

• 制剂与炮制 •

基于分子动力学模拟和实验验证的
法半夏炮制解毒机制研究赵陈涛¹, 朱晓富², 何君³, 刘露², 彭诗涵², 谭钰祺², 杨娇²,
陈旭冰^{1*}, 周浓^{4*}, 陶兴宝^{2*}

- (1. 大理大学 药学院, 云南 大理 671000;
2. 重庆中医药学院 中药学院, 重庆 402760;
3. 重庆中医药学院 中医学院, 重庆 402760;
4. 重庆三峡学院 生物与食品工程学院, 重庆 404120)

[摘要] 该文探讨法半夏炮制过程中辅料溶液中甘草酸及钙离子对其毒性成分凝集素蛋白的影响, 阐释其炮制解毒机制。以分子对接和分子动力学模拟技术构建凝集素蛋白的三维结构模型, 并模拟计算甘草酸及钙离子与凝集素蛋白的相互作用。以大肠杆菌原核表达系统制备野生型及突变型凝集素蛋白; 采用生物膜干涉技术(BLI)验证甘草酸及钙离子与野生型和突变型凝集素蛋白的相互作用, 并以家兔眼结膜刺激模型进行致炎毒性评价。结果显示, 甘草酸及钙离子共同与凝集素蛋白以相互作用形成的三元复合物结构更稳定, 其根均方偏差(RMSD)、根均方波动(RMSF)、溶剂可接触表面积(SASA)、回旋半径(Rg)、溶剂化自由能(ΔG_{SOLV})和总结合自由能(ΔG_{TOTAL})均显著降低, 而氢键数量、气相自由能(ΔG_{GAS})均显著增加; 甘草酸与钙离子的共同作用使凝集素蛋白氨基酸残基 51~56、170~175 及 232~237 区域的相互作用数量显著增加, 库仑相互作用(Coul-SR)和短程相互作用显著(LJ-SR)增强。野生型凝集素蛋白与甘草酸及钙离子共同结合时亲和动力学参数 K_D 为 $8.10 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 显著低于野生型凝集素蛋白与甘草酸及钙离子形成的二元复合物以及突变型凝集素蛋白与甘草酸及钙离子形成的三元复合物。甘草酸及钙离子混合溶液共同浸泡的凝集素蛋白在加入毒针晶后, 未明显加重对家兔眼结膜的刺激。甘草酸及钙离子以协同作用与凝集素蛋白形成结构稳定而无毒性的超分子复合物, 实现炮制解毒。

[关键词] 法半夏; 分子对接; 分子动力学模拟; 协同作用; 炮制解毒

Molecular dynamics simulation and experimental verification reveal
processing detoxification mechanism of Pinelliae Rhizoma PraeparatumZHAO Chen-tao¹, ZHU Xiao-fu², HE Jun³, LIU Lu², PENG Shi-han², TAN Yu-qi², YANG Jiao²,
CHEN Xu-bing^{1*}, ZHOU Nong^{4*}, TAO Xing-bao^{2*}

- (1. School of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China;
2. School of Chinese Materia Medica, Chongqing University of Chinese Medicine, Chongqing 402760, China;
3. School of Chinese Medicine, Chongqing University of Chinese Medicine, Chongqing 402760, China;
4. College of Biology and Food Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404120, China)

[收稿日期] 2025-06-20

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82304726); 中国博士后科学基金会第73批面上项目(2023MD734114); 新重庆青年创新人才项目(CSTB2024NSCQ-QCXM0012); 重庆博士后研究项目(2022CQBSHTB3098); 重庆市科卫联合中医药科研项目(2024ZYYB007); 重庆市巴渝学者青年学者计划项目(YS2024067); 重庆市教委科学技术研究项目(KJQN202315102); 重庆市璧山区社会民生领域科技计划项目(BSKJ2024078)

[通信作者] *陶兴宝, 副研究员, Tel: (023) 63702109, E-mail: taoxingbao@cqctcm.edu.cn; *陈旭冰, 副教授, Tel: (0872) 2257401, E-mail: abing780113@163.com; *周浓, 教授, Tel: (023) 58576130, E-mail: erhaizn@126.com

[作者简介] 赵陈涛, 硕士研究生, E-mail: 3324075343@qq.com

[**Abstract**] This study aims to investigate the effects of glycyrrhizic acid and calcium ions from adjuvant solutions on the toxic lectin in *Pinelliae Rhizoma Praeparatum* and clarify the processing detoxification mechanism. Molecular docking and molecular dynamics simulations were employed to construct a 3D model of lectin and evaluate the interactions of glycyrrhizic acid and/or calcium ions with lectin. Wild-type and mutant lectin proteins were produced via a prokaryotic expression system in *Escherichia coli*. The interactions of glycyrrhizic acid and/or calcium ions with the lectin proteins were verified by Bio-Layer Interferometry (BLI), and the irritant toxicity was assessed via a rabbit model of conjunctival irritation. The findings revealed that the ternary complex formed by glycyrrhizic acid, calcium ions, and lectin exhibited greater stability. This complex showed significantly reduced root mean square deviation (RMSD), root mean square fluctuation (RMSF), solvent-accessible surface area (SASA), radius of gyration (Rg), Gibbs free energy of solvation (ΔG_{SOLV}), and total binding free energy (ΔG_{TOTAL}), but significantly increased number of hydrogen bonds and gas-phase free energy (ΔG_{GAS}). The combined action of glycyrrhizic acid and calcium ions led to a significant increase in the number of interactions in the amino acid residue region 51-56, 170-175, and 232-237 of lectin, with enhanced Coulomb interaction-short range (Coul-SR) and Lennard-Jones-short range (LJ-SR). When the wild-type lectin protein co-bound with glycyrrhizic acid and calcium ions, the affinity constant was $8.10 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, which was significantly lower than that of the binary complex of wild-type lectin with glycyrrhizic acid or calcium ions and the ternary complex of mutant lectin with glycyrrhizic acid and calcium ions. Additionally, lectin soaked in a mixed solution of glycyrrhizic acid and calcium ions did not significantly exacerbate the irritation of the rabbit conjunctiva when being combined with toxic needle crystals. In conclusion, glycyrrhizic acid and calcium ions demonstrate a synergistic effect in forming a structurally stable and non-toxic supramolecular complex with lectin, thereby achieving the processing detoxification of *Pinelliae Rhizoma Praeparatum*.

[**Key words**] *Pinelliae Rhizoma Praeparatum*; molecular docking; molecular dynamics simulations; synergistic effect; processing detoxification

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20251027.301

半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎,具有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结的功效^[1]。历代本草中均记载其“有毒,戟人咽”^[2-3],误服半夏鲜品或生品均可致人口舌麻木肿胀、失音、呼吸困难等症状^[4]。现代研究表明,半夏的毒性成分主要为凝集素蛋白及草酸钙毒针晶,毒针晶具有强烈的致炎毒性,针晶中带有的毒蛋白为凝集素蛋白,可显著加重毒针晶引起的致炎毒性,故临床一般以其炮制品入药^[5]。法半夏作为临床上常用的半夏炮制品之一,以甘草汁和石灰水共同浸泡,保持浸液 pH>12 而制备^[1]。入肺经,味辛性温而燥,为燥湿化痰,温化寒痰之要药^[6]。

课题组前期研究发现,在法半夏炮制过程中,甘草酸是甘草汁中起解毒作用的主要成分,pH>12 是石灰水炮制解毒的关键条件。甘草汁与石灰水共同浸泡半夏可促使其辅料来源的甘草酸和钙离子与毒性成分凝集素蛋白产生自组装聚合行为,形成超分子复合物聚集体而沉淀^[7-9]。在中药炮制过程中,由于其复杂的化学成分(如蛋白质、多肽、三萜和金属离子等),通常以非共价键相互作用的方式,自发地产生自组装行为,生成聚集体或颗粒^[10-12]。有研究表明^[13-14],甘草酸作为两亲型表面活性剂,当其浓度达

到临界胶束浓度时,其疏水链段会通过非共价键作用聚集成核心,而亲水链段则围绕核心形成外壳,自发地构建成胶束结构。同时,钙离子在水中倾向于自发聚集与蛋白质相互作用,易形成自组装复合物聚集体^[14-16]。据此推测,在法半夏的炮制过程中,辅料甘草汁中的甘草酸及 pH>12 石灰水中的钙离子可能与半夏毒性成分凝集素蛋白之间存在相互作用形成超分子复合物而沉淀,实现炮制解毒目的。因此,本研究以法半夏炮制过程中炮制辅料中物质组分甘草酸及钙离子与凝集素蛋白的相互作用为切入点,采用分子对接技术及分子动力学模拟(MD)技术模拟研究甘草酸及钙离子与凝集素蛋白三者 pH>12 的相互作用及分子动力学行为,并通过制备野生型和突变型凝集素蛋白,以生物膜干涉技术(BLI)和家兔眼结膜刺激模型进行实验验证,解析法半夏炮制过程中凝集素蛋白超分子复合物的形成机制,并对其致炎毒性进行评价,以期从凝集素蛋白与甘草酸及钙离子的相互作用角度阐释法半夏的炮制解毒机制,旨在为指导法半夏临床安全合理用药提供科学支撑。

