点芯片活性和特异性

采用最佳蛋白偶联条件将 SRBD 和 ACE2 分别偶联到 CM5 芯片表面的 2、4 通道,制备成双靶点 SPR 生物传感器,最终 SRBD 偶联量为 2 231.5 RU, ACE2 偶联量为 15 166.4 RU,符合传感器测定的要求。针对固定在芯片通道上的蛋白,以其相互作用蛋白作为阳性对照,以其自身作为阴性对照,以 PBS 溶液作为空白对照,对双靶点芯片的活性和特异性进行考察,结果如图 1 所示。针对 2 通道上的 SRBD 蛋白,可以看出其对注入的不同浓度 SRBD 蛋白响应与 PBS 几乎无明显差异(图 1A),而随着注入的 ACE2 蛋白浓度的增加,2 通道上的结合响应有显著提高(图 1B),说明 2 通道上的 SRBD 蛋白能够选择性识别结合成分,并且具有活性。针对 4 通道上的 ACE2 蛋白,可以看出其对注入的不同浓度的 ACE2 蛋白响应与 PBS 几乎无明显差异(图 1C),而对 SRBD 蛋白表现出明显结合,且随 SRBD 浓度增高,响应值增大(图 1D),说明 4 通道上的 ACE2 蛋白具有特异性和活性。综上,固定在芯片上的两种蛋白均具有活性,且能够特异性与其相互作用蛋白结合,表明该双靶点 SPR 传感器能够用于筛选和验证与 SRBD 和 ACE2 结合的活性成分。

2 SPR 中药筛选

从 PubMed 和中国知网查询与 SRBD 和 ACE2 蛋

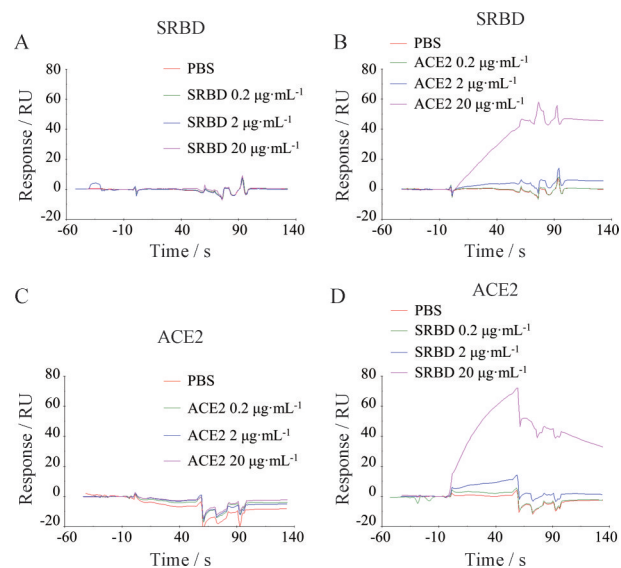


Figure 1 Specificity and activity of dual-target surface plasmon resonance (SPR) sensor. A: Negative controls for S protein receptor binding domain (SRBD); B: Positive controls for SRBD; C: Negative controls for angiotensin converting enzyme 2 (ACE2); D: Positive controls for ACE2

白相关的抗新冠病毒的中草药,共收集了 6 种:柴胡、甘草、葛根、桔梗、金银花、青连翘。分别将 6 种中药提取液用 PBS 稀释 500 倍至 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (生药浓度) 后注入 SRBD 和 ACE2 双靶点 SPR 传感器进行初步筛选,可以观察到 6 种中药在传感器上的响应值具有明显差异。葛根、甘草和柴胡在 SRBD 上响应值较高,金银花和青连翘响应值较低(图 2A);而在 ACE2 上,甘草、柴胡、葛根和青连翘响应值较高,桔梗和金银花响应值较低(图 2B)。综合选择与 SRBD 和 ACE2 两种蛋白响应值相对较高的 4 种中药(甘草、柴胡、葛根、青连翘)用于进一步中药活性化合物筛选。将中药提取液分别注入 SPR 筛选系统与 SRBD 和 ACE2 蛋白孵育,洗涤去除未结合的成分后,回收结合于蛋白上的成分。

