

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.011.005  
文章编号: 1005-8982 (2018) 011-0022-05

## 凤冈富锌硒茶对 ERp57 蛋白酶的抑制作用 及其有效成分的虚拟筛选\*

张莹<sup>1</sup>, 李惠琼<sup>2</sup>, 邹佳<sup>1</sup>, 王滔<sup>1</sup>, 李玲玲<sup>2</sup>, 申慧芳<sup>1</sup>, 岳续朋<sup>1</sup>, 崔国祯<sup>1</sup>

(1. 遵义医学院 珠海校区生物工程系 (广东省珠海市中药基础及应用研究重点实验室), 广东 珠海 519041; 2. 广州中医药大学第二附属医院, 广东 珠海 519015)

**摘要: 目的** 探讨凤冈富锌硒茶水提取物对抗血小板聚集的潜在药物靶点 ERp57 蛋白酶的抑制作用及其潜在的有效成分。**方法** 利用超高效液相色谱分析凤冈富锌硒茶水提取物的主要成分, 采用胰岛素浑浊度分析方法检测提取物对 ERp57 蛋白酶的抑制作用, 采用体外血小板聚集率实验分析提取物对血小板聚集的干预作用。采用计算机虚拟筛选和实验验证相结合的方法, 分析提取物中抑制 ERp57 蛋白酶的主要活性成分。**结果** 凤冈富锌硒茶水提取物主要存在 4 种化合物, 提取物对 ERp57 蛋白酶有显著的抑制作用, 且表现出一定程度的抗血小板聚集作用, 其中表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 对 ERp57 蛋白酶的抑制作用最强。**结论** 长期饮用绿茶有益于降低心血管疾病死亡率, 可能与绿茶抑制 ERp57 蛋白酶活性, 从而抗血小板聚集有关, 其中 EGCG 是其主要有效成分之一。

**关键词:** 凤冈富锌硒茶; ERp57; 心血管疾病; 虚拟筛选; 抗血小板聚集

**中图分类号:** R284

**文献标识码:** A

## Inhibitory effect of Se-enriched and zinc-enriched green tea of Fenggang on ERp57 protease and virtual screening of its effective constituents\*

Ying Zhang<sup>1</sup>, Hui-qiong Li<sup>2</sup>, Jia Zou<sup>1</sup>, Tao Wang<sup>1</sup>, Ling-ling Li<sup>2</sup>, Hui-fang Shen<sup>1</sup>, Xu-peng Yue<sup>1</sup>,  
Guo-zhen Cui<sup>1</sup>

[1. Department of Bioengineering, Zhuhai Campus of Zunyi Medical College (Zhuhai Key Laboratory of Basic and Applied Research on Chinese Medicine), Zhuhai, Guangdong 519041, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Zhuhai, Guangdong 519015, China]

**Abstract: Objective** To examine the effect of Se-enriched and zinc-enriched green tea of Fenggang on the enzymatic activity of ERp57, a potential anti-platelet target, and try to clarify the major constituents of the extract. **Methods** Ultra performance liquid chromatography (UPLC) was used to assay the major components of the green tea. The effect of the extract on platelet function and ERp57 activity was evaluated by light transmission aggregometry and insulin reduction assay, respectively. The major active constituents of the green tea were identified using virtual screening and experimental validation. **Results** Using UPLC, 4 major components were identified from the tea extract. Further experiments with insulin turbidity assay and virtual screening using computer-based methods

收稿日期: 2016-11-09

\* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81460552); 遵义医学院招标课题 (No: F-787); 贵州省教育厅优秀科技创新人才奖励计划

[No: 黔教合 KY 字 (2015) 494]

[通信作者] 崔国祯, E-mail: cgzum@hotmail.com; Tel: 13750035436

demonstrated the green tea extract displayed potent inhibitory effect on the enzymatic activity of ERp57 (among which EGCG had the strongest effect) and certain anti-platelet aggregation effect. **Conclusions** The beneficial effect of green tea on the mortality of CVD patients could be associated with its inhibition of ERp57 activity and platelet aggregation. In addition, EGCG is one of the major active constituents of the green tea.

