

基于虚拟筛选的酸性磷酸酶抑制剂及其抑制机理

李颖畅¹, 李园园¹, 赵楠¹, 杜凤霞^{1,2}, 仪淑敏¹, 励建荣^{1*}

(¹渤海大学食品科学与工程学院 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心 辽宁锦州 121013

²大连工业大学 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心 辽宁大连 116034)

摘要 磷酸酶是参与水产品鲜味物质肌苷酸(IMP)的降解途径中的关键酶,以海鲈鱼肝中酸性磷酸酶为研究对象,通过同源建模、分子对接等手段,从中药化合物中虚拟筛选出 ACP 抑制剂,并研究其抑制机理。结果表明:苯甲酸、槲皮素、十六烷二酸、二氢白藜芦醇具有很强的抑制磷酸酶活性作用。选取抑制效果最好的十六烷二酸结合荧光光谱分析,结果表明:氢键和范德华力是十六烷二酸与 ACP 结合的主要驱动力,同时导致 ACP 荧光强度降低,最大发射波长红移。十六烷二酸与 ACP 的活性中心结合,使 ACP 二维和三维结构发生变化,降低了 ACP 与 IMP 的接触,可延缓 IMP 降解。

关键词 同源建模;虚拟筛选;酸性磷酸酶;抑制剂;十六烷二酸

文章编号 1009-7848(2022)09-0036-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.09.004

酸性磷酸酶(ACP)属于水解酶类,在酸性介质(pH 5~6)中催化各种磷脂水解释放磷酸单酯和无机磷酸盐^[1]。ACP 也是参与鲜味物质 IMP 的降解途径中的关键酶^[2],寻找 ACP 抑制剂是保持水产品鲜味的主要措施。然而,利用传统方法寻找 ACP 抑制剂不仅低效、目标范围大,且试验成本高,而采用虚拟筛选可以避免这一问题。虚拟筛选技术是利用计算机的高性能计算,对大型小分子数据库进行分析,从中选可能的化合物^[3]。虚拟筛选针对特定的靶标或多个靶标,其具有很强的靶向性,且筛选得到的活性化合物具有针对性强、特异性高、毒副作用小和活性高等特点^[4]。

目前,通过虚拟筛选寻找抑制剂已取得许多成就。Lin 等^[5]从中药数据库中筛选出 HMG-COA 还原酶的抑制剂,以期找到副作用更少、毒性更小的降血脂候选药物。张倩等^[6]从天然产物库进行虚拟筛选,利用分子对接方法寻找蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 抑制剂,用于治疗 II 型糖尿病。Reithmeier 等^[7]从小分子数据库中筛选出 6 种化合物,作为抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP/ACP5)酶活抑制剂。上述研究说明通过分子对接和虚拟筛选的方法来寻找潜在的 ACP 抑制剂是可行的。鉴于此,通过同

源建模构建 ACP 蛋白结构,并以此为靶点,利用虚拟筛选,从中药数据库中寻找更加实用、安全和有效的 ACP 抑制剂,然后,结合紫外吸收光谱、内源荧光光谱、同步荧光光谱、三维荧光光谱技术研究 ACP 与抑制剂的作用机理,探究筛选出小分子与 ACP 作用过程中的构象变化。

1 材料与方法

1.1 试验材料及试剂

ACP 从海鲈鱼肝中分离纯化得到。十六烷二酸、苯甲酸、二氢白藜芦醇和苯甲酸(HPLC ≥ 98%),四川省维克奇生物科技有限公司;酸性磷酸酶和总蛋白定量测试盒,南京建成生物工程研究所;醋酸钠、冰醋酸,上海源叶生物科技有限公司。

970CRT 荧光分光光度仪,上海精密仪器仪表有限公司;UV-2550 紫外-可见分光光度仪,岛津仪器(苏州)有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 同源建模及模型验证 NCBI 数据库(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>)中下载三色鱼的 ACP 的氨基酸序列(登录号:AEV45926.1),将 ACP 氨基酸序列提交到 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org>)网站进行 ACP 蛋白酶的同源建模,构建海鲈鱼 ACP 的晶体结构^[8],并将构建好的 ACP 的模型用拉氏构象图(Ramachandran plots)和 SAVES v6.0(<https://saves.mbi.ucla.edu>)对

收稿日期:2021-09-15

基金项目:“十三五”国家重点研发计划项目
(2018YFD0901004)

作者简介:李颖畅(1973—),女,博士,教授

通信作者:励建荣 E-mail:lijr6491@163.com

模型进行质量评估。SWISS-MODEL 是常用的同源建模的一种方法,它是利用已知蛋白的一段氨基酸序列预测未知蛋白质空间结构^[9]。

1.2.2 虚拟筛选 以同源建模得到的 1nd6.1.A 蛋白为靶点虚拟海鲈鱼 ACP 的抑制剂。将建好的蛋白模型用 Discovery Studio (DS)4.5 进行预处理,包括加氢、去杂原子、删除水分子和修补非完整的氨基酸残基等,最后用 CHARMM(哈佛大学高分子力学化学)固定对蛋白进行能量最小化,使该结构能正确用于分子对接过程。利用 DS4.5 的 Define and Edit Binding Site 工具,通过 PDB 位点记录估算受体空腔或活性位点,预测配体结合位点^[10]。中药小分子取自 TCSMP(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform)库(<http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/index.php>)。选取分子质量小于 500 的小分子进行添加氢原子和能量最小化(Minimize Ligand)操作,并用 DS4.5 的 LibDock 和 CDOCKER 程序对其进行筛选。筛选过程如下:

首先采用 LibDock 快速筛选方法(LibDock-fast)进行对接,选取对接得分(LibDockScore)前 20%的小分子,再用 LibDock 高质量筛选方法(LibDock-high quality searching method)与 ACP 蛋白进行对接,然后选取对接得分大于 100 的小分子,最后采用 CDOCKER 程序与所建的 ACP 蛋白模型进行对接,选取得分大于 50 的小分子进行购买及酶抑制活性测试。