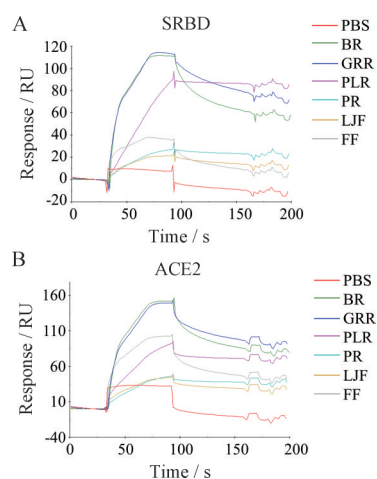


Figure 2 Pre-screening of 6 Chinese herbs using dual-target SPR sensor. A: Response on SRBD; B: Response on ACE2. PLR: Puerariae Lobatae Radix; GRR: Glycyrrhizae Radix et Rhizoma; FF: Forsythiae Fructus; BR: Bupleuri Radix; PR: Platycodonis Radi; LJF: Lonicerae Japonicae Flos

3 UPLC-QTOF-MS 分析

将回收液和中药提取液样品进行 UPLC-QTOF-MS 分析,利用 Agilent Qualitative Analysis B.07.00 定性分析软件分析回收液与提取液中的共有成分,鉴定出回收液中结合成分的分子式为: $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5$ 、 $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$ 和 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$,如表 1 所示。从中药综合数据库 (Traditional Chinese Medicine Integrated Database, TCMID) 和 HERB 数据库 (<http://hreb.ac.cn/>) 中收集中药成分的化学信息,初步确定中药提取液中的活性成分为甘草查尔酮 D ($\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5$)、异甘草素 ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$) 和黄豆苷 ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$),如图 3 所示。进一步采用对照品对鉴定结果进行确证,发现黄豆苷对照品的保留时间为 5.449 min, m/z 值为 418.118 6 ($[\text{M}+\text{H}]^+$),与葛根提取液样品和葛根回收样品中检测到的离子信号一致,因此

确定黄豆苷是回收到的潜在活性成分, 如图4所示。

4 亲和力测定

为验证双靶点 SPR 筛选和 UPLC-QTOF-MS 鉴定的结果, 分别测定黄豆苷与 SRBD、ACE2 的亲和力, 结果如图5所示。黄豆苷与双靶点芯片上2种蛋白均有结合, 与 SRBD 结合的响应值随黄豆苷浓度升高而升高, 但没有明显的饱和趋势, 与 ACE2 结合符合特异性结合的趋势, 采用动力学拟合方法计算其亲和力 K_D 为 $5.18 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 表明筛选和鉴定结果准确可信, 结合速率常数 k_{on} 为 $6.40 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, 表明黄豆苷与 ACE2

的结合速度是慢结合, 解离速率常数 k_{off} 为 $3.31 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, 表明黄豆苷与 ACE2 的解离速度是中等解离。以上结果说明, 黄豆苷是中药葛根中能够与 ACE2 特异性结合的成分, 是葛根抗病毒的药效物质之一; 此外, 以其结合速率常数和解离速率常数为依据对黄豆苷进行结构优化, 有可能开发出更优的抗新冠病毒药物。

