

基于中草药数据库细菌群体感应抑制剂的虚拟筛选

张燎原 陈立志 闫潞锋 胡开辉*

(福建农林大学 生命科学学院 生物农药与化学生物学教育部重点实验室 福建 福州 350002)

摘要: 研究表明微生物致病性在很大程度上受到群体感应系统的调控, 筛选群体感应系统抑制剂被认为是解决微生物致病性的有效方法之一。以铜绿假单胞菌群体感应系统受体蛋白 RhlR 为研究对象, 通过蛋白建模模拟了 RhlR 蛋白的空间高级结构, 在此基础上运用药物虚拟筛选的方法, 从中草药小分子数据库(TCM) 中筛选出 10 个与 RhlR 结合较好的化合物, 并对其中 2 个化合物(穿心莲内酯和绿原酸) 进行了活性测定, 结果表明穿心莲内酯和绿原酸均具有较好的抑制群体感应系统活性。

关键词: 群体感应; 抑制剂; 铜绿假单胞菌; 虚拟筛选; 中草药数据库

中图分类号: Q939.11⁺² 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)05-0948-06

Virtual Screening for Quorum Sensing Inhibitors from the TCM Database

ZHANG Liao-yuan, CHEN Li-zhi, YAN Lu-feng, HU Kai-hui*

(College of Life Science, Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The pathogenicity of the pathogen microorganism is regulated partially by microbial quorum sensing (QS), while the screening of QS inhibitors (QSIs) is regard as an effective strategy to solve this problem. In this study, 3D structural model of RhlR (Quorum sensing receptor protein) from *Pseudomonas aeruginosa* was simulated by homology modeling with Modeller 9v8. A virtual screening method was employed to screening QSIs from the TCM database based on the simulated 3D structure of RhlR. Ultimately, ten potential QSIs were obtained according with the docking scores. And two compounds (Andrographolide and Chlorogenic acid) of them were selected for inhibition activities of QS. The results revealed that andrographolide and chlorogenic acid exhibited good QS inhibition activities.

Key words: quorum sensing; inhibitor; *Pseudomonas aeruginosa*; virtual screening; TCM database

长久以来, 使用抗生素是人类对付致病菌感染的有效方法, 然而伴随抗生素的广泛使用, 越来越多的致病菌对抗生素产生了耐药性, 因此, 开发新的抗生素和建立新的治疗模式是十分必要的^[1-2]。目前认为, 最有前景的治疗策略应是不致死微生物细胞而仅消弱病原菌的致病毒性, 该策略不威胁病原菌自身的生存因而不会引起耐药性问题^[3-4]。近来的研究发现, 病原菌的致病性是由一种密度依赖的群体感应系统(Quorum Sensing) 调控, 群体感应系统通过介导致病基因的表达以实现其致病性^[5-6]。此外,

收稿日期: 2012-02-20 修回日期: 2012-04-22

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2011J05048) 和福建省教育厅 A 类科技项目(JA11089)

作者简介: 张燎原(1979—), 男, 讲师, 博士, 主要从事工业微生物代谢调控研究, E-mail: zliaoyuan@126.com。

群体感应系统还调控病原菌生物被膜(biofilm)的形成,从而提高其耐药性^[7]。该系统的调控机制为开发新型抗生素提供了新的靶点,寻找高效的群体感应系统受体蛋白抑制剂将有望实现对病原菌致病性和生物被膜的控制^[8]。

卤化呋喃是首个被发现而且也是目前为止普遍认可的群体感应系统抑制剂,该抑制剂来源于一种海洋红藻(*D. pulchra*),能阻断多种细菌的群体感应系统,使细菌不能在*D. pulchra*表面产生群聚和形成生物膜,然而由于其具有一定毒性,在治疗方面仍然存在诸多问题^[9]。Zhu等^[8,10]从食用真菌黑木耳和银耳子实体中提取到具有抑制群体感应系统的物质,而Bosgelmez等^[11]从洋葱中也提取到了具有群体感应系统抑制效果的活性物质。此外,在许多植物,如胡萝卜、大豆、番茄、黄姜、红辣椒和大蒜中也发现有类似的群体感应系统抑制活性物质^[12-14]。这些抑制剂的发现为抑制群体感应系统达到减弱病原菌致病性的研究提供了许多依据。然而,上述研究更多地停留在各种真菌或植物粗提物上来考察抑制活性,很少有分离出具体的化合物,这阻碍了群体感应系统抑制剂的开发和应用,究其原因主要为群体感应抑制剂含量低、筛选工作量大以及分离纯化困难等。因此,建立新的方法来筛选具有高活性群体感应系统抑制剂对于提高筛选效率和降低工作量将具有重要意义。