1.2.3 所筛选物质对 ACP 活性的抑制 ACP 酶活性为 700 U/mL,蛋白质含量为 1.4 mg/mL(海鲈鱼肝中分离纯化得到,已达到电泳纯)。取一定量的所筛选的小分子物质溶液,加入 ACP 酶液 1 mL,用 20 mmol/L NaAc-HAc 缓冲液[pH 5.0,含 5 mmol/L β -巯基乙醇(ME)]稀释。将小分子物质与 ACP 混合物混匀,4 °C 黑暗中反应 15 min。采用酸性磷酸酶(ACP)测试盒和总蛋白定量测试盒测定 ACP 酶活和蛋白质浓度。

1.2.4 十六烷二酸对 ACP 的内源荧光光谱分析

十六烷二酸对 ACP 的内源荧光光谱分析根据 Zhou 等^[11]方法。十六烷二酸对 ACP 的同步荧光光谱分析参考王晓霞等^[12]方法。十六烷二酸对 ACP 的三维荧光光谱分析:三维荧光光谱测定溶液配

制过程同内源荧光光谱。参数设置为狭缝宽度均为 2.5 nm,扫描速度为 60 000 nm/min,在激发波长为 200~360,发射波长 200~500 nm 范围内进行三维荧光扫描。

1.2.5 数据分析 试验数据用平均值 \pm 标准差(standard deviation,SD)表示,每组样品最少重复 3 次。用 Origin 8.0 进行作图。采用 SPSS16.0 进行方差分析,当 $P < 0.05$ 认为数据差异显著。

2 结果与讨论

2.1 同源建模结果及模型评价

将查到的已知三色鱼的 ACP 蛋白的氨基酸序列提交到 SWISS-MODEL 网站进行同源建模,结果如表 1 所示。对于 ACP,1nd6.1.A 的序列相似性最高为 46%,GMQE 得分为 0.71。序列相似性可以反映两条序列的相似程度。GMQE 得分可以初步评价所建模型的质量,GMQE 得分越高,表明模型的质量越好。

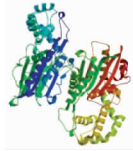
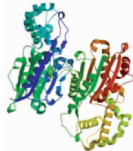
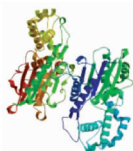
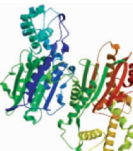
局部质量图 1a,所建模型的大部分氨基酸得分都高于 0.6,表明这个 ACP 模型具有较好的质量。QMEAN 的 Z-score 得分可以反映蛋白结构与所建模型结构的一致性程度,以此评估模型的质量^[13]。通过 QMEAN 得分可知,同源建模方法所建的 ACP 蛋白模型的 Z-score 得分大于 -4.0,这表明所建的模型结构是合理的。此外,在拉氏构象图(图 1b)显示了 ACP 所有氨基酸在处于最适区、允许区域、一般允许区域以及不允许区域的氨基酸数量占总量的百分比分别为 90.0%,9.1%,0.7%和 0.2%。由此也表明 1nd6.1.A 模型具有很好的质量,可作为进行虚拟筛选 ACP 抑制剂的靶点。Hollingsworth 等^[14]用同源建模的方法建立了 HIV-1 的 gp 120 蛋白的晶体结构并利用拉氏构象图以及 ANOLEA 得分评价了所建模型质量。史艳丽等^[15]利用同源建模得到柞蚕小吐白水软化病毒(Ap IV)3C 蛋白酶的三维模型并进行优化,选用 Profile-3D 和 Ramachandran Plot 进行评估。

2.2 虚拟筛选结果

虚拟筛选结果如表 2 所示。对于 ACP 蛋白,筛选到 7 个物质。在评估了 7 种化合物的对接分数、实用性和已知功能之后,选择苯甲酸、槲皮素、十六烷二酸、二氢白藜芦醇进行酶活抑制验证,这

表1 ACP蛋白的三维结构及描述

Table 1 Descriptions and structures of ACP protein models

蛋白类型	序列模板	描述	序列一致性/%	序列相似性/%	GMQE 得分	QMEAN 得分	模型
	1nd6.1.A	酸性磷酸酶	51.00	46	0.71	-0.74	
ACP	2hpa.2.A	酸性磷酸酶	32.58	36	0.71	-0.90	
	1nd5.2.A	酸性磷酸酶	50.5	46	0.70	-1.25	
	1rpt.1.A	酸性磷酸酶	51.92	47	0.72	-2.36	

