



四川農業大學

SICHUAN AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

基于福寿螺靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS 和
PcRoo 的杀螺剂设计研究

姓 名 _____ 马雨晴 _____

学 号 _____ 2020201082 _____

指导教师 _____ 陈华保 副教授 _____

专业名称 _____ 农药学 _____

研究方向 _____ 农药分子设计 _____

院所名称 _____ 农学院 _____

2023 年 6 月

分类号 S481.1
UDC 632

密 级 _____
学校代码 10626

四川农业大学
硕 士 学 位 论 文

基于福寿螺靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS
和 PcRoo 的杀螺剂设计研究

姓 名 马雨晴
学 号 2020201082
指导教师 陈华保 副教授
专业名称 农药学
研究方向 农药分子设计
院所名称 农学院

2023 年 6 月

A Dissertation Submitted to Sichuan Agricultural University
in Partial Fulfillment of the Requirements for
the Degree of Master of Science

Study on molluscicides design based on target
protein PcAdv, PcnWAS and PcRoo in
Pomacea canaliculata

by

Yuqing Ma

Supervised by

Assistant Professor Huabao Chen

Majored in

Pesticide Science

June, 2023

Sichuan Agricultural University

Wenjiang, Sichuan

学位论文答辩委员会组成

姓名	职称	工作单位	备注
胡安龙	教授	贵州大学	主席
王学贵	教授	四川农业大学	
林恬恬	副教授	四川农业大学	
杨春平	副教授	四川农业大学	
杨继芝	副教授	四川农业大学	

摘要

福寿螺 (*Pomacea canaliculata*) 对作物生产、生态环境和人类健康具有较大的威胁, 施用化学农药是目前防治福寿螺的常用方法之一, 然而实际生产中常见的药剂仅有四聚乙醛、氯硝柳胺等少数几个品种, 类别单一化问题突出, 已无法实现对福寿螺的有效防控。为了开发新型杀螺剂, 本研究采用计算机辅助药物设计的方法, 以前期研究发现的福寿螺关键靶标蛋白绒毛蛋白 (Advlin, PcAdv)、神经维斯科特-奥尔德里奇综合征同种型 X1 (neural Wiskott-Aldrich syndrome isoform X1, PcnWAS) 和纤毛小根蛋白 (Rootletin-like, PcRoo) 为基础, 利用虚拟筛选的手段获得了一系列具有不同程度杀螺活性的化合物, 并以此为基础建立了反映其结构和杀螺活性之间关系的模型, 为新型杀螺剂的筛选、定向设计和开发提供了可借鉴的技术方案。主要结果如下:

1. 通过计算法对靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 的三级结构模型及其与探针化合物的结合方式进行了预测, 对不同靶标蛋白分别构建了 5 个模型, 并分别选取了能量最低且氨基酸间扭转角排布最合理的三级结构模型。以此为基础, 采用蛋白空腔法寻找探针化合物与靶标蛋白的结合区域, 结果表明, 苦葛皂苷 A 与靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS 结合能力强的区域分别有 5 个和 3 个, 槟榔碱与靶标蛋白 PcRoo 结合能力强的区域有 2 个。进一步分子对接结果表明, 靶标蛋白与探针化合物苦葛皂苷 A 和槟榔碱结合的位点分别为 549 号丝氨酸、585 号赖氨酸、112 号丙氨酸和 47 号丝氨酸。

2. 采用分子对接的手段对 DrugBank 数据库中的 9213 个化合物进行了虚拟筛选。刚性对接结果表明, 针对靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 分别筛选得到排名靠前的化合物各 15 个。以刚性对接筛选得到的结果为基础进行柔性对接, 选取到了结合能明显降低的 6 个化合物, 分别为 6-四磷酸腺苷甲基-7,8-二氢蝶呤、3,8-二氨基-6-苯基-5-[6-[1-[2-[(1,2,3,4-四氢-9-吡啶基)氨基]乙基]-1-1,2,3-三唑]己基]-菲啶、海藻酸钾、硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸、巴氯芬和醋苯氨酸。

3. 研究了海藻酸钾、硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸、巴氯芬和醋苯氨酸对福寿螺的毒杀活性。室内生物活性测定结果表明, 硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸和巴氯芬毒杀福寿螺的 LC_{50} 值分别为 16.2437 mg/L 和 57.7102 mg/L。生理特征变化及生

化指标测定结果表明, 化合物海藻酸钾、硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸和巴氯芬可以导致福寿螺产生中毒症状, 具体表现为排泄物异常增多、耗氧率排氨率及氧氮比降低、血蓝蛋白含量降低、鳃部纤毛脱落及靶标蛋白基因表达量降低, 这些症状与探针化合物苦葛皂苷 A 和槟榔碱处理后福寿螺的中毒症状相同。进一步采用等温滴定量热法研究了候选化合物与靶标蛋白的结合情况, 结果显示, 靶标蛋白 PcnWAS 与化合物海藻酸钾、硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸能够发生体外结合, 结合常数分别为 $2.17 \pm 0.51 \times 10^{-4} / \text{M}$ 和 $2.08 \pm 0.94 \times 10^{-4} / \text{M}$ 。

4. 以苦葛皂苷 A 为模板, 建立了反映杀螺化合物结构与活性的药效团模型和 3D-QSAR 模型。药效团模型构建结果表明, 该模型包含 4 个化学特征元素, 具体包括 2 个疏水作用基团和 2 个氢键受体基团, 且化合物的药效团特征元素与杀螺活性具有一定的几何约束关系, 疏水作用基团与两个氢键供体基团和两个氢键受体的间的距离比例为 13.624:10.516:5.895。3D-QSAR 结果表明苦葛皂苷 A 及其它五环三萜及皂苷类化合物的结构和杀螺活性存在较高的相关性。通过对立体场、静电场、疏水场、氢键供体场和氢键受体场进行改变, 设计出了 3 个新颖的具有杀螺潜力的皂苷类化合物, 分子对接结果显示这些化合物与靶标蛋白结合后结合能明显降低。

以上结果表明从 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 的结构入手, 利用基于靶标蛋白的药物设计方法可以获得新的杀螺化合物, 该研究为新型杀螺化合物的研发奠定了基础。

关键词: 计算机辅助农药设计; 虚拟筛选; 构效关系分析; 杀螺化合物设计

Abstract

Pomacea canaliculata does great harm to crop production, ecological environment and human health, and currently, chemical molluscicides are the main method to control *P. canaliculata*. However, common molluscicides such as tetraacetaldehyde and chlornitrothiamine can not control it effectively. To find new compounds with molluscicidal activity for the prevention of *P. canaliculata*, in this study, with the help of computer-aided drug design, protein Advlin (PcAdv), neural Wiscott-Aldrich syndrome isoform X1 (PcnWAS) and ciliated root-like (PcRoo) were set as targets, a series of compounds with different degrees of molluscicidal activities were obtained, and then a model could reflect the relationship between their structure and molluscicidal activity was established. Finally, the efficient and reasonable screening of molluscicidal compounds was realized. This study provided a technical scheme for the screening, development and directional design of new molluscicides, and the main results are shown as follows:

1. The models of target protein PcAdv, PcnWAS, and PcRoo, as well as their binding sites with probe compounds, were predicted through computational. Five models were constructed for different target proteins, and the most reasonable model with the lowest energy and the most reasonable arrangement of amino acid twist angles were selected. On this basis, cavity method was used to find the binding region between the probe compound and target proteins. The results showed that there were 5 and 3 regions with strong binding ability between pedunsaponin A and protein PcAdv and PcnWAS respectively, and 2 regions with strong binding ability between arecoline and PcRoo. Results of molecular docking indicate that the binding sites between the target protein and probe compounds pedunsaponin A and arecoline are 549-ser, 585-lys, 112-ala, and 47-ser respectively.

2. A virtual screening in database DrugBank with 9213 candidate compounds was conducted via molecular docking techniques. The rigid docking results showed that 15 compounds were screened for the target proteins PcAdv, PcnWAS, and PcRoo

respectively that ranking high. Based on the results of rigid docking screening, flexible docking was carried out, and 6 compounds with significantly reduced binding energy were selected, including 6-adenosine tetraphosphate methyl-7,8-dihydropterin, 3,8 - diamino -6 -phenyl - 5 - [6 - [1 - [2 - [(1,2,3,4 - tetrahydro -9 -aridinyl) amino] ethyl] - 1,1,3 -triazole] hexyl] - phenanthridine, potassium alginate, thiocoenzyme adenine dinucleotide, baclofen and acedoben.

3. Several new molluscicidal compounds including potassium alginate, thiocoenzyme adenine dinucleotide and baclofen were obtained through indoor bioassay. The killing effects and symptoms of hit compounds on the snails were studied by immersion method, Winkler iodometry, sodium hypobromate oxidation method, ultraviolet absorption method and paraffin section method respectively. After that the target of these compounds on *P. canaculata* were verified. The results showed that the LC₅₀ values of thiocoenzyme adenine dinucleotide and baclofen killing *P. canaculata* were 16.2437 mg/L and 57.7102 mg/L, respectively. At the same time, these compounds could cause similar poisoning symptoms in *P. canaculata*, which were manifested as abnormal excretion, alteration of metabolic pathway, decreased content of hemocyanin, gill cilia shedding and decrease of target genes expression. Further, isothermal titration calorimetry was used to study the binding of candidate compounds and target proteins. The results showed that the target proteins and candidate compounds were bound in vitro, their binding constants with PcnWAS were $2.17 \pm 0.51 \times 10^{-4} / \text{M}$ and $2.08 \pm 0.94 \times 10^{-4} / \text{M}$.

4. Setting pedunsaponin A as a template, pharmacophore models and 3D-QSAR models were established to reflect the structure and activity of molluscicidal compounds. The construction results of the pharmacophore model indicate that the model contains four chemical characteristic elements, namely, 2 hydrophobic interaction groups and 2 hydrogen bond receptor groups, and the pharmacophore characteristic elements of the compound have a certain geometric constraint relationship with molluscicidal activity. The distance ratio between the hydrophobic

interaction group and the two hydrogen bond donor groups and the two hydrogen bond receptors is 13.624:10.516:5.895. The results of 3D-QSAR showed that there was a high correlation between the structure and molluscicidal activity of pedunsaponin A and other pentacyclic triterpenes. By optimizing the template compound pedunsaponin A, compounds with higher activity could be obtained. By changing the three-dimensional field, electrostatic field, hydrophobic field, hydrogen bond donor field, and hydrogen bond acceptor field, three novel compound structures with snail killing potential were designed. Molecular docking results showed that the binding energies of these compounds after binding to target proteins were significantly reduced.

All these results indicated that, based on the structure of target protein PcAdv, PcnWAS and PcRoo, new molluscicidal compounds could be found via computer-aided-pesticide-design technology, and this study lay a foundation of new molluscicides design.

Key words: Computer-aided pesticide design; Virtual screening; Structure-activity relationship; Design of molluscicidal compounds

目 录

第一章 文献综述	1
1 药物靶标的研究方法及其进展	1
2 基于靶标蛋白的药物设计的研究进展	3
3 计算机辅助药物设计的方法和技术	4
3.1 分子对接.....	5
3.2 虚拟筛选.....	5
3.3 定量构效关系.....	7
4 新农药的研发模式.....	9
4.1 以表型为基础的新农药研发.....	9
4.2 以靶标为核心的新农药研发.....	10
5 化合物毒杀福寿螺靶标研究进展	12
6 研究内容及技术路线.....	14
6.1 研究内容.....	14
6.2 技术路线.....	14
第二章 靶标蛋白三级结构模型构建及基于靶标蛋白的虚拟筛选	16
1 材料与方法.....	16
1.1 供试材料.....	16
1.2 试验方法.....	17
2 结果与分析.....	20
2.1 靶标蛋白拓扑结构的研究.....	20
2.2 靶标蛋白三级结构模型的构建.....	21
2.3 靶标蛋白三级结构模型评估.....	22
2.4 靶标蛋白活性口袋预测.....	26
2.5 探针化合物与靶标蛋白结合区域的研究	26
2.6 探针化合物与靶标蛋白结合位点的研究	28
2.7 虚拟筛选结果.....	29
2.8 靶标蛋白与目标化合物结合模式分析.....	35
3 小结与讨论.....	38
3.1 靶标蛋白结构模型构建与新农药研发.....	38
3.2 虚拟筛选与新农药研发.....	39
第三章 目标化合物对福寿螺的毒杀作用研究	42
1 材料与方法.....	42
1.1 供试材料.....	42
1.2 方法.....	44

2 结果与分析.....	49
2.1 目标化合物对福寿螺的毒杀效果.....	49
2.2 目标化合物对福寿螺浸杀毒力的研究.....	50
2.3 目标化合物对福寿螺生理的影响.....	50
2.4 目标化合物对福寿螺耗氧排氨的影响.....	52
2.5 目标化合物对福寿螺鳃部形态结构的影响	53
2.6 目标化合物对福寿螺血蓝蛋白含量的影响	56
2.7 目标化合物与靶标蛋白 PcnWAS 的体外结合情况	57
2.8 目标化合物对靶标蛋白基因表达量的影响	60
3 小结与讨论.....	62
第四章 基于分子共同特征的杀螺剂药效团模型构建及 3D-QSAR 研究	65
1 材料与方法.....	65
1.1 供试材料.....	65
1.2 试验方法.....	71
2 结果与分析.....	75
2.1 基于分子共同特征的药效团模型构建.....	75
2.2 基于具有公共骨架化合物的 3D-QSAR 研究.....	76
2.3 杀螺化合物的设计及活性预测.....	81
3 小结与讨论.....	83
第五章 总结.....	85
1 结论.....	85
2 创新点.....	85
3 展望.....	86
参考文献.....	87

第一章 文献综述

新药物的研发对人类生存和社会发展意义重大。迄今为止，农业和临床方面仍有大量的有害生物和人类疾病缺乏安全有效的治理手段，这种情况一方面源于新疾病或新病害的出现，另一方面源于对已知疾病或有害生物缺乏对症且副作用小的种类^[1]。

从广义上来讲，农药和医药都属于药物的范畴，因为它们都是具有特定生物活性功能的化学品，用于疾病的治疗和农业有害生物的防治^[2,3]。究其本质，这些化学品都能够在生物体内与相对应的各种靶标产生特异性和非特异性结合，从而影响生物的各种生理过程。因此从本质入手，基于靶标进行药物的研发具有重要的意义。

1 药物靶标的研究方法及进展

农药靶标和医药靶标都属于药物靶标，具体是指在体内有药效功能并能被药物作用的生物大分子，是药物与生物体发生作用时直接结合的部位^[4]。相比于农药靶标，目前对医药靶标的研究较为深入，以医药靶标为例，从化学成分来看，尽管有少数部分是核酸或其它物质，但大多数的医药靶标都属于蛋白质^[5,6]，这表明对靶标蛋白进行筛选和验证具有巨大的研究价值。人类基因组序列无间隙版本 T2T-CHM13 表明，人类染色体中含有 0.55 亿个碱基对和 19969 个编码蛋白质的基因，其中许多蛋白质与疾病的发生和发展直接相关，由此可见许多蛋白质都可以作为药物的潜在靶点进行研究，而截至目前，至少有 90% 的医药靶标蛋白尚未被发现^[7]。

药物靶标蛋白的发现和验证对疾病的治疗和新药的开发而言至关重要。随着生命科学的发展以及各种科技的创新，近年来涌现出了许多定位药物靶标蛋白的技术，这些靶标蛋白定位及验证的方法主要涉及到的学科主要包括化学、遗传学、生物信息学、分子生物学和生物化学，应用的具体方法包括蛋白质芯片、二维凝胶电泳、同位素亲和标签、双向荧光差异凝胶电泳、质谱鉴定、表面等离子共振、基因敲除、串联亲和纯化、双分子荧光互补、代谢途径分析以及计算机分子模拟等，其中应用最广泛的方法有药物探针法、基因差异表达法、蛋白质差异表达法、

基因敲除法和 RNA 干扰法^[8-14]。如刘永红等^[15]通过药物探针法,发现了 1 个分子量为 20 KDa 的蛋白能与胡椒酸衍生化合物探针发生特异性结合,进一步功能验证结果表明,该蛋白具有降血脂方面的功能,因此可以作为潜在的降血脂药物开发的靶标; Zhang 等^[16]利用转录组学分析比较了正常及病变状态下的胃癌的 mRNA,发现了 14 个与代谢途径相关的差异基因,其中支链氨基酸转氨酶 2 基因的失调与胃癌患者的总生存期相关,该结果表明支链氨基酸转氨酶 2 可能成为治疗胃癌药物的靶标;张璐莹等^[17]应用蛋白质组学技术比较了黄当归醇处理前后肝癌细胞中的蛋白质表达情况,发现缺少 CCNB2、MCM2、MCM3 等 10 个蛋白将导致肝癌细胞的活性出现变化,该结果揭示这些蛋白有可能是治疗肝癌的新靶标; Fung 等^[18]对胰腺导管腺癌细胞全基因组进行了 RNA 干扰筛查,发现混合谱系白血病蛋白 MLL4 以及蛋白 H3K4 的甲基转移酶是胰腺导管腺肿瘤发生的癌变相关基因之一。进一步研究了上述蛋白被干扰后细胞的癌变情况,结果证明靶向抑制蛋白 MLL4 可作为治疗胰腺导管腺癌的潜在方式。

在发现和确证药物靶标后,如何对其空间结构进行解析也是药物靶标研究的关键问题之一,因为靶标蛋白结构,特别是三级结构一旦被发现,往往会成为一系列新药发现的突破口。目前靶标蛋白三级结构的构建方法主要有实验法和算法,其中实验法包括 X 射线衍射法、核磁共振法、冷冻电子显微镜法^[19-21],通过实验法获得的蛋白结构较为准确,但价格昂贵、试验周期长等缺点不可忽视,目前在药物设计领域,算法是获得其三级结构的主要手段^[22]。

算法包括同源建模法、从头算法和穿线法^[23]。同源建模法的原理是相似的氨基酸序列具有相似的蛋白质高级结构,即目标蛋白质与模板的基本折叠相同,因此当目标蛋白氨基酸序列与模板蛋白具有大于 30% 同源性且模板蛋白可以覆盖目标蛋白全长的情况下可以使用同源建模法计算目标蛋白质的三级结构^[24],但不可忽视的是,由于能量分布等问题,有时在序列一致度很高的情况下也会出现结构差异较大的情况^[25]。另外,模板蛋白的获取仍然需要依赖实验法对其他具有相似一级结构的模板蛋白质的结构进行分析,因此这种方法在分辨率和数量方面依然存在较大的限制,在大多数情况下,对于一个未知的蛋白样本,很难找到符合建模要求的模板蛋白。从头算法的原理为蛋白质的三级结构取决于自身的氨

氨基酸序列，并处于最低的自由能状态，此方法无需模板，仅需要目标蛋白的氨基酸序列即可根据物理化学、量子化学、量子物理的基本原理，从理论上进行运算^[26]，目前已有一些相对成熟的算法或软件被用于测试研究，例如，Rosetta 是从头计算法预测蛋白质三级结构模型的一种比较成功的方法，其在优化算法上主要采用蒙特卡罗（Markov Chain Monte Carlo, MCMC）和模拟退火（Simulated Annealing, SA）2 种方法。但由于计算量巨大、计算缓慢、无法计算氨基酸序列大于 150 个残基的蛋白质以及准确性较低等问题，从头计算法计算蛋白质三级结构的方法使用较少^[27]。

由于计算速度限制、模板蛋白检索困难等问题，利用穿线法构建蛋白质三级结构模型的方式逐渐开始得到应用。穿线法又称折叠识别法，其原理为不相似的氨基酸序列也可以拥有相似的结构，比如很多蛋白质具有相似的空间结构，但它们的序列相似度高于 5%但低于 25%，即远程同源，对于这类蛋白质，穿线法利用氨基酸序列的结构倾向（如二级结构的倾向、疏水性、极性）通过打分函数来评价一个远程相似序列所对应的结构是否能够配适到给定的结构环境中^[28-30]。蛋白质结构分类数据库（Structural Classification of Protein, SCOP）显示，截至 2009 年发布的 1.75 版数据库，经实验研究获得的蛋白质拓扑结构即折叠模式仅有 1393 种，这远小于蛋白质的自由度，由此可见蛋白质的折叠具有高度的规律性，因此通过穿线法计算蛋白质三级结构能够获得较为准确的结果^[31]。