我们建立了分子对接虚拟筛选群体感应抑制剂方法,模拟了铜绿假单胞菌群体感应系统受体蛋白RhlR的空间高级结构,选择安全性较高的中草药小分子数据库作为筛选库,最终筛选出10个与RhlR结合较好的小分子化合物,并对其中2个化合物(穿心莲内酯和绿原酸)中进行了活性测定,结果表明两个化合物具有较好的群体感应抑制活性。

1 材料与方法

1.1 材料

计算机,生物数据库,如NCBI,PDB等;软件:Modeller9v8,UCSF Chimera,PROCHECK,UltraEdit,ICM-DOCK,Swiss-pdb Viewer等;供本项目分析的RhlR蛋白氨基酸序列来源于NCBI(登录号为:AAC44036);供虚拟筛选的中草药小分子数据库来源于中科院化学专业数据库;紫色杆菌CV026检测菌,穿心莲内酯和绿原酸标品(纯度大于95%),信号分子标品(Sigma公司),卡那霉素(Sigma公司),其他化学试剂均为分析纯。

1.2 培养基

LB培养基(g/L):蛋白胨10;酵母粉5;氯化钠5;pH7.0。

LB固体培养基(g/L):蛋白胨10;酵母粉5;氯化钠5;琼脂15;pH7.0。

1.3 方法

1.3.1 RhlR蛋白结构建模 从NCBI数据库中下载RhlR蛋白的氨基酸序列,在软件Modeller9n8环境下进行手动建模,获得5个预测模型,采用PROCHECK程序对5个所建模型进行评价,验证模型的质量。

1.3.2 抑制剂的虚拟筛选 从中草药小分子数据库中下载现有的小分子化合物(共4万多个),以sdf格式存储,用UltraEdit软件对下载下来的小分子化合物进行分割,共分割为24个文件,每个文件中含有约2000个小分子化合物(以避免文件过大导致虚拟筛选过程中计算机运行时间过长)。在ICM-DOCK环境下运行dock模块,将RhlR1加上极性氢原子和赋予电荷,转换为ICM可识别格式,寻找底物结合口袋(pocket),分别对24个sdf文件进行虚拟筛选,并按照结合能能量最低原则进行排序,最终确定排名靠前的10个化合物作为候选化合物。

1.3.3 活性测定 紫色杆菌CV026指示菌用于检测抑制剂抑制群体感应系统活性。紫色杆菌CV026在LB液体培养基中进行活化,取1 mL活化后的菌液以及100 μ L信号分子(浓度为10 μ mol/L)与加热后冷却至40 $^{\circ}$ C左右的LB固体培养基(含20 μ g/mL卡那霉素)混合均匀,倒入预先灭菌好的平板中,培养基凝固后,用打孔器在平板中打孔,将用乙醇配制好的浓度为0.2 mg/mL的穿心莲内酯和绿原酸标品按10、20和30 μ L梯度加入至平板的孔中,以30 μ L乙醇作为空白对照。将平板封口后正置于30 $^{\circ}$ C培养箱中培养24 h,观察紫色杆菌CV026产紫色色素情况。

1.3.4 色素产量测定 将浓度为0.2 mg/mL穿心莲内酯和绿原酸标品按照体积梯度5、10、15、20、25和30 μ L加入至含有2 mL LB液体培养基(含20 μ g/mL卡那霉素)的试管中,以30 μ L乙醇作为对照,

培养 30 h 培养条件为: 30 °C 和 120 r/min 培养时间为 24 h。

将培养好的培养液离心, 去除上清液, 加入 2 mL 二甲基亚砷(DMSO), 重悬菌体, 使紫色色素充分溶解于 DMSO 中, 再次离心去除菌体。在 585 nm 条件下测定上清液中的紫色色素吸光值^[5]。