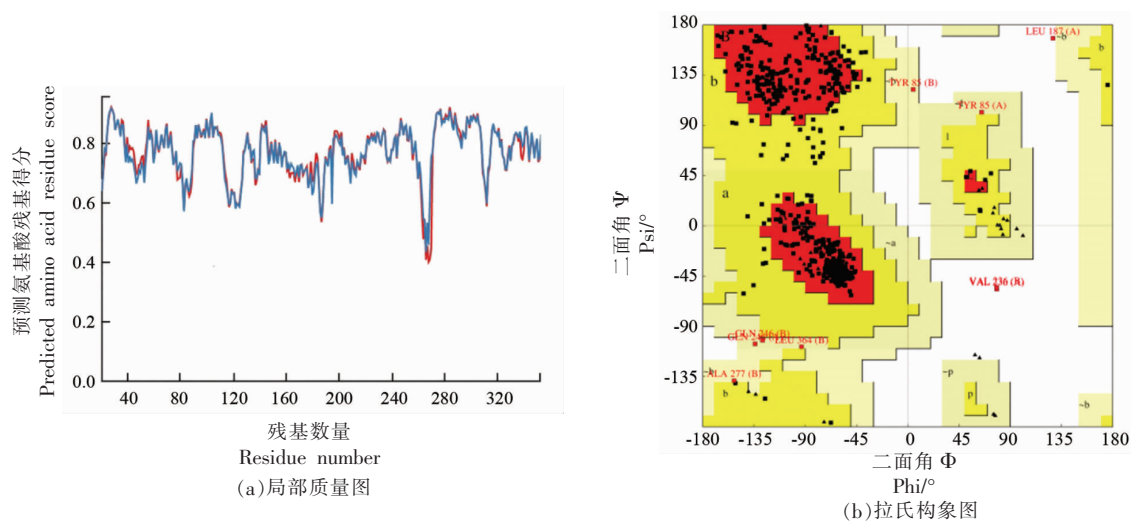


图1 酸性磷酸酶(ACP)蛋白模型质量评价结果

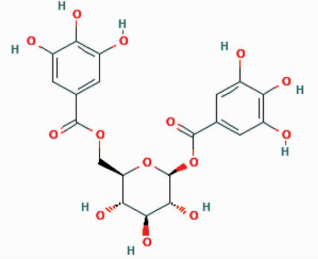
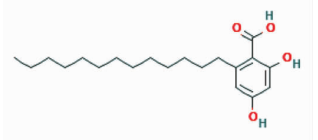
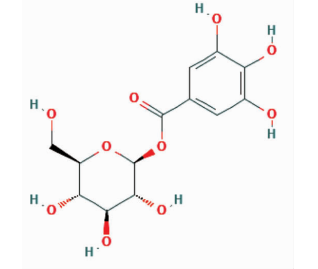
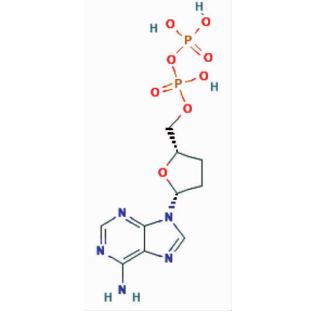
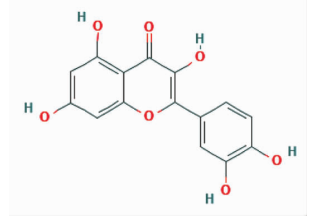
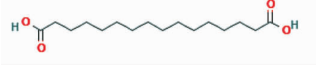
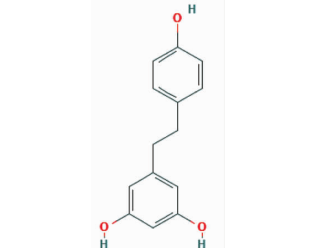
Fig.1 Evaluation results of ACP protein models

4种化合物来自草药或者植物。苯甲酸是一种芳香酸类有机化合物^[6],在某些植物的叶和茎中以游离酸的形式存在,低毒无味常用作食品添加剂,具有抑制细菌繁殖生长的作用。槲皮素是一种常见的黄酮类化合物,存在于多种蔬菜、水果和茶叶中,在生物学和药理学方面发挥重要作用,如抗癌、抗氧化、抗病毒、抗动脉粥样硬化和抗炎等活

性^[7]。十六烷二酸是用于人类血压调节研究的一种中药中间体,来源于白附子、椿皮、苦陈皮等。二氢白藜芦醇具有较强的抗氧化性,它是一种典型的非黄酮类多酚,来源于珍贵中药材石斛兰,可用于治疗急性胰腺炎和相关肺损伤^[8]。因此,可以预见,它们应用于食品上的潜力很大。

表 2 TCSMP 数据库虚拟筛选 ACP 抑制剂的结果

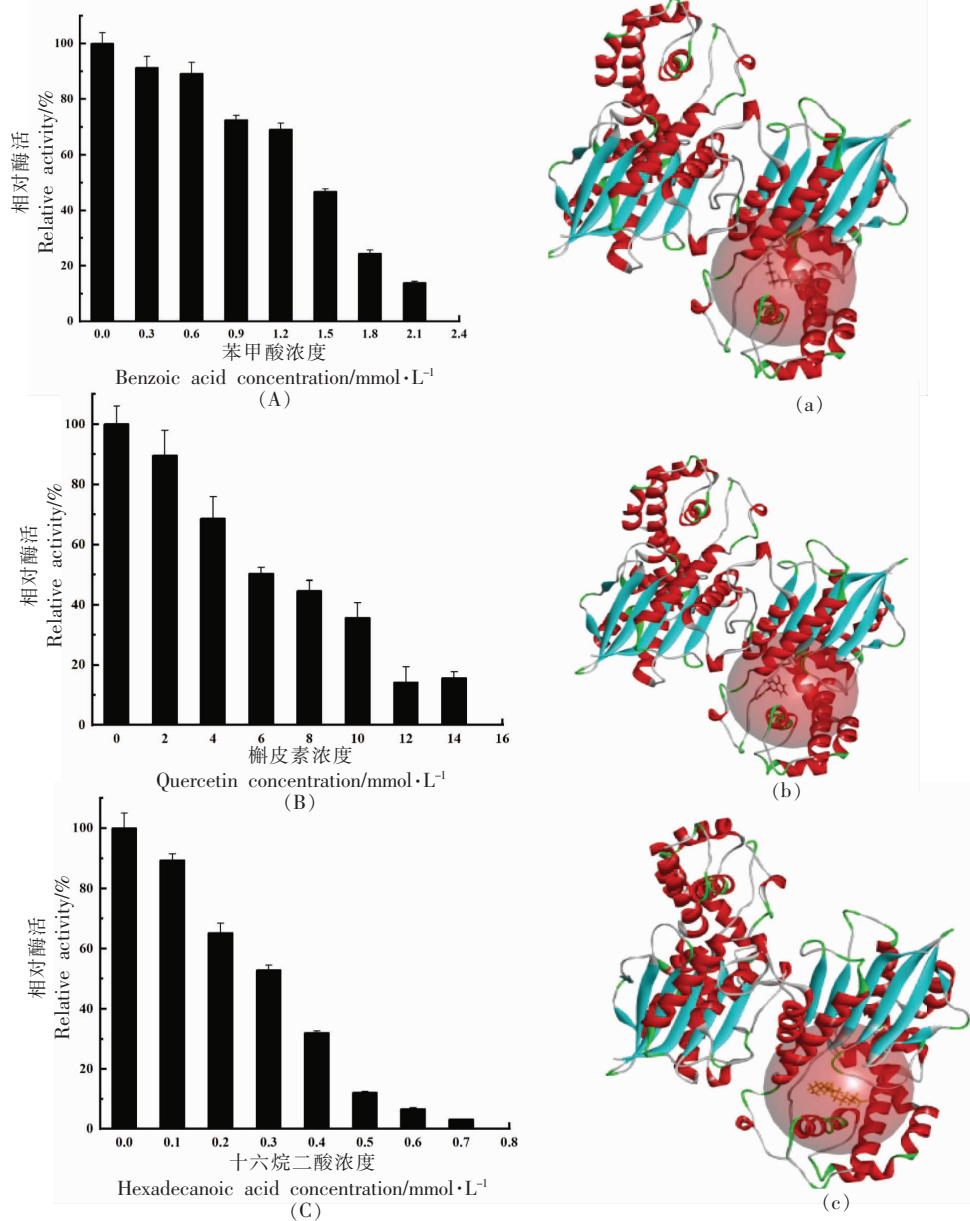
Table 2 Virtual screening results for ACP of weever from the TCSMP database