5 ELISA 实验

为了进一步验证黄豆苷与2种蛋白结合后能否发挥药理作用, 采用 ELISA 实验测定黄豆苷对 SRBD 与 ACE2 结合的抑制率, 结果如图6所示。可见不同浓度

Table 1 Identification of 3 compounds using UPLC-QTOF-MS

No.	Formula (theoretical mass number)	Extracting solution		Recovered solution		Identification	Source
		Retention time/min	MS (error in ppm)	Retention time/min	MS (error in ppm)		
1	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5$ (355.154 0 [M+H] ⁺)	10.903	355.154 0 [M+H] ⁺ (-5.2)	11.15	355.152 6 [M+H] ⁺ (-6.88)	Licochalcone D	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma
2	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$ (257.080 8 [M+H] ⁺)	5.953	257.080 0 [M+H] ⁺ (3.2)	6.014	257.079 5 [M+H] ⁺ (0.84)	Isoliquiritigenin	Bupleuri Radix
3	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$ (418.119 4 [M+H] ⁺)	5.445	418.119 5 [M+H] ⁺ (7.11)	5.571	417.113 4 [M+H] ⁺ (5.72)	Daidzin	Puerariae Lobatae Radix

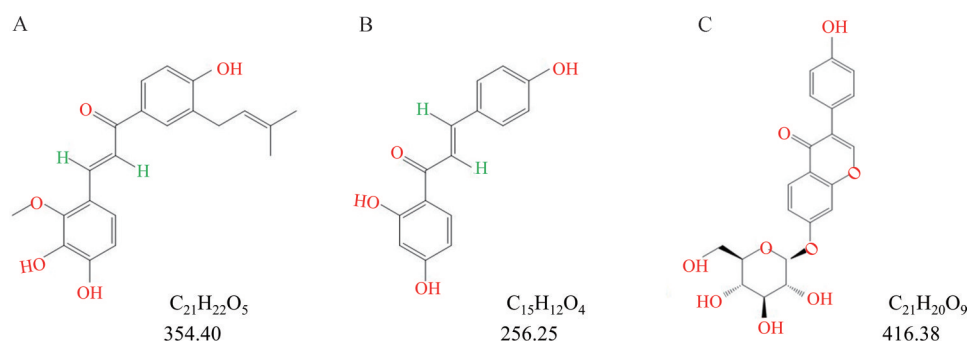


Figure 3 Structures of identified components. A: Licochalcone D; B: Isoliquiritigenin; C: Daidzin

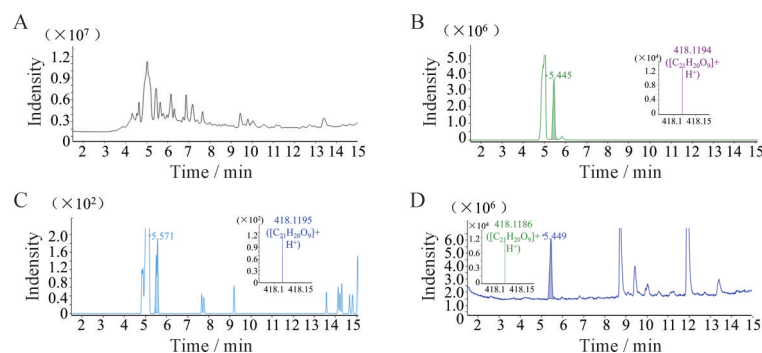


Figure 4 Identification and validation of daidzin. A: Total ion chromatogram of Pueraria montana extract; B: Extracted ion chromatogram of daidzin in pueraria montana extract sample; C: Extracted ion chromatogram of daidzin in pueraria montana recovery sample; D: Total ion chromatogram of daidzin standard

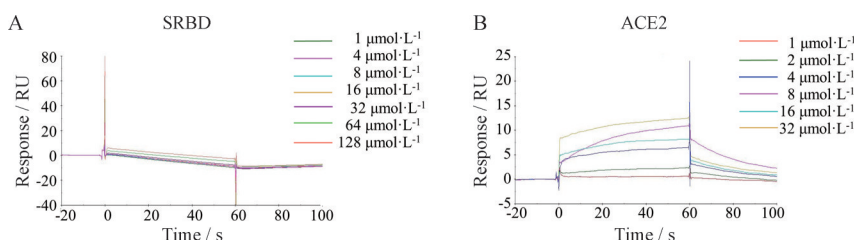


Figure 5 Binding affinity between daidzin and SRBD (A) or ACE2 (B) protein

的黄豆苷均对二者的结合有抑制作用, 2 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄豆苷的抑制率为 37.9% 和 38.6%。结果表明, 黄豆苷能够抑制 SRBD 与 ACE2 的结合, 且呈浓度依赖关系, 黄豆苷具有抑制 SARS-CoV-2 进入宿主细胞的潜力。