2 结 果

2.1 RhIR 蛋白的空间结构建模

在 Modeller9v8 环境下进行铜绿假单胞菌群体感应系统受体蛋白 RhIR 建模, 共获得 5 个模型, 采用 PROCHECK 分析程序对 5 个模型的质量进行评价, 结果如表 1 所示, 从表中可以看出拉氏图核心区 (core) 有 4 个模型超过 90%, 一般认为核心区超过 90%, 二面角(dihedral)、共价键(covalent)和角距(overall)的质量高于 -0.5 就认为模型比较可靠, 根据表 1 数据模型 RhIR1 和 RhIR2 质量较高, 考虑到 RhIR2 部分残基出现在不合理区(disallowed), 最终确定 RhIR1 为出发模型, 作为后续虚拟筛选的受体蛋白。

表 1 用 PROCHECK 程序评价目标模型的结果

Tab. 1 Quality of 3D structures checked by procheck program

模型 Models	拉氏图质量/% Ramachandran plot quality				效应系数 Goodness factor		
	核心区 Core	合理区 Allowed	次合理区 General	不合理区 Disallowed	二面角 Dihedrals	共价键 Covalent	角距 Overall
RhIR1	92.6	6.5	0.9	0	0.12	-0.20	0.00
RhIR 2	93.0	5.1	0.5	1.4	0.10	-0.22	-0.02
RhIR 3	90.2	8.4	0.9	0.5	0.17	-0.12	0.06
RhIR 4	89.3	9.8	0.9	0	0.06	-0.18	-0.03
RhIR 5	92.1	6.5	0.5	0.9	0.12	-0.24	-0.01

2.2 RhIR 蛋白空间结构的描述

如图 1 所示, RhIR 受体蛋白由两个结构域组成, 两个区域被一个裂缝分为 A 区域和 B 区域, A 区域由 7 个 α -螺旋和 5 个 β -折叠组成, 底物结合位点由其中 4 个 α -螺旋和 5 个 β -折叠组成, 该位点将作为抑制剂筛选的靶点进行后续的虚拟筛选, 而 B 区域由 4 个 α -螺旋组成, 根据相关文献报道, 推断为受体蛋白 RhIR 与被调控相关基因的启动子互相作用位点。

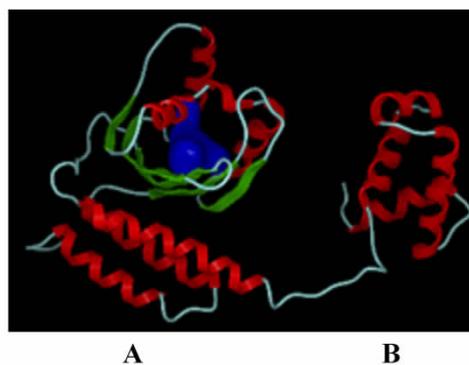


图 1 RhIR 受体蛋白空间结构

Fig. 1 3D structure of receptor protein RhIR

2.3 抑制剂的虚拟筛选

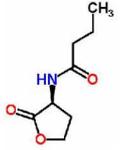
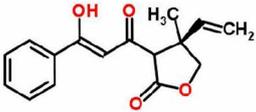
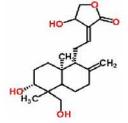
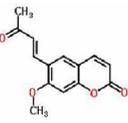
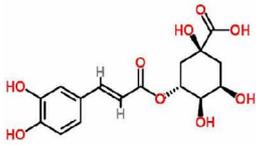
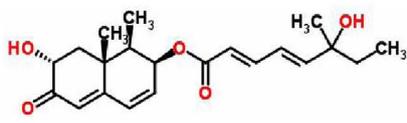
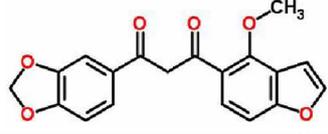
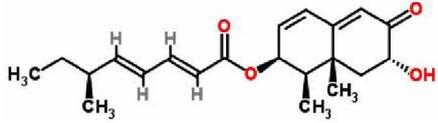
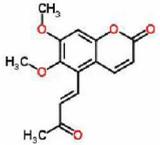
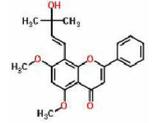
在 ICM-DOCK 环境下, 以信号分子 AHL 为对照, 对 4 万多个小分子进行虚拟筛选, 结果如表 2 所示, 共筛选出 10 个小分子化合物, 其中信号分子 AHL 的分数最低, 表明 AHL 为受体蛋白 RhIR 的最适底物, 而筛选获得的候选化合物与信号分子具有较为接近的能量, 有望成为信号分子 AHL 的竞争性抑制剂。这些化合物中穿心莲内酯和绿原酸已有商品化产品购买, 因此, 最终选择穿心莲内酯和绿原酸进行群体感应抑制活性验证。图 2 展示了穿心莲内酯和绿原酸分子与 RhIR 分子对接结果, 从图中可以看到两个化合物经对接后位于 RhIR 空间结构底物结合位点上, 其中穿心莲内酯与 RhIR 中残基 G46、T121 以及 V133 发生作用, 形成氢键, 而绿原酸与其中残基 G46、W68 和 S135 形成氢键。两个化合物均与 G46 互相作用形成氢键暗示 G46 在与底物发生作用过程中起较为重要的作用。