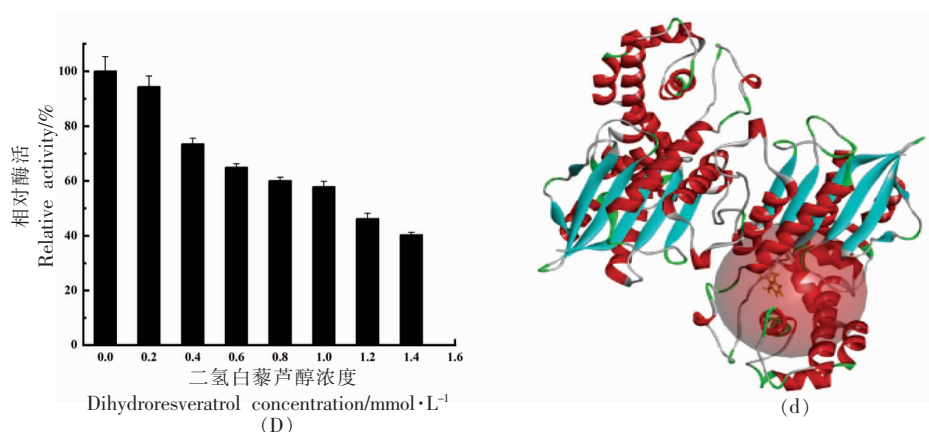
序号	名称	2D 结构	分子式	相对分子质量	LibDock 评分	能量值
F1	1,6-双邻苯三酰 β -D-葡萄糖		$C_{20}H_{20}O_{14}$	484.4	145.517	51.2724
F2	苯甲酸		$C_{20}H_{32}O_4$	336.5	110.74	55.8827
F3	β -糖蛋白		$C_{13}H_{16}O_{10}$	332.26	101.689	51.533
F4	2',3'-二脱氧腺 苷-5'-二磷酸		$C_{10}H_{15}N_5O_8P_2$	395.2	115.112	50.5185
F5	槲皮素		$C_{15}H_{10}O_7$	302.23	105.573	58.1355
F6	十六烷二酸		$C_{16}H_{30}O_4$	286.41	106.158	55.9421
F7	二氢白藜芦醇		$C_{14}H_{14}O_3$	230.26	102.434	55.4357

2.3 筛选物质对 ACP 活性的影响

苯甲酸、槲皮素、十六烷二酸、二氢白藜芦醇与 ACP 的分子对接图和对 ACP 的抑制作用如图 2 所示,由图 2 可知苯甲酸、槲皮素、十六烷二酸、二氢白藜芦醇对接在 ACP 活性位点中心,它们与 ACP 蛋白结合良好。苯甲酸对 ACP 活性的抑制具有浓度依赖关系。随着苯甲酸浓度的增加,ACP 的剩余酶活性持续降低。当苯甲酸浓度处于 0.3~1.2 mmol/L 范围时,ACP 的酶活下降较慢,之后下降速度加快,当苯甲酸浓度达到 2.1 mmol/L 时,ACP 的剩余酶活性仅为 13.76%。在图 2B 中,当槲皮素浓度范围为 2~12 mmol/L 时,ACP 剩余酶活随着

槲皮素浓度上升而下降,但当槲皮素浓度为 14 mmol/L 时,槲皮素对 ACP 活性的抑制效果趋于稳定,故而认为槲皮素对 ACP 活性的最佳抑制浓度约为 12 mmol/L。十六烷二酸对 ACP 活性有很强的抑制作用,浓度越大,抑制效果越好,酶活性下降 50% (IC_{50}) 的十六烷二酸抑制浓度约为 0.38 mmol/L。当浓度达到 0.7 mmol/L 时,ACP 的活性仅剩余 3.16%。在二氢白藜芦醇浓度为 0.2~1.4 mmol/L 时,ACP 的剩余酶活性下降较慢。当二氢白藜芦醇浓度达到 1.4 mmol/L 时,ACP 的剩余酶活性为 40.29%。苯甲酸、槲皮素、十六烷二酸、二氢白藜芦醇的 IC_{50} 分别为 1.42, 6.03, 0.38 和 1.18





注:A-D:苯甲酸、槲皮素、十六烷二酸和二氢白藜芦醇对 ACP 活性抑制;a-d:苯甲酸、槲皮素、十六烷二酸和二氢白藜芦醇与 ACP 对接图。

图 2 苯甲酸、槲皮素、十六烷二酸和二氢白藜芦醇对 ACP 活性的影响及对接图

Fig.2 Effects of benzoic acid, quercetin, hexadecanoic acid and dihydroresveratrol on ACP activity and docking diagram

mmol/L,故而十六烷二酸对 ACP 活性抑制效果最好,因此可以将其作为新的抑制剂进一步探究十六烷二酸与 ACP 蛋白的相互作用。

2.4 十六烷二酸与 ACP 相互作用的机制

2.4.1 十六烷二酸对 ACP 内源荧光光谱的影响

在 280 nm 左右的激发波长下,蛋白质中的内源荧光基团包括酪氨酸(Tyr)和色氨酸(Trp)残基,对蛋白的微环境非常敏感^[19],通过荧光分子中荧光基团的信息可以反映蛋白的结构变化。如果酪氨酸和色氨酸残基接近羰基或离子化,使蛋白荧光强度降低^[20]。