2 基于靶标蛋白的药物设计的研究进展

靶标蛋白约占总靶标数量的 97%^[32]，从这样的数量和比例上来说，有针对性地基于靶标蛋白进行药物研究可以实现绝大多数疾病药物的设计需求。

基于靶标蛋白的药物设计是以传统药物设计理论为基础不断延伸和发展出的一种新方法，具有高效、低成本等特点。利用传统方法开发新药物由于缺乏模拟和仿真的手段，因此要付出十分高昂的成本，虽然不同类型的药物的研发成本相差很大，但统计显示，传统的药物研究中，仅从化合物的随机筛选到优化先导化合物并确定候选药物这一过程的研发时间就至少需要 10 年，成本为 8 亿至 18 亿元^[33-35]。为了更好的寻找先导化合物，提升药物研发的效率，降低新药的研发成本，新药设计开始朝向基于靶标蛋白的合理药物设计迈进。

基于靶标蛋白的药物设计旨在利用蛋白质靶标寻找新的备选药物，是药物设计学领域的核心问题，目前通过这种方式进行药物开发在医药领域占据了主导地位^[36]。从治疗领域的角度来看，不论是遗传疾病、癌症、病毒感染亦或是罕见疾病的治疗都可以使用这种方法进行药物设计。

在过去的几十年中，许多药物的研发都依赖于目前已知的 500 多个药物靶标蛋白，例如，最早运用靶标蛋白和化合物相互作用的结构信息进行药物设计的例子可以追溯到心血管紧张素转化酶（ACE）抑制剂卡托普利的开发。虽然 ACE 的 X 射线晶体结构信息并未得到解析，但是与其结构相似的酶羧肽酶 A 的结构是已知的。羧肽酶 A 和 ACE 有许多相同的特征，包括在蛋白质活性位点都存在一个锌离子。基于此蛋白结构信息和一些从蛇毒中分离得到的肽类 ACE 先导抑制剂的结构信息，百时美施宝贵公司的研究人员模拟了 ACE 的活性位点，并通过推理设计得到卡托普利，这是第一个获得 FDA 批准的 ACE 抑制剂，并于 1981 年上市用于治疗高血压^[37]。其它著名的案例还包括 2001 年诺华制药以蛋白 Bcr-Abl 为靶标，通过抑制其激酶活性，在极短的时间内内开发出了治疗慢性髓细胞白血病的药物伊马替尼，这是第一个专门靶向 Bcr-Abl 融合蛋白的抗癌药物，该药物的发现开创了肿瘤分子靶向治疗的新时代^[38]；2020 年，以 RNA 聚合酶 SARS-CoV-2 为靶标设计的新药瑞德西韦先后被美国、日本、英国、欧盟等 41 个国家和地区批准用于新冠病毒感染的治疗，该药物是一种核苷类似物，能够有效地抑制病毒核酸的合成^[39]；历时不到 2 年，2021 年 12 月，辉瑞制药以冠状病毒中的 3CL 蛋白酶为靶标成功设计出了药物奈玛特韦，该药物是治疗新冠病毒感染的特效药 Paxlovid 中的主要成分之一，这也是国际上首个被多个国家批准使用的新冠病毒感染的特效口服药物^[40]。

3 计算机辅助药物设计的方法和技术

近年来，随着计算机科学和生物学、医学的融合发展，计算机辅助药物设计（Computer Aided Drug Design, CADD）在新药研究和制药工业中形成了一种不可抗拒的发展趋势，并逐渐成为了进行基于靶标蛋白的药物设计的主要方法^[41-43]。CADD 将药物设计的诸多理论形象化，这大幅度地降低了药物研发过程中的盲目性^[44]。目前，已经有许多利用 CADD 手段开发出的药物成功上市，如基

于碳酸酐酶设计出了治疗青光眼的药物多佐胺、基于 HIV 蛋白水解酶设计出了治疗艾滋病的药物沙奎那韦、基于神经氨酸苷酶设计出了治疗禽流感的药物瑞乐砂以及基于凝血酶设计出了治疗脑卒中和栓塞的药物 Ro466240^[45-47]。

CADD 涉及生物学、计算化学、化学以及药理学等多个学科，主要以配体与受体间相互作用（如范德华力、氢键作用、静电作用、疏水作用等）为基本原理，通过模拟分子的行为，描述并评价分子的结构特征，从而辅助新型药物分子的设计和发现。主要应用的方法和技术有分子对接、定量构效关系分析及虚拟筛选等^[48,49]。

3.1 分子对接

分子对接是 CADD 的核心技术，其最初思想源于 Fisher E 的“锁-钥模型”，具体是利用两个或多个分子之间通过几何匹配和能量匹配相互识别寻找最佳匹配模式的过程^[50,51]。

如何对受体配体复合体系进行空间匹配和能量匹配是分子对接中最关键的问题，因为空间匹配是分子间发生相互作用的基础，而能量匹配是分子间保持稳定结合的基础。在空间识别方面，目前常用的对接方法包括刚性对接、半柔性对接和柔性对接^[52]。刚性对接适用于蛋白质与蛋白质或核酸之间的对接，在这种研究体系中受体和配体的构象不发生变化，因此在所有方法中具有最快的速度；半柔性对接主要应用于蛋白质、核酸等大分子与小分子化合物间的结合模式研究，在该过程中，小分子的构象是可以根据化学键转动的，而大分子是保持不变的；柔性对接是指在对接过程中，研究体系中受体和配体的构象均可以自由变化^[53]。这种方法一般用于精确考虑分子间的识别情况。在能量匹配方面，根据体系的差异，分子对接中常用的方法包括人工神经网络、遗传算法、模拟退火、局部搜索等。目前应用较多的分子对接软件包括 AutoDock、AutoDOCK Vina、LeDock、rDOCK、UCSF Dock、MOE、Surflex-Dock、SYBYL、Discovery Studio 等^[54]。

3.2 虚拟筛选

随着基因技术、蛋白质化学、蛋白质纯化与鉴定技术的快速发展，大量成药与潜在成药靶标蛋白已被解析，而随之产生的利用计算机参数模拟的虚拟筛选（Virtual Screening, VS），已经成为相对可靠和廉价的用于先导化合物发现的一

种重要技术手段^[55]。

VS 首先需要借助计算机软件从大量的候选化合物中筛选出一系列候选化合物，再通过实验进行活性评价的一种方法，其目的是从几十个乃至百万个分子中筛选出新的先导化合物或活性化合物。

作为 CADD 的起点，采用 VS 的方法可以快速地从化合物数据库中筛选出具有潜在药物活性的化合物，根据筛选条件的不同，阳性命中率可达 5%至 20%，这大大提高了筛选的速度，并能够有效地降低成本^[56]，因此随着计算机技术的发展和化合物网络数据库的完善，这种方法逐渐成为了药物筛选的主流模式^[57]。目前常用的化合物数据库如表 1-1 所示。

表 1-1 CADD 常用的化合物数据库

Table 1-1 Commonly used compound databases for CADD

数据库名称	网址	类型	化合物数量
Name	Website	Type	Quantity
ChemSpider	http://www.chemspider.com/	公共库	68000000+
ZINC	http://zinc.docking.org/	公共库	750000000+
PubChem	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/	公共库	102000000+
ChEMBL	https://www.ebi.ac.uk/chembl/	公共库	1879000+
BindingDB	http://www.bindingdb.org/bind/	公共库	786000+
Toxnet	https://toxnet.nlm.nih.gov/	公共库	400000+
Drug Future	https://www.drugfuture.com/synth/	公共库	7000+
DrugBank	https://www.drugbank.ca/	公共库	13000+
SMPDB	http://smpdb.ca/	公共库	55724
HMDB	http://www.hmdb.ca/	公共库	114000+
ChemBlink	https://www.chemblink.com/	公共库	40000+
ChemDiv	https://www.chemdiv.com/	商业库	1400000+
Enamine	https://www.enaminestore.com/	商业库	1000000+
SPECS	https://www.specs.net/	商业库	200000+
Chembridge	https://www.chembridge.com/	商业库	700000+

Maybridge	https://maybridgechem.lookchem.com/	商业库	60000+
Lifechemicals	https://lifechemicals.com/	商业库	600000+
Microsource	http://www.usmicrosource.com/	商业库	100000+
MOLBASE	https://www.molbase.com/	商业库	45000000+
Vitas-M	http://vitas.chemcd.com/	商业库	18739
Interbioscreen	https://www.ibscreen.com/	商业库	550000+

VS 依赖于分子对接技术,从原理上来讲,VS 有 2 个研究方向,即基于受体的虚拟筛选和基于配体的虚拟筛选^[58]。

基于受体的虚拟筛选,也称作基于结构的虚拟筛选,是以生物大分子的三级结构为基础,通过分子对接的方法,在结合位点处自动的匹配化合物数据库中的小分子化合物,并确定化合物配体与受体间的结合模式,根据结合能、亲和性等特定的判断标准对受体和配体的结合能力进行预测,最终挑选符合要求的化合物,用于后续的室内活性研究^[59]。这种方法具有的优势是能有效避免活性化合物微小的结构变化所引起的活性改变,但也存在一些不足,如打分函数的准确性及适用性。一般情况下,为了计算速度,通常会采用比较简单的打分函数,但这些简单的打分函数不能很好地对分子间较弱的相互作用进行分类和计算,同时基于受体的虚拟筛选需要确定的受体结构和特定的结合位点,然而许多重要的靶标蛋白并没有符合筛选要求的结构模型,更没有固定的结合位点,因此基于配体的虚拟筛选开始被广泛关注。

基于配体的虚拟筛选的理论基础为物质的结构决定性质^[60]。这种方法的理论基础是药物设计学中的相似性原理,具体可描述为总体相似的分子应具有相似的生物活性。作为分子对接的重要补充手段,基于配体的虚拟筛选具有高效、不受受体分子结构限制等优点。

3.3 定量构效关系

定量构效关系(Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR)是 CADD 的常用手段。所谓 QSAR,就是“定量地建立分子结构和活性的关系”^[61]。QSAR 的基本理论认为,化合物的生物活性取决于其特定的化学结构,旨在解释化合物生物活性如何随着化合物的结构(如拓扑结构、空间位阻等)及其理化参数(溶

解性、疏水性和极性等的变化而改变，从而提示其可能的作用机制，然后根据新化合物的结构数据预测其活性或改变现有化合物的结构以提高其活性，并借助分子的参数，以数学和统计学的手段，研究小分子在生物体内吸收、分布、代谢、排泄，及其生物活性等性质^[62]。

按维数分类，QSAR 可分为二维定量构效关系（2D-QSAR）和多维定量构效关系（主要是 3D-QSAR）^[63,64]。2D-QSAR 最初发展于 20 世纪 60 年代，在早期的药物设计领域中占据了主导地位，主要是将分子整体的机构性质作为参数，对分子的活性进行回归分析，进而建立相关模型。2D-QSAR 中最常用的方法是线性自由能相关方法，将分子作为一个整体然后考虑其性质。20 世纪 90 年代以来，随着计算机计算能力的提高和众多生物大分子三级结构的精确定义，基于分子结构的 3D-QSAR 逐渐取代了最初 2D-QSAR 在药物设计领域的主导地位，至今已成为了计算机辅助药物设计的基本手段与方法。

3D-QSAR 在 2D-QSAR 基本原理的基础上直接引入了化合物的立体结构，间接反应了化合物与受体靶标互作过程中的伸缩能、键角的弯折能、二面角的扭转能、非键相互作用能等非键相互作用特征。相较于 2D-QSAR，3D-QSAR 可以提供更丰富的信息量，有更明确的物理意义。常见的 3D-QSAR 方法有距离几何法 (Distance Geometry, DG)、分子形状分析法 (Molecular Structure Analysis, MSA)、比较分子力场分析法 (Comparative Molecular Field Analysis, CoMFA)、分子相似性指数分析法 (Comparative Molecular Similarity Index Analysis, CoMSIA)、全息定量构效关系分析法 (Hologram Quantitative Structure-Activity Relationship, HQSAR) 和虚拟受体方法 (Pseudo Receptor, PR)。其中，使用较为广泛的是 CoMFA 和 CoMSIA^[63]。

CoMFA 是 3D-QSAR 研究中最常用的方法，主要是通过对力场的分析，建立分子的生物活性与力场参数的定量关系模型，从而推测受体的某些性质、预测其他类似分子的药效。而 CoMSIA，是从 CoMFA 衍生出的一种方法。在计算分子场时，CoMSIA 采用了与距离相关的高斯函数形式，这可以有效地避免 CoMFA 分析中难以解决的分子表面附近格点上能量的显著变化等问题，因此模型的准确性有了一定的提升。与此同时，CoMSIA 更多地考虑了立体场、静电场、疏水场、

氢键供体场和氢键受体场等分子特征,这些特征涵盖了配体与受体间相互作用最主要的特征,因此,能够较完整的揭示配体的生物活性与配体与受体相互作用关系之间的关联性^[66]。

4 新农药的研发模式

农药是动态发展的特殊商品,由于农药减施政策的颁布、农药抗药性以及环境残留问题突出,但各类有害生物对农业生产的危害无法通过其它手段有效避免,因此需要不断增加新品种农药来替代原有种类。在这样的前提下,如何研发高效、低毒且环境友好的新农药成为了农业领域的核心问题,目前新农药研发模式主要有以表型为基础的新农药研发和以靶标为核心的新农药研发^[67,68]。

4.1 以表型为基础的新农药研发

以表型为基础的新农药研发是化学农药研发最为传统和常见的方法,具体是将生物个体作为研究对象,将现有的化合物作为探针,观察这些化合物处理前后生物体模型出现的生理变化,获得新的先导化合物的方法^[69]。不论是原始的无机化合物农药还是有机合成农药,大多数的农药都是通过这种方法发现并进一步加以研究最终应用于农业生产的,如滴滴涕、六六六。这种模式的优点在于,可以从宏观的角度对生物个体或组织器官进行整体评价,在研究药效的同时,一定程度上还能够反映出农药吸收、分布等代谢动力学行为和化合物的安全性,而且运用这种方法最终表现出的药效可以代表生理学的总体表现,因此具有较高的成药效率。

尽管如此,由于评价方法的限制,以表型为基础的新农药研发需要耗费大量的时间成本,效率较为低下,具有随机性和盲目性^[70]。比如滴滴涕在 1874 年就已经可以通过化学的手段进行合成,但直到 1939 年,才被发现具有杀虫活性^[71]。类似的,从 1825 年首次合成到 20 世纪 40 年代才得以作为杀虫剂广泛应用,科学家们对农药六六六的探索之路也持续了将近 100 年^[72]。另外,还有些农药表现出了较高的毒性和广谱性,在杀灭靶标生物的同时也会对天敌及非靶标生物造成伤害,最终会导致有害生物的再猖獗。在这样的背景下,许多国家对农业中可以使用的农药进行了严格的限制,比如截至 2019 年,中国已有 46 种农药被要求禁止使用于农业生产,包括六六六、滴滴涕、毒杀芬、二溴氯丙烷、杀虫脒等,而

2024年9月1日起，甲拌磷、甲基异柳磷、水胺硫磷以及灭线磷也将禁止销售和使用^[73,74]。由此可见，老旧品种的农药将不断被淘汰，而利用传统的以表型为基础研发农药的方法无法满足当前市场对农药的需求。为了更高效的防治有害生物，需要不断地研发活性高、专一性强且环境友好的新品种农药，因此以靶标为核心的农药研发方法应运而生。

4.2 以靶标为核心的新农药研发

目前以靶标为核心的新农药研发模式已成为农药学研究的热门领域，这种研发模式以其简便、快捷的特点给人们带来了巨大的期望。以靶标为核心的农药研究认为大多数农药最终会作用于病原生物的某种或某类蛋白，因此破坏这些蛋白正常的结构或使其异常表达，就有可能达到破坏其生理功能的目的，从而抑制或杀灭有害生物^[75]。2015年至2018年，来自美国、德国以及日本等国的研究人员开发出了作用于20多种靶标的新农药56种，这其中有许多效果显著且靶标新颖的品种具有深入研究的价值，且具有较高的环境安全特性，可以作为长远储备^[76,77]。在中国近几年登记上市或申请专利的三氟草啶、Beflubutamid-M、环溴虫酰胺、甲氧吡啶乙酯、双丙环虫酯、Fenpicoxamid、双清茉莉酸酮酯、氟噻唑吡乙酮等几十个新品种农药中就有许多作用于新颖靶标的种类，例如双丙环虫酯、双清茉莉酸酮酯、氟噻唑吡乙酮的作用靶标分别为弦振器官香草素受体亚家族通道、茉莉酸信号途径中的JAZ蛋白以及氧化固醇结合性蛋白^[78-84]。

近年来，农药行业的研发费用持续上升，但新农药的登记数量并没有相应增加，投入产出比失调，分析其原因主要是有害生物对农药作用靶标的敏感性逐渐降低，而在农药开发中选择的靶标大多为已知且常用的种类，缺乏缓解农药抗药性的能力。在这种情况下发现新的农药作用靶标，并根据靶标设计并开发新的农药具有积极的意义。

新的作用靶标意味着新的作用机制和新的研究思路，为了研发出更符合现代农业要求的新农药，研究者们对农药靶标的探索从未停歇，一些新的农药靶标正在不断地被发现。比如，2018年，Camille等发现哒嗪硫醚酰胺类化合物VUO463271可影响氯化钾共转运蛋白的生物功能，该蛋白在GABAergic信号传导和抑制神经传递中具有封闭离子通道的作用，主要能够引起昆虫肌肉麻痹，最

终导致昆虫无法进食而亡^[85]，目前并未见与该蛋白靶标相关的农药品种；2019年，Hatamotoa 等发现联苯氧基苯甲酸酯类化合物 Aminopyrifen 可以通过抑制酰基转移酶 GWT-1 的活性进而切断有害生物与细胞膜结合的目的最终起到杀菌作用，该研究为 Aminopyrifen 及其类似物在杀菌剂领域的应用奠定了基础^[86]；2020年在中国被批准使用的间苯二甲酰胺类杀虫剂溴虫氟苯双酰胺在蚂蚁、蟑螂、苍蝇等害虫的防治方面效果显著，其作用靶标是 GABA 受体，但区别于传统品种，溴虫氟苯双酰胺是 GABA 门控氯离子通道别构调节剂，能够最终导致昆虫产生抽搐等症状，2017年，溴虫氟苯双酰胺被国际杀虫剂抗性行动委员会指定为新类别杀虫剂^[87,88]。2022年 Qiao 等揭示了杀虫剂氟啉虫酰胺的作用机制为抑制烟酰胺酶的活性，这是继 TRPV 离子通道的发现之后，人们时隔 30 年再次发现的位于昆虫神经系统中的第 9 个直接分子靶标，同时这也是中国学者首次发现商业杀虫剂的分子靶标^[89]。

在新的靶标被确证后，如何利用发现的新靶标进行新农药的研发也是农药学领域的重点问题。一般来说，新农药的研发需要先后经历农药靶标的发现及验证、先导化合物的发现及结构优化、剂型研究、室内及田间活性验证、毒理学研究及环境安全性评价、代谢及残留分析、合成路线优化及产业化推广等环节，其中先导化合物结构的发现是最关键的环节，决定了整个新农药创制的速度和成功率。

开发新农药需要消耗大量的时间和资金。数据显示，成功开发一种新农药，需要合成筛选约 15.9 万个化合物，耗资约 2.86 亿美元，一种化合物从首次合成到登记成为农药进入市场平均历时 11.5 年^[90]。因此，发展高效的分子设计方法，从而快速发现有研究和改造价值的先导化合物是新农药创制所面临的关键挑战^[91]。相反地，传统的以表型为基础的农药研发模式已经无法满足农业市场对农药的需求，因此只有推陈出新，利用更加合理和有针对性的方法才能为农药创制领域和现代农业的高质量发展提供可持续的技术支撑。而 CADD 技术在基于靶标的药物设计领域的成功应用使得研究者们认识到如果对这种方法加以改造并合理地应用于农药学研究，将成为新农药研发的一条有效途径，有巨大的研究前景。

