

基于分子对接的鸡血藤抗血栓活性成分的筛选研究

毕艺鸣¹, 殷贝¹, 范冠杰^{2*}, 王献哲¹(1.广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510405; 2.广东省中医院/广州中医药大学第二附属医院, 广州 510120)

摘要: 目的 采用分子对接技术筛选鸡血藤中抗血栓形成的活性成分。方法 检索 TCMSP 得到鸡血藤所有化学成分, 结合口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%以及类药性(drug likeness, DL)≥0.18, 筛选出活性化合物, 利用 PharmMapper 初步预测鸡血藤的活性成分的对靶点, 选择与抗血栓形成相关的靶点, 以 Drug Bank 中对血栓形成有抑制作用并已上市或者正在进行临床试验的小分子药物为阳性对照, 再以 AutoDock Vina 进行分子对接。结果 共筛选出鸡血藤活性化合物 23 个, 抗血栓相关靶点 4 个, 以低于活性化合物最低结合能平均值的化合物为最终阳性结果, 对比分析原配体、阳性对照和鸡血藤活性化合物作用于各靶点的主要活性位点, 阐明鸡血藤抗血栓的机制可能与其抑制内外凝血途径有关。结论 分子对接技术不仅为鸡血藤活血作用的机制研究提供了参考, 也为进一步开发安全有效的抗血栓类单体提供了研究方向。

关键词: 鸡血藤; 抗血栓活性; 分子对接; 虚拟筛选

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)15-1803-10

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.15.003

引用本文: 毕艺鸣, 殷贝, 范冠杰, 等. 基于分子对接的鸡血藤抗血栓活性成分的筛选研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(15): 1803-1812.

Study on Screening of Antithrombotic Active Components of Spatholobi Caulis Based on Molecular Docking Technology

BI Yiming¹, YIN Bei¹, FAN Guanjie^{2*}, WANG Xianzhe¹(1.The Second Clinical Medical School, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2.Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine/The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To screen the antithrombotic active components of Spatholobi Caulis by molecular docking technology. **METHODS** Compounds of Spatholobi Caulis were collected by searching TCMSP. Compounds with oral bioavailability(OB)≥30% and drug likeness(DL)≥0.18 were considered to be the active components in Spatholobi Caulis. These active components were uploaded to PharmMapper to predict the corresponding targets, and the targets related to antithrombotic were selected. In addition, the small-molecules drugs which had antithrombotic effect that had been listed or undergoing clinical trials from Drug Bank database were set as positive references. AutoDock Vina was applied to perform molecular docking. **RESULTS** Twenty-three compounds of Spatholobi Caulis and 4 potential targets which showed close correlation with antithrombotic were obtained. The compound with a binding energy below the average energy was selected as the final positive result. The antithrombotic effects of Spatholobi Caulis were finally explained by compared the main active sites of the test compounds with original ligands and references, which were related to the inhibition of intrinsic and extrinsic coagulation pathways. **CONCLUSION** Molecular docking not only provides a certain reference to explore the mechanisms of Spatholobi Caulis in invigorating the circulation of blood, but also provides research direction for the development of safe and effective antithrombotic drugs in the future.

KEYWORDS: Spatholobi Caulis; antithrombotic; molecular docking; virtual screening

血栓性疾病是一种与血栓形成关系密切的全身性疾病, 可累及心脑血管、周围动脉等, 具有发病范围广、容易复发、发病率高、致残率高、死亡率高临床特点。随着社会的发展和人口老龄化的进程, 血栓性疾病的发病率及死亡率不断增加, 尤其是冠心病、脑卒中等心脑血管疾病, 仍是中国人口死亡的首要病因; 同时, 血栓形成

是糖尿病下肢血管病变, 糖尿病足等疾病的病理变化之一, 已经成为世界致残的重要因素^[1]。可见, 血栓性疾病已成为当今社会威胁人们生命健康的重大疾病。抗血栓形成是预防和治疗血栓性疾病的的一线手段, 目前, 临床上抗血栓形成的药物主要包括阿司匹林、利伐沙班、达比加群、华法林等, 通过抗血小板聚集, 拮抗凝血酶以及凝血因子的活

基金项目: “十二五” 国家科技支撑计划资助项目(2015BAI04B09); 广东省中医药科技创新平台建设项目(2018KT1068)

作者简介: 毕艺鸣, 女, 硕士生 Tel: (020)81887233 E-mail: 451645244@qq.com *通信作者: 范冠杰, 男, 博士, 博导, 主任医师 Tel: (020)81887233 E-mail: fanfanfangji@163.com

化等机制达到抗血栓形成的目的^[2-3]。从中医学的角度上,血栓性疾病主要从“瘀”论治,以活血化瘀类中药进行治疗,随着中医药的发展,水蛭素、红花黄色素、三七总皂苷等中药单体或提取物的出现,使得中药单体及其提取物在抗血栓性疾病上具有一定优势^[4-6]。研究表明,中药单体不仅在抑制血小板活化和聚集起至关重要的作用,同时可降低血液黏稠度,改善内皮功能,间接影响凝血过程的启动,为治疗血栓性疾病带来新的方向。

鸡血藤,又名血风藤、三叶鸡血藤等,是豆科植物密花豆(*Spatholobus suberectus* Dunn)的干燥藤茎,由于其可分泌红棕色树脂分泌物而得名。鸡血藤始载于《本草纲目拾遗》,具有活血补血、调经止痛、舒筋活络的功效。作为一种传统的活血化瘀类中药,其用药历史悠久,目前在临床上广泛应用于冠心病、肢体动脉硬化闭塞症等血栓性疾病的防治^[7]。现代药理研究也表明,鸡血藤水提取物、醇提取物、乙酸乙酯提取物及二氯甲烷提取物均有一定的抗血栓活性,可以显著延长全血凝固时间,同时具有促进纤维蛋白溶解的作用^[8-9]。此外,已有研究证实鸡血藤提取物在抗血小板聚集、改善血液黏度等方面比红花、莪术的作用更强,这可能与抑制 P-选择素、减少血小板与内皮细胞黏附有关^[10]。李才唐等^[11]则发现鸡血藤总黄酮能抑制二磷酸腺苷、胶原和凝血酶诱导的血小板聚集,从而达到抗血栓形成的目的。然而,目前已有的关于鸡血藤活血作用的研究主要集中在血小板聚集方面^[12],目前尚缺乏足够的证据说明鸡血藤与凝血酶及凝血因子的相互作用机制,鸡血藤具体药效物质基础值得进一步探讨和研究。