十六烷二酸对 ACP 内源荧光光谱的影响如图 3a 所示。随着十六烷二酸浓度的增加,ACP 的

内源荧光强度不断降低,但当十六烷二酸浓度大于 0.6 mmol/L 后,内源荧光强度的降低幅度趋于缓慢。0.8 mmol/L 十六烷二酸处理后,ACP 蛋白残基的荧光强度为原酶荧光强度的 42.3%。荧光猝灭可能是由于酪氨酸和色氨酸氧化的影响^[21]。最大荧光发射峰可以反映蛋白质构象变化的程度^[22]。ACP 蛋白荧光红移越大,在变性过程中的三级构象变化越大。在图 3b,ACP 蛋白的最大发射波长发生红移,最大荧光发射峰从 333.6 nm 移动到 336.6 nm。这是因为十六烷二酸与 ACP 相互作用,导致 ACP 的色氨酸和酪氨酸残基折叠而向极性环境偏移,致使荧光基团周围的微环境改变,酶蛋白的三级结构改变,最大发射波长多数发生红移。

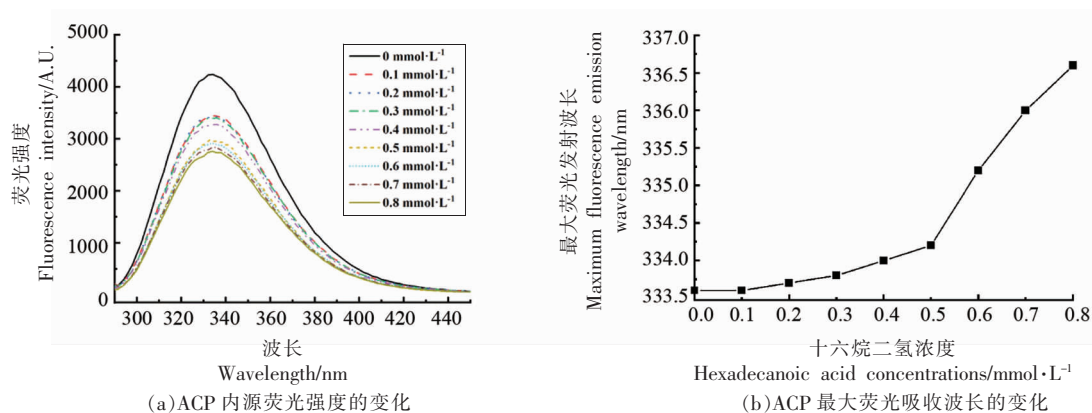


图 3 十六烷二酸对 ACP 内源荧光光谱的影响

Fig.3 Effect of various concentrations hexadecanedioic acid on intrinsic fluorescence emission spectrum of ACP

2.4.2 十六烷二酸对 ACP 同步荧光光谱的影响

同步荧光光谱可以提供荧光基团构象的变化,具有窄化谱带、简化光谱和较少光谱重叠等优势^[23]。通常情况, $\Delta\lambda$ 设为 15 nm 时,显示 ACP 中酪氨酸 (Tyr) 残基的荧光光谱特性; $\Delta\lambda$ 设为 60 nm 时,反映 ACP 中色氨酸 (Trp) 残基的特征荧光光谱特性^[24]。十六烷二酸与 ACP 相互作用的同步荧

光光谱如图 4 所示,加入十六烷二酸后,ACP 的酪氨酸和色氨酸代表的发射峰强度均降低。随着十六烷二酸浓度的提高,ACP 的两个荧光吸收峰均不断猝灭。表明十六烷二酸改变了 ACP 蛋白质荧光基团残基微环境,蛋白二级结构变得疏松,极性增加,疏水性减小^[25]。这与内源荧光光谱所测结果一致。

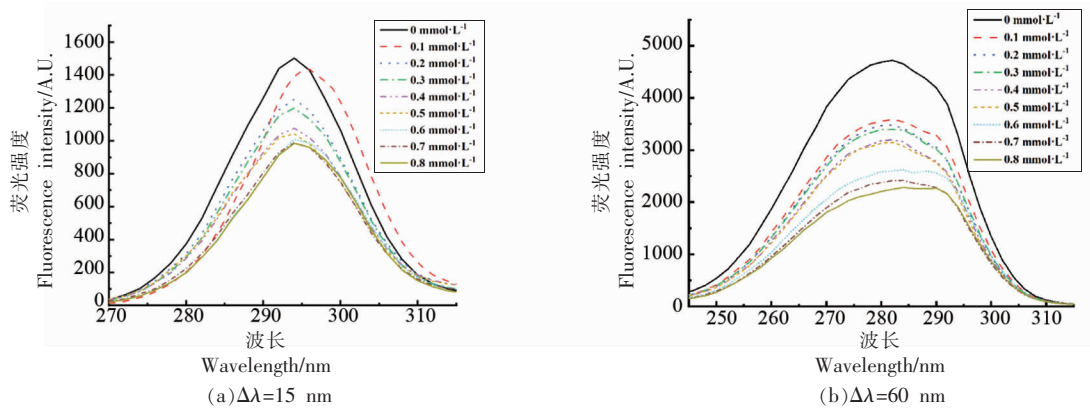
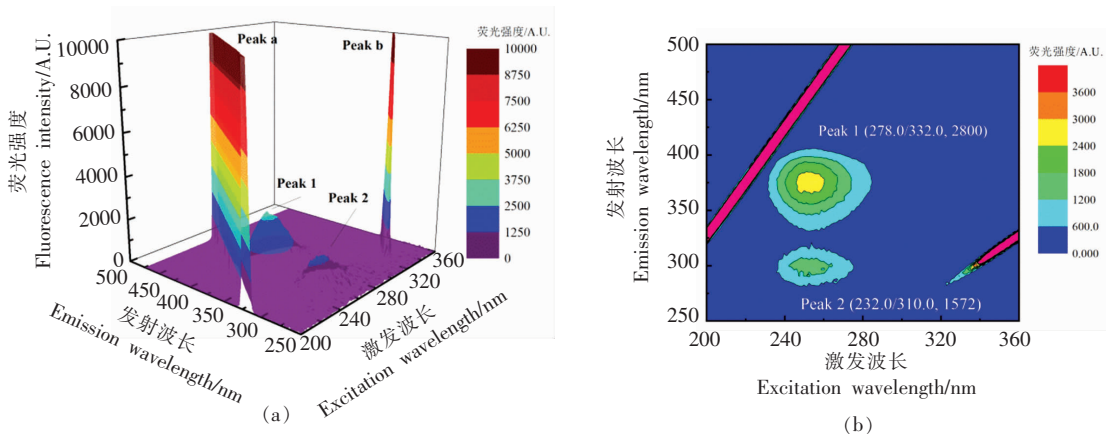