目前利用 CADD 技术，依据靶标开发农药的方法正逐渐成为国际农药研究中最活跃的课题，比如张俊钦等^[92]将昆虫的几丁质酶作为靶标蛋白受体，对

SPECS 数据库中的 130000 个化合物进行了虚拟筛选, 最终获得了 5 个具有一定活性的化合物, 为杀虫剂的设计和筛选提供了理论和方法支持; 陶涛等^[93]以甾醇载体蛋白 2、保幼激素酯酶和几丁质酶作为靶标蛋白, 通过虚拟筛选技术, 在 Chemdiv 天然产物库中筛选出了 8 个潜在的抑制剂, 进一步通过室内试验测定, 最终得到 3 个对棉铃虫具有一定毒杀活性的化合物; 采用基于结构的对比方法, Xie 等^[94]建立了以 3-(2-基) 苯磺胺系列类衍生物为模板的 3D-QSAR 模型, 并根据静电场、疏水场等分析结果设计并合成了 4 个具有高除草活性的新化合物; 姚婷婷等^[95]以真菌中的受体型蛋白酪氨酸激酶家族为靶标, 构建了基于 JAK1、JAK2、JAK3、Tyk2 激酶结构的虚拟筛选方法用于特异性筛选杀菌剂, 最终通过该方法发现了 1 个对水稻纹枯病原菌菌丝生长具有显著抑制能力的先导化合物; 蒋丹平等^[96]用乙酰胆碱结合蛋白的结构模拟昆虫烟碱型乙酰胆碱受体, 并针对化合物数据库 PubChem 进行虚拟筛选, 最终发现了 6 个化合物, 对蚜虫具有一定的杀灭活性。

这些研究结果表明, CADD 技术能够加快农药先导化合物的发现速度, 在农药先导化合物的发现中发挥着举足轻重的作用。

5 化合物毒杀福寿螺靶标研究进展

寻找高效安全的杀螺剂是福寿螺防治的重要工作之一, 除了已经作为商品化杀螺剂大量使用的氯硝柳胺和四聚乙醛外, 目前已发现的对福寿螺具有毒杀作用的物质还有很多, 如昆阿诺藜皂甙、伞形花内酯、空心莲子草皂素等^[97-99], 然而对于这些物质毒杀福寿螺的主要化学成分的分析却鲜有研究。基于这样的背景, 以这些化学成分为靶标定位新颖的福寿螺杀螺剂靶标的研究更是寥寥无几。尽管靶标定位的方法已较为成熟, 但由于福寿螺具有水陆两栖属性, 生理机制较为复杂, 目前有关福寿螺杀螺剂靶标的研究依然处于起步阶段, 靶标的定位也较为困难。目前最常用的杀螺剂是四聚乙醛和氯硝柳胺, 它们的杀螺机制分别为促进乙酰胆碱酯酶大量释放和抑制线粒体氧化磷酸化过程, 但对于其它已发现具有杀螺活性的化合物的杀螺机理和靶标研究很少^[100,101]。由于福寿螺的防治较为困难, 而现有的药剂无法实现对福寿螺的有效防控, 因此发现新的杀螺剂靶标, 并以此为基础进行杀螺剂的研发具有重要的意义。

前期研究发现, 苦葛皂苷 A 和槟榔碱对福寿螺具有极强的毒杀作用, 其对福寿螺中螺 (螺壳直径为 $1.5 \pm 0.2 \text{cm}$) 72 h 的 LC_{50} 值分别为 3.983 mg/L 和 1.05 mg/L。Yang 等^[102,103]系统性地开展了这些化合物对福寿螺的毒杀机理研究, 通过组织切片和电镜扫描技术, 观察其处理后, 福寿螺不同器官的病理学变化, 发现其处理福寿螺后的中毒症状为鳃纤毛消失, 血细胞核变形至溶烂, 细胞质大量外流。

Yang 等^[104-106]首先通过 RNA-seq 获得转录组并筛选出差异表达基因后, 利用 iTARQ 技术进行福寿螺蛋白质组学研究, 筛选获得了苦葛皂苷 A 和槟榔碱处理后福寿螺血细胞及鳃部差异表达明显的蛋白。进一步根据 GO 功能注释分析分子功能、生物学过程以及细胞组分的情况并结合前期对血细胞形态损伤以及鳃部纤毛结构破坏的研究, 发现了合子 DNA 复制许可因子 mcm3-like (Zygotic DNA replication licensing factor mcm3-like)、DNA 复制许可因子 MCM5 同种型 X1 (DNA replication licensing factor MCM5 isoform X1)、泛素-40S 核糖体 27a (Ubiquitin-40S ribosomal S27a)、神经维斯科特-奥尔德里奇综合征同种型 X1 (Neural Wiskott-Aldrich syndrome isoform X1)、绒毛蛋白 (Advlin)、受体型酪氨酸蛋白磷酸酶 (Receptor-type tyrosine-protein phosphatase beta)、非常规型肌球蛋白重链 6 (Unconventional myosin heavy chain 6)、纤毛相关蛋白 157 (Cilia and flagella-associated 157-like) 以及纤毛小根蛋白 (Rootletin-like) 等 9 个疑似的靶标蛋白, 经 RNA 干扰验证发现绒毛蛋白 (简称为 PcAdv)、神经维斯科特-奥尔德里奇综合征同种型 X1 (简称为 PcnWAS) 和纤毛小根蛋白 (简称为 PcRoo) 是福寿螺关键的靶标蛋白。

虽然目前对福寿螺体内这些靶标蛋白的结构及功能研究仍不深入, 但这些蛋白在人、小鼠等其它生物体内的存在形式和功能是有一定研究的。从这些蛋白的功能和分布来看, PcnWAS 蛋白为血细胞膜相关蛋白, 而 PcAdv 和 PcRoo 均为鳃纤毛相关蛋白。研究表明 PcnWAS 蛋白只在造血细胞中表达, 参与蛋白复合体组装、细胞运动性及肌动蛋白丝聚合等生命活动, 如果该蛋白缺乏或者表达受到抑制就有可能导致细胞骨架受损和血细胞结构破坏, 进而导致福寿螺死亡^[107]。PcAdv 和 PcRoo 蛋白均为鳃纤毛的结构蛋白, 其中 PcAdv 蛋白分布于肌动蛋白

的细胞骨架，参与细胞骨架组织和生物发生、神经系统发育、肌动蛋白细胞骨架组织和以及尖锐端肌动蛋白丝戴帽等生命活动^[108]；PcRoo 蛋白是一类卷曲的螺旋状蛋白，是纤毛根部的结构性蛋白^[109]。如果这些蛋白无法正常发挥功能，就有可能导致福寿螺死亡。

目前还没有利用福寿螺靶标蛋白进行杀螺剂研发的成功案例或研究报道，本研究以福寿螺 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 蛋白为基础，进行了基于福寿螺靶标蛋白的杀螺剂设计研究，以期能为杀螺剂的研发提供新的候选化合物。

6 研究内容及技术路线

6.1 研究内容

新型杀螺剂的开发一直是农药领域的前沿课题，近年来多种具有杀螺活性的先导化合物相继被发现，但相比于成品农药，大多数化合物的难以直接合成，并且杀螺活性极其有限，无法在低剂量下实现福寿螺的有效防治。农药靶标和农药分子的相互作用机制研究是农药学领域的关键问题，是开展分子设计的理论基础。因此对这些先导化合物的作用机制研究和化学改造设计成为了杀螺剂研究的热点问题之一。

本文以实验室前人研究苦葛皂苷 A 和槟榔碱处理后福寿螺后的差异蛋白及 RNA 干扰结果等为基础，选择了福寿螺靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 作为研究对象，通过分子对接、虚拟筛选、生物活性测定、qPCR、等温量热滴定以及药效团模型构建和 3D-QSAR 等方法进行了以下研究：

- (1) PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 蛋白三级结构模型构建及结合位点预测
- (2) 基于靶标蛋白的虚拟筛选及柔性分子对接验证
- (3) 目标化合物杀螺活性室内验证及作用靶标验证
- (4) 基于药效团模型构建和 3D-QSAR 的杀螺化合物分子设计研究

6.2 技术路线

本研究的技术路线图如图 1-1 所示。

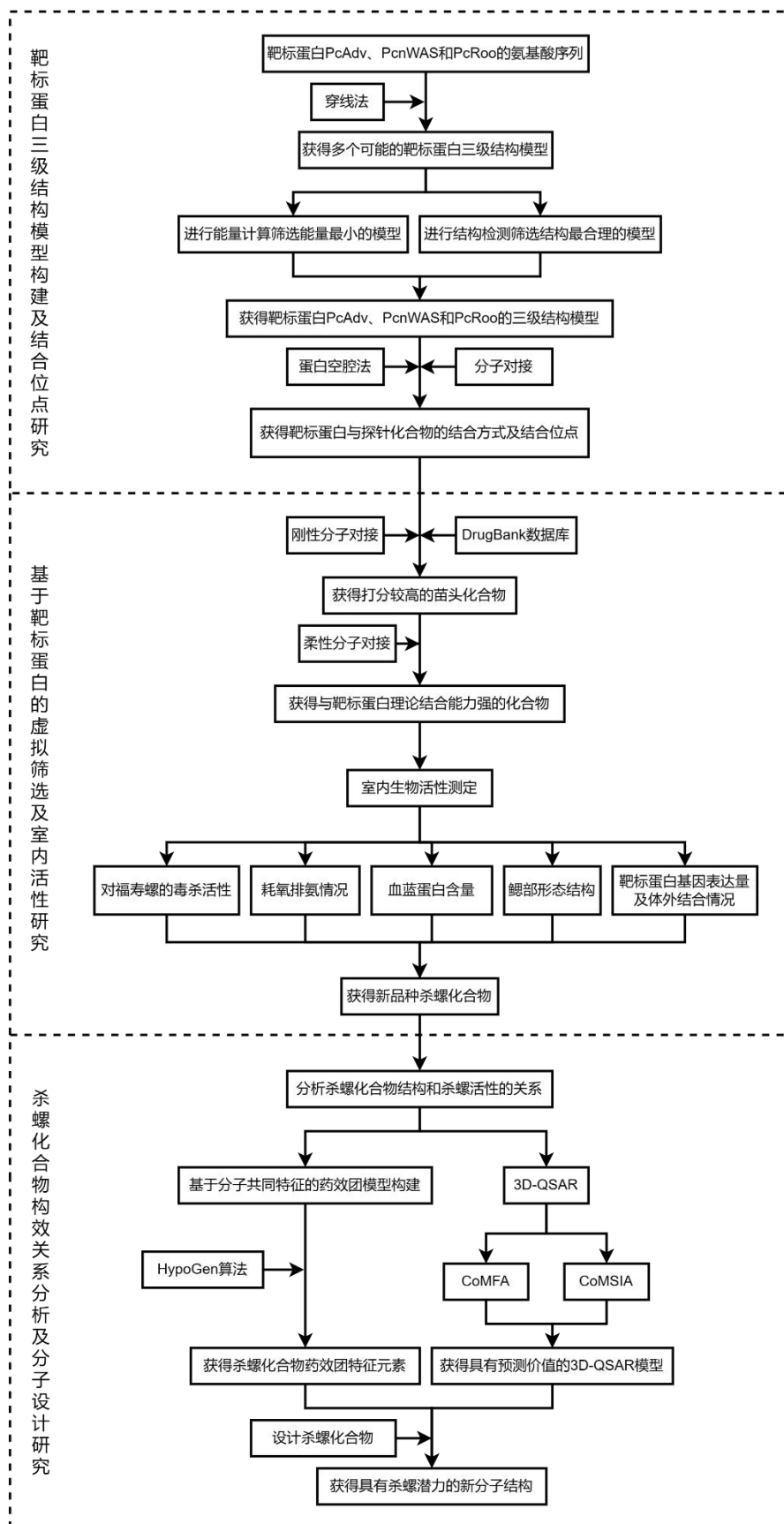


图 1-1 技术路线图

Figure 1-1 Technical route

第二章 靶标蛋白三级结构模型构建及基于靶标蛋白的虚拟筛选

虚拟筛选是农药先导化合物发现的重要途径之一,具有高效、低成本的特点。虽然目前并没有利用这种方式获得的农药通过登记审批,但作为计算机辅助药物设计的核心方法,虚拟筛选对于农药研发具有重要的意义。

基于靶标的农药研发是近年来农药学领域的热点问题,前期研究表明,PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 蛋白是福寿螺重要的靶标蛋白,为了基于这些靶标蛋白有针对性地发现新的农药先导化合物,本章从靶标蛋白结构模型构建、结合位点研究以及虚拟筛选的角度进行了研究,以期能够发现新的具有杀螺活性的化合物。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 氨基酸序列

前期研究通过蛋白质测序技术获得了福寿螺关键靶标蛋白 Advlin (PcAdv)、Neural Wiskott-Aldrich syndrome isoform X1 (PcnWAS) 和 Rootletin-like (PcRoo) 的氨基酸序列^[104-106]。

1.1.2 主要软件

本章所用到的主要软件如表 2-1 所示。

表 2-1 软件列表

Table 2-1 Softwares used in this section

功能	软件名称
Function	Name
蛋白质拓扑结构分析	TOPDRAW (CCP4: Supported Program)
蛋白质三级结构模型构建	I-TASSER (http://zhanggroup.org/I-TASSER/)
模型评估、虚拟筛选	Discovery Studio 2016
蛋白质结合口袋预测	POCASA

(<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/service/pocasa/>)

分子对接文件准备	AutoDock Tools
分子对接	AutoDock 4.0
分子对接 2D 效果图绘制	Proteins Plus
分子对接 3D 效果图绘制	Pymol 2.5

1.1.3 数据库

虚拟筛选研究应用的数据库为 DrugBank 数据库的子数据库 DrugBank-3D structures, 该数据库包括 9213 个目前已知的具有一定药物活性的化合物的 3D 结构。

1.2 试验方法

1.2.1 靶标蛋白拓扑结构研究

采用折叠堆积法^[110]: 将获得的福寿螺 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 蛋白的氨基酸序列输入至 TOPDRAW (CCP4: Supported Program)软件, 进行蛋白质拓扑结构的分析, 具体操作方法为:

输入命令, 分别运行 Save/Open function for reusing/editing previous drawings.
→ Postscript output for printing/publication. → Runs (probably) on all common platforms (anywhere Tcl/Tkv8 will run). → Horizontal or vertical helices and strands.
→ New version allows diagonal connections.

在最终的运行文件中提取分析结果, 绘制拓扑结构分析图。

1.2.2 靶标蛋白三级结构模型构建

采用穿线法^[111-113]: 利用 txt 文本格式文件将获得的 PcAdv 蛋白和 PcnWAS 蛋白的氨基酸序列编写为 fasta 格式, 上传至 I-TASSER 服务器 (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>), 结合 1.2.1 中拓扑结构的分析结果, 运行 I-TASSER Suite 进行靶标蛋白三级结构模型的构建。具体操作方法为:

输入命令, 分别运行 standardize seq.fastato seq.txtand get the sequence length.
→ run psiblastto generate chk, ou, pssm, mtx files. → runPSSpred to getseq.dat, seq.dat.ss. → run solve to get exp.dat. → run pairmod to get pair1.dat and pair3.dat. →

run threading programs sequentially. → run mkinit.plto generate restraints. → run I-TASSER simulation. → run SPICKER clustering program. → run get_cscore.pl to get confidence score. → run EMrefinement.pl to get full-atomic models. → run get_rsq_bfp.pl to get local accuracy and B-factor estimations. → run runCOACH.pl to generate ligand-binding sites, EC number and .GO terms predictions.

运行结束后分别导出排名前 5 位的蛋白质三级结构模型。

1.2.3 靶标蛋白三级结构模型评估

利用 I-TASSER Suit 中自带的分析软件, 获得所构建模型的 C-Score、TM-Score 和 RMSD, 根据能量计算, 筛选出能量最低的结构作为模型用于进一步的研究。此外还需利用 Discovery Studio 软件绘制靶标蛋白三级结构模型的拉氏图, 从结构的扭转角判断模型的准确性。

1.2.4 靶标蛋白结合口袋预测

采用蛋白空腔法: 通过 POCASA 算法计算靶标蛋白的结合口袋^[114]。根据口袋体积确定可能的结合口袋位置。试验设置的参数如表 2-2 所示。

表 2-2 结合口袋预测参数设置情况

Table 2-2 Parameter settings of ombining pocket prediction

晶格大小	探针半径	单独点参数	蛋白深度参数
Grid Size	Hit Radius	Single Point Flag	Protein Depth Flag
1 Å	3 Å	16	18

1.2.5 探针化合物与靶标蛋白结合位点研究

采用柔性分子对接法: 使用 AutoDock 4.0 软件将探针化合物与靶标蛋白进行对接^[115,116], 根据结合能高低判断化合物与靶标蛋白各结合口袋的结合能力, 具体操作方法如下所示。

1.2.5.1 配体化合物的预处理

首先, 从数据库中导出化合物的结构, 使用 MM2 工具进行能量优化, 利用 OPEN Babel GUI 对保存好的 sdf 文件进行预处理, 转换并保存为 mol2 格式文件。其次, 利用 AutoDock Tools 中 Ligand 菜单下拉框中的 Tortion Tree 模块对检测扭

转键及扭转中心，最终输出 pdbqt 格式文件。

1.2.5.2 受体蛋白的预处理

使用 AutoDock 4.0 分别打开靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 的结构文件，去除水分子，加入极性氢并进行合并，保存为 pdbqt 格式文件。

1.2.5.3 Auto Grid 参数文件的准备

利用 Autodock Tools 中 Grid 菜单，加载蛋白质的 pdbqt 格式文件，设置 Grid Box，盒子的大小依据蛋白进行设置，盒子的中心设置为蛋白质活性口袋的中心坐标，将设置好的 Grid Box 保存为 gpf 格式文件。

1.2.5.4 分子对接参数文件的准备

利用 AutoDock Tools 中 Docking 菜单，选择所需要的受体和配体，将拉马克遗传算法（Lamarckian GA）定义为对接算法，保存为 dpf 格式文件。

1.2.5.5 Auto Grid 的运行

在 AutoDock 4.0 软件的控制台中输入命令 `Autogrid4-p name.gpf -l name.glg`，生成所需的 map 格式文件（name 表示文件名称）。

1.2.5.6 AutoDock 的运行

在 Autodock Tools 的 Docking 菜单选择 Search Parameters，将对接次数设置为 50。接下来，在 AutoDock 4.0 软件的控制台中输入命令 `Autodock4-p name.dpf -l name.dlg`，生成所需的 dlg 格式文件（name 表示文件名称）。

1.2.5.7 柔性分子对接结果分析

使用 Autodock Tools 中 Analyze 选项卡，打开获得的 dlg 格式文件，在下拉框中依次选择 Conformation 和 Play，ranked by energy 选项，同时在弹出的选项框中选中 Build H-bonds。点击 Write Complex 选项将结果文件导出为 pdbqt 格式文件，统计结合能数据，并记录结合模式。

1.2.6 基于刚性分子对接的虚拟筛选

1.2.6.1 蛋白受体的定义

在 Discovery Studio 软件中的 Macromolecules 模块下打开靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 的三级结构模型，对蛋白进行加氢、去杂质处理，并将 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 蛋白分别定义为受体，并根据 1.2.5 的结果定义对接参数。

1.2.6.2 配体的定义

将 DrugBank-3D structures 数据库中的化合物结构整理成为单独的数据库文件,在 Discovery Studio 软件中的 Small Molecules 模块下打开化合物结构数据库,对这些化合物结构进行准备操作,运行结束后选择合适的分子构象,保存为单独的文件。

1.2.6.3 LibDock 程序的运行

在 Discovery Studio 软件中的 Receptor-Ligand Interaction 模块下选择定义的蛋白受体和配体化合物,选择全部的结合位点进行对接筛选后启动程序运行。

1.2.6.4 刚性分子对接结果分析

运行结束后,在结果文件中获得基于刚性分子对接的虚拟筛选的打分情况,统计 LibDock Score,选择每组打分排名前 15 的化合物作为候选化合物进行柔性分子对接筛选。