中药单体化合物是中药中化学成分明确,药理属性清晰的活性化合物,目前已经成为开发新型中药制剂的途径之一。然而,传统的中药分离分析技术成本高,耗时长,效率低,极大地限制了中药单体的开发^[13]。而分子对接技术为药物小分子及相应受体相互作用关系的研究提供了有力的手段。分子对接是受体和配体之间基于几何匹配及能量匹配相互识别,形成分子复合物,同时预测复合物结构的过程。分子对接技术主要通过识别受体以及配体的相互作用力,研究 2 个分子在形成复合物过程中分子构象的改变,预测小分子和受体之间的亲和力,从而评价小分子可能的生物活性^[14]。Huang 等^[15]通过分子对接技术,证实龙胆苦苷可靶向作用于周期蛋白 D1,周期蛋白

E1, 蛋白激酶 B 以及 P38 等蛋白,从而抑制胃癌细胞增殖。刘永杰等^[16]则通过分子对接技术,明确石菖蒲活性成分发挥抗抑郁作用的靶点。以上研究均证实分子对接技术已经成为开发和设计新药重要工具。因此,本研究应用分子对接技术,探讨鸡血藤具有抗血栓活性的化合物,阐明鸡血藤活血化瘀的物质基础及其作用机制,为进一步研究抗血栓中药单体或提取物提供参考。

1 材料与方法

1.1 活性化合物的筛选

以鸡血藤 *Spatholobi Caulis* 在中国药典 2015 年版中的规范药材名,在传统中药药理数据库(TCMSP, <http://tcmssp.com/tcmssp.php>)中进行检索,并根据药理属性,对检索得到的化合物进行初步筛选。TCMSP 数据库不仅包含了 499 味常见中草药,还包含了将近 30 000 种化合物药理学信息。通过对每个化合物吸收、分布、代谢及排泄(absorption, distribution, metabolism, excretion, ADME)性质的评价,可进一步筛选出中草药中的活性化合物成分。其中,口服生物利用度(oral bioavailability, OB)和类药性(drug likeness, DL)是评价化合物药理性质的关键指标,许多中药药理研究将 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 作为中草药活性化合物的筛选标准^[16-18]。根据上述筛选标准,笔者对 TCMSP 中鸡血藤的 68 味化合物进行 2 次筛选,得到鸡血藤中活性化合物成分 23 种。将这些化合物逐一输入到 Pubchem 数据库(Pubchem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行搜索,下载这些可能化合物的 3D 分子结构图,并保存为 sdf 格式,使用 pymol 软件将 sdf 格式转换为 pdb 格式,最后用 AutoDock Tools(ADT)保存为 pdbqt 的格式备用。

1.2 中药的作用靶点蛋白的初步筛选

中药的作用靶点识别是研究其物质基础和作用机制的关键。PharmMapper 数据库主要通过“反向药效团匹配”的方法,以活性小分子为探针,从 TargetBank、DrugBank 等数据库中提取药物的潜在靶标,是预测中药化合物与作用靶点的重要数据库之一^[19]。登录 PharmMapper 数据库(PharmMapper, <http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html>),上传鸡血藤化合物成分的 sdf 格式文件,将“Select Targets Set”设为“Human Protein Targets Only”,其余选项保持默认。将收集到的靶蛋白利用 UniProt 数据库(UniProt, <http://www.uniprot.org/>)进行校正,得到与血栓形成密切相关的靶点,同时初步筛选出

对上述靶点具有抑制作用的活性化合物。从 RCSB PDB 数据库(RCSB PDB, <https://www.rcsb.org>)下载以上靶蛋白的晶体结构,并保存为 pdb 格式,使用 pymol 软件分离原配体和靶蛋白,最后用 ADT 对靶蛋白进行去水、加氢等处理,并保存为 pdbqt 的格式备用。

1.3 阳性化合物的筛选

根据靶蛋白信息,以 Drug Bank 或 Therapeutic Target Database 中对血栓形成有抑制作用并已上市或者相关文献中报道的正在进行临床试验的小分子药物为阳性对照化合物,下载其 pdb 格式,用 ADT 保存为 pdbqt 的格式备用。

1.4 分子对接参数的设置以及可行性验证

AutoDock Vina 是由斯科利普斯研究所开发的分子对接软件之一,主要采用改良的遗传算法来对配体和受体的结合构像进行优化,将能量计算以及构象评价结合在一起,同时使用格点对接的方法,在保证准确率的同时大大提高了对接效率^[20]。本研究应用 AutoDock Vina 的半柔性分子对接功能,以靶点蛋白原配体作为中心设置格点,将原配体对接回去,选取能量最低的构象,利用 python 软件([python, https://github.com/charnley/rmsd](https://github.com/charnley/rmsd)),计算原配体的均方根偏差(root-mean-square deviation, RMSD),进行可信性验证。

1.5 靶蛋白与阳性对照化合物及候选化学物分子对接及结果评价

根据“1.2”项下得到的初步筛选结果,利用 AutoDock Vina 对处理好的活性化合物以及阳性对照化合物分别与靶蛋白进行进一步分子对接。根据“1.4”项下的结果得到格点信息,并得到靶点蛋白活性位点的三维坐标,并将该活性位点外围形成盒子,将盒子划分为格点,用配体不同类型的原子探针进行扫描,计算格点能量,采用改良的遗传算法在盒子范围对配体进行构象探索,以配体旋转键的个数、氢键、离子键、疏水以及亲水作用等作为参数进行多元回归,计算受体和配体不同构象的最低结合能,并对不同构象的最低结合能进行排序,利用 pymol 分析和观察原配体、活性化合物、阳性对照化合物与靶蛋白的对接结果。

2 结果

2.1 中药的作用靶点蛋白的初步筛选结果

根据 PharmMapper 数据库对鸡血藤 23 种活性化合物的作用靶点进行初步筛选,得到与血栓形

成密切相关的 4 个靶点蛋白,分别是凝血酶、凝血因子 VII(coagulation factor VII, FVII)、凝血因子 X(coagulation factor X, FX)、凝血因子 XI(coagulation factor XI, FXI),相应的 PDB ID 及其配体见表 1。其中,23 种化合物对凝血酶及 FX 具有抑制作用,18 种化合物对 FVII 具有抑制作用,12 种化合物对 FXI 具有抑制作用,鸡血藤的活性化合物成分及对应抗血栓靶点见表 2。