1 材料

1.1 药材

半夏鲜品、生品均收集于甘肃陇南,经重庆中医

药学院王刚教授鉴定为天南星科植物半夏 *P. ternata* 的块茎。

1.2 试剂

甘草酸(四川维克奇生物科技有限公司,批号1405-86-3);磷酸盐缓冲液(北京兰杰柯科技有限公司,批号24115288);羧甲基纤维素钠(北京博奥拓达科技有限公司,批号202501);硫酸铵(上海麦克林生化科技股份有限公司,批号C17264239);生物素化试剂(江苏博美达生命科学有限公司,批号2406M);异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(美国Sigma公司,批号V900917);卡那霉素(北京索莱宝科技有限公司,批号IK0030);原核表达载体 pET-30a 购自武汉淼灵生物科技有限公司;表达宿主菌 BL21(DE3) 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.3 仪器

电泳仪(美国Bio-Rad公司,型号Mini Trans-Blot);蛋白纯化仪(美国Bio-Rad公司,型号NGC Quest 10 Plus);Phenyl SepharoseTM High Performance 疏水色谱柱(瑞典Cytiva公司,型号10346532);Q SepharoseTM High Performance 离子交换柱色谱(瑞典Cytiva公司,型号10347746);SSA 传感器(德国Sartorius公司,型号2410004711);生物膜干涉分子相互作用仪(德国Sartorius公司,型号OCTET R2)。

1.4 动物

健康8周龄成年新西兰大白兔30只,雌雄各半,体质量(2.4 ± 0.2) kg,购自重庆恩彼生物科技有限公司,许可证号SCXK(渝)2022-0007。重庆中医药学院实验动物中心提供医学实验动物环境设施,温度23~27℃,湿度45%~60%,12 h光照,适应性喂养1周后进行实验。本研究所涉及的动物实验经重庆中医药学院生物医学伦理委员会审核批准(批准号20231301)。

2 方法

2.1 分子对接及分子动力学模拟

2.1.1 同源建模 通过UniProt蛋白质序列数据库获取凝集素蛋白的氨基酸序列。将该序列输入AlphaFold3(<https://alphafoldserver.com>),运用AI驱动的预测算法生成凝集素蛋白的三维结构^[17-18]。对AlphaFold3生成的5个构象进行优化,于CHARMM36m力场下依次进行2 000步最陡下降法和2 000步共轭梯度法能量最小化,继以20 ns分子

动力学模拟弛豫。计算并选取钙离子均方根偏差(RMSD)最小的结构作为可信模型用于后续分析。利用Swiss-Model(<https://swissmodel.expasy.org/assess>)中的结构评估工具和Ramachandran Plot工具对模型进行验证和评分^[19]。

2.1.2 分子对接 采用AutoDock Vina(<https://github.com/ccsb-scripps/AutoDock-Vina>)进行凝集素蛋白与甘草酸的分子对接研究^[20-23]。在对接实验开始前,使用AutoDockTools对凝集素蛋白进行预处理,包括去除水分子、添加极性氢、分配Gasteiger电荷,并定义旋转键以确保配体能够自由旋转^[24]。对凝集素蛋白的带电氨基酸进行质子化处理,构建pH>12的强碱性体系。完成甘草酸与凝集素蛋白的对接后,对输出的结合能和结合模式进行分析,选取结合能最低且符合生物学意义的对接构象进行与钙离子的对接研究。对钙离子进行力场参数化并确定初始结合位点,使用AutoDock Vina进行凝集素蛋白与钙离子的分子对接模拟。将获得的钙离子位置与甘草酸和凝集素蛋白对接形成的复合物进行整合,构建完整的复合物体系。以能量最小化步骤优化复合物的几何结构,确保所有原子处于合理的范德华距离内,避免不合理的原子重叠或空间冲突。

2.1.3 分子动力学模拟 采用GROMACS(<https://github.com/ElsevierSoftwareX/SOFTX-D-15-00003>)模拟甘草酸及钙离子与凝集素蛋白在pH>12下的分子动力学行为。选用CHARMM36力场^[25-26]描述三者间的相互作用,通过Nose-Hoover温度耦合器控制温度,压力耦合则采用Parrinello-Rahman算法。为研究凝集素蛋白在不同结合条件下的分子动力学行为,构建了3个模拟体系:凝集素蛋白-甘草酸、凝集素蛋白-钙离子以及凝集素蛋白-甘草酸-钙离子。运用Steepest Descent算法对体系进行能量最小化,以消除可能存在的原子重叠和不合理的几何结构。使用正则系综(NVT)进行100 ps的平衡模拟,在等温等压系综(NPT)下进行100 ps的动力学模拟^[27-28]。设置模拟温度稳定在303.15 K,以模拟室温反应条件将压强设定为1 atm。在完成平衡模拟后,进行100 ns的生产模拟,并将模拟时间步长设置为2 fs。每50 000步输出1次压缩的坐标轨迹文件,每1 000步记录1次能量和日志数据。采用Cut-off方式处理范德华相互作用,并将切断距离设为1.2

nm,同时采用 Particle Mesh Ewald (PME) 方法计算长程静电相互作用,切断距离为 1.2 nm。使用 LINCS 算法对所有与氢原子相连的键进行约束。通过 GROMACS 中的工具计算模拟过程中 RMSD、根均方波动值(RMSF)、溶剂可接触表面积(SASA)、回旋半径(Rg)和氢键数量。借助 MMPBSA 和 DSSP 算法计算体系稳定后的结合自由能和二级结构变化。

表 1 野生型与突变型凝集素蛋白的氨基酸序列

Table 1 Amino acid sequences of wild-type and mutant lectin proteins

名称	序列
野生型凝集素蛋白	MASKLLFLLPAIFGLVIPPAAATAVGTNYLLSGETLNTDGHLRNGDFDFIM <u>QDDCNA</u> VLYNGNWQSTANKGRDCKLTLDRGELVINNGE-GSAVWRSGSQAAGNYAAVLHPEGKLVYGPSVFKINPWPGLNSRLGNVPFTNNMLFSGQVLYGDGKITARNHMLVM <u>QGDCNL</u> VLYGG-KYGWQSNTHNGEHCFLRLNHKGELIHKDDDFKSIWSSQSSSKQGDYVFIL <u>QDNGYG</u> VYIGPAIWATSSKRSAAAQETMIGMVTEKVN
突变型凝集素蛋白	MASKLLFLLPAIFGLVIPPAAATAVGTNYLLSGETLNTDGHLRNGDFDFIM <u>NAAIRS</u> VLYNGNWQSTANKGRDCKLTLDRGELVINNGE-GSAVWRSGSQAAGNYAAVLHPEGKLVYGPSVFKINPWPGLNSRLGNVPFTNNMLFSGQVLYGDGKITARNHMLVM <u>NAAIRS</u> VLYGG-KYGWQSNTHNGEHCFLRLNHKGELIHKDDDFKSIWSSQSSSKQGDYVFIL <u>NAAIRS</u> VYIGPAIWATSSKRSAAAQETMIGMVTEKVN

注:下划线加粗部分为已报道的凝集素蛋白甘露糖结合位点序列。

将重组质粒分别转化至大肠杆菌 SHuffle[®] T7 Express 和 BL21(DE3)pLysS 感受态细胞中,接种于含卡那霉素的 LB 培养基,37 ℃、200 r·min⁻¹ 培养 4 h,加入 0.5 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导表达(SHuffle[®] T7 Express 在 30 ℃ 诱导 4 h)。当 SHuffle[®] T7 Express 菌株的 A_{600 nm} 达 0.8~1 时,降温至 15 ℃,加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导 16 h。收集细胞后经超声裂解、离心,上清液通过镍柱纯化、透析和 0.22 μm 滤器过滤获得目的蛋白,采用 Bradford 法测定浓度,并通过 SDS-PAGE 和 Western blot 分析蛋白表达、纯度和相对分子质量。

2.2.2 突变型凝集素蛋白制备 采用大肠杆菌表达系统对半夏凝集素蛋白序列中的 3 个甘露糖结合位点进行定点突变,具体位点包括结合位点 I (QDDCNA)、结合位点 II (QGDCNL) 和结合位点 III (QDNGYG),将上述结合位点统一突变成 NAAIRS,突变型凝集素蛋白的氨基酸序列见表 1。将优化合成的突变型凝集素蛋白 DNA 序列克隆至 pET-30a 载体,转化至 BL21(DE3) 感受态细胞。单菌落接种于含卡那霉素的 LB 培养基,37 ℃、200 r·min⁻¹ 培养至 A_{600 nm} 达 0.6~0.8 时,用 0.5 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导表达并通过 SDS-PAGE 检测。放大表达时,将甘油菌接种于含有卡那霉素抗性的 TB 培养基,A_{600 nm} 达 1.2 时加入 IPTG,15 ℃ 诱导 16 h。