1.2.7 基于柔性分子对接的虚拟筛选

采用柔性分子对接法:使用 AutoDock 4.0 软件将虚拟筛选获得的候选化合物与靶标蛋白进行对接,根据结合能高低判断化合物与蛋白质的结合情况,具体操作方法参照第二章 1.2.5。根据最终计算出的结合能选择能使体系结合能进一步降低,且降低幅度超过探针化合物的候选化合物作为目标化合物。

1.2.8 靶标蛋白与目标化合物结合模式的分析

将靶标蛋白与探针化合物苦葛皂苷 A、槟榔碱的结合能数据作为标准,分子对接结束后,筛选结合能数据低于标准的蛋白-配体复合物,利用 Proteins Plus 和 Pymol 2.5 软件对其进行可视化分析,获得靶标蛋白与目标化合物的结合模式。

2 结果与分析

2.1 靶标蛋白拓扑结构的研究

借助牛津大学 TopDraw 分析算法及其他相关组件,通过折叠堆积法对福寿螺关键靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 的拓扑结构,即二级结构的分布及连接模式进行了研究,分析结果分别如图 2-1 (a、b 和 c) 所示。

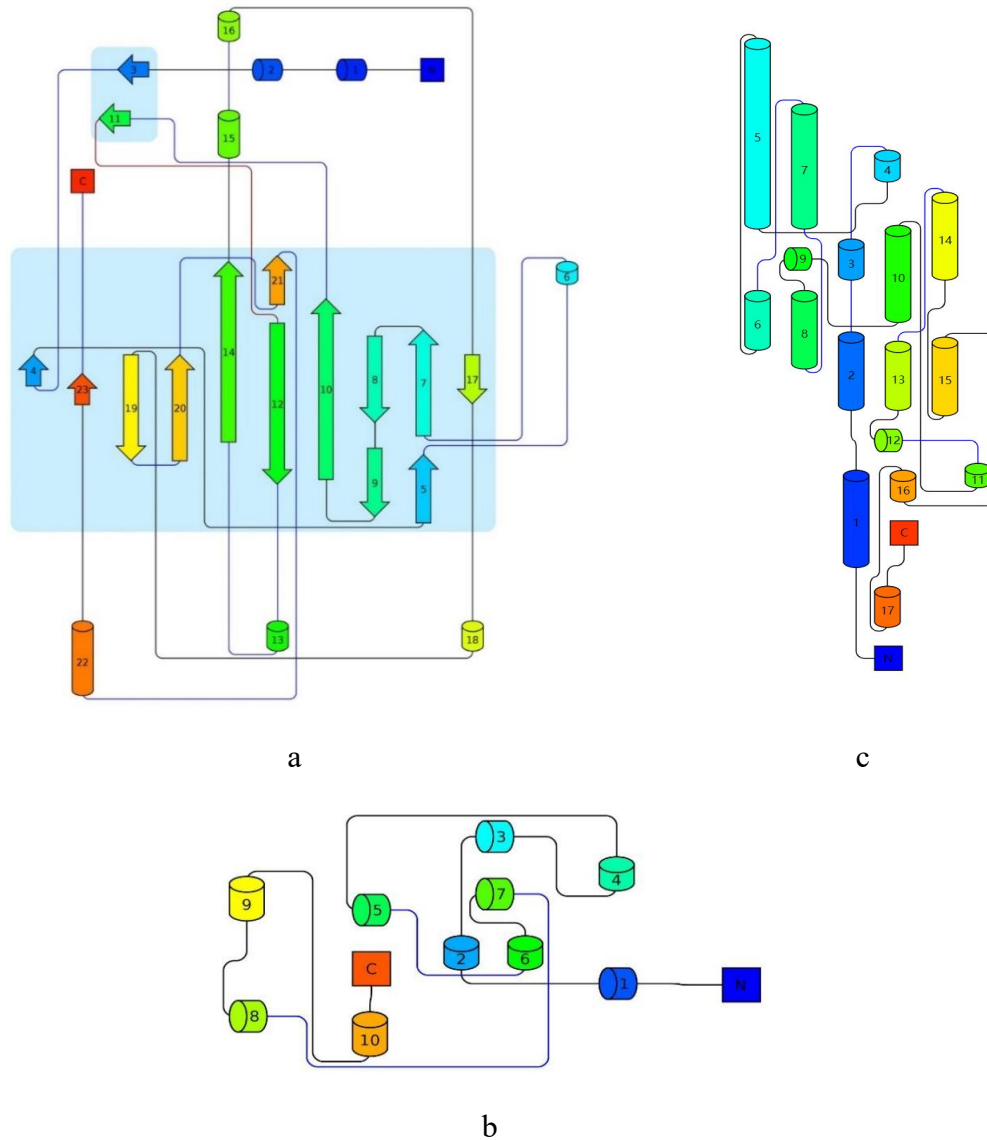


图 2-1 PcAdv (a)、PcnWAS (b) 和 PcRoo (c) 蛋白拓扑结构分析

Figure 2-1 Topological structure analysis of protein PcAdv (a), PcnWAS (b), and PcRoo (c)

注：蓝色区域表示能量可替换区域，处于该区域内的二级结构可能由于能力分布出现变化；圆柱体表示 α 螺旋；箭头表示 β 转角

Note: The blue area represents the energy replaceable area, and the secondary structure within this area may undergo changes due to capacity distribution. Cylindrical representation α spiral. Arrow representation β corner

2.2 靶标蛋白三级结构模型的构建

借助密歇根大学 I-TASSER 服务器及其相关组件，结合拓扑结构研究结果，

通过穿线法构建的福寿螺关键靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 的三级结构模型如图 2-2 所示。

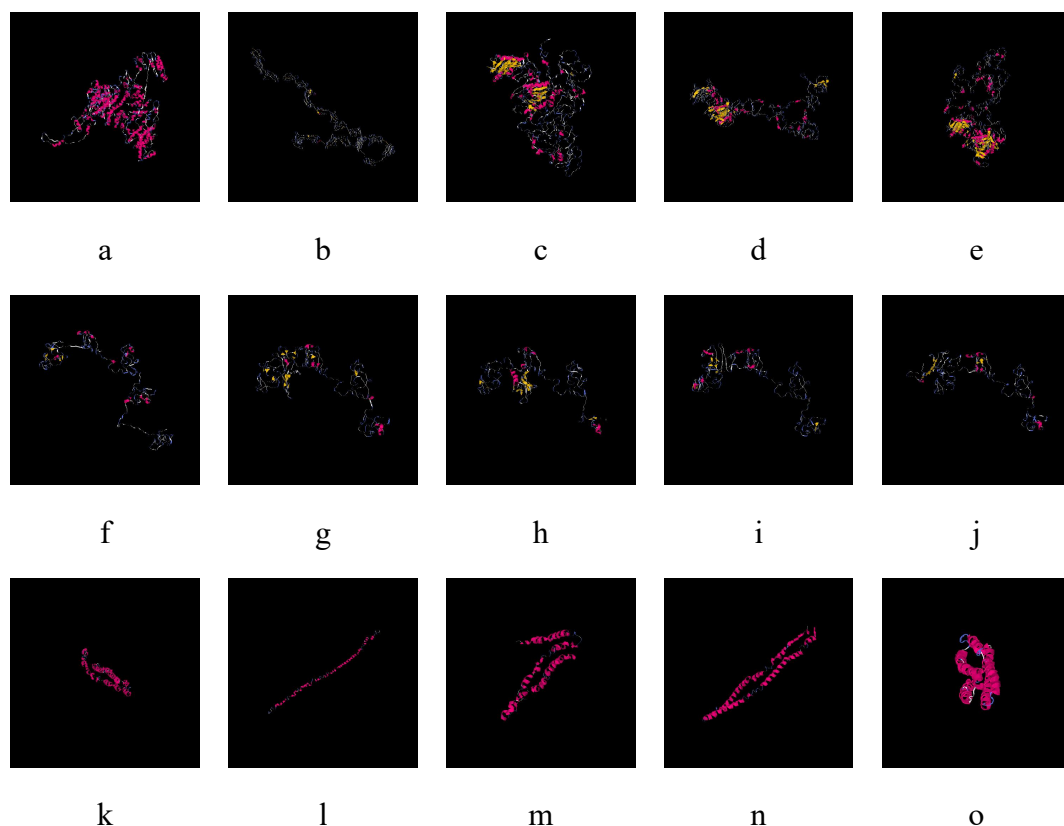


图 2-2 靶标蛋白三级结构模型示意图

Figure 2-2 Schematic diagram of the tertiary structure model of target proteins

注：a-e, f-j 和 k-o 分别为靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 的三级结构模型

Note: Figure a-e, f-j and k-o are tertiary structure models of protein PcAdv, PcnWAS and PcRoo respectively

2.3 靶标蛋白三级结构模型评估

2.3.1 以能量为基础的模型评估

利用 I-TASSER Suit 中的分析软件对构建的蛋白质三级结构模型的质量系数 (C-Score)、模型与模板间的相似系数 (TM-Score) 和模型与模板间的距离偏差 (RMSD) 进行分析, 结果如表 2-3 所示。根据表 2-3 中的数据, 综合 C-Score、TM-Score 和 RMSD 评价结果, 福寿螺 PcAdv 蛋白 a 模型、PcnWAS 蛋白 f 模型和 PcRoo 蛋白 k 模型因为具有最高的 C-Score、TM-Score 评分以及最好的 RMSD, 因此 PcAdv 蛋白模型 a、PcnWAS 蛋白模型 f 和 PcRoo 蛋白模型 k 被选作用于进

行后续试验的基础模型，所用蛋白质模板信息如表 2-4 所示。

表 2-3 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 蛋白三级结构模型评价

Table 2-3 Evaluation of models for protein PcAdv, PcnWAS, and PcRoo

靶标蛋白名称	模型编号	质量评估系数	相似度系数	距离偏差
Name	Number	C-Score	TM-Score	RMSD
PcAdv	a	0.69	0.62	11.4
	b	-0.70	0.60	66
	c	-3.07	0.55	77
	d	-3.21	0.51	72
	e	-3.21	0.46	600
	f	-0.33	0.67	7.9
	g	-2.67	0.62	220
PcnWAS	h	-3.24	0.58	172
	i	-3.47	0.46	159
	j	-3.07	0.43	152
	k	-2.49	0.42	13.6
	l	-2.68	0.41	9.4
PcRoo	m	-3.27	0.41	8.2
	n	-2.91	0.38	8.9
	o	-2.85	0.37	9.3

注： C-Score 代表模型的质量评估系数，范围为[-5, 2]，分值越大代表模型的可信度越高； TM-Score 为模型与模板间的相似度系数，分值>0.5 说明模型具有正确的结构拓扑，可信，<0.17 说明模型属于随即模型，不可信； RMSD 为模型与模板间的距离偏差。

Note: C-score is typically in the range of [-5, 2], where a C-score of a higher value signifies a model with a higher confidence and vice-versa; TM-score and RMSD are estimated based on C-score and protein length following the correlation observed between these qualities.

表 2-4 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 蛋白三级结构模型模板

Table 2-4 Protein structure templates of PcAv, PcnWAS and PcRoo

序号	PcAdv (a)			PcnWAS (f)			PcRoo (k)		
	PDB	Ident	Score	PDB	Ident	Score	PDB	Ident	Score
1	1d0nA	0.15	1.97	2nbiA	0.20	1.67	4cgkA	0.13	1.32
2	3gawA	0.18	1.74	2nbiA	0.15	1.66	2tmaA	0.11	2.20
3	3ffnA	0.14	5.28	2ifsA	0.16	1.24	7mkdL	0.11	0.70
4	3javA	0.23	4.05	2nbiA	0.15	2.35	6fltA	0.18	1.26
5	1d0nA	0.15	2.65	2ifs	0.16	4.62	6z6f	0.09	1.19
6	3ja4A	0.15	1.33	2nbiA	0.20	2.45	5nnvA	0.09	1.57
7	1d0n	0.15	5.79	2ifs	0.16	3.64	6z6f	0.06	1.54
8	1d0n	0.15	3.97	2nbiA	0.20	2.87	5xg2A	0.12	2.08
9	3gavA	0.18	1.73	2ifs	0.16	6.73	4iloA	0.10	0.80
10	1d0nA	0.15	4.39	2nbiA	0.15	1.66	7rscD	0.11	1.36

注：本表仅列出了穿线过程中排名前 10 的模板； PDB 表示蛋白质 PDB 编号； Ident 表示模型与模板序列的相似度； Score 表示模板与待测序列的对齐程度，大于 1 表示待测序列与模板具有较好的对齐效果。

Note: Rank of templates represents the top ten threading templates used by I-TASSER; PDB Hit is the PDB number of protein; Ident is the percentage sequence identity of the whole template chains with query sequence;

2.3.2 以结构为基础的模型评估

在氨基酸残基的扭转角方面，蛋白质三级结构的评估依赖于拉氏图 (Ramachandran Plot)，如图 2-3 (a, b 和 c) 所示。对福寿螺 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 蛋白三级结构进行拉氏图分析可知，以上 3 种蛋白模型均具有较高的准确性。对于 PcAdv 蛋白，93.3%的残基处于完全允许区域，3.5%的残基处于一般允许区域，仅有 3.2%的残基处于不合理区域；对于 PcnWAS 蛋白，83.2%的残基处于完全允许区域，13.0%的残基处于一般允许区域，仅有 3.8%的残基处于不

合理区域；对于 PcRoo 蛋白，94.1%的残基处于完全允许区域，2.9%的残基处于一般允许区域，仅有 3.0%的残基处于不合理区域。以上结果表明，落于完全允许区的氨基酸残基数量均大于 85%，因此通过穿线法构建的蛋白质三级结构模型具有较高的准确性，可以用于后续试验。

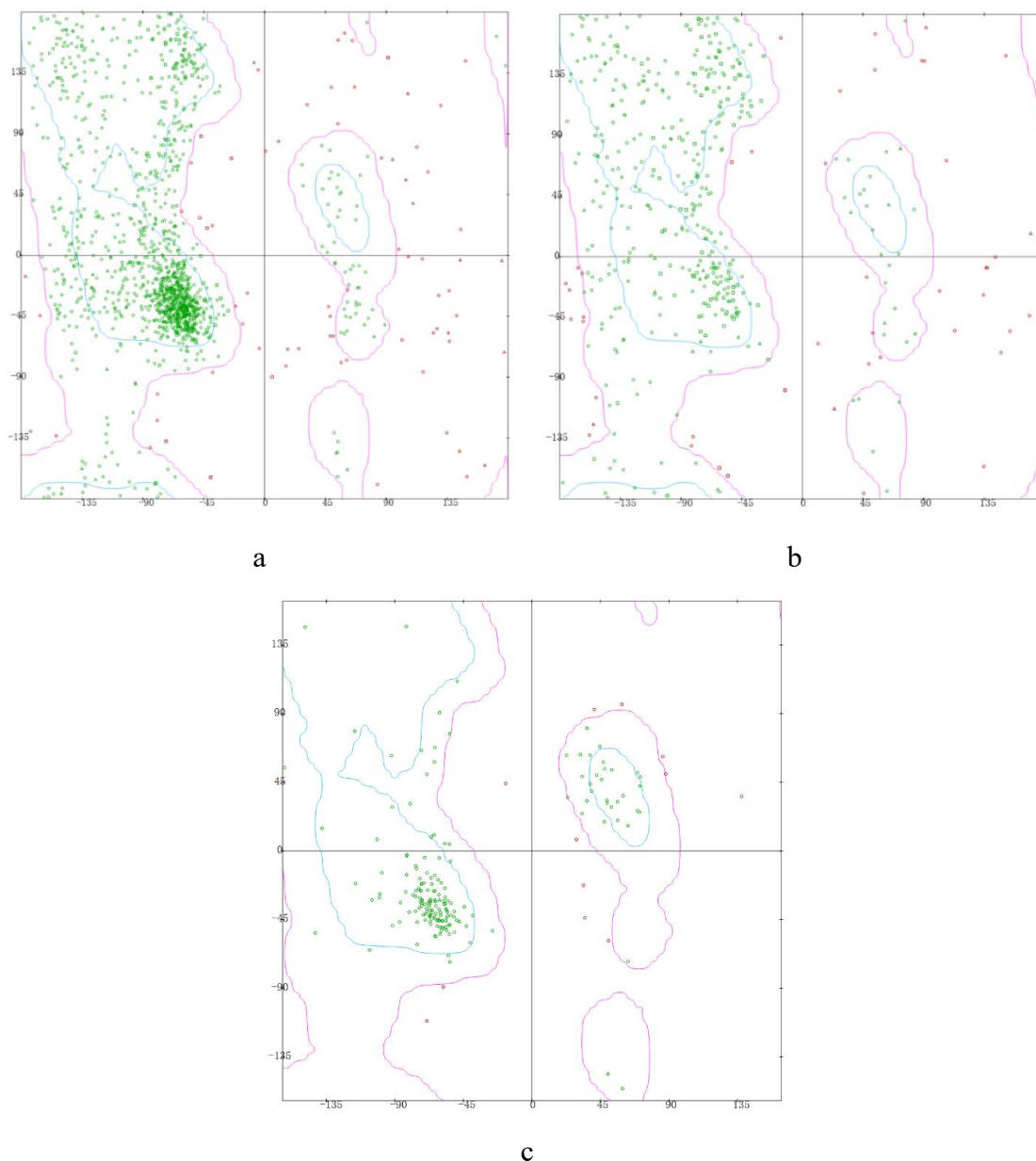


图 2-3 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 蛋白三级结构模型拉氏图

Figure 2-3 Raman plot of protein PcAdv, PcnWAS and PcRoo

注：图中各点表示氨基酸残基，红色表示该氨基酸处于不合理区域内，绿色表示该氨基酸处于合理区域内，合理区域包括完全允许区和一般允许区；蓝色闭合区域表示完全允许区，粉色闭合区域表示一般允许区；若落于合理区内的氨基酸残

基数量大于总数量的 85% 则表明该蛋白质三级结构模型具有较稳定的结构, 可以应用于后续研究。

Note: Each green and red point in the figure represents an amino acid residue. The closed blue area represents the fully allowed area, while the closed pink area represents the general allowed area. The number of amino acid residues in the reasonable region more than 85% indicates that the protein tertiary structure model can be used for subsequent research.