表 1 与血栓形成相关的靶点蛋白、PDB ID 及原配体

Tab. 1 Target proteins, PDB IDs and original ligands associated with thrombosis

靶点名称	PDB ID	原配体
凝血酶	1jvt	4-氧代-2-苯甲酰基磺酰基-邻羟基-吡咯并[1,2-a]吡嗪-6-羧酸[1-(N-羟基氨基甲酰基)-哌啶-4-基乙氧基]-酰胺
FVII	2flr	[2'-羟基-3'-(1h-吡咯并[3,2-C]吡啶-2-基)-联苯-3-基甲基]-脲
FX	1f0r	噻吩并[3,2-b]吡啶-2-磺酸[1-(1-氨基-异喹啉-7-基甲基)-2-氧代-吡咯烷-3-基]-酰胺
FXI	1zrk	4-甲基戊酸{1-[4-胍基-1-(噻唑-2-碳基)丁基氨基甲酰基]-2-甲基-丙基}-酰胺

表 2 鸡血藤的化合物成分及对应靶蛋白的初步筛选结果

Tab. 2 Preliminary screening results of chemical compounds of Spatholobi Caulis and target proteins

化合物编号	化合物名称	靶蛋白			
		凝血素	FVII	FX	FXI
MOL000296	常春藤皂苷元	+	+	+	+
MOL000033	(24S)-24-丙基胆甾-5-烯-3 β -醇	+	+	+	-
MOL000358	β -谷甾醇	+	+	+	-
MOL000392	芒果花黄素	+	-	+	+
MOL000417	毛蕊异黄酮	+	+	+	+
MOL000449	豆甾醇	+	+	+	-
MOL000461	3,7-二羟基-6-甲氧基二氢黄酮醇	+	-	+	+
MOL000468	8-邻-甲基雷杜辛	+	+	+	+
MOL000469	3-羟基豆甾-5-烯-7-酮	+	+	+	+
MOL000470	8-C- α -L-吡喃阿拉伯糖苷 木犀草素	+	+	+	+
MOL000471	芦荟大黄素	+	+	+	+
MOL000483	顺式-N-阿魏酰酰胺	+	-	+	-
MOL000490	矮牵牛素	+	+	+	+
MOL000491	白芷内酯	+	+	+	+
MOL000492	(+)-儿茶酸	+	+	+	+
MOL000493	菜油甾醇	+	+	+	-
MOL000497	甘草查耳酮 a	+	+	+	+
MOL000500	牛角花酮	+	+	+	-
MOL000502	卡亚宁	+	+	+	-
MOL000503	首蓿酚	+	+	+	-
MOL000506	鹰爪豆碱	+	-	+	-
MOL000507	野靛黄素	+	-	+	-
MOL000006	木犀草素	+	+	+	-

注:“+”表示有一定亲和力;“-”表示无亲和力。

Note:“+”meant affinity;“-”meant non-affinity.

2.2 阳性化合物的确定

根据 Drug Bank 或 Therapeutic Target Database 或最新文献得到的信息, 分别以上市小分子药物阿加曲班^[21]、利伐沙班^[22]作为抑制凝血酶、FX 的阳性对照药物, 以正处于临床试验的 PCI-27483^[23]、BMS-962212^[24]作为 FVII、FXI 的对照抑制剂。阳性化合物结构及其对应的靶蛋白见图 1。

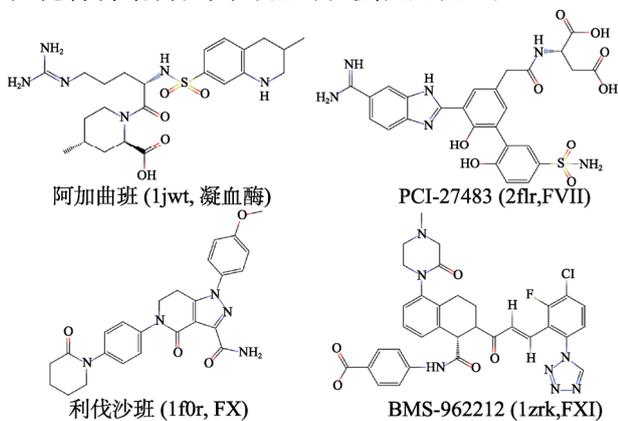


图 1 阳性化合物结构及其对应的靶蛋白

Fig. 1 Structures of positive references and corresponding target proteins

2.3 AutoDock Vina 分子对接参数的确定

利用 pymol 软件分离原配体和靶蛋白后, 再利用 AutoDock Vina 重新进行靶点蛋白和原配体对接, 分析对接后的原配体与对接前的构象变化, 得到 RMSD 的值均 <2 , 表明该对接参数合理可靠。4 个靶点相关参数设置及对接后的相关结果见表 3。

表 3 AutoDock Vina 中 4 个靶点的参数设置和对应结果

Tab. 3 Parameters setup and corresponding results for four targets in AutoDock Vina

PDB ID	中心坐标(x, y, z)/nm	盒子大小(x×y×z)/nm	RMSD	最低结合能/kcal·mol ⁻¹
1jw	15.907, -13.54, 23.704	3.6×3.6×3.6	1.188 6	-9.33
2flr	52.683, -6.575, 9.672	3.8×3.8×3.8	0.298 4	-12.28
1f0r	7.356, 4.695, 22.422	3.4×3.4×3.4	1.326 3	-10.37
1zrk	109.104, 19.898, 52.617	3.6×3.6×3.6	0.833 5	-9.43

2.4 对接结果分析

分析原配体与靶蛋白相互作用情况, 得到其相互作用见表 4。随后利用 AutoDock Vina 分别对“2.1”及“2.2”项下的化合物及靶蛋白进行分子对接。为了避免假阴性及假阳性化合物的产生, 以活性化合物最低结合能的平均值为参考, 将低于该参考值的化合物认定为阳性结果。比较原配体、阳性对照化合物、活性化合物与各靶蛋白之间主要作用残基的相似性, 推测活性化合物是否与阳性对照化合物或原配体具有相似药理作用。

表 4 原配体与靶蛋白相互作用情况

Tab. 4 Interactions between original ligands and targets

原配体	靶蛋白	相互作用	
		疏水作用	氢键
4-氧代-2-苯甲酰基磺酰基-邻羟基-吡咯并[1,2-a]吡嗪-6-羧酸[1-(N-羟基氨基甲酰基)-哌啶-4-基乙氧基]-酰胺	凝血酶	His79、Tyr83、Asn131、Ile209、Ala230、Glu232、Ser235、Trp257、Gly268	Asp229、Ser256、Gly258、Gly260、Tyr270
		[2'-羟基-3'-(1H-吡咯并[3,2-C]吡啶-2-基)-联苯-3-基甲基]-脲	FVII
噻吩并[3,2-b]吡啶-2-磺酸[1-(1-氨基-异喹啉-7-基甲基)-2-氧代-吡咯烷-3-基]-酰胺	FX	Glu97、Thr98、Try99、Phe174、Ala190、Cys191、Ser195、Val213、Ser214、Trp215、Cly216、Glu217、Cys220	Gly219
4-甲基戊酸{1-[4-胍基-1-(噻唑-2-羰基)丁基氨基甲酰基]-2-甲基-丙基}-酰胺	FXI	Leu146、Ala190、Cys191、Lys192、Ser195、Thr213、Trp215、Glu217、Cys219、Gly226	Asp189、Gly216、Gly218