2.2 凝集素蛋白与甘草酸及钙离子的相互作用

2.2.1 野生型凝集素蛋白的制备 以半夏凝集素基因为研究对象,参考已报道的含有甘露糖结合位点的凝集素基因序列^[29-31],委托南京金斯瑞生物科技有限公司进行基因合成。优化密码子并合成野生型凝集素蛋白的 DNA 序列,将其克隆至 pET-30a 表达载体中,用于大肠杆菌的蛋白质表达。野生型凝集素蛋白的氨基酸序列见表 1。

收集的细胞经裂解缓冲液(50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 150 mmol·L⁻¹ NaCl, 1 mmol·L⁻¹ TCEP, pH 8.0) 重悬、超声破碎后,沉淀用含 7 mol·L⁻¹ 盐酸胍的溶解缓冲液溶解,上清液经镍柱和 Sephadex 200 柱两步纯化。纯化蛋白复性至含 0.5 mL 精氨酸和 10% 甘油的最终缓冲液,经 0.22 μm 过滤后,通过 Bradford 法和 SDS-PAGE 分别测定浓度、纯度和相对分子质量。

2.2.3 生物膜干涉实验 采用 BLI 以亲和力检测野生型和突变型凝集素蛋白与甘草酸及钙离子的相互作用。将 2.2.1 和 2.2.2 项制备获得的 2 种重组蛋白进行生物素化。BLI 在 FORTEBIO Octet R2 系统中进行,温度 30 ℃,选择 4 根 Super Streptavidin (SSA) 传感器在 PBST 缓冲液中提前润湿 10 min,其中 2 根作为固化传感器。蛋白生物素化后,基线设置 120 s 进行平衡,在 SSA 传感器上固化 600 s。固化完成后在 PBST 溶液中平衡 30 s,依次结合不同梯度的甘草酸和钙离子 60 s,分别测定甘草酸及钙离子与凝集素蛋白的亲和力值。结合后的探针转移至缓冲溶液中解离 30 s,数据用 ForteBio Octet Analysis 软件进行双扣除处理。

2.3 致炎毒性评价

2.3.1 凝集素蛋白的分离纯化 取新鲜半夏块茎适量,洗净去皮后,加适量纯水匀浆,8 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,取上清液加饱和硫酸铵至饱和度 45%,

搅拌后, $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 收集沉淀, $0.6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸铵溶液溶解, 得半夏总蛋白粗提物。粗提物经 Phenyl Sepharose™ High Performance 疏水色谱柱、Q Sepharose™ High Performance 离子交换柱色谱, 以 $0\sim 1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液梯度洗脱 60 min, 收集出峰液, 经 $7\,000\text{ Da}$ 透析袋透析后冻干, 得纯化的凝集素蛋白^[7,32]。

2.3.2 草酸钙毒针晶的提取 鲜半夏块茎切碎, 加入少量石油醚多次研磨至液体浑浊, 合并混悬液, 纱布过滤, 滤液以 $0.25\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤, 得白色滤饼, 即半夏草酸钙毒针晶^[9]。

2.3.3 家兔眼结膜刺激实验 将 30 只家兔雌雄对半随机分为 10 组, 每组 3 只, 每组样品使用 6 只兔眼, 通过兔眼结膜进行给药刺激, 分组及给药浓度见表 2。实验操作如下: 轻柔撩起实验家兔上下眼睑形成杯状腔隙, 将药液充分混悬后, 向每只家兔双侧眼各滴入 $50\text{ }\mu\text{L}$; 滴药后闭合家兔双眼, 轻轻搓揉眼睑 10 s, 以保证药液与眼组织充分接触; 2 min 后立即用生理盐水冲洗兔眼, 直至无可见异物残留。给药 2 h 后, 观察兔眼刺激反应并即时拍照记录; 同时, 以对照组混悬液作为空白对照, 同步记录给药后家兔眼刺激性反应的具体情况。参照《药物研究技术指导原则》关于“中药、天然药物刺激性和溶血性研究技术指导原则”评分标准^[33]对兔眼的肿胀程度进行评分。

2.4 数据分析

采用 SPSS 24.0 软件对数据进行处理, 数据均

表 2 家兔眼刺激实验分组及给药浓度

Table 2 Grouping and medication concentrations in the rabbit eye irritation test

组别	mg·mL ⁻¹	
	蛋白	针晶
空白	—	—
淀粉对照	—	—
凝集素蛋白	0.5	—
毒针晶	—	25
凝集素蛋白+毒针晶	0.5	25
凝集素蛋白+甘草酸	0.5	—
凝集素蛋白+钙离子	0.5	—
凝集素蛋白+甘草酸+钙离子	0.5	—
凝集素蛋白+甘草酸+毒针晶	0.5	25
凝集素蛋白+钙离子+毒针晶	0.5	25
凝集素蛋白+甘草酸+钙离子+毒针晶	0.5	25

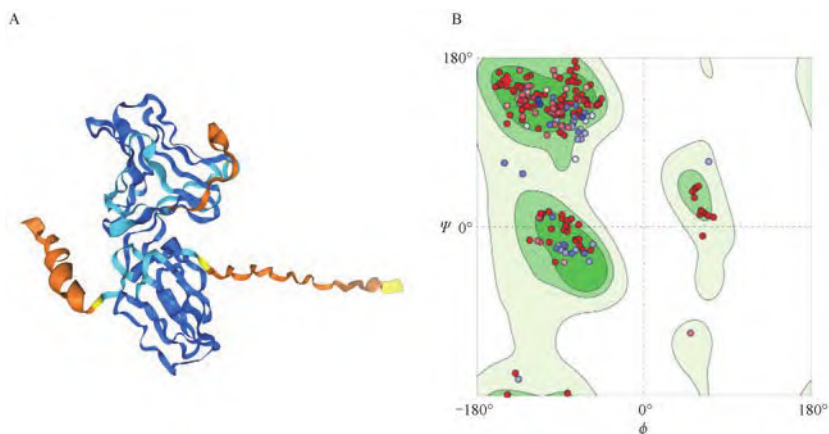
注: 凝集素蛋白+甘草酸. 甘草酸溶液浸泡的凝集素蛋白; 凝集素蛋白+钙离子. 钙离子溶液浸泡的凝集素蛋白; 凝集素蛋白+甘草酸+钙离子. 甘草酸及钙离子溶液共同浸泡的凝集素蛋白(表 6 同)。

以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间采用独立样本 t 检验, $P<0.05$ 为具有显著性差异。

3 结果

3.1 凝集素蛋白同源建模

利用 AlphaFold3 成功构建半夏凝集素蛋白的三维结构模型, 结合人工智能算法进行优化, 经优化后的三维结构模型见图 1。采用 Swiss-Model 对构建的模型进行质量评估, 其拉氏图见图 1。结果显示, 大多数的氨基酸残基位于允许区域内, 整体氨基酸处合理性位置的比例为 95.41%, 表明同源建模构建的凝集素蛋白结构合理可靠, 可用于后续进行分子对接及分子动力学模拟研究。



A. 三维结构模型; B. 拉氏图。

图 1 凝集素蛋白的三维结构模型

Fig. 1 Three-dimensional structure model of lectin proteins

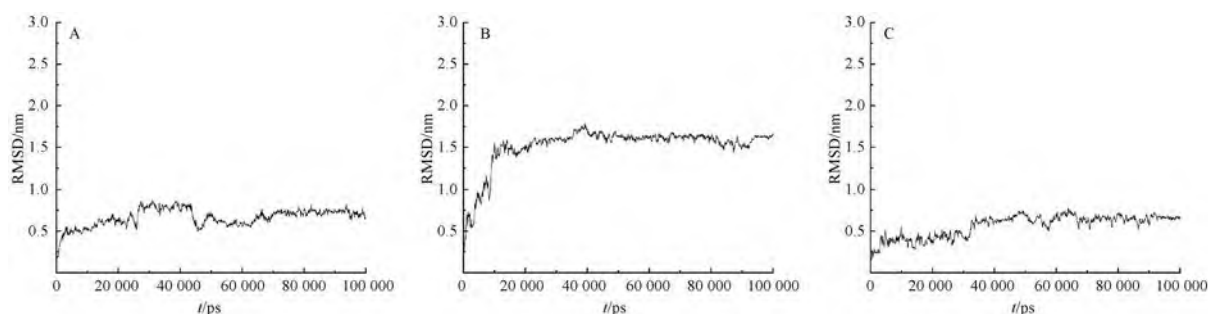
3.2 甘草酸及钙离子与凝集素蛋白的分子对接

使用 AutoDock Vina 进行甘草酸与凝集素蛋白的分子对接,并预测了甘草酸在蛋白质表面的结合位点及其构象。其三维结构可视化结果见中国知网本文增强出版附加材料。结果显示,甘草酸能够在凝集素蛋白的关键结合位点形成稳定的复合物结构,其结合能为 $-7.8 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,表明甘草酸与凝集素蛋白之间具有较高的亲和力,结合相对稳固。在 $\text{pH} > 12$ 模拟条件下,使用 AlphaFold3 预测钙离子在上述复合物中的对接情况。结果表明,钙离子在强碱性环境下能成功结合至甘草酸与凝集素蛋白形成的复合物,且位置合理,进一步增强其复合物的结构稳定性。优化后获得稳定的三者结合复合物结构三维可视化图见中国知网本文增强出版附加材料,其结合能为 $-8.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,显著优于单用甘草酸对接凝集素蛋白的结合能,表明甘草酸和钙离子共同