图 4 十六烷二酸与 ACP 的同步荧光光谱

Fig.4 Synchronous fluorescence spectra of hexadecanedioic acid and ACP

2.4.3 十六烷二酸与 ACP 三维荧光 三维荧光的光谱数据相比二维荧光光谱,具有更多的坐标点,故而三维荧光显示的信息更精准,选择性更高。图 5 为 ACP 和十六烷二酸与 ACP 体系的三维荧光图及剖面图,“山脊”状的 Peak a 和 Peak b 是典型的瑞利散射峰 ($\lambda_{ex}=\lambda_{em}$)。“驼峰”状的 Peak1 和 Peak2 是常见的荧光峰 ($2\lambda_{ex}=\lambda_{em}$) 分别代表酪氨酸和色氨酸残基的光谱特征^[26]。当十六烷二酸与 ACP 相互作用后,Peak1 和 Peak2 的荧

光强度明显降低,同时峰位发生红移,表明十六烷二酸的加入使 ACP 的酪氨酸和色氨酸残基周围的微环境极性发生变化,亲水性增强,疏水性减小。十六烷二酸对 ACP 的肽链骨架结构产生了影响,Peak a 的荧光强度在加入十六烷二酸后略有下降,说明十六烷二酸与 ACP 结合后使 ACP 蛋白发生解聚作用,蛋白质结构分散、粒径变小,造成 ACP 荧光强度降低。这与荧光光谱和同步荧光光谱的结果相对应。



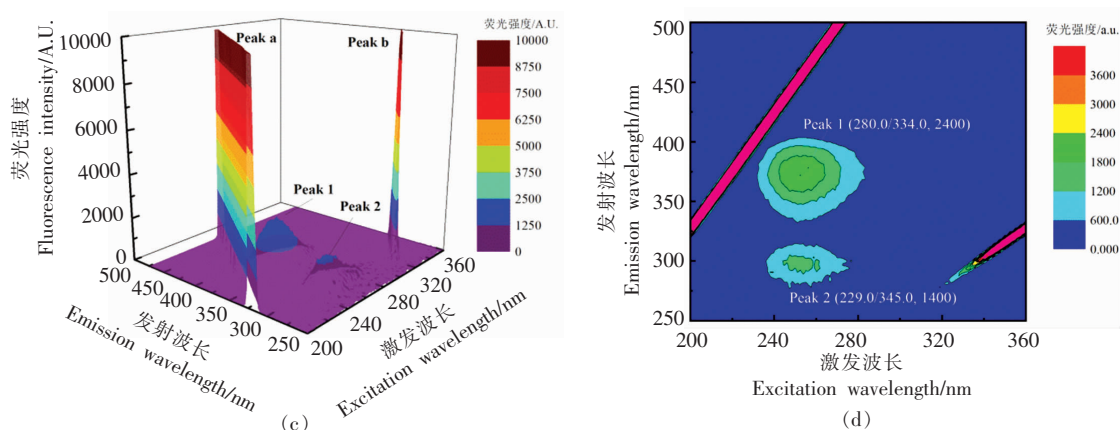


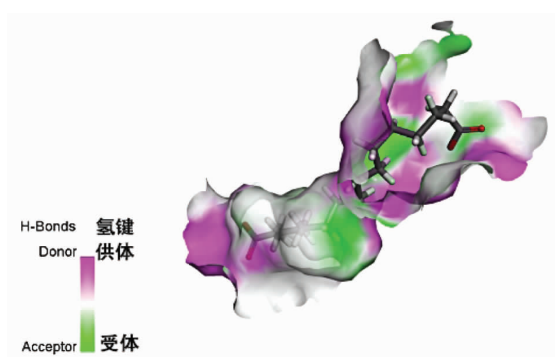
图 5 十六烷二酸与 ACP 相互作用前 (a 和 b) 后 (c 和 d) 的三维荧光光谱

Fig.5 The three-dimensional fluorescence spectra of ACP and hexadecanedioic acid before (a and b) and after (c and d) reaction

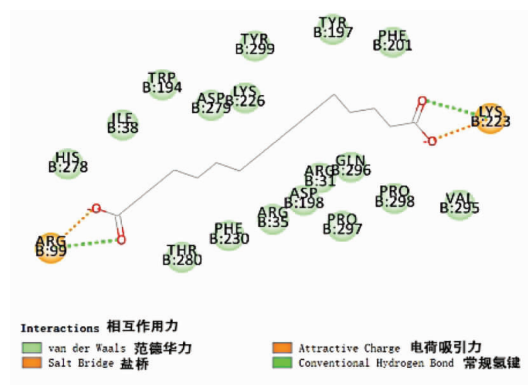
2.5 十六烷二酸对 ACP 分子对接模拟

配体-蛋白质相互作用可通过 DS4.5 进一步分析。十六烷二酸与 ACP 的相互作用如图 6 所示,发现其与 ACP 蛋白酶的活性区域的关键氨基酸形成了多种相互作用,如传统氢键、电荷相互作用和范德华力等。由图 6 的十六烷二酸与 ACP 相互作用的分子对接模拟图及氨基酸残基的 2D 和 3D 示意图可知,十六烷二酸的小分子对接在 ACP 蛋白的活性中心位置,同时 2D 图显示了十六烷二酸与 ACP 结合作用贡献较大的氨基酸残基,其中十六烷二酸与 ARG99 和 LYS223 氨基酸残基之间