2.4.1 鸡血藤中活性化合物与靶点凝血酶 鸡血藤中活性化合物与凝血酶有较强亲和力的化合物有 9 种, 分别是(24S)-24-丙基胆甾-5-烯-3 β -醇、3-羟基豆甾-5-烯-7-酮、菜油甾醇、常春藤皂苷元、 β -谷甾醇、豆甾醇、鹰爪豆碱、白芷内酯以及甘草查耳酮 a, 前 8 种化合物的最低结合能低于阿加曲班, 其中(24S)-24-丙基胆甾-5-烯-3 β -醇的最低结合能低于凝血酶原配体。鸡血藤中活性化合物、阳性对照化合物与靶点凝血酶相互作用情况见表 5。结果显示阿加曲班与原配体均占据凝血酶残基 His79、Ala230、Glu232 等组成的活性空腔, 均与凝血酶 Ser256、Gly258 形成氢键相互作用; 而活性化合物中, 白芷内酯占据凝血酶相似的活性空腔, 并与凝血酶 Gly258 形成氢键相互作用, 且白芷内酯最低结合能低于阿加曲班, 提示白芷内酯可能与阿加曲班有相似活性。除此之外, (24S)-24-丙基胆甾-5-烯-3 β -醇及甘草查耳酮 a 同样占据凝血酶相似的活性空腔, 分别与 Gly260 及 Asp229、Tyr270 形成氢键, 这 2 个化合物与原配体相互作用方式相似, 提示可能与原配体具有相似活性。其他化合物则与原配体、阳性化合物均无相似活性。相关化合物结合模式以及与周围氨基酸残基的相互作用, 结果见图 2。

表 5 各化合物与凝血酶相互作用情况

Tab. 5 Interactions between chemical compounds and prothrombin

化合物名称	最低结合能/ kcal·mol ⁻¹	相互作用	
		疏水作用	氢键
阿加曲班	-7.72	His79*, Trp86, Leu132, Ile209*, Asp229, Ala230*, Cys231, Glu232*, Val255, Trp257*, Glu259, Gly260, Cys261, Tyr270	Ser256*, Gly258*
(24S)-24-丙基胆甾-5-烯-3β-醇	-9.51	His79*, Tyr83*, Trp86#, Asn131*, Leu132#, Asp229#, Cys231#, Glu232*#, Ser235*, Val255#, Ser256, Trp257*#, Gly258, Glu259, Cys261#	Ala230, Gly260*
3-羟基豆甾-5-烯-7-酮	-9.20	His79*#, Trp86#, Asn131*, Leu132#, Ile209*#, Asp229#, Ala230*#, Glu232*#, Asp234, Ser235*, Val255, #Ser256, Trp257*#, Gly258, Glu259#, Gly260#	Glu130
菜油甾醇	-9.02	His79*#, Trp86#, Asn131*, Leu132#, Ile209*#, Ala230*#, Ser235*, Val255#, Ser256, Trp257*#, Gly258, Gly260#	Glu130
常春藤皂苷元	-8.92	His79*#, Leu132#, Asp229#, Ala230*#, Glu232*#, Ser235*, Val255#, Ser256, Trp257*#, Gly258, Gly260#, Gly268*, Tyr270#	-
β-谷甾醇	-8.90	His79*#, Leu132#, Asp229#, Ala230*#, Glu232*#, Ser235*, Val255#, Ser256, Trp257*#, Gly258, Gly260#, Gly268*, Phe269, Tyr270#	-
豆甾醇	-8.67	His79*#, Trp86#, Leu132#, Asp229#, Ala230*#, Glu232*#, Gly233, Ser235*, Val255#, Ser256, Trp257*#, Gly258, Gly260#, Phe269	-
鹰爪豆碱	-8.18	Asp229#, Ala230*#, Glu232*#, Val255#, Ser256, Trp257*#, Gly258, Gly260#, Cys261#, Gly268*, Phe269	-
白芷内酯	-7.87	His79*#, Trp86#, Leu132#, Asp229#, Ala230*#, Glu232*#, Ser235*, Val255#, Ser256, Trp257*#, Gly260#, Gly268*	Gly258*#
甘草查耳酮 a	-7.45	His79*#, Trp86#, Leu132#, Ala230*#, Glu232*#, Val255#, Ser256, Trp257*#, Gly260#, Gly268*	Asp229*, Tyr270*

注：“-”表示无相互作用；“*”表示该残基与原配体一致；“#”表示该残基与阳性化合物一致。

Note:“-”meant non-interaction; “*”meant the same residues with original ligands; “#”meant the same residues with positive references.

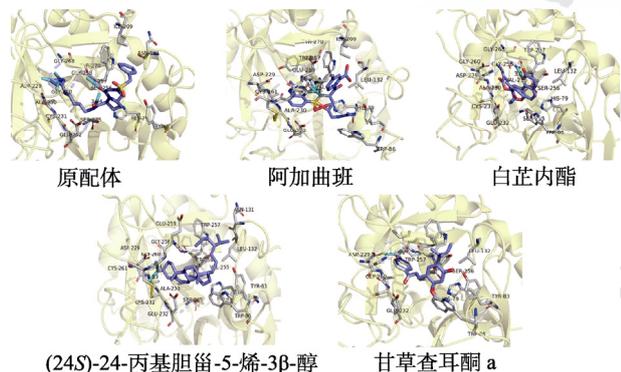


图 2 原配体、阳性对照化合物、活性相似化合物与凝血酶结合模式

Fig. 2 Binding mode of original ligands, positive references and similar chemical compounds with prothrombin

2.4.2 鸡血藤中活性化合物与靶点 FVII 与 FVII 有较强亲和力的化合物有 9 种，分别是甘草查耳酮 a、豆甾醇、牛角花酮、芦荟大黄素、苜蓿酚、β-谷甾醇、毛蕊异黄酮、菜油甾醇以及(24S)-24-丙基胆甾-5-烯-3β-醇，以上化合物的最低结合能均低于 PCI-27483。鸡血藤中活性化合物、阳性对照化合物与靶点 FVII 相互作用情况见表 6。结果显示 PCI-27483 与原配体均占据 FVII 残基 Leu41、Cys42、Cys191 等组成的活性空腔，均与 Trp215 形成 π 键；PCI-27483 还与 FVII 残基 Ser190、