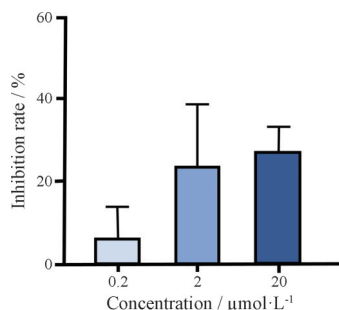


Figure 6 Inhibition rate of daidzin on SRBD-ACE2 binding. $n = 3, \bar{x} \pm s$

6 分子对接

利用 Discovery Studios 软件对 SRBD 和 ACE2 的结合复合物与黄豆苷进行分子对接, 寻找黄豆苷的精确结合位点, 结果如图 7 所示。图 7A 为 2D 非键相互作用展示图, 图 7B 为 3D 模拟对接图, 蓝色片段为 ACE2 残基, 绿色片段为 SRBD 残基, 黄豆苷在两个蛋白结合区域附近有最佳结合, CDOCKER-ENERGY 可达 -36 kJ 。黄豆苷与 SRBD 上 GLN409、ARG403、GLY496 等均存在氢键作用, 与 ACE2 上 HIS34、GLU37、LYS353 存在 π 键作用与静电作用。说明黄豆苷与 SRBD-ACE2 复合物具有稳定的结合结构。

讨论

在中药的初步筛选中, 本研究发现不同中药提取液在不同靶点上的响应值排序基本一致, 其主要原因可能是不同中药在同一提取方法下的提取效率不同, 导致有的中药提取液浓度较高、成分较多, 而有的中药提取液浓度较低、成分较少, 高浓度的提取液中由于非

特异性结合的影响比较显著, 因此在不同靶点上的响应值均偏高。然而也有一些其他情况, 如葛根提取液在 SRBD 上的结合相对强于青连翘提取液, 而在 ACE2 上却相反, 说明葛根里可能存在与 SRBD 结合较强的成分, 而青连翘里可能存在与 ACE2 结合较强的成分。虽然本研究尚未筛选出这些成分, 但提示下一步还需要尽力提高 SPR 筛选系统的灵敏度和特异性, 从而为复杂体系中活性成分的发现提供有力工具。

本研究对 4 种中药提取液中与 SRBD 和 ACE2 结合的成分进行了 SPR 回收, 并通过 UPLC-QTOF-MS 对回收液中的成分进行鉴定, 从 3 种中药提取液中找到 3 个化合物分子式, 进一步通过中药化学成分数据库进行匹配, 然而采用对照品只确证了 1 个成分。一方面可能是由于本研究构建的中药化学成分数据库不够全面, 没能涵盖所有的化学成分; 另一方面可能是由于在筛选中发现了目前还未知的成分。因此, 本课题组将进一步构建完善的中药化学成分信息数据库, 并同时未能用对照品确证的化合物进行结构鉴定, 以期发现更具价值的新活性成分。

基因表达研究表明, ACE2 在人体心脏、肾脏、肺、肝、脑及生殖系统等各处均有表达^[15], 其与肾脏疾病、心血管疾病、糖尿病及中枢系统疾病的发病机制都密切相关。如常见的沙坦类降压药就是通过竞争性拮抗 ACE2 受体, 来阻断“肾素-血管紧张素-醛固酮”系统, 从而发挥降压作用。因此, 发现能与 ACE2 结合的化合物不仅对于研发抗新冠病毒药物具有重要启发, 也对于今后研究与 ACE2 靶点相关的疾病有很大参考价值。后续工作可以对黄豆苷进行结构设计和优化提高其对 ACE2 靶点的选择性和亲和力, 从而为与 ACE2 相关疾病的治疗药物开发提供活性先导化合物。