**Keywords:** Se-enriched and zinc-enriched green tea of Fenggang; ERp57; cardiovascular disease; virtual screening; anti-platelet aggregation

心血管疾病严重威胁人类健康, 其死亡率居我国各种疾病之首<sup>[1]</sup>。有研究表明, 饮用绿茶可以显著降低心血管疾病的死亡率<sup>[2]</sup>, 但具体作用机制尚不清楚。本实验以蛋白酶 ERp57 为抗血小板聚集药物的作用靶点, 采用虚拟筛选与实验验证相结合的方法, 对凤冈富锌硒茶预防心血管疾病的作用靶点和有效成分进行探讨, 进一步认识绿茶抗心血管疾病的作用机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

凤冈富锌硒茶由贵州省凤冈县万壶缘锌硒茶业有限公司提供, 乙腈、甲酸、甲醇(色谱纯)购自德国 Merck 公司, 分析标准品表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)(纯度 $\geq 98\%$ )、氯吡格雷购自上海阿拉丁试剂公司, 分析标准品表没食子儿茶素(Epigallocatechin, EGC)、表儿茶素没食子酸酯(epicatechin gallate, ECG)和咖啡因(Caffeine, CAF)(纯度 $\geq 98\%$ )购自宝鸡金泰辰光生物公司, 胰岛素溶液(美国 Sigma 公司), ERp57 蛋白酶(本实验室自制), 新西兰兔[广东省医学实验动物中心, 动物合格证号: SCXK(粤)2014-0035], 枸橼酸钠采血管(冀州市博昌医疗器械有限公司), 二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)(美国 Sigma 公司)。

### 1.2 仪器与设备

超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC)[美国 Waters 公司, 配有 Waters Acquity UPLC BEH C18(2.1 mm $\times$ 50.0 mm, 1.7 $\mu$ m)色谱柱、二极管阵列检测器、Empower 3 色谱工作站], 冷冻干燥机(ALPHA2-4/LSC PLUS 型)(德国 CHIRST 公司), Multiskan Mk3 酶标仪(美国宝特公司), 旋转蒸发器(德国 IKA 公司), 血小板聚集仪(美国 Helena 公司), 台式低速离心机(长沙赫西仪器装备有限公司)。

### 1.3 方 法

#### 1.3.1 凤冈富锌硒茶的提取

取凤冈富锌硒茶置于

80℃烘箱烘干, 打粉机粉碎后取 200 g 茶粉, 加入 2 L 沸腾的双蒸水中, 煎煮 10 min, 纱布过滤并收集滤液。滤渣再加入 2 L 沸腾的双蒸水中, 重复上述步骤 2 次。3 次滤液合并, 用旋转蒸发器浓缩, 冷冻干燥仪干燥后称重, 得到绿茶水提取物。

**1.3.2 UPLC 检测绿茶水提取物** ①供试品溶液的制备。精确称取绿茶水提取物 0.2 g, 加入 10 ml 50% 甲醇溶液于试管中, 超声 5 min, 用注射器吸取 2 ml, 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤, 得到待测液。②标准品溶液的配制。精确称取标准品 EGCG、EGC、ECG 和 CAF 各 2 mg, 加入 5 ml 50% 甲醇溶液于试管中, 超声 5 min, 用 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤, 得到标准品溶液。③UPLC 色谱条件。UPLC 仪, 流动相 A: 45 ml 乙腈、10 ml 甲酸, 以去离子水定容至 500 ml; 流动相 B: 400 ml 乙腈、10 ml 甲酸, 以去离子水定容至 500 ml。色谱柱: Waters Acquity UPLC BEH C18(2.1mm $\times$ 50.0 mm, 1.7 $\mu$ m)。梯度洗脱条件: 0~10 min(100% A), 10~32 min(100%~80% A)。流量 1.0 ml/min, 柱温 35℃, 检测波长 278 nm; 进样量 10 $\mu$ l。