Lys192、Gln217 形成氢键，而原配体则与 FVII 残基 His57 形成 π 键，并同时与 His57、ASP60、Ser195 形成氢键；甘草查耳酮 a 除占据相似活性空腔外，还分别与 His57、Gln217 等形成氢键相互作用，牛角花酮、毛蕊异黄酮则与 Ser195、Gln217 等形成氢键相互作用，同时还与 His57 形成 π 键作用，说明以上化合物可能与 PCI-27483 及原配体均有相似活性；而芦荟大黄素、苜蓿酚除与 Ser195 形成氢键相互作用外，也与 His57 形成 π 键，表明芦荟大黄素、苜蓿酚可能与原配体具有相似活性。相关化合物结合模式以及与周围氨基酸残基的相互作用结果见图 3。

2.4.3 鸡血藤中活性化合物与靶点 FX 与 FX 有较强亲和力的化合物有 7 种，分别是 3-羟基豆甾-5-烯-7-酮、豆甾醇、菜油甾醇、(24S)-24-丙基胆甾-5-烯-3β-醇、常春藤皂苷元、β-谷甾醇以及野靛黄素，以上化合物的最低结合能均低于利伐沙班，且 3-羟基豆甾-5-烯-7-酮、豆甾醇的最低结合能低于 FX 原配体。鸡血藤中活性化合物、阳性对照化合物与靶点 FX 相互作用情况见表 7。结果显示利伐沙班与原配体均占据 FX 残基 Try99、Phe174、Trp215 等组成的芳香性口袋，并均与 Gly219 形成氢键；

表 6 各化合物与凝血因子 VII 相互作用情况

Tab. 6 Interactions between chemical compounds and FVII

化合物名称	最低结合能/ kcal·mol ⁻¹	相互作用	
		疏水作用	氢键
PCI-27483	-6.70	Leu41*, Cys42*, His57, Cys58*, Cys191*, Gly193, Ser195, Val213*, Ser214*, Trp215*, Gly216, Gly219, Cys220, Gly226	Ser190, Lys192, Gln217
甘草查耳酮 a	-10.49	Leu41*#, Cys42*#, Ser190*, Cys191*#, Lys192*, Ser195#, Val213*#, Ser214*#, Trp215*#, Gly216#, Gly219#, Cys220#	His57*, Cys58, Gln217#
豆腐醇	-10.42	His57#, Asp60, Cys191*#, Lys192*, Ser195#, Ser214*#, Trp215*#, Gly216#, Gln217, Gly219#, Cys220#	Asp189, Ser190#
牛角花酮	-10.07	Cys42*#, His57#, Cys58*#, Ser190*, Cys191*#, Ser214*#, Trp215*#, Gly216#, Gly219#	Gly193, Ser195*, Gln217#, Cys220
芦荟大黄素	-10.04	Ser190*, Lys192*, Asp194, Val213*#, Ser214*#, Trp215*#, Gly216#, Gln217, Cys220#	Cys191, Gly193, Ser195*
苜蓿酚	-9.90	Cys42*#, Ser190*, Cys191*#, Lys192*, Gly193#, Val213*#, Ser214*#, Trp215*#, Gly216#, Gln217, Cys220#	Leu41, Ser195*
β-谷甾醇	-9.73	Gly97, Asp170, Cys191*#, Lys192*, Ser195#, Ser214*#, Trp215*#, Gly216#, Gln217, Gly219#, Cys220#	Ser190#
毛蕊异黄酮	-9.96	Cys42*#, His57#, Ser190*, Cys191*#, Lys192*, Gly193#, Ser214*#, Trp215*#, Gly216#, Gln217#, Cys220	Leu41, Ser195*, Gly216, Gln217#, Cys220
菜油甾醇	-9.36	Gly97, Asp170, Cys191*#, Lys192*, Ser195#, Ser214*#, Trp215*#, Gly216#, Gln217, Gly219#, Cys220#	Ser190#
(24S)-24-丙基胆甾-5-烯-3β-醇	-9.35	Leu41*#, Cys42*#, His57#, Cys58*#, Asp60*, Lys192*, Gly193#, Ser195#, Trp215*#, Gln217, Gly219#	Ser195*

注：“*”表示该残基与原配体一致；“#”表示该残基与阳性化合物一致。

Note: “*” meant the same residues with original ligands; “#” meant the same residues with positive references.

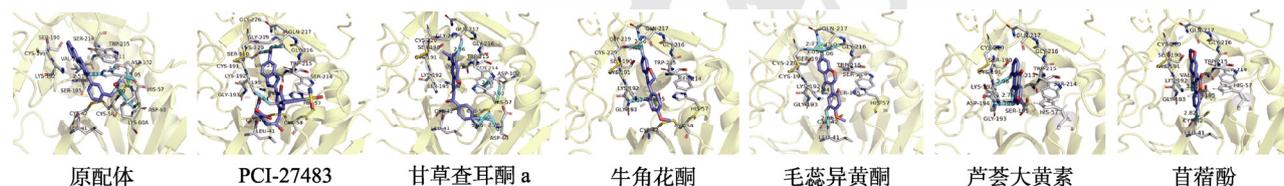


图 3 原配体、阳性对照化合物、活性相似化合物与凝血因子 VII 结合模式

Fig. 3 Binding mode of original ligands, positive references and similar chemical compounds with FVII