与凝集素蛋白的结合更为稳定。

3.3 甘草酸及钙离子与凝集素蛋白的分子动力学模拟

3.3.1 结构稳定性分析 分子动力学模拟结束后,对轨迹进行 RMSD 分析,见图 2。甘草酸与凝集素蛋白形成复合物的 RMSD 稳定在 0.5 nm 左右,波动幅度较小;钙离子与凝集素蛋白形成复合物的 RMSD 在模拟初期快速上升,随后在 1.5 nm 附近波动,波动幅度较大;而甘草酸及钙离子共同形成复合物的 RMSD 初始值较低,随后逐渐上升至约 1.0 nm ,波动幅度较小。结果表明,甘草酸与凝集素蛋白相互作用形成的复合物构象的稳定性相较于钙离子与凝集素蛋白相互作用形成的复合物构象更为稳定,尤以甘草酸及钙离子与凝集素蛋白共同作用形成的复合物构象最稳定。钙离子需与甘草酸共存才能稳定凝集素复合物,单独存在则诱发构象重排。



A. 凝集素蛋白-甘草酸;B. 凝集素蛋白-钙离子;C. 凝集素蛋白-甘草酸-钙离子(图3~6、10同)。

图2 甘草酸、钙离子、凝集素蛋白相互作用的 RMSD 变化

Fig. 2 RMSD changes of the interactions of glycyrrhizic acid, calcium ions, and lectin proteins

通过分子动力学模拟验证配体的稳定性,计算凝集素蛋白与配体的 RMSF 随时间的变化,见图 3。甘草酸与凝集素蛋白形成的复合物中,大多数残基的 RMSF 低于 1.0 nm ,而在靠近第 250 残基(C 端)出现显著波动,RMSF 达 2.0 nm ;钙离子与凝集素蛋白形成的复合物中,第 1 残基(N 端)和 C 端都出现显著的波动,C 端的波动接近 4.0 nm ,中间残基的 RMSF 波动也相对较大;而甘草酸及钙离子共同与凝集素蛋白形成复合物中的残基 RMSF 维持在 1.0 nm 以下,C 波动幅度较小,在 1.5 nm 左右,低于甘草酸及钙离子单独以凝集素蛋白形成复合物结合时的波动幅度。结果表明,甘草酸与凝集素蛋白相互作用可显著增强其复合物构象

稳定性,而钙离子与凝集素蛋白相互作用则可能扰乱凝集素蛋白的自身的部分结构。甘草酸及钙离子协同稳定凝集素 C 端,抑制柔性区波动,增强复合物结构刚性。

3.3.2 SASA 和 Rg 分析 采用 GROMACS 中的分析工具计算甘草酸及钙离子与凝集素蛋白相互作用在模拟过程中的暴露面积变化,见图 4。甘草酸与凝集素蛋白形成复合物的 SASA 主要在 $140 \sim 160 \text{ nm}^2$,整体趋势稳定;钙离子与凝集素蛋白形成复合物的 SASA 在初期接近 160 nm^2 ,随后逐渐下降至 140 nm^2 左右;而甘草酸及钙离子共同与凝集素蛋白形成复合物中的 SASA 稳定在 150 nm^2 ,且在整个模拟过程中仅有小幅下降,整体波动较小。结果表

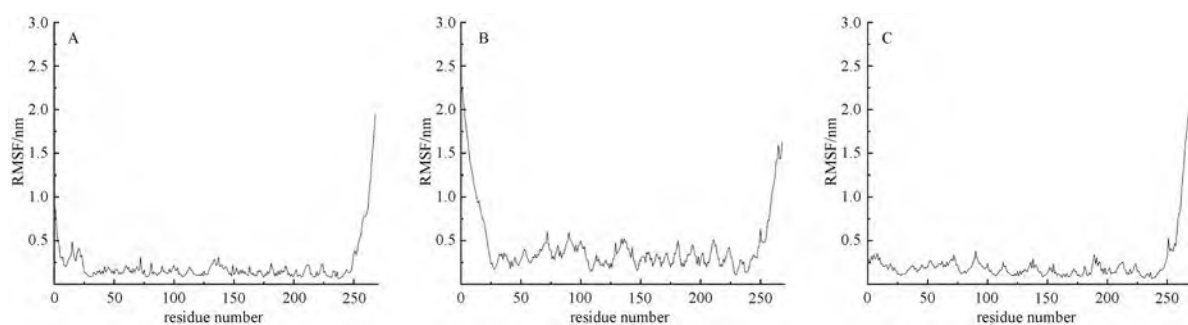


图 3 甘草酸、钙离子、凝集素蛋白相互作用的 RMSF 变化

Fig. 3 RMSF changes of the interactions of glycyrrhizic acid, calcium ions, and lectin proteins

明,甘草酸单独结合对凝集素蛋白形成复合物的 SASA 影响较小,而钙离子单独结合虽能减小凝集素蛋白形成复合物的 SASA,但其结构稳定性低于甘

草酸单独结合时的水平。尤以甘草酸与钙离子共同结合凝集素蛋白时,能有效稳定凝集素蛋白形成复合物的结构,而减少其 SASA 暴露。

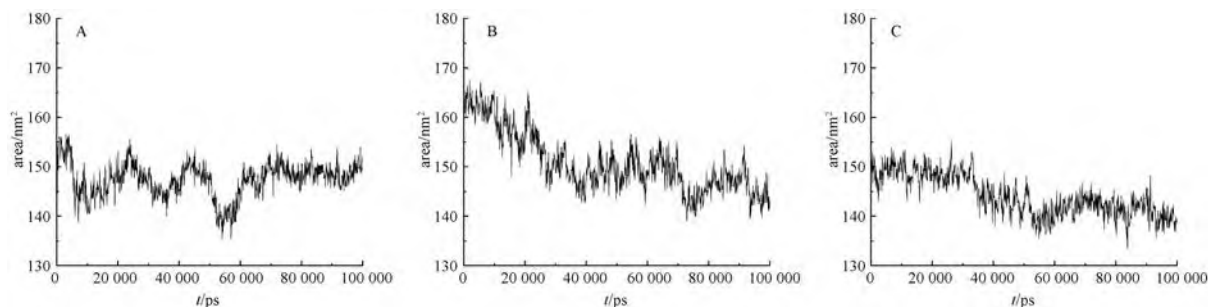
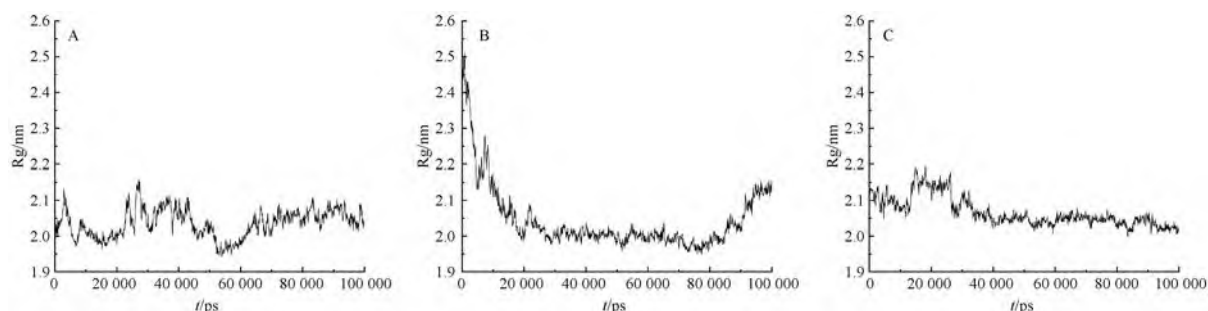


图 4 甘草酸、钙离子、凝集素蛋白相互作用的 SASA 变化

Fig. 4 SASA changes of the interactions of glycyrrhizic acid, calcium ions, and lectin proteins