**1.3.3 ERp57 蛋白酶活性测定** 采用胰岛素浑浊度分析方法检测绿茶水提取物及其化合物对 ERp57 蛋白酶活性的抑制作用<sup>[3-4]</sup>。将反应物[胰岛素、二硫苏糖醇(DL-dithiothreitol, DTT)、ERp57 蛋白酶和待测样品]加入到 96 孔板中反应振荡 30 s, 检测 630 nm 波长处的吸光度, 读数 1 次/4 min, 持续检测 68 min, 实验重复 3 次。酶抑制率(%)=[1-(OD<sub>化合物+ERp57+DTT</sub>-OD<sub>DTT</sub>)/(OD<sub>ERp57+DTT</sub>-OD<sub>DTT</sub>)] $\times$ 100%<sup>[5]</sup>。

**1.3.4 血小板聚集实验** ①获取富血小板血浆(platelet rich plasma, PRP)和贫血小板血浆(platelet poor plasma, PPP)。用枸橼酸钠抗凝采血管从兔耳缘动脉采血。将血液 750 r/min 离心 15 min, 收集上清得 PRP; 剩余血样 2 800 r/min 离心 10 min, 收集上清得 PPP。②血小板聚集率的检测。用 PPP 调零, 以 PRP 为血小板供体, 检测不同浓度绿茶水提取物对血小板

聚集的干预作用, 设置模型组 (ADP 处理)、阳性对照组 (氯吡格雷处理), 以及 30、100 和 300  $\mu\text{g/ml}$  绿茶水提取物干预组。PRP 与待测药物作用 5 min 后, 加入 15  $\mu\text{mol/L}$  ADP 溶液, 用血小板聚集仪检测血小板聚集情况。

**1.3.5 计算机虚拟筛选** ①三维结构的获得与处理。从 Protein Data Bank 下载 ERp57 的晶体结构 (PDB ID: 3F8U), 按照 MOE 软件的说明书对蛋白结构进行虚拟筛选前的结构准备。②绿茶中小分子数据库的构建。根据中药系统药理学数据库<sup>[6]</sup>, 收集绿茶中的 20 种小分子, 用 MOE 软件建立绿茶小分子数据库, 并做能量最低化操作。③虚拟筛选。运行分子模拟软件 MOE, 以蛋白 ERp57 的 CGHC 残基为活性位点。从绿茶小分子库中虚拟筛选 ERp57 的抑制剂。

## 1.4 统计学方法

数据分析采用 Graphpad prism 6.0 统计软件, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 用方差分析, 两两比较用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 绿茶水提取物的成份

取 200 g 茶粉经提取后, 得到 62.12 g 绿茶水提取物, 得率为 31.06%。利用 UPLC 对绿茶水提取物中的成分进行分析。绿茶水提取物 UPLC 色谱图中各目标峰的分离度和峰形较好, 绿茶水提取物中的各种成分与 4 种标准品在相同的保留时间处均有相对应的峰出现, 检出各成分与标准品的保留时间一致, 说明绿茶水提取物中主要含有 EGC、ECG、EGCG、CAF 4 种化合物。见图 1。