2.4 候选化合物的活性测定

在所筛选的候选化合物中, 选择市场上可以购买到的两种化合物(穿心莲内酯和绿原酸) 标品, 进

表2 虚拟筛选结果

Tab.2 Results of virtual screening

编号 Number	候选化合物结构 Structure of candidate compounds	分数 Scores
信号分子 AHL		-44.36
3-(3-羟基-3-苯基丙烯酰)-4-甲基-4-乙基-二氢呋喃-2(3H)-酮		-42.42
4-羟基-3-(2-((1R,4aS,5R,6R,8aS)-6-羟基-5-(羟甲基)-5,8a-二甲基-2-亚甲基-十氢萘-1-基)亚乙基)-二氢呋喃-2(3H)-酮 (穿心莲内酯)		-41.97
(E)-7-甲氧基-6-(3-羰基丁-1-烯基)-2H-色烯-2-酮		-41.97
(1S,3R,4R,5R,Z)-3-(3-(3,4-二羟基苯基)丙烯酰基氧基)-1,4,5-三羟基环己羧酸 (绿原酸)		-40.94
(R,2E,4E)-((1R,2R,7S,8aS)-7-羟基-1,8a-二甲基-6-羰基-1,2,6,7,8,8a-六氢萘-2-基) 6-羟基-6-甲基辛-2,4-二烯酸酯		-40.88
1-(苯并[d][1,3]二噁唑-5-基)-3-(4-甲氧基苯并呋喃-5-基)丙烷-1,3-二酮		-40.61
(S,2E,4E)-((1R,2S,7R,8aR)-7-羟基-1,8a-二甲基-6-羰基-1,2,6,7,8,8a-六氢萘-2-基) 6-甲基辛-2,4-二烯酸酯		-40.60
(E)-6,7-二甲氧基-5-(3-羰基丁-1-烯基)-2H-色烯-2-酮		-40.23
3,5,6-三羟基-2-(4-羟基苯基)-7-甲氧基-4H-色烯-4-酮		-40.06
(E)-8-(3-羟基-3-甲基丁-1-烯基)-5,7-二甲氧基-2-苯基-4H-色烯-4-酮		-39.98

行活性测定,活性测定由两种方法进行实施。平板测定法对穿心莲内酯标品进行定性活性测定,如图 3 所示,穿心莲内酯和绿原酸对指示菌紫色杆菌 CV026 均具有抑制紫色色素产生的效果,抑制圈随着穿心莲内酯和绿原酸加入量的增加而变大,而对照组没有出现类似的抑制圈,表明抑制圈的产生是两个化合物加入引起的。进一步可以看出抑制圈中紫色杆菌 CV026 的生长没有受影响,而只是色素不产生,这说明