表 7 各化合物与凝血因子 X 相互作用情况

Tab. 7 Interactions between chemical compounds and FX

化合物名称	最低结合能/ kcal·mol ⁻¹	相互作用	
		疏水作用	氢键
利伐沙班	-7.16	His57, Glu97*, Thr98*, Try99*, Phe174*, Ala190*, Cys191*, Gln192, Ser195*, Val213*, Gly219*, Ser214*, Trp215*, Gly216*, Glu217*	
3-羟基豆腐-5-烯-7-酮	-10.19	Try99*#, Phe174*#, Asp189#, Ala190*#, Cys191*#, Gln192, Ser195*#, Val213*#, Ser214*#, Gly219*, Trp215*#, Gly216*#, Glu217*#, Cys220*, Ile227, Tyr228	
豆腐醇	-9.15	Try99*#, Phe174*#, Asp189#, Ala190*#, Cys191*#, Gln192, Ser195*#, Cys220*, Val213*#, Ser214*#, Trp215*#, Gly216*#, Gly219, Ile227	
菜油甾醇	-8.85	Try99*#, Phe174*#, Asp189#, Ala190*#, Cys191*#, Gln192, Val213*#, Ser214*#, Trp215*#, Gly216*#, Gly219, Cys220*, Gly226, Ile227	
(24S)-24-丙基胆甾-5-烯-3β-醇	-8.69	His57, Try99*#, Phe174*#, Ala190*#, Cys191*#, Gln192, Ser195*#, Val213*#, Ser214*#, Trp215*#, Gly216*#, Gly219, Cys220*	
常春藤皂苷元	-8.37	Try99*#, Phe174*#, Asp189#, Ala190*#, Cys191*#, Gln192, Ser195*#, Val213*#, Ser214*#, Trp215*#, Gly216*#, Gly219, Gly226, Ile227, Tyr228	
β-谷甾醇	-7.82	Try99*#, Phe174*#, Asp189#, Ala190*#, Cys191*#, Gln192, Asp194, Val213*#, Trp215*, Gly216, Glu217*, Gly219, Cys220*	
野靛黄素	-7.81	His57, Try99*#, Ala190*#, Gln192, Ser195*#, Val213*#, Ser214*#, Trp215*#, Gly216*#, Asp189, Gly219, Gly226	Tyr228

注：“-”表示无相互作用；“*”表示该残基与原配体一致；“#”表示该残基与阳性化合物一致。

Note: “-” meant non-interaction; “*” meant the same residues with original ligands; “#” meant the same residues with positive references.

而活性化合物中, 3-羟基豆甾-5-烯-7-酮同样占据 FX 相似的活性空腔, 并与 FX 的残基 Gly219 形成氢键, 这与前期报道利伐沙班与 FX 的作用方式一致^[25], 且 3-羟基豆甾-5-烯-7-酮与 FX 最低结合能低于利伐沙班以及原配体, 提示其可能与利伐沙班有相似活性, 且可能具有更强的抑制 FX 的作用。其他化合物则与原配体、阳性化合物均无相似活性。相关化合物结合模式以及与周围氨基酸残基的相互作用结果见图 4。

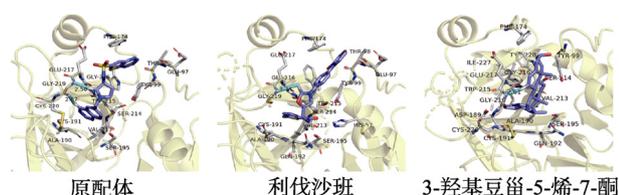


图 4 原配体、阳性对照化合物、活性相似化合物与凝血因子 X 结合模式

Fig. 4 Binding mode of original ligands, positive references and similar chemical compounds with FX

2.4.4 鸡血藤中活性化合物与靶点 FXI 与 FXI 有较强亲和力的化合物有 8 种, 分别是白芷内酯、3-羟基豆甾-5-烯-7-酮、(+)-儿茶酸、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素、常春藤皂苷元、芦荟大黄素以及 3,7-二羟基-6-甲氧基二氢黄酮醇。鸡血藤中活性化合物、阳性对照化合物与靶点 FXI 相互作用情况见表 8。结果显示 BMS-962212 与原配体均占据 FXI

表 8 各化合物与凝血因子 XI 相互作用情况

Tab. 8 Interactions between chemical compounds and FXI

化合物名称	最低结合能/ kcal·mol ⁻¹	相互作用	
		疏水作用	氢键
BMS-962212	-8.36	Glu98、Leu146*、Ala190*、Cys191*、Ser195*、Thr213*、Ser214、Trp215*、Gly216、Glu217*、Gly218、Cys219*、Gly226*	Lys192、So4247
白芷内酯	-7.36	Asp189、Ala190*、Cys191*#、Lys192*#、Ser195*#、Thr213*#、Ser214#、Gly216#、Gly218#、So4247	Glu217
3-羟基豆甾-5-烯-7-酮	-7.00	His57、Ala190*、Cys191*#、Lys192*#、Ser195*#、Thr213*#、Ser214#、Trp215*#、Gly216#、Gly218#、Cys219*#、So4247	Glu217
(+)-儿茶酸	-6.99	Leu146*#、Ala190*、Cys191*#、Lys192*#、Ser195*#、Thr213*#、Trp215*#、Gly216#、Glu217*#、Gly218#、Cys219*#	Asp189*
毛蕊异黄酮	-6.94	Ala190*、Cys191*#、Ser195*#、Thr213*#、Gly216#、Gly218#、Cys219*#、Gly226*#	Asp189*、Lys192#、So4247#
芒柄花黄素	-6.89	Ala190*、Cys191*#、Thr213*#、Ser214#、Trp215*#、Gly216#、Gly218#、Cys219*#、Gly226*#、So4247	Asp189*、Lys192#
常春藤皂苷元	-6.72	Asp189、Ala190*、Cys191*#、Lys192*#、Ser195*#、Thr213*#、Ser214#、Trp215*#、Gly216#、Glu217*#、Gly218#、So4247	-
芦荟大黄素	-6.72	Ala190*、Ser195*#、Thr213*#、Ser214#、Trp215*#、Gly226*#	Asp189*、Gly216*、Gly218*、So4247#
3,7-二羟基-6-甲氧基二氢黄酮醇	-6.48	Asp189、Ala190*、Cys191*#、Thr213*#、Trp215*#、Gly216#、Gly218#、Cys219*#、So4247	His57、Lys192#、Ser195、Ser214

注: “-”表示无相互作用; “*”表示该残基与原配体一致; “#”表示该残基与阳性化合物一致。

Note: “-” meant non-interaction; “*” meant the same residues with original ligands; “#” meant the same residues with positive references.