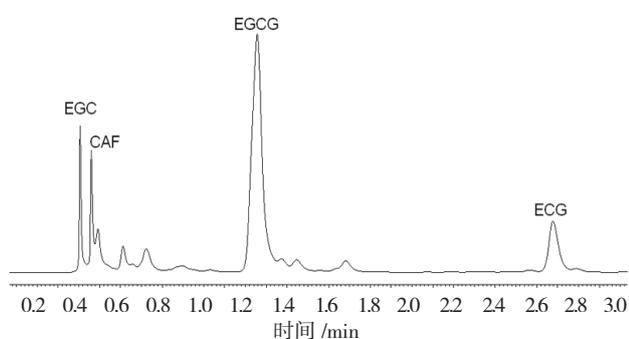


图 1 278 nm 波长处绿茶水提取物的成分分析

### 2.2 不同浓度绿茶水提取物对 ERp57 酶活性的影响

与模型组相比, ERp57 蛋白酶活性随着绿茶水提取物浓度的增加而降低, 表明绿茶水提取物对 ERp57 的活性有抑制作用, 半数抑制率为 30 ~ 100  $\mu\text{g/ml}$ 。见图 2。

### 2.3 绿茶水提取物对血小板聚集的影响

各组血小板聚集率比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 16.574, P = 0.000$ ), 不同处理组对血小板聚集率的影响不全相同, 100 和 300  $\mu\text{g/ml}$  绿茶水提取物干预组与模型组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 说明绿茶水提取物对血小板聚集有抑制作用。绿茶水提取物抑制 ADP 诱导的血小板聚集, 且呈剂量依赖关系。见图 3。

### 2.4 计算机虚拟筛选结果

绿茶小分子库经虚拟筛选过后, 以活性位点和化合物的亲和力为指标, 结合能力越小, 得分越高, 配体和受体的亲和力更大, 从 20 个化合物中获得 3 个打分较高, 并符合实验验证要求的小分子。蛋白质 ERp57 以丝带模式渲染, EGCG、ECG、EGC 结合能分别为 -21.8、-19.1 和 -15.7 kcal/mol (1kcal=4.184kJ) (见图 4)。筛选后 3 种小分子的化学结构见图 5。

### 2.5 绿茶水提取物和化合物单体对 ERp57 活性的抑制作用

各组 ERp57 抑制率比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 18.848, P = 0.000$ ), 绿茶水提取物及化合物对酶活性抑制率的影响作用不同。其中, 检测的 3 种化合物中, EGCG 对 ERp57 活性的抑制作用最强。绿茶水提取物、EGC、EGCG 及 ECG 对 ERp57 活性均有一定的抑制作用, 并呈剂量依赖关系。见图 6。

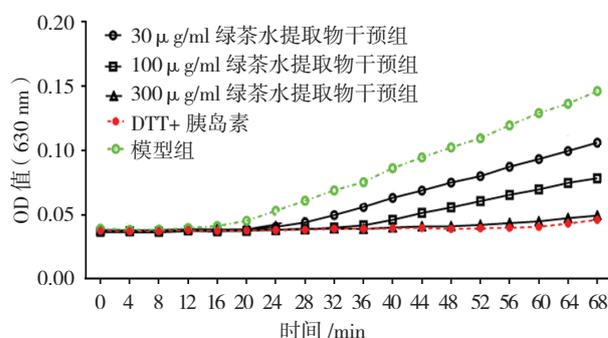
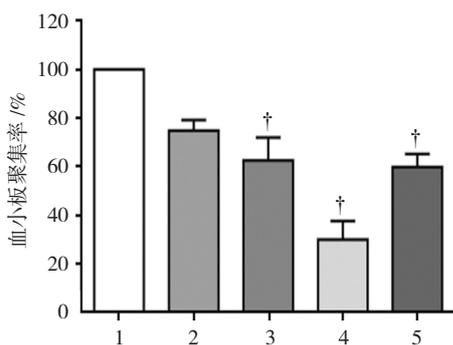
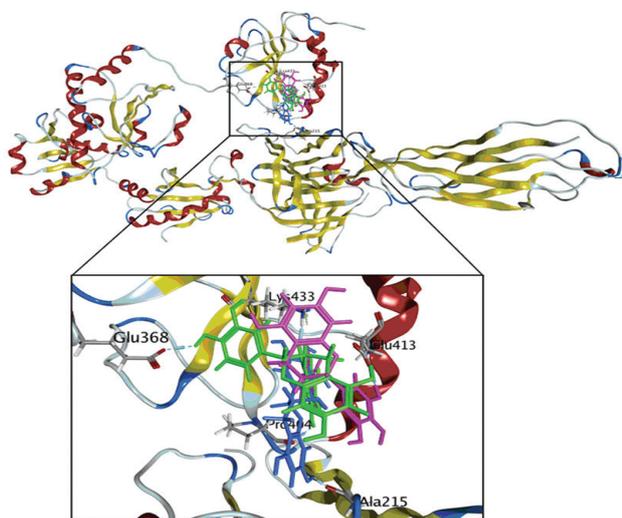