采用 GROMACS 计算甘草酸及钙离子与凝集素蛋白相互作用在模拟过程中的 R_g 变化,见图 5。甘草酸单独结合凝集素蛋白形成复合物的 R_g 主要维持在 2.1 nm 左右,并伴有小幅波动;钙离子单独结合凝集素蛋白形成复合物的 R_g 初始值接近 2.4 nm,随后迅速下降至 2.1 nm 且在此水平附近波动,后期 R_g 逐渐上升;而甘草酸及钙离子与凝集素蛋白共同相互作用形成复合物的 R_g 在 100 ns 的模拟期间稳定在 2.05 nm 左右,且波动范围小。结果表明,甘草酸单独结合凝集素蛋白时,对形成凝集素蛋白复合物结构的影响较小,而钙离子单独结合则会引发凝集素蛋白自身结构的动态重排,从而影响凝集素蛋白形成复合物结构的稳定性。此外,当甘草酸与钙离子共同与凝集素蛋白相互作用时,两者以协同作用促进凝集素蛋白形成复合物的稳定性,有利于维持其功能构象。此结果与 SASA 分析结果契合。

3.3.3 氢键分析 氢键的数量是评价蛋白质结构稳定性和分子间相互作用强度的重要参数。甘草酸及钙离子与凝集素蛋白形成复合物在模拟期间的氢键变化分析,见图 6。结果显示,甘草酸与凝集素蛋白相互作用的氢键数量在 150~180 个,整体保持稳定,偶尔短暂接近 190 个;钙离子与凝集素蛋白的相互作用导致氢键数量起初波动较大,但随着模拟时间的推进,氢键数量逐渐增加,并最终稳定在 190 个左右;而甘草酸及钙离子与凝集素蛋白形成复合物表现出较高的稳定性,氢键数量在 160~180 个波动,整体波动幅度较小。说明甘草酸与凝集素蛋白的结合有助于维持其复合物氢键网络的稳定性,而钙离子单独结合时凝集素蛋白结构在初期经历了不稳定性,而在后期随氢键网络的增强导致凝集素蛋白自身收缩或构象重排。此外,当甘草酸与钙离子共同与凝集素蛋白结合时,在模拟后期凝集素蛋白

图 5 甘草酸、钙离子、凝集素蛋白相互作用的 R_g 变化Fig. 5 R_g changes of the interactions of glycyrrhizinic acid, calcium ions, and lectin proteins

内部的氢键数量有所增加,有助于维持凝集素蛋白形成复合物结构的长期稳定性。

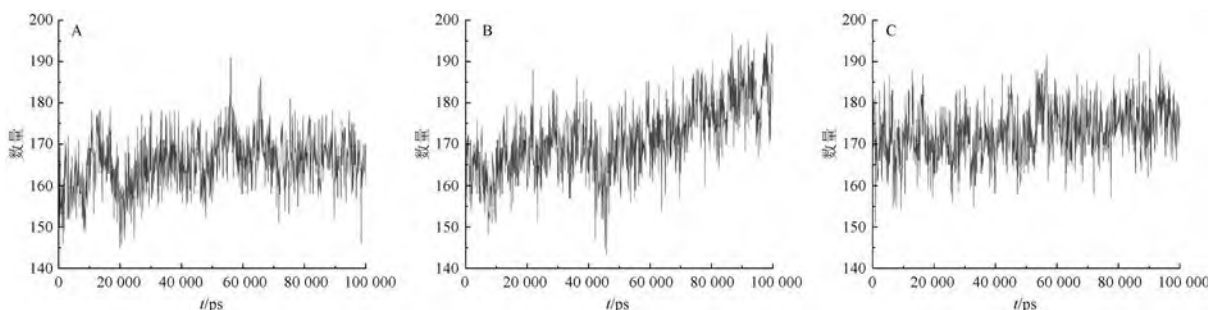


图 6 甘草酸、钙离子、凝集素蛋白相互作用的氢键变化

Fig. 6 Hydrogen bond changes of the interactions of glycyrrhizinic acid, calcium ions, and lectin proteins

3.3.4 结合自由能分析 甘草酸及钙离子与凝集素蛋白结合后的自由能变化分析,见图 7。在甘草酸与凝集素蛋白结合体系中,其气相自由能(ΔG_{GAS})、溶剂化自由能(ΔG_{SOLV})和总结合自由能(ΔT_{TOTAL})分别为 250.13、-258.04、-7.91 kcal·mol⁻¹。在甘草酸及钙离子与凝集素蛋白结合体系中, ΔG_{GAS} 增加至 318.98 kcal·mol⁻¹,而 ΔG_{SOLV} 及 ΔT_{TOTAL} 分别降低至 -336.67、-17.69 kcal·mol⁻¹。钙离子的存在显著增强甘草酸与凝集素蛋白之间的相互作用,提高其复合物的溶剂化稳定性。在无甘草酸条件下,钙离子与凝集素蛋白结合体系中, ΔG_{GAS} 、 ΔG_{SOLV} 、 ΔT_{TOTAL} 分别为 -746.93、766.24、19.31 kcal·mol⁻¹;而在加入甘草酸后的结合体系中, ΔG_{GAS} 增加至 -698.58 kcal·mol⁻¹,而 ΔG_{SOLV} 、 ΔT_{TOTAL} 分别降低至 714.50、15.93 kcal·mol⁻¹。结果表明,在气相环境中,钙离子与凝集素蛋白间存在较强的相互作用,但引入甘草酸配体后,其结合强度呈现轻微减弱趋势。值得注意的是,甘

草酸的存在同时降低了钙离子与凝集素蛋白相互作用形成复合物的溶剂化效应,表明甘草酸配体可能通过竞争性结合或空间位阻改变了离子溶剂界面特性。尽管气相条件下钙离子与凝集素蛋白的直接作用占优,但经溶剂化自由能校正后,体系总结合自由能呈现正值,这提示溶剂化效应在热力学平衡中起关键抵消作用。说明,甘草酸的存在在一定程度上缓解钙离子与凝集素蛋白形成复合物溶剂化作用的负面影响,促使三者结合更为有利。

3.4 相互作用分析

3.4.1 甘草酸及钙离子与凝集素蛋白的相互作用

在无钙离子存在条件下,对甘草酸与凝集素蛋白的相互作用进行分析,见图 8。在蛋白结构中,参考已报道的含有甘露糖结合位点的凝集素基因序列即红色高亮的氨基酸残基,包括 51~56、170~175 和 232~237 位,是本次模拟分析重点关注的关键区域,它们在甘草酸结合过程中可能发挥重要作用^[34]。结果显示,紫色标识的氨基酸残基直接与甘草酸相

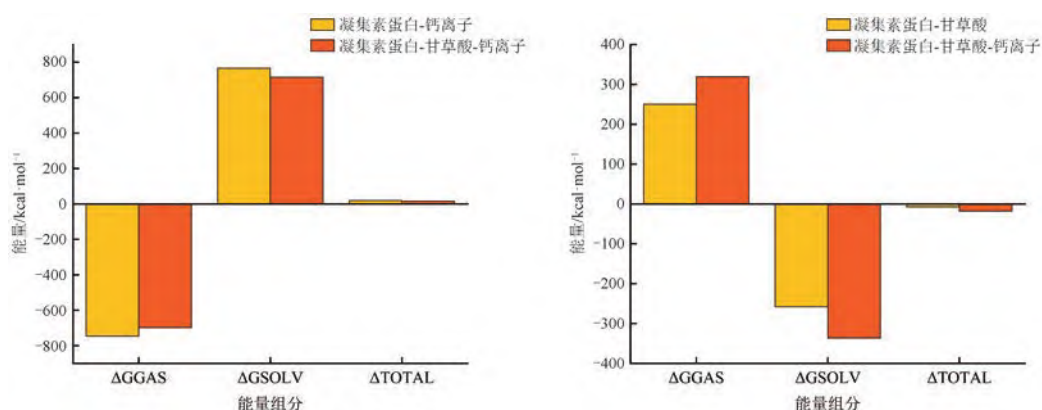
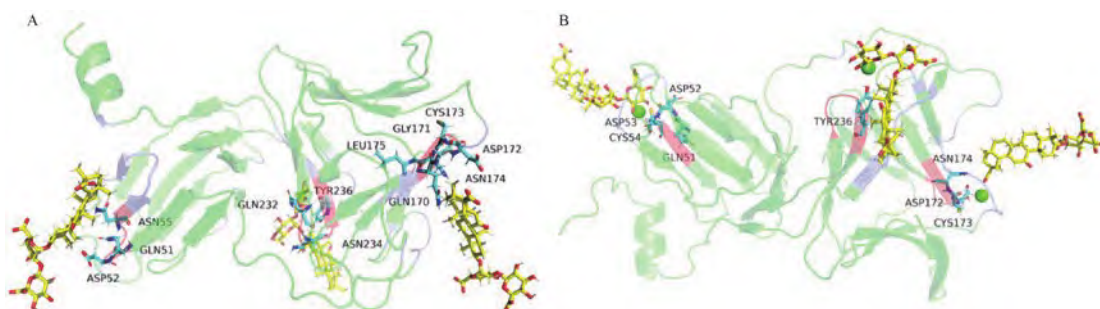