2.4 靶标蛋白活性口袋预测

采用蛋白空腔法, 利用 POCASA 算法分别对 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 蛋白三级结构模型的活性口袋进行检索, 检索发现 PcAdv 蛋白具有 5 个活性口袋, PcnWAS 蛋白具有 3 个活性口袋, PcRoo 蛋白具有 2 个活性口袋, 以上结合口袋的空间坐标如表 2-5 所示。

表 2-5 预测活性口袋坐标

Table 2-5 Coordinates of protein activity pockets

蛋白名称 Name	位点 Site	X	Y	Z	R (Å)
PcAdv	1	181.702	89.599	105.545	12.9
	2	164.352	119.929	119.359	14.5
	3	164.352	156.684	135.172	13.6
	4	111.806	133.429	189.848	5.0
	5	109.647	136.581	188.630	5.0
PcnWAS	1	176.555	188.596	137.491	10.4
	2	150.439	141.394	76.057	12.8
	3	95.723	82.122	126.473	13.5
PcRoo	1	101.538	104.196	139.149	11.4
	2	108.652	97.341	105.417	5.2

2.5 探针化合物与靶标蛋白结合区域的研究

采用 AutoDock 4.0 软件将探针化合物苦葛皂苷 A、槟榔碱分别与以上 10 个活性口袋进行分子对接，结果如表 2-6 所示。对接结果显示，探针化合物与靶标蛋白各个活性口袋均具有一定的结合效果，其中苦葛皂苷 A 与 PcAdv 蛋白口袋 1、PcnWAS 蛋白口袋 3 的结合能下降数值最大，分别为-6.30 和-3.23 kcal/mol，槟榔碱与 PcRoo 蛋白口袋 1 的结合能下降数值最大，为-5.02 kcal/mol，显示这些口袋位置最可能为探针化合物苦葛皂苷 A、槟榔碱与靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 结合的主要区域，这些区域在靶标蛋白中的位置示意图如图 2-4 所示。

表 2-6 化合物与靶标蛋白各结合口袋的对接结果

Table 2-6 Docking results of compounds and target protein binding pockets

蛋白名称	PcAdv					PcnWAS			PcRoo	
Name										
位点	1	2	3	4	5	1	2	3	1	2
结合能 (kcal/mol)	-6.30	-2.53	-3.61	-2.75	-2.63	-2.00	-1.63	-3.23	-5.02	-1.94

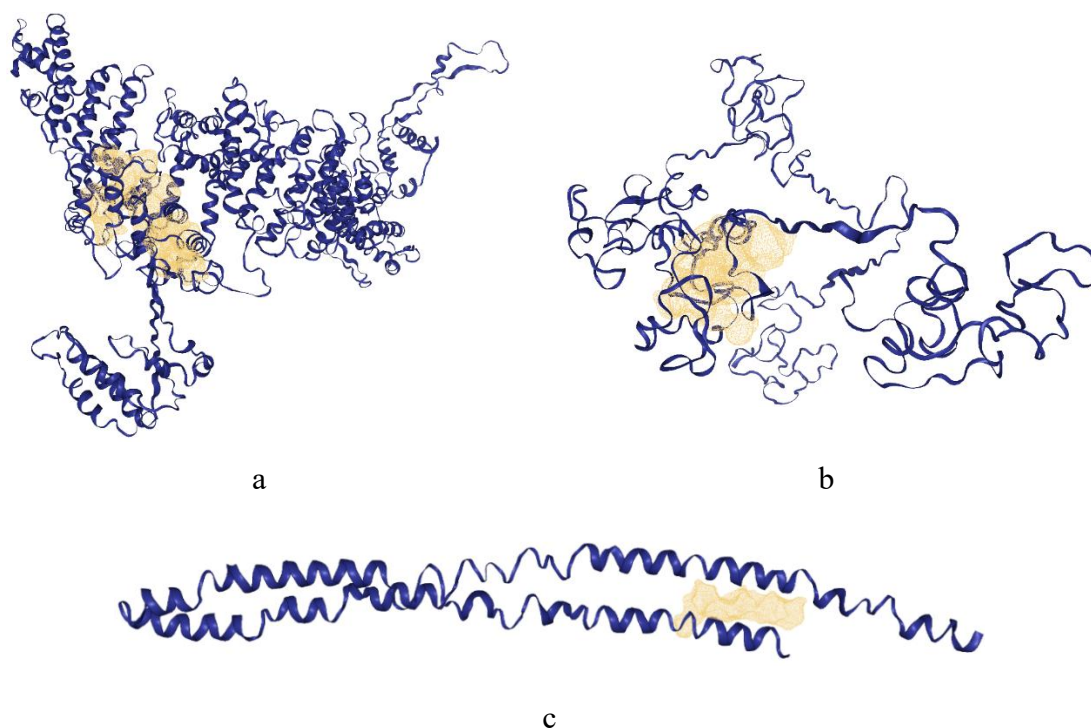


图 2-4 靶标蛋白与探针化合物主要结合区域示意图

Figure 2-4 Schematic diagram of the main binding regions between target proteins

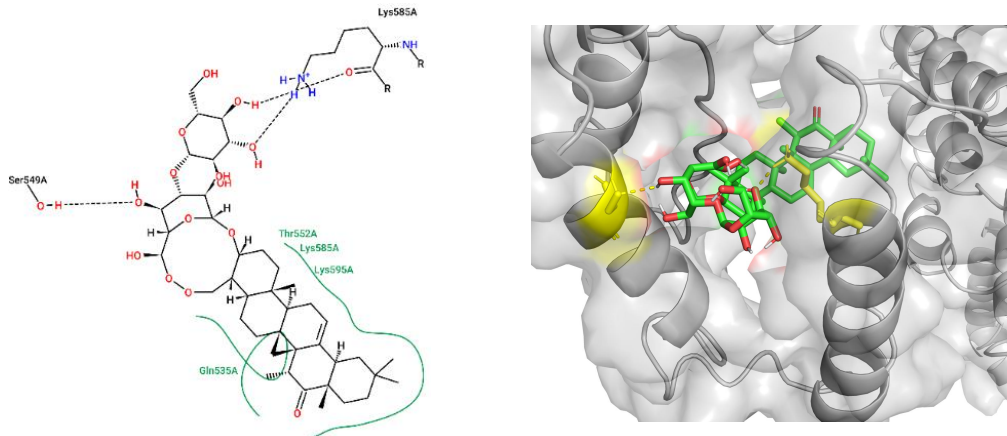
and probe compounds

注：a 为 PcAdv 蛋白，b 为 PcnWAS 蛋白，c 为 PcRoo 蛋白，黄色区域表示探针化合物与靶标蛋白主要的结合区域

Note: a, b and c represent protein PcAdv, PcnWAS and PcRoo. The yellow area represents the main binding region between the probe compounds and the target proteins

2.6 探针化合物与靶标蛋白结合位点的研究

进一步对分子对接获得的靶标蛋白-探针化合物配体的复合结构进行分析，结果显示，探针化合物苦葛皂苷 A 和槟榔碱与靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 发生了一定的相互作用，具体的作用方式包括疏水作用和氢键。其中苦葛皂苷 A 与 PcAdv 蛋白结合位点为丝氨酸和赖氨酸，苦葛皂苷 A 与 PcnWAS 蛋白的结合位点为丙氨酸，槟榔碱与 PcRoo 蛋白的结合位点为丝氨酸。另外在 PcAdv 蛋白的苏氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺残基；PcnWAS 蛋白的亮氨酸、酪氨酸残基；PcRoo 蛋白的亮氨酸残基处可以与探针化合物形成疏水作用，这表明探针化合物苦葛皂苷 A、槟榔碱与靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 能够发生相互作用，且整个蛋白-配体复合物体系可以保持稳定。探针化合物与靶标蛋白具体的作用位置和模式如图 2-5 所示。



a

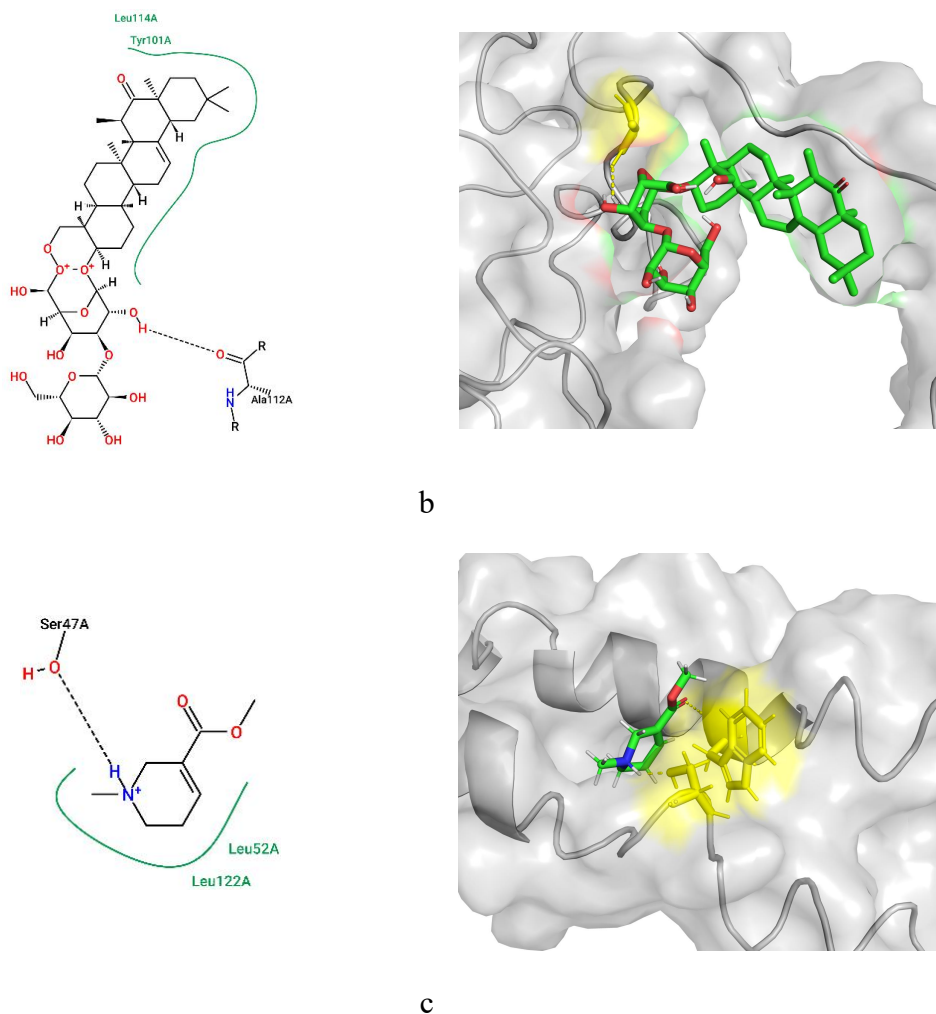


图 2-5 探针化合物与靶标蛋白的结合模式

Figure 2-5 Binding mode of probe compounds and target proteins

注：a 和 b 分别表示苦葛皂苷 A 与 PcAdv 蛋白、PcnWAS 蛋白的结合模式，c 表示槟榔碱与 PcRoo 蛋白的结合模式；图中绿色曲线和黑色虚线分别表示靶标蛋白与探针化合物形成疏水作用和氢键

Note: a and b represent the binding mode of pedunsaponin A with PcAdv and PcnWAS respectively, and c represents the binding mode of arecoline with PcRoo; The green curve and black dashed line in the figure represent the hydrophobic interaction and hydrogen bonding between the target proteins and the probe compounds, respectively

2.7 虚拟筛选结果

在 DrugBank-3D structures 数据库中对靶标蛋白进行基于刚性分子对接的虚

拟筛选, 分别以靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 为受体进行筛选, 统计各组排名前 15 的化合物作为候选化合物, 打分情况 LibDock Score 分别如表 2-7、2-8 和 2-9 所示。

进一步利用柔性分子对接的方式对获得的候选化合物进行筛选, 将苦葛皂苷 A 与 PcAdv 蛋白、PcnWAS 蛋白的结合能 (-6.30 kcal/mol, -3.23 kcal/mol) 以及槟榔碱与 PcRoo 蛋白的结合能 (-5.02 kcal/mol) 作为标准, 筛选结合能更低的化合物作为目标化合物。筛选结果如表 3-2 所示, 相比于苦葛皂苷 A 和槟榔碱, 化合物 6-四磷酸腺苷甲基-7,8-二氢蝶呤、6-四磷酸腺苷甲基-7,8-二氢蝶呤、3,8-二氨基-6-苯基-5-[6-[1-[2-[(1,2,3,4-四氢-9-吡啶基)氨基]乙基]-1-1,2,3-三唑]己基]-菲啶、海藻酸钾、硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸、巴氯芬、醋氨苯酸与靶标蛋白结合后具有更低的结合能参数, 这表明, 从理论上来说, 这些化合物能够更好的和靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 结合, 是潜在的具有杀螺活性的目标化合物。

表 2-7 PcAdv 蛋白虚拟筛选结果统计

Table 2-7 Results of virtual screening based on protein PcAdv

化合物名称	中文名称	刚性对接打分	结合能 (kcal/mol)
Name	Name in Chinese	LibDock Score	Binding energy
6-(adenosine tetraphosphate-methyl)-7,8-dihydropterin	6-四磷酸腺苷甲基-7,8-二氢蝶呤	224.61	-10.03
Thionicotinamide-Adenine-D inucleotide	硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸	222.908	-8.22
[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-acetonyl-3-carbamoyl-pyridin-1-ium-1-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl]methyl	[(2R, 3S, 4R, 5R)-5-(4-乙酰基-3-氨甲酰基-吡啶-1-鎓-1-基)-3,4-二羟基-四氢呋喃-2-基]甲基	216.997	-5.82
[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(6-aminop	[[[(2R, 3S, 4R, 5R)-5- (6-		

urin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl]methoxyhydroxy-phosphoryl] phosphate	氨基嘌呤-9-基)-3, 4-二羟基四氢呋-2-基]甲氧基羟基磷酸基]磷酸盐		
Adenylate-3'-phosphate-[[2'-deoxy-uridine-5'-phosphate]-3'-phosphate]	腺苷酸-3'-磷酸-2'-脱氧尿苷-5'-磷酸-3'-磷酸盐	210.317	-4.97
3,8-Diamino-6-Phenyl-5-[6-[1-[2-[(1,2,3,4-Tetrahydro-9-Acridinyl)Amino]Ethyl]-1,1,2,3-Triazol]Hexyl]-Phenanthridinium	3,8-二氨基-6-苯基-5-[6-[1-[2-[(1,2,3,4-四氢-9-吡啶基)氨基]乙基]-1,1,2,3-三唑]己基]-菲啶	208.479	-6.74
7-thionicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate Cpad	7-硫代烟酰胺腺嘌呤-二核苷酸磷酸	208.314	-5.79
Nicotinamide 8-bromo-adenine dinucleotide phosphate	— 8-溴腺嘌呤二核苷酸磷酸	206.103	-4.85
3-Acetylpyridine Adenine Dinucleotide	3-乙酰吡啶腺嘌呤二核苷酸	205.144	-5.94
Potassium Alginate	海藻酸钾	204.899	-3.06
6-phenyl-5-[6-[1-[2-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-ylamino)ethyl]triazol-4-yl]hexyl]phenanthridin-3,8-diamine	6-苯基-5-[6-[1-[2-(1,2,3,4-四氢吡啶-9-基氨基)乙基]三唑-4-基]己基]菲啶-3,8-二胺	204.724	-6.83
5,6-dihydroxy-NADP	5,6-二羟基-NADP	202.528	-5.73
Adenylate-3'-phosphate-[[2'-	腺苷酸-3'-磷酸-[2'-脱氧	202.141	-4.82
		200.026	-5.15

deoxy-uridine-5'-phosphate]- 3'-phosphate]	尿苷-5'-磷酸]-3'-磷酸盐]		
3-Aminomethyl-Pyridinium- Adenine-Dinucleotide	3-氨基甲基吡啶-腺嘌呤- 核苷酸	200.005	-3.83
N-[2-hydroxy-1-indanyl]-5-[(2-tertiarybutylaminocarbonyl)-4(benzo[1,3]dioxol-5-ylmet hyl)-piperazino]-4-hydroxy-2 -(1-phenylethyl)-pentanamid e	N-[2-羟基-1-茛基]-5-[(2- 叔丁基氨基羰基)-4-(苯 并[1,3]二氧基-5-基甲 基)-哌嗪基]-4-羟基-2-(1- 苯基乙基)-戊酰胺	197.183	-4.09

表 2-8 PcnWAS 蛋白虚拟筛选结果统计

Table 2-8 Results of virtual scening based on protein PcnWAS

化合物名称	中文名称	刚性对 接打分 LibDock Score	结合能 (kcal/mol) Binding energy
Name	Name in Chinese		
3-Acetylpyridine Adenine Dinucleotide	3-乙酰吡啶腺嘌呤二核 苷酸	222.338	-1.46
Thionicotinamide-Adenine-Di nucleotide	硫代辅酶腺嘌呤二核苷 酸	221.86	-7.99
Deamido-Nad+	烟酸腺嘌呤二核苷酸	221.76	-2.21
5-beta-D-ribofuranosylnicotin amide adenine dinucleotide	5-β-D-呋喃核糖基烟酰 胺腺嘌呤二核苷酸	220.336	-1.49
Carba-nicotinamide-adenine-d inucleotide	卡巴烟酰胺腺嘌呤二核 苷酸	219.889	-3.11
EM-1745	—	217.93	-2.40
Cpad	—	215.966	-0.59
Potassium Alginate	海藻酸钾	215.447	-7.71

6-(adenosine tetraphosphate-methyl)-7,8-dihydropterin	6-四磷酸腺苷甲基-7,8-二氢蝶呤	212.497	-2.74
GDP-alpha-D-mannuronic acid	GDP- α -D-甘露糖酸	212.046	-3.01
Bis(Adenosine)-5'-Triphosphate	二腺苷-5'-三磷酸	211.539	-2.99
[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-acetyl-3-carbamoyl-pyridin-1-ium-1-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl]methyl	[(2R, 3S, 4R, 5R)-5-(4-乙酰基-3-氨基酰基-吡啶-1-鎓-1-基)-3,4-二羟基-四氢呋喃-2-基]甲基	210.784	-1.83
[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(6-aminopyrimidin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl]methoxy-hydroxy-phosphoryl] phosphate	[[[(2R, 3S, 4R, 5R)-5-(6-氨基嘌呤-9-基)-3, 4-二羟基四氢呋喃-2-基]甲氧基羟基磷酰基]磷酸盐		
3-Aminomethyl-Pyridinium-Adenine-Dinucleotide	3-氨基甲基吡啶-腺嘌呤-核苷酸	209.442	-1.48
Nicotinamide adenine dinucleotide 3-pentanone adduct	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 3-戊酮加合物	206.903	-0.52
Uridylyl-2'-5'-phosphoguanosine	尿酰基-2'-5'-磷酸鸟苷	205.167	-0.14

表 2-9 PcRoo 蛋白虚拟筛选结果统计

Table 2-9 Results of virtual screening based on protein PcRoo

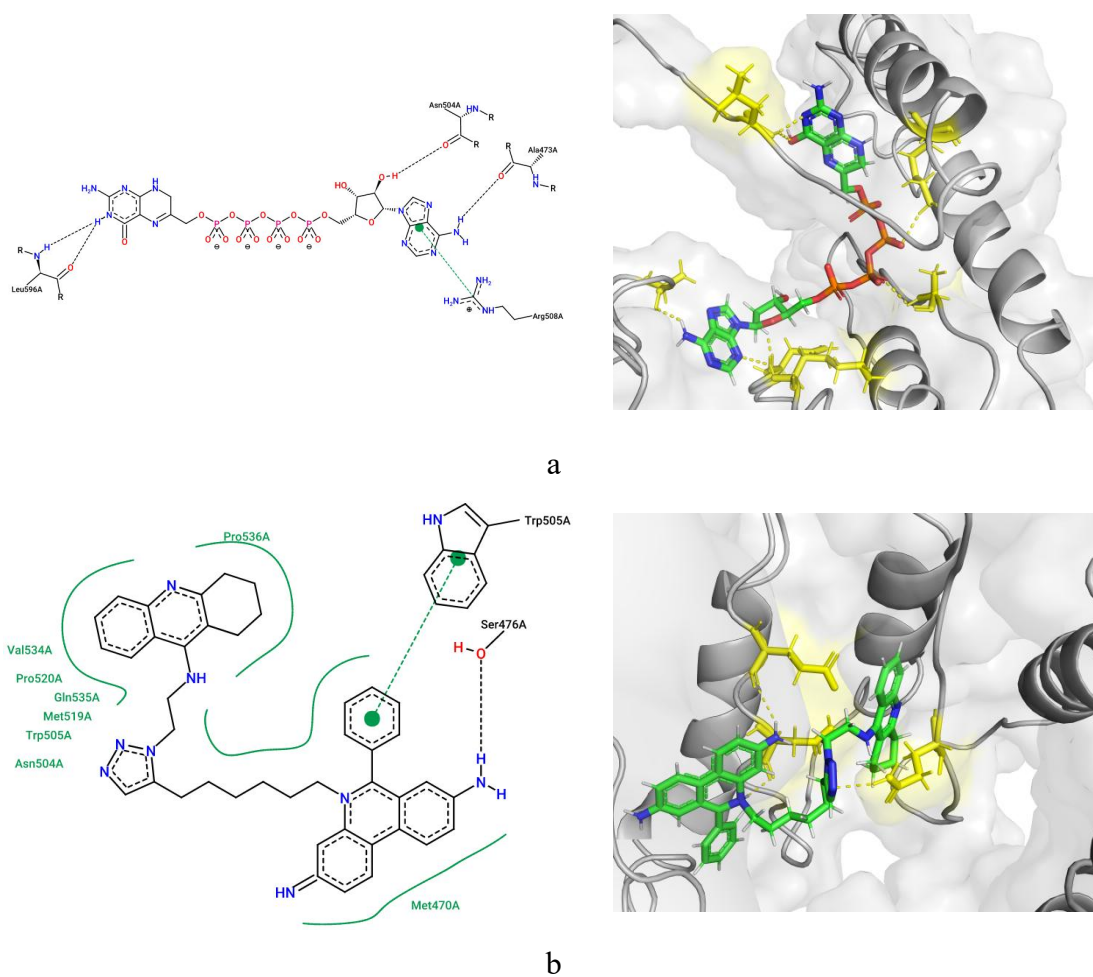
化合物名称	中文名称	刚性对接打分	结合能 (kcal/mol)
Name	Name in Chinese	LibDock Score	Binding energy