图 2 绿茶水提取物对 ERp57 酶活性的抑制作用



1: 模型组; 2: 30 μg/ml 绿茶水提取物干预组; 3: 100 μg/ml 绿茶水提取物干预组; 4: 300 μg/ml 绿茶水提取物干预组; 5: 阳性对照组。† 与模型组比较,  $P < 0.05$

图 3 绿茶水提取物对血小板聚集的影响



紫色小分子为 EGCG, 绿色小分子为 ECG, 蓝色小分子为 EGC

图 4 筛选后的 3 个 ERp57 蛋白酶抑制剂

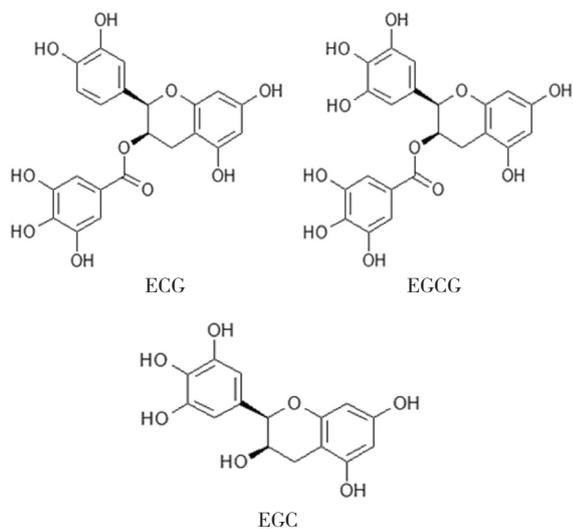
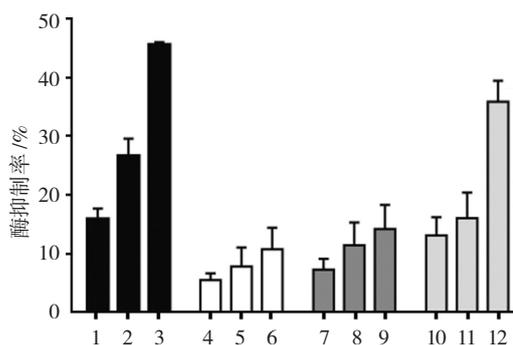


图 5 筛选后的 3 个 ERp57 抑制剂化学结构



1: 30 μg/ml 绿茶水提取物干预组; 2: 100 μg/ml 绿茶水提取物干预组; 3: 300 μg/ml 绿茶水提取物干预组; 4: 30 μmol/L ECG 干预组; 5: 100 μmol/L ECG 干预组; 6: 300 μmol/L ECG 干预组; 7: 30 μmol/L ECG 干预组; 8: 100 μmol/L ECG 干预组; 9: 300 μmol/L ECG 干预组; 10: 30 μmol/L EGCG 干预组; 11: 100 μmol/L EGCG 干预组; 12: 300 μmol/L EGCG 干预组