图 7 甘草酸、钙离子、凝集素蛋白相互作用的结合自由能变化

Fig. 7 Binding free energy changes of the interactions of glycyrrhizinic acid, calcium ions, and lectin proteins

互作用,其中青色棍棒模型特别标注了那些既与甘草酸有相互作用又是重点关注的氨基酸残基,例如 GLN51、ASN55、GLY171、CYS173 等,它们通过氢键

或疏水相互作用与甘草酸形成紧密结合。图中以黄色标识甘草酸分子,其复杂的分子结构以及在蛋白结合口袋内的空间定位清晰可见。



A. 无钙离子;B. 有钙离子(图 9 同)。

图 8 甘草酸、钙离子、凝集素蛋白之间的相互作用分析

Fig. 8 Interactions of glycyrrhizinic acid, calcium ions, and lectin proteins

在有钙离子参与条件下,对甘草酸及钙离子与凝集素蛋白的相互作用进行分析,见图 8。紫色标识的氨基酸残基直接与甘草酸相互作用,其中青色的棍棒模型标注了与甘草酸有直接作用的氨基酸关键残基,如 GLN51、ASP52、CYS54、ASP53、TYR236、ASN174 和 ASP172 等。它们通过氢键和疏水相互作用与甘草酸结合,增强了分子间的稳定性。图中以绿色小球标识钙离子,位于凝集素蛋白和甘草酸分子之间。结果表明,钙离子在该相互作用中作为连接甘草酸和凝集素蛋白的关键角色,引入后可能会增强甘草酸与凝集素蛋白的相互作用,维持形成复合物的稳定性和功能。

3.4.2 氨基酸残基的相互作用分析 分析凝集素

蛋白氨基酸残基在有无钙离子条件下与甘草酸的相互作用,见图 9。结果显示,在无钙离子条件下,凝集素蛋白氨基酸残基 51~56、170~175 和 232~237 位与甘草酸的相互作用数量在特定时间点出现峰值,但大部分时间相互作用较少。相比之下,在有钙离子参与条件下,甘草酸与这些区域的相互作用数量显著增加,且在较长时间内维持高水平。结果表明,钙离子的存在显著增强甘草酸与凝集素蛋白的相互作用,提高了结合频率和复合物的稳定性。特别是在钙离子存在时,氨基酸残基 232~237 位的相互作用数量较无钙体系显著增加,且呈现出高结合态势,提示该区域在结合过程中发挥关键作用。

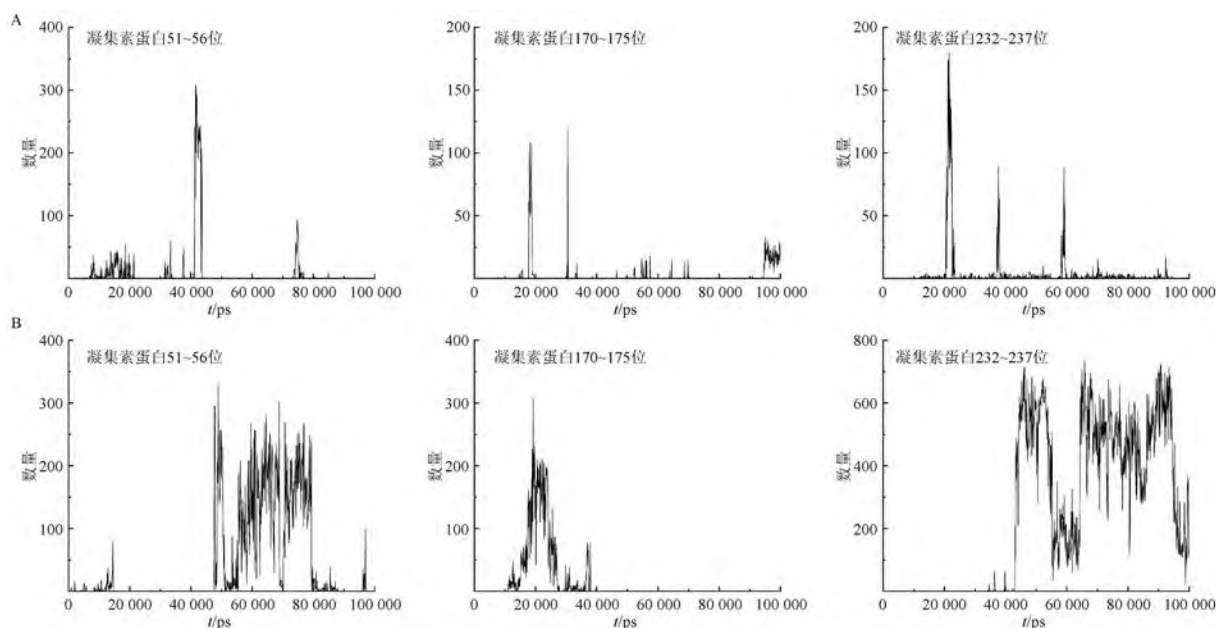


图9 甘草酸、钙离子、凝集素蛋白中不同区域的氨基酸残基之间的相互作用分析

Fig. 9 Interactions of glycyrrhizic acid, calcium ions, and lectin proteins in different regions of amino acid residues

3.4.3 相互作用能分析 分析凝集素蛋白与甘草酸及钙离子间的相互作用能,见表3。在有无钙离子参与条件下,甘草酸与凝集素蛋白形成复合物体系中的库仑相互作用(Coul-SR)均为负值,显示出电荷吸引作用,此吸引作用在钙离子参与后显著增强。短程相互作用(LJ-SR)同样在有无钙离子参与条件下,甘草酸与凝集素蛋白形成复合物体系中为负值,表明范德华吸引作用的存在,且在引入钙离子后显示出增强,同时促进了凝集素蛋白与甘草酸配体的紧密结合。此外,在有无甘草酸参与条件下,对于钙离子与凝集素蛋白形成复合物体系中的Coul-SR均为负值,显示出强烈的电荷吸引,且在无甘草酸条件下更为显著。尽管LJ-SR在钙离子与凝集素蛋白形成复合物体系中显示为正值,表明存在一定排斥作用,但这种作用相对较小,不足以抵消库仑吸引。在甘草酸及钙离子与凝集素蛋白形成复合物体系中,钙离子对凝集素蛋白与甘草酸配体结合的增强作用明显,特别是在范德华相互作用方面,促使其三者结合整体更为稳定。

3.5 二级结构分析

甘草酸及钙离子与凝集素蛋白相互作用对其蛋白二级结构(如 α -螺旋、 β -折叠、转角、无规则卷曲等)的影响,见图10。无论是加入甘草酸配体还是

表3 各体系中的相互作用能数据

相互作用	对象	甘草酸	钙离子	甘草酸-钙离子
库仑	甘草酸	-150.96	-	-157.05
	钙离子	-	-604.03	-401.59
短程	甘草酸	-50.47	-	-71.11
	钙离子	-	42.54	25.77

钙离子,无规则卷曲和 β -折叠等主要二级结构在3种体系中均保持稳定,说明它们对凝集素蛋白整体结构的影响有限。尽管甘草酸及钙离子与凝集素蛋白形成复合物体系中 α -螺旋数量的轻微减少以及弯曲(Bend)和转角(Turn)结构的波动,提示钙离子可能引起凝集素蛋白自身局部结构的微小变化,但不会显著破坏其整体二级结构稳定性。

3.6 动态可视化分析

基于分子对接结果,选取甘草酸和钙离子与凝集素蛋白结合的最优构象进行分子动力学模拟分析,并从100 ns内每隔20 ns抽取一帧观察其结合状态。整个模拟过程中甘草酸及钙离子均未脱离蛋白活性区域,说明甘草酸及钙离子与凝集素蛋白具有较高的结合稳定性,能够稳定结合。在甘草酸与凝集素蛋白形成复合物体系中,甘草酸可能通过其特定的化学基团与凝集素蛋白的活性位点形成氢键

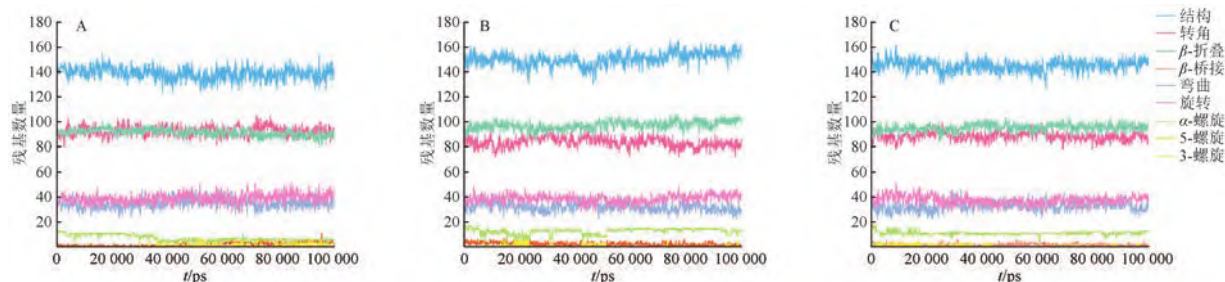


图 10 甘草酸、钙离子、凝集素蛋白二级结构的影响

Fig. 10 Effects of glycyrrhizic acid and calcium ions on the secondary structure of lectin proteins