存在氢键作用力 (Conventional hydrogen bond)。十六烷二酸与 HIS 278、ILF 38、TRP 194、ASP 79、LYS 226、TYR 299、ARG 35 等氨基酸残基之间存在范德华作用力 (Van der Waals),这说明十六烷二酸与 ACP 通过多种作用力稳定结合且氢键和范德华力是结合反应的主要作用力。通过分子对接和荧光技术,十六烷二酸与 ACP 基于氢键和范德华相互作用的酸性磷酸酶结合,从而导致酸性磷酸酶的静态猝灭^[27]。因此推测,在这个氢键复合体中,力占主导地位。



(a)十六烷二酸对接到 ACP 蛋白的活性区域的 3D 氢键图



(b)十六烷二酸对接到 ACP 蛋白对接口袋附近的氨基酸的相互作用二维图

图 6 分子对接分析配体-蛋白相互作用

Fig.6 Analysis of ligand-protein interactions by molecular docking

3 结论

1) 通过将 ACP 蛋白的氨基酸序列提交到 SWISS-MODEL 中进行同源建模,并用 QMEAN 方

法以及拉氏构象图对所建蛋白模型进行质量评价,发现所建的 1nd6.1.A 模型的质量较好,打分高,作为进行虚拟筛选抑制剂的靶点。

2) 进行 ACP 的虚拟筛选后, 选取 LibDock Score 和 -CDOCKER ENERGY 打分较高的小分子, 筛选了 7 个小分子物质。选取实用性强的 4 种物质进行 ACP 活性抑制验证发现, 苯甲酸、槲皮素、十六烷二酸、二氢白藜芦醇对 ACP 酶活都具有很强的抑制作用, 其半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 1.42, 6.03, 0.38 和 1.18 mmol/L。

3) 选取抑制酶活性最强的十六烷二酸检验其对 ACP 结构的影响。十六烷二酸与 ACP 结合后, 导致酶的内源荧光强度下降, 最大发射波长发生红移。同步荧光光谱表明, 十六烷二酸使 ACP 的色氨酸 (Try) 残基附近微环境极性增大, 亲水性增强, 导致 ACP 的构象改变。三维荧光光谱法分析可知, 十六烷二酸对 ACP 的荧光强度产生猝灭, 证明了十六烷二酸改变荧光分子的周围微环境极性, 进一步证实了 ACP 二级结构的变化。

4) 分子对接模拟表明, 十六烷二酸分子对接在 ACP 的活性中心, 结合作用力有氢键、电荷相互作用和范德华力, 阐明了十六烷二酸对 ACP 的作用机理。

参 考 文 献

- [1] MITEVA R, ZAPRYANOVA D, FASULKOV I, et al. Investigations on acid phosphatase activity in the seminal plasma of humans and animals [J]. *Trakia Journal of Sciences*, 2010, 8(2): 184-187.
- [2] 吕东坡, 朱仁俊. 肌苷酸的研究现状及展望[J]. *肉类研究*, 2007(11): 12-15.
LV D P, ZHU R J. The research status and potential using of IMP[J]. *Meat Research*, 2007(11): 12-15.
- [3] 徐筱杰, 侯廷军, 乔学斌, 等. 计算机辅助药物分子设计方法研究[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 11-12.
XU X J, HOU T J, QIAO X B, et al. Research on computer aided drug molecular design method[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 11-12.
- [4] 吴萍, 孔德信. HMG-CoA 还原酶抑制剂的虚拟筛选模型的建立[J]. *计算机与应用化学*, 2009, 26(11): 1485-1490.
WU P, KONG D X. The establishment of virtual screening models for the discovery of HMG-CoA reductase inhibitors[J]. *Computers and Applied Chemistry*, 2009, 26(11): 1485-1490.
- [5] LIN S H, HUANG K J, WENG C F, et al. Exploration of natural product ingredients as inhibitors of human HMG-CoA reductase through structure-based virtual screening [J]. *Drug Design Development & Therapy*, 2015, 9: 3313-3324.
- [6] 张倩, 甘强, 刘霞, 等. 基于天然产物的蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 抑制剂的虚拟筛选(英文)[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2018, 45(4): 442-452.
ZHANG Q, GAN Q, LIU X, et al. Virtual screening of protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors based on natural products[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2018, 45(4): 442-452.
- [7] REITHMEIER A, LUNDBÄCK T, HARALDSSON M, et al. Identification of inhibitors of Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP/ACP5) activity by small-molecule screening [J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2018, 9(2): 1255-1271.
- [8] GNANENDRA S, ANUSUYA S, NATARAJAN J. Molecular modeling and active site analysis of SdiA homolog, a putative quorum sensor for *Salmonella typhimurium* pathogenicity reveals specific binding patterns of AHL transcriptional regulators [J]. *Journal of Molecular Modeling*, 2012, 18(10): 4709-4719.
- [9] KIEFER F, ARNOLD K, KÜNZLI M, et al. The SWISS-MODEL repository and associated resources [J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 37: 387-392.
- [10] HUANG K J, LIN S H, LIN M R, et al. Xanthone derivatives could be potential antibiotics: Virtual screening for the inhibitors of enzyme I of bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system [J]. *Journal of Antibiotics*, 2013, 66(8): 453-458.
- [11] ZHOU L, LIU W, XIONG Z, et al. Effect of ultrasound combined with malic acid on the activity and conformation of mushroom (*Agaricus bisporus*) polyphenoloxidase [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 90: 61-68.
- [12] 王晓霞, 马力通, 聂智华, 等. 多光谱法和分子对接模拟法研究黄腐酸与胃蛋白酶的相互作用[J]. *高等学校化学学报*, 2019, 40(9): 1840-1846.
WANG X X, MA L T, NIE Z H, et al. Interaction between fulvic acid and pepsin investigated by multispectral and molecular docking simulation [J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2019, 40