图 6 绿茶水提取物及化合物对 ERp57 的抑制率比较

### 3 讨论

经过长约 11 年的流行病学调查发现, 长期饮用绿茶能够显著降低心血管疾病患者的死亡率<sup>[2]</sup>, 提示绿茶具有预防心血管疾病的作用。本实验通过提取凤冈富锌硒茶, 基于 ERp57 蛋白酶为抗血小板聚集的作用靶点, 采用计算机虚拟筛选与实验验证相结合的方法, 进一步证明, 绿茶水提取物有较强的抑制 ERp57 蛋白酶活性的作用, 且通过体外血小板聚集实验, 绿茶水提取物显著抑制 ADP 诱导的血小板聚集。其中, EGCG 是抑制 ERp57 蛋白酶的主要活性成分。该研究为进一步认识绿茶抗心血管疾病的保健功能, 为绿茶产业的发展和应用提供科学依据。

蛋白质二硫键异构酶 (protein disulfide isomerase, PDI) 家族是一类在细胞内质网内调节肽链氧化折叠等多重功能的巯基-二硫键氧化还原酶, 是一种潜在的治疗血栓的药物靶点<sup>[7]</sup>。ERp57 是 PDI 家族的成员之一。最近研究发现, ERp57 蛋白酶在血小板聚集和血栓的形成中也发挥重要作用<sup>[8]</sup>, ERp57 基因敲除小鼠在血小板数量及表面糖蛋白的表达上都未发生变化, 但其尾静脉出血时间延长, 血小板聚集率下降, 在添加外源性的 ERp57 蛋白酶后, 血小板聚集缺陷得到很好地改善<sup>[9]</sup>, 提示抑制 ERp57 蛋白酶活性, 可以显著抑制血小板的聚集。筛选出具有拮抗 ERp57 蛋白酶活性的物质, 对开发抗血栓类药物或保健品方面都有巨大的应用潜力。

本实验采用胰岛素浑浊度分析法测定绿茶水提

取物对 ERp57 蛋白酶的抑制作用。与模型组对比,随着绿茶水提取物浓度的不断提高,ERp57 蛋白酶的活性逐渐降低,绿茶水提取物对 ERp57 蛋白酶有明显的抑制作用;且血小板聚集实验表明,与模型组相比,绿茶水提取物显著抑制 ADP 诱导的血小板聚集。进一步通过虚拟筛选结合实验验证的方法,发现 ECG、EGC 和 EGCG 3 种化合物对 ERp57 蛋白酶活性均有明显的抑制作用,并呈一定剂量依赖关系。其中,EGCG 对 ERp57 蛋白酶活性的抑制作用最强。

实验结果显示,3 种化合物对 ERp57 蛋白酶活性的抑制作用强度分别为 EGCG>EGC>ECG。3 种化合物的结构相似,基本结构均为  $\alpha$ -连或邻苯酚基苯并吡喃,3 者结构中 A 环的 5-位和 7-位均带有 1 个酚羟基,其结构差异主要体现在 C 环的 2-位和 3-位上所带的基团类型,主要表现为 2-位上带邻苯酚基或者是连苯三酚基,3-位带羟基或者是没食子酯结构。其中,EGC 与 ECG 相比较,EGC 中 C 环的 2-位带有连苯三酚基,而 ECG 中为邻苯酚基,EGC 比 ECG 多 1 个羟基;EGCG 与 EGC 比较,差异主要表现在 C 环的 3-位上,EGCG 中 3-位带有没食子酯结构,没食子酯结构中带有 3 个羟基,而 EGC 中的 3-位带有 1 个羟基,EGCG 带有的羟基数量大于 EGC;EGCG 与 ECG 的结构差异表现在 C 环的 2-位上,EGCG 带有 1 个连苯三酚基,ECG 带邻苯酚基,EGCG 比 ECG 多 1 个羟基;3 者结构相似,但对 ERp57 蛋白酶活性的抑制作用存在差异,由 3 者化学结构分析可以说明羟基对于化合物的活性而言占有主导地位,羟基具有极强的抗氧化活性,羟基数目越多,可提供的氢原子越多,其抗氧化活性越强。由此可以推测,3 种化合物对 ERp57 蛋白酶抑制作用的强弱源于羟基所处位置及数量。