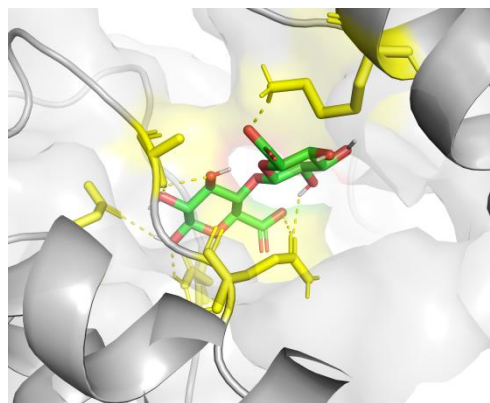
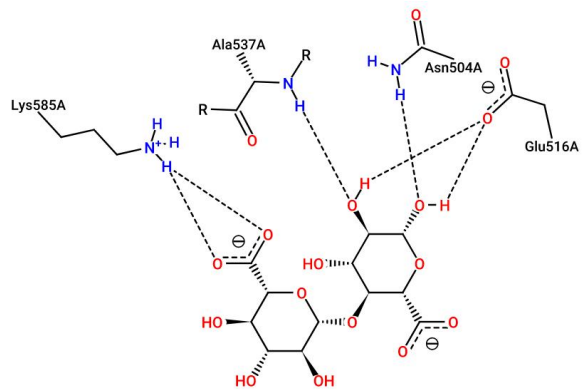
Inarigivir soproxil	索那吉韦	160.532	-4.72
<i>N</i> -butyl-3-{{6-(9H-purin-6-yl amino)hexanoyl}amino} benzamide	<i>N</i> -丁基-3-{{6-(9H-嘌呤-6-基氨基)己酰基}氨基}苯甲酰胺	158.493	-3.58
Carba-nicotinamide-adenine-dinucleotide	卡巴烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	156.608	-1.87
(2 <i>R</i>)-2-({9-(1-methylethyl)-6-[(4-pyridin-2-ylbenzyl)amino]-9H-purin-2-yl}amino)butan-1-ol	(2 <i>R</i>)-2-({9-(1-甲基乙基)-6-[(4-吡啶-2-基苄基)氨基]-9H-嘌呤-2-基}氨基)丁-1-醇	151.599	-4.59
4-(2-{{4-{{3-(4-Chlorophenyl)Propyl}Sulfanyl}-6-(1-Piperazinyl)-1,3,5-Triazin-2-Yl}Amino}Ethyl)Phenol	4-(2-{{4-{{3-(4-氯苯基)丙基}磺酰基}-6-(1-哌嗪基)-1,3,5-三嗪-2-基}氨基}乙基)苯酚	148.706	-3.97
Ticagrelor	替格瑞洛	148.004	-2.83
Baclofen	巴氯芬	147.826	-5.35
5'-S-[2-(decylamino)ethyl]-5'-thioadenosine	5'-S-[2-(癸基氨基)乙基]-5'-硫代腺苷	147.437	-4.09
Telaglenastat	替拉格司他	147.327	-2.15
Evodenoson	依伏诺生	146.685	-3.62
Methyl (2 <i>S</i>)-2-[[2-[(3 <i>R</i>)-1-carbamimidoylpiperidin-3-yl]acetyl]amino]-3-[4-(2-phenylethynyl)phenyl]propanoate	(2 <i>S</i>)-2-[[2-[(3 <i>R</i>)-1-氨基甲酰亚胺基哌啶-3-基]乙酰基]氨基]-3-[4-(2-苯基乙炔基)苯基]丙酸甲酯	145.367	-2.51
Preladenant	瑞德南特	144.34	-4.23
Acedoben	醋氨苯酸	144.236	-5.11
Dopexamine	多培沙明	144.193	-2.74

<i>N</i> -({6-[(4-cyano-2-fluoroben	<i>N</i> -({6-[(4-氰基-2-氟苄基)		
zyl)oxy]naphthalen-2-yl}sulf	氧基]萘-2-基}磺酰基)-D-	144.168	-1.09
onyl)-D-glutamic acid	谷氨酸		

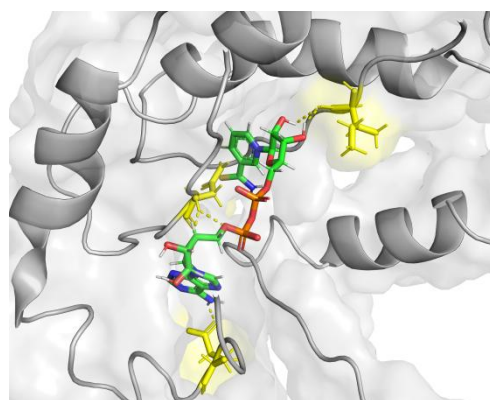
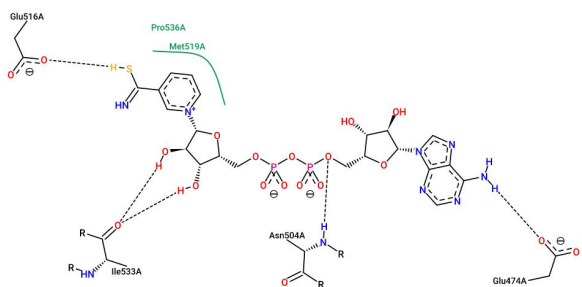
2.8 靶标蛋白与目标化合物结合模式分析

对筛选出的目标化合物 6-四磷酸腺苷甲基-7,8-二氢蝶呤、3,8-二氨基-6-苯基-5-[6-[1-[2-[(1,2,3,4-四氢-9-吡啶基)氨基]乙基]-1-1,2,3-三唑]己基]-菲啶、海藻酸钾、硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸、巴氯芬和醋氨苯酸与靶标蛋白的结合模式进行分析，结果如图 2-6 所示。

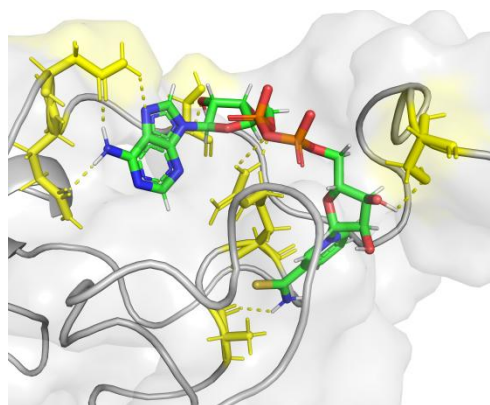
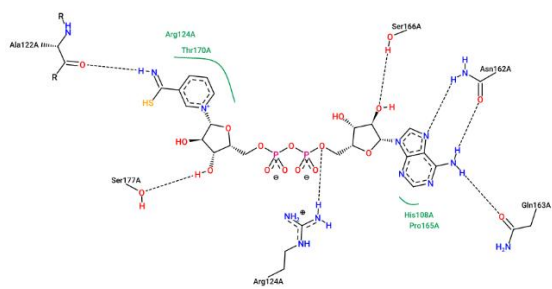




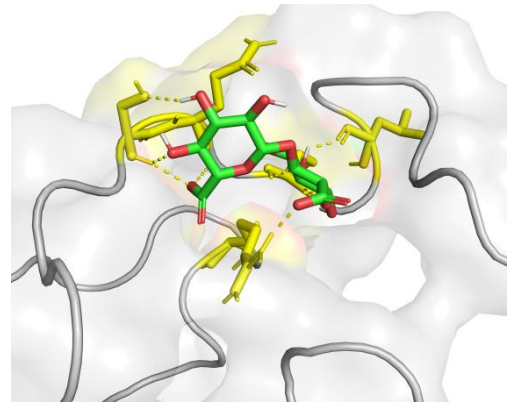
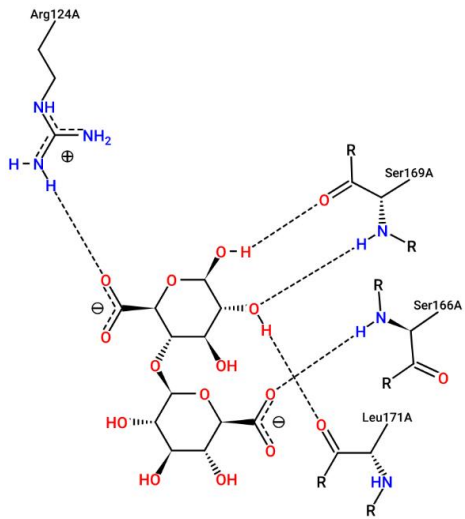
c



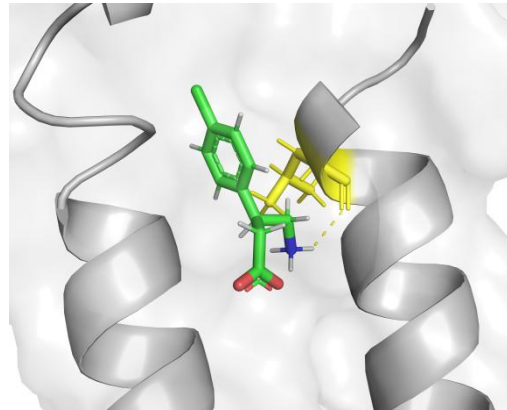
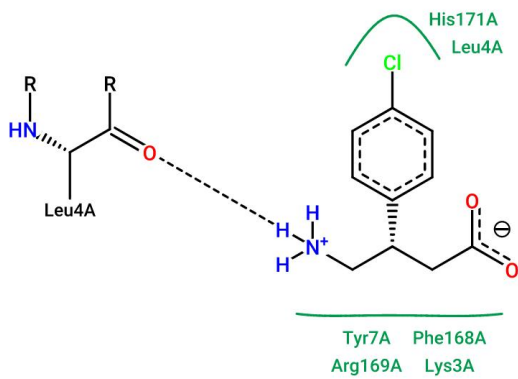
d



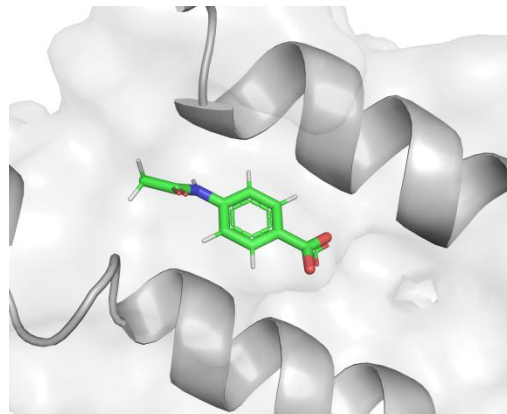
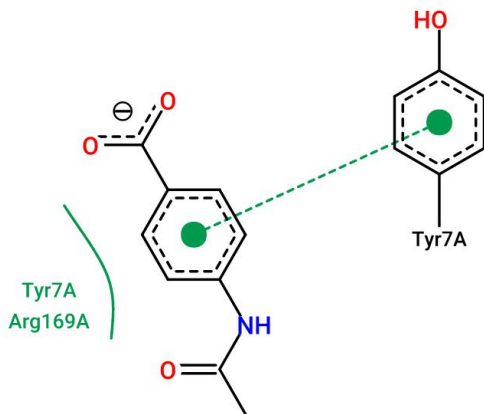
e



f



g



h

图 2-6 不同目标化合物与靶标蛋白结合模式示意图

Figure 2-6 Binding modes of different target compounds and target proteins

注：a-d 分别表示 PcAdv 蛋白与 6-四磷酸腺苷甲基-7,8-二氢蝶呤、3,8-二氨基-6-苯基-5-[6-[1-[2-[(1,2,3,4-四氢-9-吡啶基)氨基]乙基]-1-1,2,3-三唑]己基]-菲啶、海藻

酸钾和硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸的结合模式；e 和 f 分别表示 PcnWAS 蛋白与硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸和海藻酸钾的结合模式；g 和 h 分别表示 PcRoo 蛋白与巴氯芬和醋氨苯酸的结合模式

Note: Figure a-d represent binding modes between PcAdv and 6-(adenosine tetraphosphate-methyl)-7,8-dihydropterin,3,8-Diamino-6-Phenyl-5-[6-[1-[2-[(1,2,3,4-Tetrahydro- 9- Acridinyl) Amino] Ethyl]- 1-1,2,3- Triazol] Hexyl]- Phenanthridinium, potassium alginate and thionicotinamide-adenine-dinucleotide; Figure e and f represent binding modes between PcnWAS and thionicotinamide-adenine-dinucleotide and potassium alginate; Figure g and h represent binding modes between PcRoo and baclofen and acedoben

3 小结与讨论

3.1 靶标蛋白结构模型构建与新农药研发

在本研究中，我们通过穿线法构建了靶标蛋白的三级结构模型，依靠密歇根大学 ZhangYang 团队创建的 I-TASSER 服务器、牛津大学 Charles 团队编写的 TopDraw 分析算法及相关组件，将获得的氨基酸序列排列于预测出的拓扑结构模板内，计算能量最小结构为标准进行相关优化，最终成功获得了符合试验要求的靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 的三级结构模型。能量以及结构检验结果表明，通过本试验方法构建的模型准确性较高，可以用作后续研究。

不论是在医学领域还是农药领域，大多数药物作用的靶标均为蛋白质。从微观角度而言，农药与有害生物的作用方式就是农药配体与受体靶标蛋白发生选择性相互作用的过程，致使有害生物的某些生物途径或功能改变。因此了解靶标蛋白的结构和功能既是蛋白质结构领域的基本问题，又是农药开发领域的关键问题。

蛋白质的功能是由其三级结构决定的，因此了解靶标蛋白的三级结构对进一步利用靶标开发农药具有积极的意义。在前期的研究中，我们通过蛋白质组学结合蛋白质测序技术经 RNA 干扰试验获得了福寿螺 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 蛋白的氨基酸序列，并最终确定其为杀螺剂的作用靶标蛋白，但在 NCBI、PDB 等数据库进行功能和结构查询后，并未发现有福寿螺体内该蛋白的功能和结构的相关研究。

了解福寿螺靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 的结构是有针对性开发新杀螺剂的基础,而目前,通过计算法获得蛋白质三级结构模型是蛋白质结构构建领域的主流方法。目前利用穿线法计算蛋白质三级结构模型已经在蛋白质模型构建领域取得了广泛的应用,如 2021 年 Mccullough 等^[117]利用 I-TASSER 建立了盘状假单胞菌中多个蛋白的三级结构模型,并根据该模型获得了这些蛋白的 GO 功能分析,为了解这些蛋白的功能奠定了基础; Zhang 等^[118]比较了利用 QUARK 法和 I-TASSER 构建的 CASP11 蛋白的三级结构模型与晶体衍射法获得的蛋白质结构模型,结果显示,利用 I-TASSER 建立的模型准确性很高,可以作为进一步研究的依据; Jethra 等^[119]利用 I-TASSER 对小麦中一个未知的蛋白进行了模型构建,最终通过该结构推测出了蛋白功能,最终经试验验证了该蛋白的功能。以上实例再次表明,通过 I-TASSER 获得的蛋白质三级结构模型可以较为准确的反映蛋白质的结构和功能,可以用于后续研究。

蛋白质只在特定位置发挥生理功能,而同一个蛋白处于细胞内外不同位置时可能会发挥不同的生理功能,因此研究蛋白质发生生理功能的位置可以为进一步探索其生理功能的发生机制奠定了基础。对于靶标蛋白承担的生理功能和其发挥机制,目前主要依赖于生物信息学分析和高分辨率蛋白三维结构的解析,而在本研究中,通过蛋白空腔法,对构建的靶标蛋白三级结构模型进行生物信息学分析,最终获得了其作为农药靶标可能发挥生理功能的区域,并进一步利用分子对接的方法研究了探针化合物与靶标蛋白的主要结合位置,这些研究结果为进一步基于靶标的杀螺剂筛选奠定了基础。

3.2 虚拟筛选与新农药研发

在本研究中,我们将最新研究发现的福寿螺靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 蛋白作为受体,首先通过基于刚性分子对接的虚拟筛选获得了一系列打分较高的化合物,进一步通过柔性分子对接对化合物与相应的靶标蛋白的结合能以及结合模式进行了计算和分析,通过两次筛选,获得了以海藻酸钾、巴氯芬、醋氨苯酸以及硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸为代表的目标化合物。目前在农药开发领域,虚拟筛选作为一个将理论形象化的有力工具,最大程度地避免了新农药设计和筛选过程中的盲目性,极大地提升了农药筛选的效率。

虚拟筛选作为现代药物的开发的主流模式之一，与传统的随机筛选法相比，具有高效、低成本的特点。目前已有许多通过虚拟筛选方式获得的药物已经被批准使用，如 Haloperidol、Eprazinone 以及 Fenbutrazate^[120]，另外还有许多成药性较高的化合物正不断地通过虚拟筛选的方式被发现，如 Kaplan 等^[121]利用 5-HT_{2A} 受体作为靶标，通过虚拟筛选获得了 2 种 LSD 类似物，该类化合物在小鼠中具有抗抑郁作用，但相比于其它药物没有致幻的副作用。然而，相比于医药研究，农药开发的进度相对落后，通过虚拟筛选方法获得的农药数量很少，而利用虚拟筛选的方法进行杀螺剂筛选的研究则完全处于空白领域。一方面，可以用于杀螺剂筛选的靶标蛋白的鉴定工作进展缓慢，目前普遍认为杀螺剂四聚乙醛的靶标蛋白为乙酰胆碱酯酶，除此以外，几乎没有其它的靶标蛋白被报道。同时，已有众多报道显示福寿螺对四聚乙醛产生了严重的抗药性^[122]，因此该蛋白无法作为受体蛋白进行虚拟筛选研究。另一方面，有关虚拟筛选的方法，特别是筛选标准，一直是杀螺剂乃至整个药物筛选领域的关键问题，目前虚拟筛选主要依靠打分和结合能的降低情况进行判断和筛选，然而对于不同的蛋白-配体复合物体系，标准并不统一，甚至并没有对虚拟筛选标准进行研究的文献，这就启示我们，在杀螺剂的虚拟筛选中，我们首先需要利用新的靶标蛋白作为受体，与此同时，还需要制定符合实际情况的筛选方法。

从筛选的条件来看，虚拟筛选可以分为以刚性分子对接为基础的虚拟筛选和以柔性分子对接为基础的虚拟筛选两种方式，分别具有不同的优缺点。以 LibDock 为代表的以刚性分子对接为基础的虚拟筛选具有对接速度快的特点，但精确度相对较低，盲目性较大，常用于从小分子数据库中筛选出与蛋白活性位点匹配的小分子。官方信息显示，LibDock 得出的结合模式需要进一步通过其它方法进一步验证其合理性。利用柔性分子对接的方法进行虚拟筛选可以精确的模拟化合物与靶标蛋白的作用方式和结合模式，但筛选效率较低，常用于对少量中标化合物进行二次筛选分析。本研究首先进行了基于刚性分子对接的虚拟筛选获得了一系列候选化合物，进一步对这些候选化合物进行基于柔性分子对接的虚拟筛选，逐步缩小目标化合物的范围，从筛选的角度而言，可以更加精准的获得候选化合物，这为构建杀螺化合物的筛选方法奠定了基础。