残基 Cys191、Ser195、Thr213 等组成的活性空腔, BMS-962212 与 FXI 残基 Lys192、So4247 形成相互作用, 原配体则与 Asp189、Gly216、Gly218 形成相互作用; 毛蕊异黄酮占据同样的活性空腔, 且同时与 Lys192、So4247、Asp189 形成氢键, 表明毛蕊异黄酮可能与 BMS-962212 及原配体均有相似活性; 芒柄花黄素、芦荟大黄素则分别与 Asp189、Lys192 及 Asp189、So4247 等形成氢键作用, 表明以上化合物可能与原配体具有相似活性。相关化合物结合模式以及与周围氨基酸残基的相互作用结果见图 5。

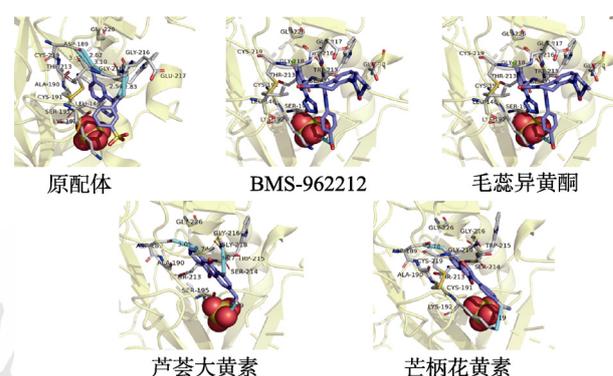


图 5 原配体、阳性对照化合物、活性相似化合物与凝血因子 XI 结合模式

Fig. 5 Binding mode of original ligands, positive references and similar chemical compounds with FXI

3 讨论

传统的中药药理研究效率较低,而计算机药物虚拟筛选通过从中药单体数据库,从几十到上百万个分子中,筛选与疾病特定靶标分子相互作用的化合物或是符合定量构效关系模型的化合物,从而实现了高通量的中药单体筛选,无疑对目前中药有效成分的新药开发是有益的^[26]。鸡血藤属于活血化瘀类中药,历年来对于鸡血藤药理作用的研究主要集中在抗血小板聚集、抗炎抗肿瘤等方面,鸡血藤抗凝血及抗凝血因子的相关报道较少,鸡血藤抗血栓形成的具体化合物仍未完全清楚。

TCMSP 数据库是研究中药、靶点与疾病相互作用的平台,目前该数据库已经广泛应用于中药药理研究当中。基于该数据库的权威性和专业性,在本研究当中,笔者利用该数据库进行鸡血藤化合物成分的筛选,从该数据库中,可收集到鸡血藤化学成分共 68 个。但由于并非所有化合物具有药理活性作用,在本研究当中,笔者针对这 68 个化合物进行 2 次筛选,根据药理学特征得到 23 种鸡血藤活性化合物,主要包括黄酮类、酚酸类、萜醌类、香豆素类、三萜类等。其中,根据文献报道,可知(+)-儿茶酸、芒柄花黄素、毛蕊异黄酮、芦荟大黄素等均是鸡血藤的主要化学成分,部分成分可作为鸡血藤饮片的质量控制标准,这些化学成分组成了鸡血藤的药效物质基础,并为鸡血藤的药理作用提供研究目标^[27-28]。随后笔者以反向分子对接技术进一步对鸡血藤活性化合物抗凝血的靶点进行初步预测,根据初步筛选结果发现这 23 种活性化合物主要作用于 4 个凝血相关靶点,包括凝血酶、FVII、FX 和 FXI。这 4 个靶点均是凝血过程的关键靶点,并涉及内外凝血途径。FVII 主要与外源性凝血过程的启动有关,活化的 FVII 与组织因子形成复合物,激活凝血因子 IX 和 FX; FXI 则与内源性凝血过程有关,FXI 被活化后,通过一系列凝血因子的相互作用,使 FX 活化; FX 被激活后则与凝血因子 V 形成凝血酶原酶复合物,激活凝血酶,最终导致纤维蛋白单体凝血块的形成。

尽管反向分子对接技术对鸡血藤抗凝血活性进行了预测,但仍需要进一步验证不同化合物与凝血相关靶点的相互作用。而分子对接技术是基

于实验测定或同源模型构建受体生物大分子的三维结构,对小分子与受体结合构象进行评价,明确其与受体结合活性的新技术。因此,分子对接技术有一定的实验依据,在研究化合物药理作用方面比其他高通量筛选技术有优势^[26]。分子对接结果发现,白芷内酯可与凝血酶相互作用,其作用方式与阿加曲班相似。白芷内酯是一类香豆素类化合物,属于 7,8-呋喃香豆素类,据报道呋喃香豆素类具有一定的抗凝活性,呋喃香豆素类通过结构修饰后,其抗凝活性增强,抗凝效果与华法林相当,可使凝血酶时间显著延长^[29-30],这提示白芷内酯可能成为合成新型凝血酶抑制剂的基础原料。据报道,FX 的活性口袋主要由 Try99、Phe174、Trp215 等组成,配体与 FX 作用的关键在于与口袋中的 Gly219 形成氢键,这与本研究的对接结果相似。而通过与利伐沙班的作用机制对比发现 3-羟基豆甾-5-烯-7-酮与利伐沙班具有相似的作用机制^[25]。3-羟基豆甾-5-烯-7-酮则属于甾醇类化合物,虽然已有大量研究发现该化合物具有抗氧化、抗炎、抗衰老、降血脂等功效,但该类化合物抗凝作用鲜见文献报道^[31],本研究为甾醇类药理研究提供了新方向。同时,根据分子对接的结果可知,鸡血藤黄酮类成分主要与 FVII 和 FXI 的活性空腔相互作用。甘草查耳酮 a、毛蕊异黄酮与牛角花酮主要通过影响 FVII 参与外源性凝血过程,同时表现出与 PCI-27483 相似的活性;而毛蕊异黄酮还可作用于 FXI 参与内源性凝血过程,其作用机制与 BMS-962212 相似。虽然目前有关于毛蕊异黄酮作用于凝血过程的相关报道^[32],但其具体机制尚未完全明确,而根据本研究结果可知,毛蕊异黄酮可能通过与凝血因子结合,抑制凝血酶形成,发挥抗凝的作用。尽管本研究所筛选的化合物成分大部分在水中的溶解度低,但是基于本研究的结果,将来可以通过不同的现代技术手段,对其进行合理有效的结构修饰甚至结构改造,开发出符合现代新药标准的新药,实现抗血栓单体新药的研发。

综上所述,本研究首次将反向药效团对接与分子对接技术应用到鸡血藤抗血栓活性成分的筛选中,实现了鸡血藤单体化合物的高通量筛选。本研究筛选出的活性小分子化合物不仅与血栓形成靶点具有较高的亲和力,且部分与已上市或在