儿茶素类化合物是含有黄烷-3-醇结构的一大类化合物,该类化合物具有多个酚羟基而显示出强抗氧化活性。儿茶素与蛋白质通过疏水键相结合,通过氢键和环氧基团进一步稳定,儿茶素高亲和力的氧化结构域可使蛋白质构象发生变化,其中氧化和二聚体的形成伴随着蛋白构象的改变和表面疏水蛋白质的增加<sup>[10]</sup>。儿茶素在发挥作用时,优先结合到氧化酶活性位点附近,这可能是影响 ERp57 蛋白酶氧化还原功能及其他配体相互作用的主要原因,从而使 ERp57 活性受到抑制。研究人员发现,给小鼠注入 ERp57 蛋

白酶拮抗剂,发现其尾部出血时间延长,血小板聚集作用欠佳, $\alpha$  II b  $\beta$  和 P 选择素的表达受到抑制<sup>[11]</sup>。儿茶素对 ERp57 蛋白酶活性抑制作用机制,以及与  $\alpha$  II b  $\beta$  受体和 P 选择素的相关性,有待进一步实验验证。

综上所述,凤冈富锌硒茶提取物对 ERp57 蛋白酶具有一定的抑制作用,其中 EGCG 是主要的活性成分。本实验为进一步研究绿茶预防心血管疾病的机制提供了科学依据。其次,基于计算机虚拟筛选与实验验证相结合的方法为探讨中药的作用靶点和有效成分研究提供了重要研究思路。

#### 参 考 文 献:

- [1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2015》概要[J]. 中国循环杂志,2016,31(6): 521-529.
- [2] LIU J, LIU S, ZHOU H, et al. Association of green tea consumption with mortality from all-cause, cardiovascular disease and cancer in a Chinese cohort of 165,000 adult men[J]. Eur J Epidemiol, 2016, 31(9): 853-865.
- [3] CUI G, SHAN L, CHU I K, et al. Identification of disulfide isomerase ERp57 as a target for small molecule cardioprotective agents[J]. RSC Adv, 2015, 5(91): 74605-74610.
- [4] CUI G, SHAN L, GUO L, et al. Novel anti-thrombotic agent for modulation of protein disulfide isomerase family member ERp57 for prophylactic therapy[J]. Scientific Reports, 2015, DOI: 10.1038/srep10353.
- [5] JASUJA R, PASSAM F H. Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents[J]. Journal of Clinical Investigation, 2012, 122(6): 2104-2113.
- [6] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSp: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. Journal of Cheminformatics, 2014, 6(1): 1498-1504.
- [7] FLAUMENHAFT R, FURIE B, ZWICKER J I. Therapeutic implications of protein disulfide isomerase inhibition in thrombotic disease[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015, 35(1): 16-23.
- [8] SCHULMAN S, BENDAPUDI P, SHARDA A, et al. Extracellular thiol isomerases and their role in thrombus formation[J]. Antioxid Redox Signal, 2016, 24(1): 1-15.
- [9] WANG L, WU Y, ZHOU J, et al. Platelet-derived ERp57 mediates platelet incorporation into a growing thrombus by regulation of the  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 integrin[J]. Blood, 2013, 122(22): 3642-3650.
- [10] TRNKOVÁ L, RICCI D, GRILLO C, et al. Green tea catechins can bind and modify ERp57/PDIA3 activity[J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2013, 1830(3): 2671-2682.
- [11] WU Y, AHMAD S S, ZHOU J, et al. The disulfide isomerase ERp57 mediates platelet aggregation, hemostasis, and thrombosis[J]. Blood, 2012, 119(7): 1737-1746.

(童颖丹 编辑)