不同于杀菌剂、杀虫剂和除草剂具有已经形成体系的筛选体系，杀螺剂的筛选依旧处于起步阶段。由于包括福寿螺在内的有害螺类产生抗药性的速度极快，防治困难，而且近年来发现的对福寿螺具有毒杀效果的物质大多为植物源分离获得，如夹竹桃强心苷和加拿大一枝黄花提取物 PEEE 在结构和成分方面都很复杂，分析或合成的难度大，无法直接应用于农业生产^[123,124]。在这种情况下利用化合物数据库检索新的杀螺剂不论是在速度还是成功率方面都更具有优势。

接下来应对本研究中获得的目标化合物进行室内杀螺活性评估，以期验证虚拟筛选在杀螺剂筛选中应用的合理性，从而更快的获得具有杀螺活性的化合物。

第三章 目标化合物对福寿螺的毒杀作用研究

前期研究发现,虚拟筛选获得的目标化合物 6-四磷酸腺苷甲基-7,8-二氢蝶呤、3,8-二氨基-6-苯基-5-[6-[1-[2-[(1,2,3,4-四氢-9-吡啶基)氨基]乙基]-1-1,2,3-三唑]己基]-菲啶、海藻酸钾、硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸、巴氯芬和醋苯氨酸具有潜在的杀螺活性,为了验证这些化合物是否具有杀螺活性,本章利用室内生物活性测定的方法系统性地对目标化合物毒杀福寿螺的活性、中毒症状及生物靶标进行了研究,以期能够为福寿螺的化学防治提供新的备选化合物。

1 材料与amp;方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试动物

福寿螺:试验用福寿螺采集于学校农场。将采集到的福寿螺洗净置于体积为 15 L 的专用饲养箱内,以尼龙网封口,保证供氧充足。调节培养箱温度为 20 ℃,设置光照与黑暗时间分别为 16 h 和 8 h。每日定时换水、投喂饲料。于实验室内饲养 14 d 后挑选福寿螺中螺(螺壳直径为 1.5±0.2cm)进行后续试验。

1.1.2 供试化合物

苦葛皂苷 A:纯度为 98%,提取自植物苦葛根。经烘干、乙醇提取、C18 层析过柱、高效液相色谱纯化后获得苦葛皂苷 A 纯化合物。

槟榔碱:纯度为 98%,购自青岛捷世康生物科技有限公司。

海藻酸钾:纯度为 99%,购自上海麦克林生化科技有限公司。

巴氯芬:纯度为 99%,购自上海标准科技有限公司。

醋氨苯酸:纯度为 99%,购自上海标准科技有限公司。

硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸:纯度为 98%,购自上海素培生物科技有限公司。

1.1.3 主要试剂

本章所用的主要试剂如表 3-1 所示。

表 3-1 试剂列表

Table 3-1 Reagents used in this section

试剂名称	生产商
无水乙醇 (AR)	四川西陇化工有限公司
二甲苯	成都欣铭扬化工有限公司
多聚甲醛	碧云天生物技术有限公司
石蜡	上海华永石蜡有限公司
苏木素	上海翊圣生物科技有限公司
伊红	北京索莱宝科技有限公司
中性树脂	北京索莱宝科技有限公司
Marker III DNA Ladder	北京索莱宝科技有限公司
彩虹 180 广谱蛋白 Marker	北京索莱宝科技有限公司
细胞培养液 (DMEM, 高糖)	赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司
胎牛血清	沂源康源生物科技有限公司
感受态细胞 (DH5 α)	奥秘佳得医药科技有限公司
质粒中提试剂盒	奥秘佳得医药科技有限公司
核酸荧光染料试剂	奥秘佳得医药科技有限公司
哺乳动物细胞 (293T)	奥秘佳得医药科技有限公司
BCA 法蛋白浓度测定试剂盒	奥秘佳得医药科技有限公司
SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒	奥秘佳得医药科技有限公司
Goat anti-mouse (HRP)	北京中杉金桥生物技术有限公司
His-Tag	北京博奥龙免疫技术有限公司
蛋白纯化试剂	金斯瑞生物科技有限公司
TRIzol 试剂	大连宝生物工程有限公司
TransStart One-step gDNA	
One-step gDNA Removal and cDNA	北京全式金生物技术有限公司
Synthesis SuperMix	
2 \times Tap PCR MasterMix	天根生化科技有限公司

1.1.4 仪器设备

本章所用的主要仪器如表 3-2 所示。

表 3-2 主要仪器

Table 4-2 Instruments used in this section

名称	厂家
旋转切片机	徕卡显微系统(上海)贸易有限公司
全自动组织包埋机	徕卡显微系统(上海)贸易有限公司
722 型分光光度计	上海荆和分析仪器有限公司
SDS-PAGE 设备	伯乐生命医学产品（上海）有限公司
蛋白转印设备	伯乐生命医学产品（上海）有限公司
自动化学发光/荧光图像分析系统	上海天能生命科学有限公司
细胞培养箱	赛默飞世尔科技（中国）有限公司
超净工作台	武汉泰沃康仪器设备有限公司
NanoDrop 2000c 核酸浓度测定仪	NanoDrop 公司
PCR 扩增仪	德国艾本德股份公司
Allegra X-30R 型冷冻离心机	美国贝克曼库尔特有限公司

1.2 方法

1.2.1 目标化合物对福寿螺死亡率和生理状态的影响

采用浸杀法研究目标化合物对福寿螺死亡率和生理状态的影响。目前未见有文献报道这些化合物具有杀螺活性，为了避免漏筛，因此将候选化合物配置为 100 mg/L 水溶液，作为试验组，同时设置清水为空白对照、6 mg/L 苦葛皂苷 A 溶液以及 5 mg/L 槟榔碱作为阳性对照。每组重复 3 次，每个重复 15 头螺，每个重复均单独放置于 2 L 溶液内。每隔 5 小时观察福寿螺活动情况，并于 72 h 统计福寿螺死亡数量，并根据以下公式计算死亡率。

$$\text{死亡率(\%)} = \frac{\text{死亡头数}}{\text{总头数}} \times 100$$

1.2.2 目标化合物对福寿螺浸杀毒力的研究

采用浸杀法研究目标化合物对福寿螺的浸杀毒力。根据第三章 1.2.1 中的结果对目标化合物毒杀福寿螺的毒力值进行评估, 根据评估结果, 将目标化合物分别配置为系列浓度梯度溶液, 清水作为对照组, 每组重复 3 次, 每个重复选用 15 只大小及生理状况相近的螺并置于 1 L 溶液中, 分别于 24、48 和 72 h 统计每组福寿螺的死亡情况, 并计算毒力回归方程及 LC₅₀ 值。

1.2.3 目标化合物对福寿螺耗氧排氮的影响

测定主要采用 Winkler 碘量法和次溴酸钠氧化法分别对水中的溶解氧含量和氨氮比值进行评估^[125,126]。首先将目标化合物配置为一定浓度的水溶液, 试验选取的福寿螺体重为 5±0.5 g, 试验温度为 28 °C, 每处理重复 3 次。试验设置 6 mg/L 苦葛皂苷 A 溶液和 5 mg/L 槟榔碱溶液为阳性对照、清水为阴性对照。

具体试验流程为: 取 3 头生理状况相似的福寿螺 (螺壳直径为 1.5±0.2cm) 置于 500 mL 碘量瓶中处理 5 h, 取处理后水体进行福寿螺代谢能力测定。在水样采集完成后应及时将螺壳敲碎, 剖取螺软组织于 65 °C 烘箱中烘干 24 h 至恒重, 测定福寿螺软体部干重。耗氧率[R_O, mg/(g·h)]、排氮率[R_N, mg/(g·h)]及氧氮比 (R_{O: N}) 计算方法如下公式所示。

$$R_O = \frac{(O_0 - O_t) \times V}{t \times n \times W} \quad R_N = \frac{(N_t - N_0) \times V}{t \times n \times W} \quad R_{O: N} = \frac{14 \times R_O}{16 \times R_N}$$

注: 式中, O₀、O_t 分别为试验结束时清水对照、实验组水体中溶解氧质量浓度 (mg/L); t 为时间 (h); V 为水的总体积 (L); n 为福寿螺数量 (头); W 为福寿螺软组织干重 (g); N₀、N_t 分别为实验结束时清水对照、实验组水体中氨氮质量浓度 (mg/L); 所有数据用 DPS 6.0 进行邓肯氏新复极差法进行差异显著性分析。

1.2.4 目标化合物对福寿螺鳃部组织形态的影响

采用石蜡切片法研究目标化合物对福寿螺鳃部组织形态的影响^[127]。设置 6

mg/L 海藻酸钾、5 mg/L 槟榔碱以及清水为对照组，目标化合物作为试验组，每处理 3 个重复，每个重复 15 头螺，36 h 后取下福寿螺鳃部进行切片，具体流程为组织固定、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、HE 染色、封片、观察。

1.2.5 目标化合物对福寿螺血蓝蛋白含量的影响

采用紫外吸收法研究目标化合物对福寿螺血蓝蛋白含量的影响^[128]。选择 10 头生理状况相近的福寿螺，分别置于一定浓度的目标化合物溶液中，于 20 °C 处理 40 h，设 6 mg/L 苦葛皂苷 A、5 mg/L 槟榔碱及清水为对照，每隔 10 小时进行取样。取样时用镊子敲碎福寿螺心脏周围的螺壳，露出心耳，用 1 mL 的注射器从心耳中抽取血淋巴，立刻用清水将抽取的血淋巴制成 1% 的稀释液，再以 334 nm 波长在分光光度计上比色，血蓝蛋白含量的具体计算公式如下所示：

$$\text{血蓝蛋白含量} = 2.69E_{1\text{cm}}^{1\%} \text{ mmol/L}$$

1.2.6 目标化合物与靶标蛋白体外结合情况研究

1.2.6.1 质粒构建与 PcnWAS 蛋白表达纯化

(1) 密码子优化及质粒构建

将蛋白片段构建到 pcDNA3.1 (+) 载体上，形成蛋白的过表达载体。

(2) 质粒中提

收集 50 mL 菌液，于 12000 rpm 条件下离心 2 min，弃上清。在沉淀物中先后加入 2.5 mL Buffer P1 和 2.5 mL Buffer P2，颠倒混匀 10 次，充分裂解细胞，再加入 3.5 mL Buffer P3，颠倒混匀 10 次，充分中和细胞裂解液。于 12000 rpm 条件下离心 10 min，收集上清液，用过滤柱过滤。在滤液中加入 300 μL 磁珠，于 25 °C 孵育 30 min 后分别利用 Buffer W1 和 Buffer W3 对磁珠进行洗涤。加入 500 μL Elution Buffer (70 °C 预热)，3000 rpm 条件下震荡 30 s，洗脱质粒 DNA。利用超微量分光光度计测定提取质粒 DNA 的浓度和纯度。利用 0.8% 的琼脂糖凝胶分离质粒 DNA，拍照并检测质粒纯度。

(3) 细胞转染

首先进行细胞复苏与传代。从液氮中取出冻存的 293T 细胞，复苏后接种到直径为 100 mm 的培养皿中，48 h 汇合后离心收集细胞，传代接种于 100 mm 培养皿中，24 h 后转染质粒 DNA。

按照 Chemifect 说明书进行 DNA 转染。根据质粒 DNA 浓度, 计算 10 μg 质粒的体积, 加入 1 mL 的 OPTI-MEM 培养液中, 混匀后再加入 30 μL 转染试剂 Chemifect, 用枪尖混匀 10 次后于室温静置 30 min, 接着加入 100 mm 培养皿的细胞培养液中并混匀。于转染 24 h 和 48 h 时更换细胞培养液, 第二次更换后 6 h 后采用胰酶消化法收集细胞, 储存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

(4) 蛋白纯化

根据 Genscript 试剂盒提供的试剂配方配制 Lysis Buffer、Equilibration Buffer、Wash Buffer 和 Elution Buffer, 纯化步骤如下:

在 293T-NWASP 细胞中加入 5 mL Lysis Buffer, 冰上孵育 15 min。根据 1: 100 (V/V) 的比例将 50 μL Protease Inhibitor Cocktail 加入到蛋白样品中。在 4 $^{\circ}\text{C}$, 12000 rpm 的条件下离心 15 min, 沉淀细胞碎片, 收集上清。摇动旋转小瓶使磁珠悬浮, 取 2 mL 磁珠转移到干净试管中, 聚集磁珠弃上清。在 5 mL Equilibration Buffer 中加入磁珠翻转试管混合, 弃上清, 重复两次。在体系中加入 5 mL 细胞裂解液, 翻转试管混合, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。聚集磁珠, 弃上清。在体系中加入 5 mL Wash Buffer, 翻转试管混合 2 min, 聚集磁珠弃上清, 洗涤两次。继续加入 1.5 mL Elution Buffer 充分混合, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min, 保留洗脱液, 洗脱两次。4 $^{\circ}\text{C}$ 透析, 将装有蛋白样品的透析袋至于 300 mL PBS 中搅拌, 2 h 换一次液, 重复 3 次。透析后蛋白样品超滤浓缩至 1 mL, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

(5) Western Blot 验证

首先利用 BAC 法测定表达出的蛋白质浓度, 然后利用 Western Blot 试剂盒进行验证。根据样品中的蛋白浓度, 计算 10 μg 蛋白需要的样品体积, 加入聚丙烯酰胺凝胶, 转入电泳槽中, 进行电泳, 80 V 恒压电泳至样品中的指示剂 (溴酚蓝) 进入分离胶, 120 V 恒压电泳至指示剂达到胶底部。停止电泳, 剥离聚丙烯酰胺凝胶, 切除浓缩胶, 保留分离胶, 置于 PVDF 膜上, 并夹上滤纸和海绵, 制备三明治结构, 插入电转槽, 加入电转液, 200 mA/胶恒流电转 2 h, 取出 PVDF 膜, 置于 TBST 配制的 5% 脱脂奶粉中, 并于室温封闭 1 h 后从封闭液中取出 PVDF 膜, TBST 洗涤 3 次, 转入配置好的一抗 (HIS tag) 溶液中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 水平摇床上旋转摇晃, 孵育过夜。进一步用 TBST 洗涤膜 3 \times 5 min, 转入配制好的二抗

(Goat anti-mouse horseradish peroxidase)溶液中。二抗用含 5%脱脂奶粉的 TBST 稀释，于室温孵育 1 h。

1.2.6.2 目标化合物与靶标蛋白相互作用的等温滴定量热研究

利用等温滴定量热仪 ITC 200 进行试验，选择化合物 (mmol/L)：靶标蛋白 (mmol/L) = 5 : 0.1 的浓度条件进行试验。配置靶标蛋白溶液 2 mL，化合物溶液 10mL 以及 Elution Buffer 和 ddH₂O 各 100 mL 备用，并将液体进行脱气预处理。根据 GE Healthcare 使用手册进行加样，设置滴定次数为 20，时间为 1 h，准备结束后运行程序。滴定结束后，记录结合常数 K_b 和混乱度 ΔS。

1.2.7 目标化合物处理福寿螺后靶标蛋白基因表达情况的检验

1.2.7.1 总 RNA 的提取

鳃部总 RNA 的提取：解剖福寿螺，剪下鳃部并用 PBS 缓冲液冲洗表面的组织粘液，迅速置于液氮中冷冻。采用 DP419 试剂盒对鳃部总 RNA 进行提取，所有的操作在冰上进行，具体的提取步骤按照试剂盒说明书进行。

血细胞总 RNA 的提取：用眼科手术剪刀剪开福寿螺壳，以 1mL 注射器于心耳抽取血液样品 1mL，采用 TAKARA TRIzol 试剂盒对血细胞总 RNA 进行提取，具体的提取步骤按照试剂盒说明书进行。

1.2.7.2 靶标蛋白基因表达量的检测

采用 2^{-ΔΔC_t} 法进行相对定量表达试验。各基因的引物序列如表 3-3 所示 (β-actin 基因作为管家基因)。采用试剂盒进行 cDNA 的合成，相关反转录体系如表 3-4 所示。将清水处理组的 mRNA 表达水平校正为基本的表达水平。

表 3-3 qPCR 引物信息

Table 3-3 Primer sequences for qPCR

基因名称 Gene name	引物序列 (5'→3') Primer sequence
PcAdv	F: TGGCAAGAGACATGCAAGGT
	R: GTCCTGTCCCTGCCAAAAGA
PcnWAS	F: TCCCCGGGAGTATTTCCACA
	R: TGATTTGGTGGTGGACGGTT
PcRoo	F: AGGCAACAGAAGCAAACCAGC
	R: CGCCACAATGACAGAAGTCGG

表 3-4 反转录反应体系

Table3-4 Procedure for qPCR

步骤 Step	温度 (°C) Temperature	时间 (s) Time
1	94	30
2	94	5
3	60	30
4	GO TO 2→40 cycles	
5	95	15
6	60	60
7	95	15

1.2.8 数据分析

使用 DPS 6.0 数据处理软件进行统计分析, 采用邓肯氏新复极差法进行差异显著性分析。同列数据后标记不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 目标化合物对福寿螺的毒杀效果

在浓度为 100 mg/L 时, 目标化合物对福寿螺死亡率的影响如表 3-5 所示。结果表明, 在该浓度下, 巴氯芬对福寿螺的毒杀效果最好, 在处理福寿螺 24 h 后即可导致福寿螺大量死亡 (60.00%), 在 72 h 时, 该处理组福寿螺的死亡率达到了 100%。硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸对福寿螺同样具有很好的毒杀效果, 尽管在处理 24 h 时福寿螺的死亡率为 42.22%, 低于巴氯芬处理组, 但在 72 h 时, 该处理组福寿螺的死亡率同样达到了 100%。海藻酸钾也对福寿螺具有一定的毒杀作用, 在处理 72 h 时, 死亡率为 13.33%, 而醋氨苯酸未表现出对福寿螺的毒杀作用。

表 3-5 目标化合物对福寿螺的毒杀效果

Table 3-5 Killing effect of target compounds on *P. canaliculata*

化合物名称 Name	死亡率 (%) Mortality		
	24 h	48 h	72 h
海藻酸钾	0.00 c	0.00 c	13.33 b
巴氯芬	60.00 a	100.00 a	100.00 a
醋氨苯酸	0.00 c	0.00 c	0.00 c
硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸	42.22 b	82.22 b	100.00 a
清水	0.00 c	0.00 c	0.00 c

注：同列数据后标记不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Different lowercase letters indicate statistically significant differences at the 0.05 probability level

2.2 目标化合物对福寿螺浸杀毒力的研究

通过浸杀法测定巴氯芬和硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸毒杀福寿螺的 LC_{50} ，根据浓度与死亡率的关系得到的毒力回归方程分别为 $y = 2.0768 + 2.4857x$ 和 $y = 1.8585 + 1.7837x$ ，计算得到 LC_{50} 值分别为 16.2437 mg/L (上限：20.4768，下限：13.7494) 和 57.7102 mg/L (上限：63.2942，下限：50.9201)，相关系数 r 分别为 0.9796 和 0.9834。

2.3 目标化合物对福寿螺生理的影响

2.3.1 福寿螺中毒症状的观察

如图 3-1 所示，观察目标化合物处理福寿螺 72 h 后的生理状态发现，15 mg/L 巴氯芬处理福寿螺后表现出了明显的中毒症状，具体表现为头部和足部过量伸出螺壳，呈现瘫痪状态，足部肌肉无力，无法攀附烧杯壁 (图 3-1a)，该症状与对照化合物槟榔碱处理后福寿螺的中毒症状相同 (图 3-1d)。60 mg/L 硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸处理福寿螺后表现为厖壳闭合，足部不攀附烧杯壁或螺壳表面 (图 3-1b)，与 6 mg/L 苦葛皂苷 A 处理后福寿螺表现出的症状相同 (图 3-1e)。100 mg/L