本研究所使用的葛根, 经现代药理研究表明, 具有抗动脉粥样硬化、扩张冠状动脉血管、降血压、抑制血

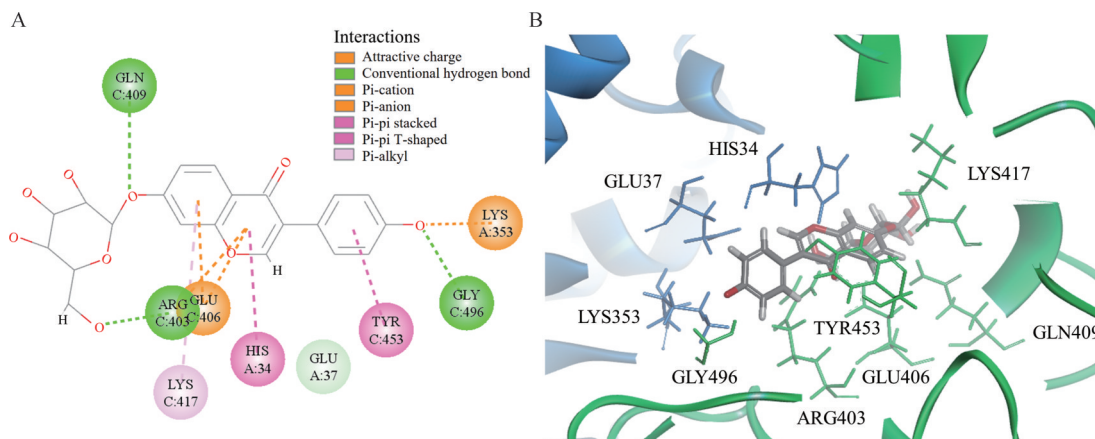


Figure 7 Action modes of daidzin with SRBD-ACE2 complex. A: 2D non-bonded interaction; B: 3D simulated docking

小板聚集、降低心肌耗氧量等药理活性,是治疗心血管疾病中较为传统和重要的一味中草药^[16]。通过对葛根中活性成分的研究发现,对心脑血管疾病治疗效果显著的是大豆异黄酮类成分^[17]。本研究筛选得到的黄豆苷是葛根中大豆异黄酮的主要存在形式,且验证了黄豆苷与ACE2受体能够相互作用,鉴于ACE2靶点与心血管疾病密切相关,提示黄豆苷也可能是葛根治疗心血管疾病的成分,为葛根的现代药理研究提供了新思路。

综上,本研究建立了一个基于SPR技术的SRBD和ACE2双靶点中药筛选系统,结合UPLC-QTOF-MS分析,对相关中药中抗新冠病毒的活性成分进行了筛选。最终从6种中药材中发现黄豆苷是潜在的结合成分,并通过ELISA竞争性结合实验证明了黄豆苷能够抑制SRBD和ACE2结合,从而可能发挥抗新冠病毒作用。由于ACE2在调节血压、体液平衡、炎症、细胞增殖、肥大和纤维化等方面均能够发挥作用,因此当化合物完全阻断ACE2时将可能发生不可预知的不良反应,对于单一化合物而言,如果其具有较多的不良反应,单一化合物将难于开发成特异性药物;对于中药复杂成分而言,一些成分能够温和阻断ACE2,而一些成分却又能通过其他途径对缺失的ACE2功能进行补偿,从而协同发挥整体药效,这正是中药的魅力所在。这些假设还值得进一步通过细胞或体内水平的研究来确证。本研究利用SPR技术同时针对SARS-CoV-2进入宿主细胞的2个相关靶点进行中药筛选,符合中药多成分、多靶点的作用特点,使中药的筛选过程向中医药“整体协同、辨证论治”的理念靠拢。此外,本研究表明,双靶点SPR筛选系统的结果准、效率高,特别适合复杂药物体系的筛选和中药药效物质的研究,为探究中药活性成分抗新冠病毒作用机制研究提供药效物质基础,并为抗新冠病毒药物开发提供先导化合物来源。