或其他类型的相互作用,从而影响蛋白的构象和功能;在钙离子与凝集素蛋白形成复合物体系中,钙离子可能通过其高电荷密度与凝集素蛋白的特定区域形成离子键,对蛋白的稳定性和构象产生显著影响。同时钙离子的存在可能增强了蛋白的某些区域的刚性,或者诱导了构象变化;在甘草酸及钙离子共同与凝集素蛋白形成复合物体系中,甘草酸和钙离子可能在凝集素蛋白的不同区域或者同一区域发挥作用,它们的相互作用可能导致蛋白构象发生更复杂的变化。模拟显示,在甘草酸和钙离子共同作用下,凝集素蛋白形成的复合物整体结构更倾向于稳定,复合物结构变化见中国知网本文增强出版附加材料。

3.7 重组蛋白的表达纯化

以半夏凝集素基因为研究对象,通过大肠杆菌原核表达系统制备获得野生型凝集素蛋白 11.10 mg,突变型凝集素蛋白 5.72 mg;SDS-PAGE 显示两者表观相对分子质量约 25 kDa(实际 12 kDa),推测由翻译后修饰或二聚体形成导致,见图 11。

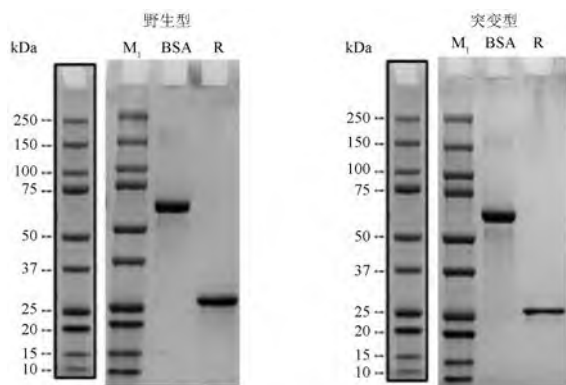
M₁: 蛋白质相对分子质量标准;BSA: 牛血清白蛋白;R: 还原剂。

图 11 半夏凝集素重组蛋白条带图

Fig. 11 SDS-PAGE profile of recombinant lectin proteins of *Pinelliae Rhizoma Praeparatum*

3.8 重组蛋白与甘草酸及钙离子的相互作用

野生型和突变型凝集素蛋白与甘草酸及钙离子的解离曲线见中国知网本文增强出版附加材料,亲和动力学参数结果见表 4、5。结果显示,野生型凝集素蛋白分别与甘草酸及钙离子结合时,其亲和动力学参数 K_D 分别为 1.06×10^{-5} 、 $1.20 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,显示出较强的亲和力。当甘草酸及钙离子与野生型凝集素蛋白共同结合时,其 K_D 为 $8.10 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,表明三者结合具有更强的亲和力。此外,与野生型凝集素蛋白相比,突变型凝集素蛋白与甘草酸结合时,形成的二元复合物 K_D 为 $1.19 \times 10^3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,显示出极低的亲和力;突变型凝集素蛋白与钙离子结合时,形成的二元复合物 K_D 为 $1.04 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,显示出较低的亲和力。突变型凝集素蛋白与甘草酸及钙离子同时结合时,形成的三元复合物 K_D 为 $3.25 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,显示出较低的亲和力。结果表明,野生型凝集素蛋白与甘草酸及钙离子共同相互作用时,其结合亲和力显著高于野生型凝集素蛋白与甘草酸及钙离子形成的二元复合物以及突变型凝集素蛋白与甘草酸及钙离子形成的三元复合物。结果表明,野生型凝集素蛋白与甘草酸及钙离子的相互作用更强,其形成的超分子复合物结构更为稳定。

3.9 甘草酸及钙离子与凝集素蛋白复合物的致炎毒性评价

采用家兔眼结膜刺激模型进行评价甘草酸及钙离子与凝集素蛋白形成超分子自组装复合物的致炎毒性,见表 6。与淀粉对照组相比,单用凝集素蛋白、甘草酸溶液浸泡的凝集素蛋白、钙离子溶液浸泡的凝集素蛋白以及甘草酸及钙离子混合溶液共同浸泡的凝集素蛋白组均对家兔眼结膜无显著刺激;与毒针晶组相比,单用毒针晶组对家兔眼结膜刺激明

表 4 BLI 检测野生型凝集素蛋白与甘草酸及 pH>12 钙离子的分子动力学

Table 4 Molecular dynamics of wild-type lectin proteins with glycyrrhizic acid and calcium ions at pH>12 detected by BLI

作用类别	分析物/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	响应值	$K_D/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	full χ^2	full R^2
野生型凝集素蛋白-甘草酸	0.63	-0.015 5	1.06×10^{-5}	2.448 2	0
	1.25	-0.044 9			
	2.5	-0.003 2			
	5	0.041 8			
	10	-0.000 8			
	20	0.004 2			
野生型凝集素蛋白-钙离子	0.5	-0.192 6	1.20×10^{-5}	8 637.812 3	0.639 1
	1	-0.202 1			
	2	-1.815 0			
	4	5.452 6			
	8	6.417 2			
	16	6.507 0			
野生型凝集素蛋白-甘草酸-钙离子	0.5	0.100 3	8.10×10^{-6}	2 974.518 3	0.860 7
	1	0.197 4			
	2	1.423 2			
	4	5.508 3			
	8	7.709 8			
	16	8.678 3			

表 5 BLI 检测突变型凝集素蛋白与甘草酸及 pH>12 钙离子的分子动力学

Table 5 Molecular dynamics of mutant lectin proteins with glycyrrhizic acid and calcium ions at pH>12 detected by BLI

作用类别	分析物/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	响应值	$K_D/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	full χ^2	full R^2
突变型凝集素蛋白-甘草酸	0.63	-0.005 1	1.19×10^3	0.028 2	0
	1.25	-0.002 8			
	2.5	-0.000 1			
	5	-0.001 0			
	10	-0.000 1			
	20	-0.000 9			
突变型凝集素蛋白-钙离子	0.5	0.010 4	1.04×10^{-2}	41.042 5	0.680 7
	1	0.014 6			
	2	-0.177 0			
	4	-0.091 4			
	8	0.156 0			
	16	0.669 8			
突变型凝集素蛋白-甘草酸-钙离子	0.5	0.003 2	3.25×10^{-3}	75.248 9	0.653 5
	1	0.004 3			
	2	-0.096 1			
	4	-0.095 5			
	8	0.062 0			
	16	1.005 8			

显,而凝集素蛋白与毒针晶组显著加剧家兔眼结膜刺激;与凝集素蛋白及毒针晶组相比,单用甘草酸及钙离子溶液浸泡的凝集素蛋白以及甘草酸及钙离子混合溶液共同浸泡的凝集素蛋白在加入毒针晶后,对家兔眼结膜刺激显著减轻,且以甘草酸及钙离子混合溶液共同浸泡的凝集素蛋白及毒针晶组最为明

显。结果表明,甘草酸及钙离子混合溶液浸泡的凝集素蛋白形成的超分子复合物无显著刺激性,提示在法半夏炮制过程中甘草汁中的甘草酸及石灰水的钙离子以协同作用易与半夏毒性成分凝集素蛋白形成结构更为稳定而无毒性的超分子复合物而发挥炮制解毒作用。

表6 家兔眼结膜刺激评分($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 6 Conjunctival irritation scores in rabbits($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	平均得分
空白	0
淀粉对照	0
凝集素蛋白	0.41±0.23 ¹⁾
毒针晶	11.50±0.19 ¹⁾
凝集素蛋白+毒针晶	14.07±0.28 ¹⁾
凝集素蛋白+甘草酸	0.73±0.33
凝集素蛋白+钙离子	0.62±0.17
凝集素蛋白+甘草酸+钙离子	0.58±0.11
凝集素蛋白+甘草酸+毒针晶	13.93±0.26 ^{2,3)}
凝集素蛋白+钙离子+毒针晶	13.65±0.34 ^{2,3)}
凝集素蛋白+甘草酸+钙离子+毒针晶	12.05±0.13 ^{2,3)}