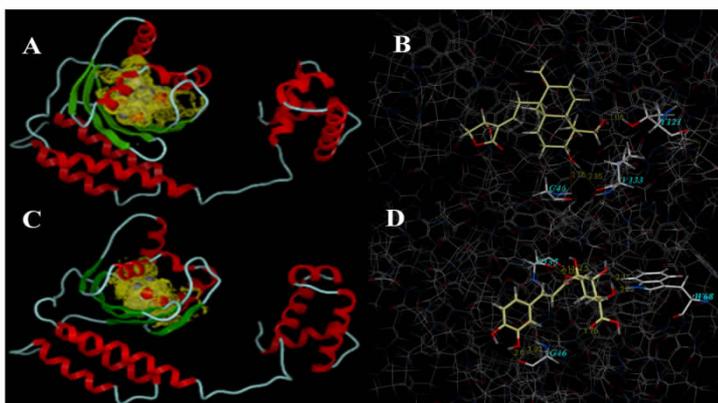
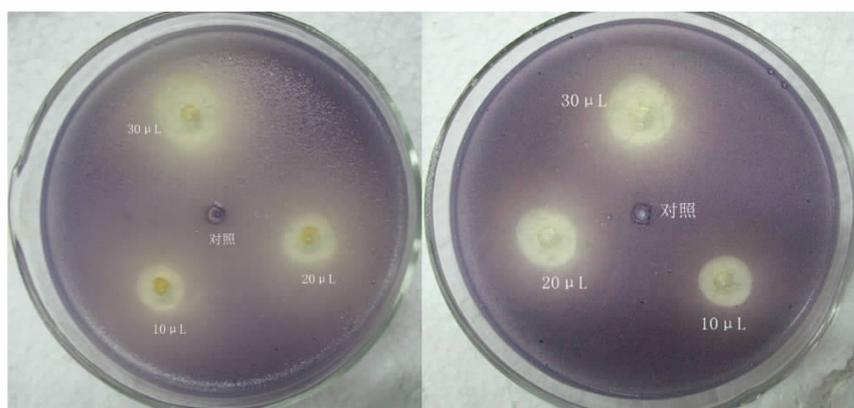


图 2 受体蛋白 RhIR 与穿心莲内酯 (A 和 B) 及绿原酸 (C 和 D) 分子对接示意图

Fig. 2 Molecular docking between receptor protein-RhIR and andrographolide (A and B) or chlorogenic acid (C and D)



穿心莲内酯 (andrographolide)

绿原酸 (chlorogenic acid)

图 3 穿心莲内酯和绿原酸抑制紫色杆菌 CV026 色素产生平板实验

Fig. 3 Inhibition of violacein production in *C. violaceum* CV026 by andrographolide and chlorogenic acid

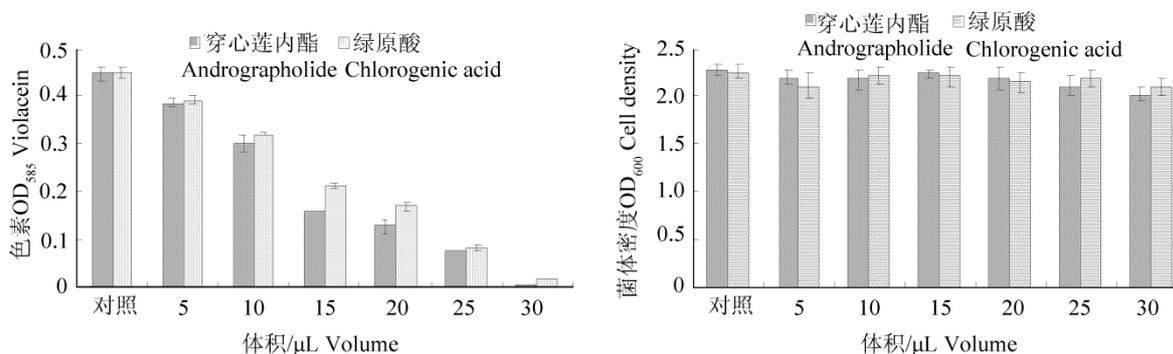


图 4 穿心莲内酯和绿原酸抑制紫色杆菌 CV026 色素产生试管实验

Fig. 4 Inhibition of violacein production in *C. violaceum* CV026 by andrographolide and chlorogenic acid

穿心莲内酯和绿原酸具有抑制群体感应系统的活性。为了进一步测定穿心莲内酯和绿原酸的抑制效果,在试管中进行了定量活性测定,如图 4 所示,随着穿心莲内酯和绿原酸浓度的增加,紫色杆菌 CV026 产生的紫色色素越来越少,而紫色杆菌 CV026 的生长在该过程中几乎没有受到影响,暗示两种化合物并非通过致死指示菌导致色素形成减少,而是通过与信号分子 AHL 竞争 RhIR 受体蛋白结合位点干扰色素的产生。