作者贡献: 张颖、王冬尧、戚敏钰、马荟琳负责实施实验;马荟琳、姚一青、王璇负责数据处理;马荟琳、张颖负责论文撰写;曹岩、王冬尧负责课题设计、论文修改。

利益冲突: 本文的作者和所涉及的内容不存在潜在的利益冲突。

References

- [1] Hao HP, Zheng CN, Wang GJ. Thoughts and experimental exploration on pharmacokinetic study of herbal medicines with multiple-components and targets [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 270-275.
- [2] He X, Shang C. Text mining analysis of TCM in treating pandemic [J]. *Acta Chin Med Pharmacol (中医药学报)*, 2020, 48: 34-39.
- [3] Lyu M, Fan G, Xiao G, et al. Traditional Chinese medicine in COVID-19 [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 3337-3363.
- [4] Chen X, Wu Y, Chen C, et al. Identifying potential anti-COVID-19 pharmacological components of traditional Chinese medicine Lianhuaqingwen capsule based on human exposure and ACE2 biochromatography screening [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 222-236.
- [5] Li F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins [J]. *Annu Rev Virol*, 2016, 3: 237-261.
- [6] Shang J, Wan Y, Luo C, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2 [J]. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 2020, 117: 11727-11734.
- [7] Zhang X, Li S, Niu S. ACE2 and COVID-19 and the resulting ARDS [J]. *Postgrad Med J*, 2020, 96: 403-407.
- [8] Chen X, Hirano M, Werner RA, et al. Novel 18F-labeled PET imaging agent FV45 targeting the renin-angiotensin system [J]. *ACS Omega*, 2018, 3: 10460-10470.
- [9] Zhao Y, Zhao Z, Wang Y, et al. Single-cell RNA expression profiling of ACE2, the receptor of SARS-CoV-2 [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020, 202: 756-759.
- [10] Liu AL, Du GH. Drug discovery for COVID-19 treatment based on drug targets [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 1073-1080.
- [11] Lv D, Xu J, Qi M, et al. A strategy of screening and binding analysis of bioactive components from traditional Chinese medicine based on surface plasmon resonance biosensor [J]. *J Pharm Anal*, 2022, 12: 500-508.
- [12] Liao L, Song X, Wang L, et al. Highly selective inhibition of IMPDH2 provides the basis of antineuroinflammation therapy [J]. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 2017, 114: E5986-E5994.
- [13] Du A, Zheng R, Disoma C, et al. Epigallocatechin-3-gallate, an active ingredient of traditional Chinese medicines, inhibits the 3CLpro activity of SARS-CoV-2 [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 176: 1-12.
- [14] Cao Y, Li Y, Lv D, et al. Identification of a ligand for tumor necrosis factor receptor from Chinese herbs by combination of surface plasmon resonance biosensor and UPLC-MS [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408: 5359-5367.
- [15] Hikmet F, Mear L, Edvinsson A, et al. The protein expression profile of ACE2 in human tissues [J]. *Mol Syst Biol*, 2020, 16: e9610.
- [16] Li X, Pan J, Chen S, et al. Research progress of chemical components and pharmacological action of *Pueraria lobata* [J]. *J Chin Instit Food Sci Technol (中国食品学报)*, 2017, 17: 189-195.
- [17] Zhou Y, Zhang H, Peng C. Puerarin: a review of pharmacological effects [J]. *Phytother Res*, 2014, 28: 961-975.