注:与淀粉对照组比较¹⁾ $P<0.05$;与毒针晶组比较²⁾ $P<0.05$;与凝集素蛋白+毒针晶组比较³⁾ $P<0.05$ 。

4 讨论

半夏中毒性成分凝集素蛋白具有显著的刺激性致炎毒性,炮制后其毒性显著下降是否与炮制过程中炮制辅料与凝集素蛋白的相互作用有关,是阐述半夏炮制解毒机制的关键。历版《中国药典》规定,法半夏以 $\text{pH}>12$ 的石灰水与甘草汁共浸,至剖面黄色均匀而制备^[1]。前期研究发现^[6,35],甘草汁与石灰水共同浸泡半夏可促使其辅料来源的甘草酸和钙离子与毒性成分凝集素蛋白产生自组装聚合行为,形成超分子复合物聚集体而沉淀。本研究发现,甘草酸及钙离子能够分别与凝集素蛋白通过锚定凝集素蛋白的51~56、170~175和232~237位氨基酸残基段关键结合位点,抑制其与凝集素蛋白表面受体的结合位点暴露而产生相互作用,形成结构稳定的三元超分子复合物结构,提示钙离子可能作为“分子桥梁”,通过库仑相互作用增强甘草酸与凝集素蛋白的电荷互补协同效应,此作用符合由非共价键相互作用形成的超分子自组装模型^[36],BLI证实甘草酸及钙离子与凝集素蛋白以相互作用形成超分子复合物的稳定结构。家兔眼结膜刺激模型结果显示,甘草酸及钙离子溶液共同浸泡凝集素蛋白形成的超分子复合物对家兔眼结膜无显著刺激性。结果证实,甘草酸和钙离子在法半夏炮制过程中通过协同作用形成了无毒性的超分子复合物,从而有效降低了凝集素蛋白的致炎毒性,进一步说明甘草酸和钙离子在法半夏炮制过程中的协同解毒作用。

传统观点认为,中药炮制解毒主要通过破坏毒性成分化学结构而实现解毒,而本研究更注重炮制

过程中辅料成分与中药成分间的物理化学非共价键相互作用,为从超分子自组装角度阐释中药炮制解毒机制提供了新视角。值得注意的是,这种非共价键相互作用形成的超分子复合物在体内外环境中具有一定的动态平衡特性,其稳定性可能受 pH 、离子强度等因素影响。法半夏炮制过程受强碱环境($\text{pH}>12$)及钙离子等因素的影响,其毒性成分凝集素蛋白极易发生降解成多肽类成分并出现再组装过程。未来,仍需进一步研究法半夏炮制解毒过程可能涉及的炮制辅料持续作用下凝集素蛋白超分子复合物的解离与再组装规律,探索评估其在胃肠道环境中的稳定性及对毒性成分释放的调控作用。本研究旨在为阐明法半夏的炮制解毒机制,推动法半夏炮制工艺优化及产业化发展提供科学支撑。同时,本研究亦为“甘草调和诸药”及“石灰解毒”的传统中医药理论阐释提供了新的科学见解,也进一步证实以传统复制法工艺选择辅料甘草汁及 $\text{pH}>12$ 的石灰水炮制法半夏的科学性和合理性。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2025: 127.
- [2] 程砚秋, 郁红礼, 吴皓, 等. 半夏不同炮制品刺激性毒性变化及凝集素蛋白检测研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(17): 4627.
- [3] 崔美娜, 钟凌云, 张大永, 等. 中药半夏复制法炮制的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(6): 1304.
- [4] 修彦凤, 王智华, 洪筱坤. 半夏毒性的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(5): 304.
- [5] 刘先琼. 天南星科有毒中药凝集素蛋白与毒性的相关性研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2012.
- [6] 陶兴宝, 吴皓. 石灰水炮制半夏对毒性成分凝集素蛋白的影响研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(4): 951.
- [7] 李书晖, 郁红礼, 吴皓, 等. 法半夏炮制过程对半夏中毒蛋白凝集素蛋白的影响[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(11): 2546.
- [8] 吴皓, 钟凌云, 李伟, 等. 半夏炮制解毒机制的研究 I [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(14): 1402.
- [9] 陶兴宝. 法半夏炮制解毒机制、化痰效应及相关物质基础研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2022.
- [10] 胡静雯, 贾国香, 董亚倩, 等. 从中药全过程视角探析纳米颗粒自组装行为及应用[J]. 中草药, 2022, 53(22): 7307.
- [11] 王蕾, 曹雪晓, 栗焕焕, 等. 中药化学成分分子识别与自组在中药研究中的应用[J]. 中草药, 2020, 51(2): 516.
- [12] ZHAO Q, LUAN X, ZHENG M. Synergistic mechanisms of constituents in herbal extracts during intestinal absorption: focus on natural occurring nanoparticles[J]. Pharmaceutics, 2020, 12

- (2): 128.
- [13] 宋金菁, 齐天昊, 岳伟胜, 等. 基于中药汤剂中超分子聚集体形成的炮制机制研究新思路[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(18): 5102.
- [14] 罗子宸, 张雯, 杨瑞, 等. 甘草“调和诸药”生物药剂学机制的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(1): 267.
- [15] ZELIKMAN M V, KIM A V, MEDVEDEV N N, et al. Structure of dimers of glycyrrhizic acid in water and their complexes with cholesterol: molecular dynamics simulation[J]. J Struct Chem, 2015, 56(1): 67.
- [16] POLYAKOV N E. Glycyrrhizic acid as a novel drug delivery vector: synergy of drug transport and efficacy[J]. Open Conf Proc J, 2011, 2(1): 64.
- [17] ROY R, AL-HASHIMI H M. AlphaFold3 takes a step toward decoding molecular behavior and biological computation[J]. Nat Struct Mol Biol, 2024, 31(7): 997.
- [18] WEE J, WEI G W. Benchmarking AlphaFold3's protein-protein complex accuracy and machine learning prediction reliability for binding free energy changes upon mutation[EB/OL]. [2025-06-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38883239/>.
- [19] 刘小赞, 潘敬灵, 梁玉婷, 等. 基于分子对接及分子动力学模拟的中药来源 II 型 5 α -还原酶抑制剂筛选[J]. 中草药, 2020, 51(10): 2819.
- [20] EBERHARDT J, SANTOS-MARTINS D, TILLACK A F, et al. AutoDock Vina 1.2.0: new docking methods, expanded force field, and python bindings[J]. J Chem Inf Model, 2021, 61(8): 3891.
- [21] TROTT O, OLSON A J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. J Comput Chem, 2010, 31(2): 455.
- [22] 周映伽, 刘佳铭, 刘滨, 等. 基于生物信息学、分子对接与细胞实验探究 C5orf46 高表达在胃癌中的意义及潜在的中药干预[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(9): 2368.
- [23] 江威, 赵秋萍, 黄琳, 等. 基于网络药理学、分子对接和实验验证探讨加味活络效灵丹干预结直肠癌的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(13): 3657.
- [24] MORRIS G M, HUEY R, LINDSTROM W, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility[J]. J Comput Chem, 2009, 30(16): 2785.
- [25] HUANG J, MACKERELL A D. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data[J]. J Comput Chem, 2013, 34(25): 2135.
- [26] HUANG J, RAUSCHER S, NAWROCKI G, et al. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins[J]. Nat Methods, 2017, 14(1): 71.
- [27] 吉冰洁, 李尚校, 王俭, 等. 基于分子对接和分子动力学模拟技术筛选 SARS-CoV-23CL 蛋白酶抑制剂[J]. 沈阳药科大学学报, 2023, 40(8): 1069.
- [28] 李泽飞, 王平. 基于分子对接与分子动力学模拟探讨生慧颗粒有效成分对 γ 氨基丁酸 A 型受体与乙酰胆碱酯酶的作用机制[J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(1): 157.
- [29] 王卫. 天南星科 4 种有毒中药凝集素蛋白促炎作用机制及炮制的影响[D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [30] 高永, 杨支力, 李东海, 等. 半夏凝集素结构预测分析[J]. 浙江理工大学学报, 2015, 33(3): 269.
- [31] 李东海. 半夏组培优化, PTA 保守结构域研究及转 PTA 浮萍的构建[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2017.
- [32] 王卫, 毛善虎, 单雪莲, 等. 基于 ROS/NF- κ B 信号通路的天南星凝集素致炎机制及炮制对蛋白的影响[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(5): 1740.
- [33] 国家食品药品监督管理局. 药物研究技术指导原则 2005 年[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2006.
- [34] 赵欢. 半夏属植物凝集素和拟南芥 SWI-SNF 相关的染色体结合蛋白基因的鉴定及功能研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
- [35] 陶兴宝, 曹纬国, 吴皓. 甘草汁炮制半夏对毒性成分凝集素蛋白的影响[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(5): 2245.
- [36] 吴淑洋, 杨晓琴, 成威键, 等. 葛根芩连汤成分间自组装纳米粒改善伊立替康所致肠毒性作用研究[J]. 中草药, 2024, 55(12): 3987.

[责任编辑 孔晶晶]