3 讨 论

研究表明病原菌的致病性在很大程度上受密度依赖型群体感应系统调控,通过控制群体感应系统来减弱病原菌的致病性已成为药物开发的一个靶标,其优势在于开发的新型抗生素具有减弱病原菌的致病性,而不是将病原菌直接杀死,因此可以避免病原菌对抗生素产生耐药性。目前,许多针对调控群体感应系统的抑制剂被发现,然而,到目前为止,卤化喹啉仍然是活性最高的抑制剂,但其毒性仍然需要进一步的考察,而其他报道的抑制剂更多的是植物或真菌的粗提物,并未获得具体的活性物质和结构。这更多的原因是粗提物中活性物质的含量低,分离纯化困难。因此,建立一高效的筛选方法将可加速这一方向的开发,本文建立了一种基于铜绿假单胞菌群体感应系统 RhlR 受体蛋白的虚拟筛选技术,同时考虑到中草药的在药物安全上有保障,最终在中草药数据库中筛选到 10 个具有群体感应抑制潜力的小分子化合物,并对其中的穿心莲内酯和绿原酸两个化合物进行了活性测定,结果表明穿心莲内酯和绿原酸均具有较高的抑制群体感应系统活性,暗示该技术在筛选群体感应抑制剂方面具有可行性。

参考文献:

- [1] Alanis A J. Resistance to antibiotics: are we in the post - antibiotic era [J]. Arch Med Res , 2005 , 36: 697 - 705.
- [2] 薛秀园, 张慧雯, 涂国全. 细菌对红谷霉素的耐药性检测 [J]. 江西农业大学学报 , 2006 , 28(6) : 927 - 932.
- [3] Von Bodman S B , Willey J M , Diggle S P. Cell - cell communication in bacteria: united we stand [J]. J Bacteriol , 2008 , 190: 4377 - 4391.
- [4] 邹珊珊, 宫倩红, 尹守亮 等. 铜绿假单胞菌群体感应抑制剂研究进展 [J]. 现代生物医学进展 , 2010 , 10(5) : 949 - 953.
- [5] Hentzer M , Givskov M. Pharmacological inhibition of QS for the treatment of chronic bacterial infections [J]. J Clin Invest , 2003 , 112: 1300 - 1307.
- [6] 杨彩云, 杜慈, 黄平 等. 重组 AiiA 蛋白可溶性表达及发酵条件优化 [J]. 江西农业大学学报 , 2011 , 33(6) : 1219 - 1227.
- [7] Davies D G , Parsek M R , Pearson J P et al. The involvement of cell - to - cell signals in the development of a bacterial bio-film [J]. Science , 1998 , 280: 295 - 298.
- [8] Zhu h , Sun S J. Inhibition of bacterial quorum sensing - regulated behaviors by *Tremella fuciformis* extract [J]. Curr Microbiol , 2008 , 57: 418 - 422.
- [9] Givskov M , de Nys R , Manefield M et al. Eukaryotic interference with homoserine lactone - mediated prokaryotic signaling [J]. J Bacteriol , 1996 , 178: 6618 - 6622.
- [10] Zhu H , He C C , Chu Q H. Inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* by pigments extracted from *Auricularia auricular* [J]. Lett Appl Microbiol , 2011 , 52(3) : 269 - 274.
- [11] Bosgelmez G , Ulusoy S , Ugur A , et al. Inhibition of quorum sensing - regulated behaviors by *Scorzonera sandrasica* [J]. Curr Microbiol , 2007 , 55(2) : 114 - 118.
- [12] Rasmussen T B , Givskov M. Quorum - sensing inhibitors as anti - pathogenic drugs [J]. Int J Med Microbiol , 2006 , 296 (2/3) : 149 - 161.
- [13] Rudrappa T , Bais H P. Curcumin , a known phenolic from curcuma longa , attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models [J]. J Agric Food Chem , 2008 , 56(6) : 1955 - 1962.
- [14] Vandeputte O M , Kiendrebeogo M , Rajaonson S. Identification of catechin as one of the flavonoids from *Combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of quorum - sensing - controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 [J]. Appl Environ Microbiol , 2010 , 76(1) : 243 - 253.