- (9): 1840–1846.
- [13] DING T, LI T, J LI. Virtual screening for quorum - sensing inhibitors of *Pseudomonas fluorescens* P07 from a food - derived compound database[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 127(3): 763–777.
- [14] HOLLINGSWORTH L R, BROWN A M, GANDOUR R D, et al. Computational study of HIV gp120 as a target for polyanionic entry inhibitors: Exploiting the V3 loop region[J]. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0190658.
- [15] 史艳丽, 刘宇博, 吴思晋, 等. ApIV 3C 蛋白酶抑制剂的虚拟筛选及活性验证[J]. *高等学校化学学报*, 2018, 39(4): 701–707.
- SHI Y L, LIU Y B, WU S J, et al. Virtual screening and activity verification of novel inhibitors of ApIV 3C protease[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2018, 39(4): 701–707.
- [16] SIEBER R, BÜTIKOFER U, BOSSET J O. Benzoic acid as a natural product in cultured dairy products and cheese[J]. *International Dairy Journal*, 1995, 5(3): 227–246.
- [17] RAVBER M, PEČAR D, GORŠEK A, et al. Hydrothermal degradation of rutin: Identification of degradation products and kinetics study[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(48): 9196–9202.
- [18] 卞兆祥, 曾少慧, 张宏杰, 等. 二氢白藜芦醇用于治疗急性胰腺炎和相关肺损伤的方法: CN106256349A[P]. 2016.
- BIAN Z X, ZENG S H, ZHANG H J, et al. Method of dihydroresveratrol for the treatment of acute pancreatitis and related lung injury: CN106256349A[P]. 2016.
- [19] SUN N, LEE S, SONG K B. Effect of high-pressure treatment on the molecular properties of mushroom polyphenoloxidase[J]. *LWT- Food Science and Technology*, 2002, 35(4): 315–318.
- [20] SCHENK G, GE Y, CARRINGTON L E, et al. Binuclear metal centers in plant purple acid phosphatases: Fe–Mn in sweet potato and Fe–Zn in soybean[J]. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 1999, 370(2): 183.
- [21] CAO M, CAO A, WANG J, et al. Effect of magnetic nanoparticles plus microwave or far-infrared thawing on protein conformation changes and moisture migration of red seabream (*Pagrus Major*) fillets[J]. *Food Chemistry*, 2018, 266(15): 498–507.
- [22] CAI L, ZHANG W, CAO A, et al. Effects of ultrasonics combined with far infrared or microwave thawing on protein denaturation and moisture migration of *Sciaenops ocellatus* (red drum)[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2019, 55: 96–104.
- [23] 申炳俊, 柳婷婷. 光谱法和分子对接技术研究胡桃醌与人血清白蛋白的相互作用[J]. *分析化学*, 2020, 48(10): 1383–1391.
- SHEN B J, LIU T T. Spectroscopy and molecular docking technique for investigation of interaction between juglone and human serum albumin[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2020, 48(10): 1383–1391.
- [24] SUTHAN T, DHANARAJ P V, RAJESH N P. Growth and characterization of organic material 3-hydroxybenzaldehyde single crystal by modified vertical Bridgman technique[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2012, 87(15): 194–198.
- [25] 王晓霞, 聂智华, 李松波, 等. 多光谱法与分子对接法研究盐酸四环素与牛血清白蛋白的相互作用[J]. *光谱学与光谱分析*, 2018, 38(8): 2468–2476.
- WANG X X, NIE Z H, LI S B, et al. Study on the Interaction between tetracycline hydrochloride and bovine serum albumin by multispectral and molecular docking [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2018, 38(8): 2468–2476.
- [26] TYAGI P, TYAGI M, AGRAWAL S, et al. Synthesis, characterization of 1,2,4-triazole Schiff base derived 3d-metal complexes: Induces cytotoxicity in HepG2, MCF-7 cell line, BSA binding fluorescence and DFT study [J]. *Spectrochimica Acta Part A Molecular & Biomolecular Spectroscopy*, 2017, 171(15): 246–257.
- [27] MORADI S, SHAREGHI B, SABOURY A A, et al. Investigation on the interaction of acid phosphatase with putrescine using docking, simulations methods and multispectroscopic techniques[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 150(1): 90–101.

Virtual Screening of Acid Phosphatase Inhibitors and Its Mechanism by Molecular Simulation

Li Yingchang¹, Li Yuanyuan¹, Zhao Nan¹, Du Fengxia^{1,2}, Yi Shumin¹, Li Jianrong^{1*}

¹College of Food Science and Technology, Bohai University, National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Jinzhou 121013, Liaoning

²Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning)

Abstract Phosphatase is a key enzyme involved in the degradation of inosinic acid (IMP) in aquatic products. Acid phosphatase from sea bass (*Lateolabrax japonicus*) liver was used as the research object. Through homologous modeling, molecular docking and other means, ACP inhibitors were selected from traditional Chinese medicine compounds and their inhibition mechanism was studied. The results showed that benzoic acid, quercetin, hexadecanoic acid and dihydroresveratrol have strong inhibitory effect on phosphatase activity. The results showed that hydrogen bond and van der Waals force were the main driving forces for the combination of hexadecanoic acid and ACP, which results in the decrease of the fluorescence intensity, the red shift of the maximum emission wavelength of ACP. The combination of hexadecanoic acid with the active center of ACP changed the two-dimensional and three-dimensional structure of ACP, reduced the contact between ACP and inosinic acid (IMP), and delays the degradation of IMP.

Keywords homology modeling; virtual screening; acid phosphatase; inhibitor; hexadecanoic acid