临床试验当中的小分子药物作用相似, 基于此, 推测这部分活性化合物与已上市或正处于临床试验的小分子化合物具有相似的抗凝活性, 以此说明鸡血藤抗凝的具体药效团及相应的靶点。本研究不仅解释了鸡血藤黄酮类化学成分可能的抗凝机制, 还揭示了其他化学成分如香豆素类、甾醇类可能存在的抗凝作用, 在丰富了鸡血藤药理研究的同时, 也为开发抗血栓类单体制剂提供了方向。然而, 尽管以阳性参照物为标准, 确保了靶点活性位点的准确性, 但这些化合物与凝血酶及凝血因子的相互作用仍需要在下一步进行实验研究验证。此外, 目前有关鸡血藤化学成分的研究仍在不断的深入当中, 除了本研究预测的成分外, 在未来仍可能鉴定出更多鸡血藤的化学成分, 有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] HU S S, GAO R L, LIU L S, et al. Summary of the 2018 report on cardiovascular diseases in China[J]. Chin Circ J(中国循环杂志), 2019, 34(3): 209-220.
- [2] 《中国血栓性疾病防治指南》专家委员会. 中国血栓性疾病防治指南[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(36): 2861-2888.
- [3] YANG W J, XIA Z N, WANG X D, et al. Research progress of drug therapy of upper extremity deep vein thrombosis[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2020, 37(21): 2678-2683.
- [4] 刁丽, 苏素文, 赵敏, 等. 红花黄色素抗血栓作用研究进展[J]. 海峡药理学, 2017, 29(7): 124-126.
- [5] CHEN S X, WEN P J, WU Y H, et al. The relation of the anti-apoptotic effect of Panax notoginseng saponin with macrophage migration inhibitory factor[J]. Pharm Today(今日药理学), 2020, 30(4): 243-245.
- [6] CAO W L, LI J. Antithrombotic effects of recombinant hirudin in mice and its mechanism[J]. Chin J Appl Physiol(中国应用生理学杂志), 2018, 34(4): 371-374.
- [7] TAN J, LIN H Q, WANG H, et al. Research progress on the pharmacological activities and clinical application of Jixueteng[J]. Pharm Clin Chin Mater Med(中药与临床), 2018, 9(5): 61-65.
- [8] 李翠琴, 杨祖才, 王振生. 鸡血藤提取物对抗凝与纤溶影响的实验研究[J]. 中医杂志, 1980(4): 78-80.
- [9] 杨冉冉. 中药鸡血藤的质量控制及对斑马鱼抗血栓作用的初步研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [10] YAN L G, RUAN J S, ZHANG L, et al. Effect of aqueous extracts of several kinds of herbs on human platelet aggregation and expression of P-selectin *in vitro*[J]. Chin J Integr Med, 2015, 21(4): 286-290.
- [11] LI C T, WANG X Q, KANG M, et al. Studies on antiplatelet aggregation and antithrombosis action of total flavonoids of *Millettia nitida* var. *Hirsutissima* Z.Wei[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2015, 32(11): 1316-1318.
- [12] YIN X M, ZHAO S Y, RAO L H, et al. Screening of the effective parts of *Spatholobus suberectus* on anti-platelet aggregation[J]. J Exp Lab Med(实验与检验医学), 2016, 34(4): 422-424.
- [13] YANG M H, LIU Y, KONG L Y. The innovative drug research base on effective monomer compositions from traditional Chinese medicine[J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med-World Sci Technol(世界科学技术-中医药现代化), 2016, 18(3): 329-336.
- [14] PINZI, RASTELLI G. Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18): E4331.
- [15] HUANG Y X, LIN J T, YI W M, et al. Research on the potential mechanism of gentiopicroside against gastric cancer based on network pharmacology[J]. Drug Des Devel Ther, 2020(14): 5109-5118.
- [16] LIU Y J, HUILONG X, HAO C, et al. Screening of anti-depressant active ingredients in *Acori Tatarinowii* Rhizoma based on molecular docking technique[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2019, 50(11): 2612-2619.
- [17] CHEN L D, CAO Y, ZHANG H, et al. Network pharmacology-based strategy for predicting active ingredients and potential targets of Yangxinshi tablet for treating heart failure[J]. J Ethnopharmacol, 2018(219): 359-368.
- [18] QIAO M, ZHU Y, ZHAO Y, et al. Study on mechanism of active compounds of celery seed in the treatment of liver fibrosis based on network pharmacology[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2021, 38(3): 257-265.
- [19] WANG X, SHEN Y H, WANG S W, et al. PharmMapper 2017 update: A web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(W1): W356-W360.
- [20] 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): 455-461.
- [21] KOSTER A, FISCHER K G, HARDER S, et al. The direct thrombin inhibitor argatroban: A review of its use in patients with and without HIT[J]. Biologics, 2007, 1(2): 105-112.
- [22] HART R G, SHARMA M, MUNDL H, et al. Rivaroxaban for stroke prevention after embolic stroke of undetermined source[J]. N Engl J Med, 2018, 378(23): 2191-2201.
- [23] RAMANATHAN R K, THOMAS G W, KHORANA A A, et al. A phase 2 study of PCI-27483, a factor VIIa inhibitor in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer[J]. Oncology, 2019, 96(4): 217-222.

- [24] PERERA V, LUETTGEN J M, WANG Z Q, et al. First-in-human study to assess the safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of BMS-962212, a direct, reversible, small molecule factor XIa inhibitor in non-Japanese and Japanese healthy subjects[J]. Br J Clin Pharmacol, 2018, 84(5): 876-887.
- [25] ROEHRIG S, STRAUB A, POHLMANN J, et al. Discovery of the novel antithrombotic agent 5-chloro-*N*-({(5*S*)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1, 3-oxazolidin-5-yl}methyl) thiophene-2-carboxamide (BAY 59-7939): An oral, direct factor Xa inhibitor[J]. J Med Chem, 2005, 48(19): 5900-5908.
- [26] YANG L, WANG X M. High-throughput drug screening method and application for TCM monomer[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2014, 21(8): 4-6.
- [27] LIU J, WANG X J, DAI Z, et al. Research progress of *Spatholobi caulis*[J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2019, 33(2): 188-194.
- [28] YANG T C, LIN Z K, DING P, et al. Studies on systematical quality evaluation of *Spatholobus suberectus*[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2009, 44(23): 1765-1768.
- [29] BRUNI R, BARRECA D, PROTTI M, et al. Botanical sources, chemistry, analysis, and biological activity of furanocoumarins of pharmaceutical interest[J]. Molecules, 2019, 24(11): 2163.
- [30] LIPEEVA A V, KHVOSTOV M V, BAEV D S, et al. Synthesis, *in vivo* anticoagulant evaluation and molecular docking studies of bicoumarins obtained from furocoumarin peucedanin[J]. Med Chem, 2016, 12(7): 674-683.
- [31] SALEHI B, QUISPE C, SHARIFI-RAD J, et al. Phytosterols: from preclinical evidence to potential clinical applications[J]. Front Pharmacol, 2020(11): 599959.
- [32] ZHANG S Y, CHENG J, CHEN W J, et al. Interactions between thrombin and natural products of *Millettia nitita* var. *hirsutissima* using capillary zone electrophoresis[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009, 877(32): 4107-4114.

收稿日期: 2020-07-28
(本文责编: 陈怡心)