海藻酸钾处理后福寿螺并未表现出明显的中毒反应（图 3-1c），与清水对照组相比，福寿螺的攀附情况并无明显差异。

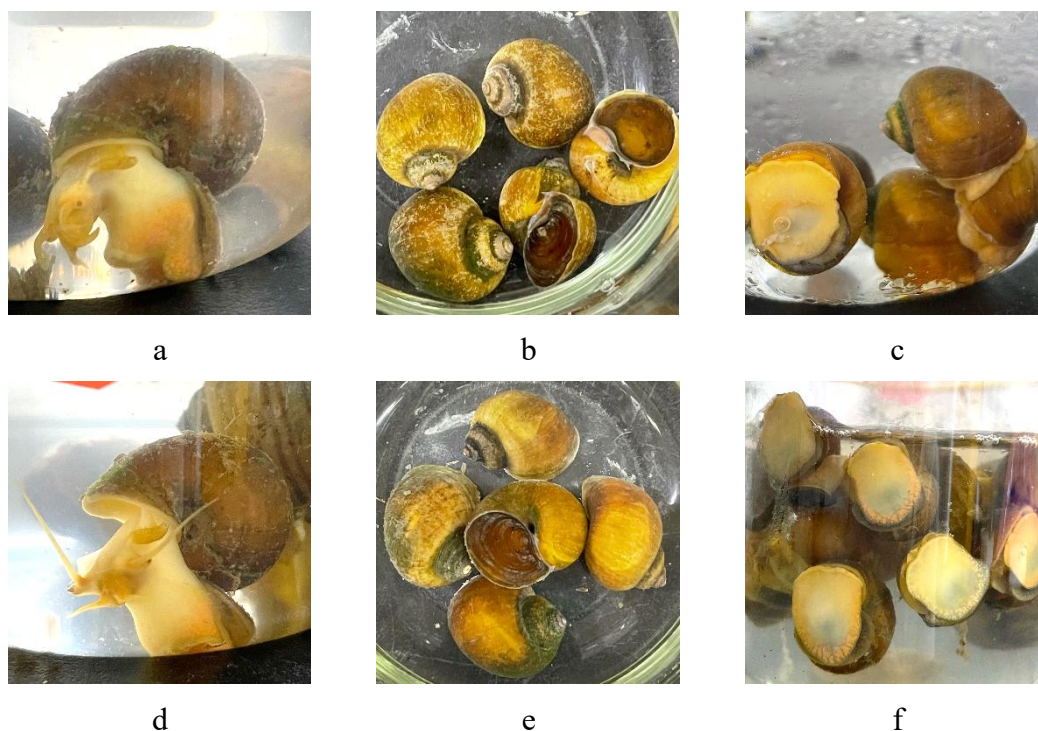


图 3-1 不同目标化合物处理下福寿螺的生理状况

Figure 3-1 Status of *P. canaliculata* under different target compounds treated

注：a-f 分别表示巴氯芬、硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸、海藻酸钾、槟榔碱、苦葛皂苷 A 和清水处理后福寿螺的生理状况

Note: Figure a-f represent living status of *P. canaliculata* after baclofen, thionicotinamide-adenine-dinucleotide, potassium alginate, arecoline, pedunsaponin A and water treated

2.3.2 目标化合物对福寿螺排泄量的影响

观察目标化合物处理福寿螺 72 h 后的水体情况发现，100 mg/L 海藻酸钾、15 mg/L 巴氯芬和 60 mg/L 硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸处理组可以导致福寿螺出现代谢异常的情况，具体表现为排出物增多（图 3-2），该症状与对照化合物苦葛皂苷 A 和槟榔碱处理后福寿螺出现的中毒症状相同。

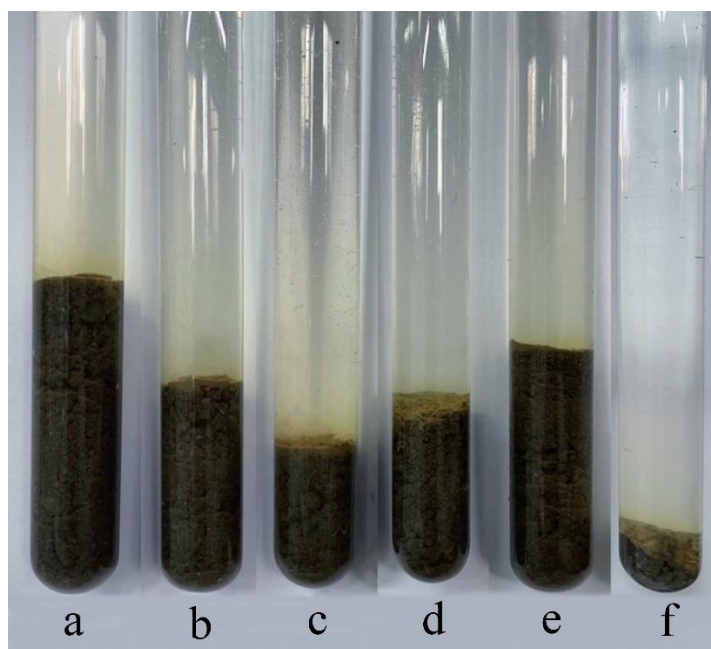


图 3-2 目标化合物处理后福寿螺生存水体情况

Figure 3-2 Water conditions after treatment of target compounds

注：a-f 分别表示海藻酸钾、巴氯芬、硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸、苦葛皂苷 A、槟榔碱和清水处理后福寿螺生存水体中的排出物

Note: Tube a-e represent water conditions of snails after compound potassium alginate, baclofen, thionicotinamide-adenine-dinucleotide, pedunsaponin A and arecoline treated. Tube f represents the water condition with clean water treated

2.4 目标化合物对福寿螺耗氧排氨的影响

对目标化合物海藻酸钾、巴氯芬和硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸处理后的福寿螺进行耗氧率、排氨率检测，根据结果计算氧氮比，结果如表 3-6 所示。结果表明，与清水对照组相比，经目标化合物处理 5 h 后，福寿螺的耗氧率、排氨率均出现了一定的改变，具体表现为氧氮比显著降低，但与对照组化合物苦葛皂苷 A 和槟榔碱相比，试验组各处理对福寿螺耗氧率、排氨率及氧氮比的影响较弱，但这种变化趋势与苦葛皂苷 A 和槟榔碱作用福寿螺后产生的生理变化相似。

表 3-6 不同目标化合物处理后福寿螺耗氧率、排氨率及氧氮比情况

Table 3-6 Oxygen consumption rate, ammonia excretion rate and oxygen nitrogen ratio of *P. canaliculata* treated with target compounds

化合物	浓度 (mg/L)	耗氧率	排氨率	氧氮比
Name	Concentration	Oxygen consumption rate	NH ₄ -N excretion rate	O:N ratio
海藻酸钾	100	0.1341	0.0055	21.2266±1.1101 b
巴氯芬	15	0.3916	0.0133	25.7632±2.8463 b
硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸	60	0.2528	0.0117	18.9059±1.3729 c
苦葛皂苷 A	6	0.1313	0.0113	10.2415±0.6379 d
槟榔碱	5	0.2790	0.0124	19.6875±1.0859 c
清水	—	0.5060	0.0123	36.0322±3.6747 a

注：氧氮比小于 7 表示机体消耗的能量完全由蛋白质提供，氧氮比为 7-24 表示机体完全由蛋白质和脂肪氧化供能，氧氮比大于 24 表示机体消耗的能量主要由脂肪和碳水化合物提供；数据后标记不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

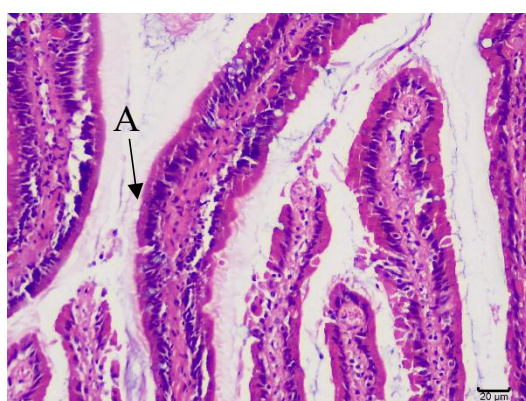
Note: The oxygen nitrogen ratio less than 7 means the energy consumed by the body is completely provided by protein; The oxygen nitrogen ratio between 7 and 24 means the body is completely powered by protein and fat oxidation; The oxygen nitrogen ratio greater than 24 means the energy consumed by the body is mainly provided by fat and carbohydrates; Different lowercase letters indicate statistically significant differences at the 0.05 probability level

2.5 目标化合物对福寿螺鳃部形态结构的影响

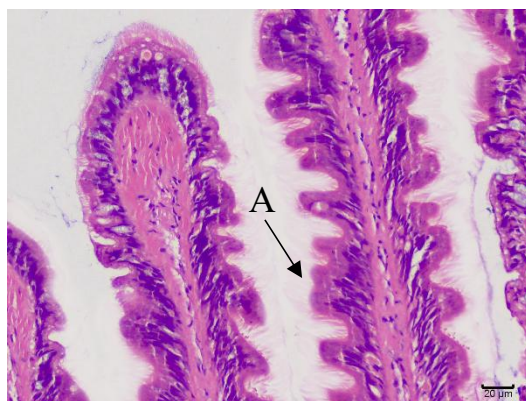
图 4-3 所示为 100 mg/L 海藻酸钾、15 mg/L 巴氯芬和 60 mg/L 硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸处理 36 h 后福寿螺鳃部的结构。由图可知，清水处理组福寿螺鳃部结构完整，纤毛排列紧密（图 3-3f），而经目标化合物海藻酸钾（图 3-3a）、巴氯芬（图 3-3b）和硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸（图 3-3c）处理后福寿螺鳃部纤毛脱落，与经苦葛皂苷 A（图 3-3d）和槟榔碱（图 3-3e）处理后产生的现象相同。



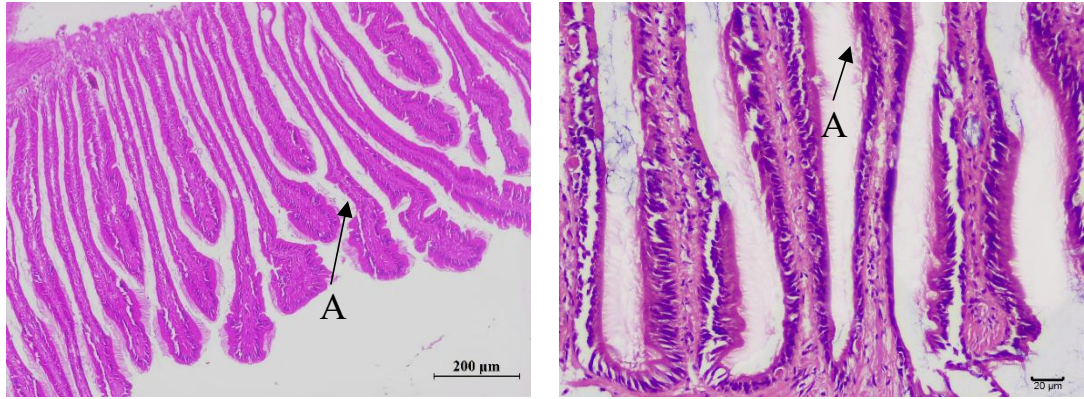
a



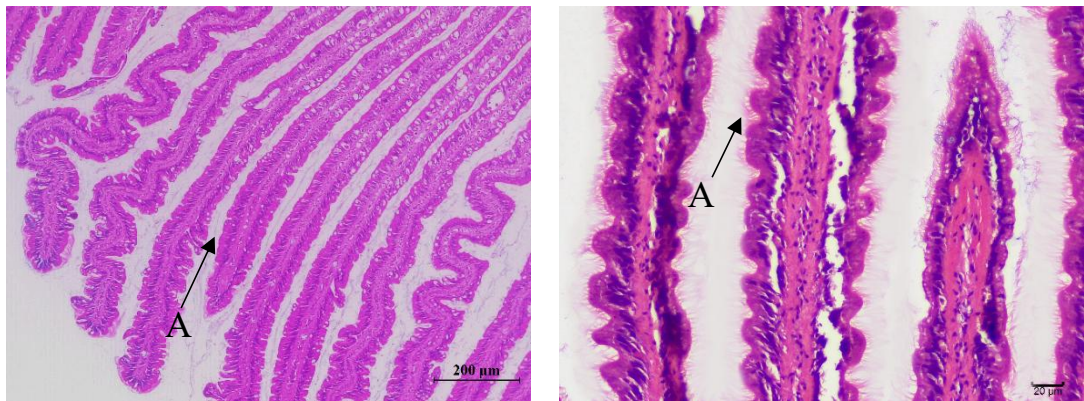
b



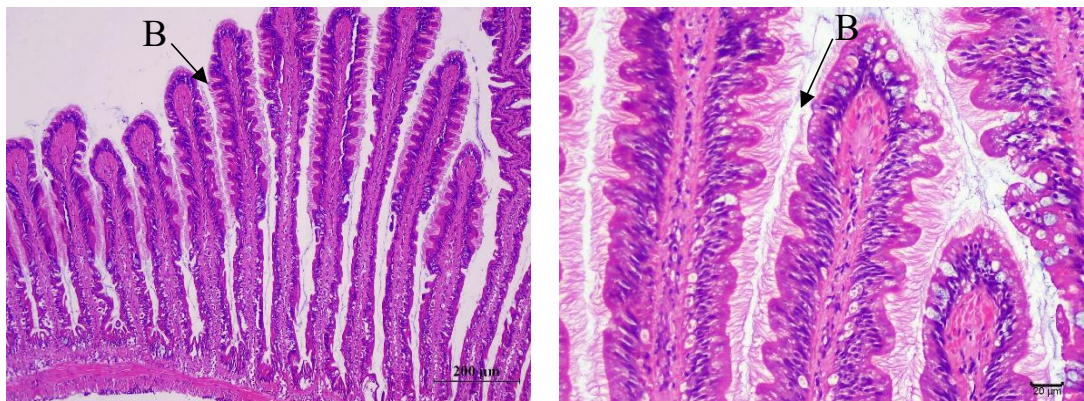
c



d



e



f

图 3-3 不同目标化合物处理后福寿螺鳃部形态

Figure 3-3 Morphology of gills after different target compounds treated

注：a 为 100 mg/L 海藻酸钾处理，b 为 15 mg/L 巴氯芬处理，c 为 60 mg/L 硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸处理，d 为 6 mg/L 苦葛皂苷 A 处理，e 为 5 mg/L 槟榔碱处理，f 为清水处理；A 为纤毛消失，B 为纤毛；每组图片中左侧图片的拍摄倍数

为 100 倍 (10×10), 右侧图片的拍摄倍数为 400 倍 (10×40)

Note: Treatments of a-f represent 100 mg/L potassium alginate, 15 mg/L baclofen, 60 mg/L thionicotinamide-adenine-dinucleotide, 6 mg/L pedunsaponin A, 5 mg/L arecoline and water; A represents disapperred cilia, and B represents cilia. The magnification of the left and right figure in each group is 100 and 400 times respectively

2.6 目标化合物对福寿螺血蓝蛋白含量的影响

如图 3-4 所示, 在目标化合物的处理下, 随着时间的变化, 福寿螺血蓝蛋白含量产生了不同程度的变化。与清水对照相比, 100 mg/L 海藻酸钾、15 mg/L 巴氯芬和 60 mg/L 硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸处理福寿螺后, 血蓝蛋白含量均出现了不同程度的下降趋势, 其中, 巴氯芬和硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸处理组福寿螺的血蓝蛋白含量在整个试验期内表现为持续下降, 但海藻酸钾处理组表现为先下降后恢复至初始状态, 而相比于清水处理组, 对照组苦葛皂苷 A 和槟榔碱处理后福寿螺的血蓝蛋白含量也同样出现了下降的趋势。这表明经化合物海藻酸钾、巴氯芬和硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸处理后, 福寿螺出现了一定的中毒症状, 而对照化合物苦葛皂苷 A 和槟榔碱处理后也产生了相同的症状。

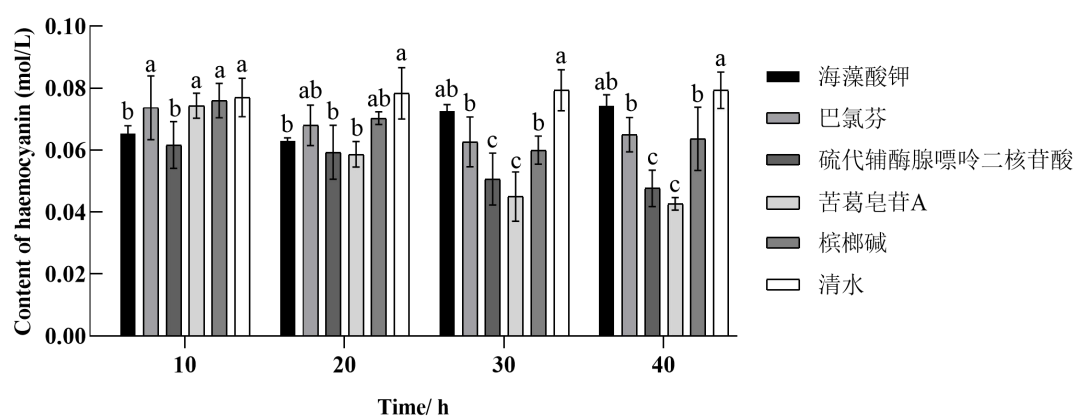


图 3-4 目标化合物对福寿螺血蓝蛋白含量影响

Figure 3-4 Effect of target compounds on the content of hemocyanin in *P. canaliculata*

注: 同行数据后标记不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Different lowercase letters indicate statistically significant differences at the

0.05 probability level.

2.7 目标化合物与靶标蛋白 PcnWAS 的体外结合情况

2.7.1 靶标蛋白 PcnWAS 的体外表达

2.7.1.1 pcDNA3.1-C-His-NWASP 质粒的构建

构建的质粒如图 3-5 (a) 所示, 进一步利用琼脂糖凝胶电泳检测其纯度, 结果如图 3-5 (b) 所示。结果表明, 构建的 pcDNA3.1-C-His-NWASP 质粒条带清晰明亮, 质粒提取完整, 无 RNA 污染, 纯度较高, 浓度为 $0.509 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 可以用于后续研究。

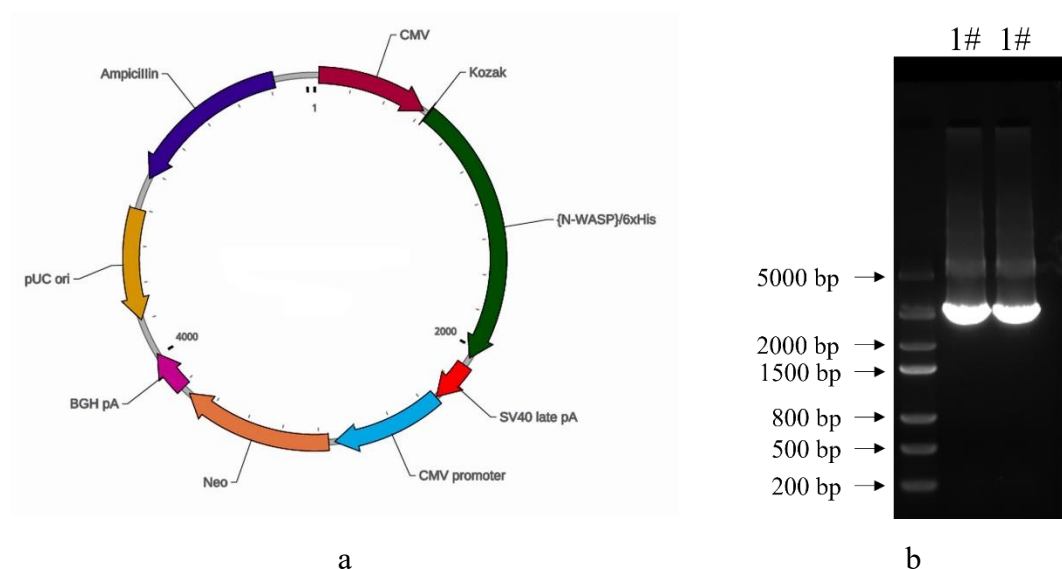


图 3-5 pcDNA3.1-C-His-NWASP 质粒的结构及验证

Figure 3-5 Structure and validation of plasmid pcDNA3.1-C-His-NWASP

2.7.1.2 蛋白浓度检测

采用 BCA 法对表达出的 PcnWAS 蛋白的浓度进行检测, 构建的标准曲线如图 3-6 所示, 测定的蛋白浓度如表 3-7 所示。结果表明, 标准曲线方程的 R^2 值为 0.9995, 说明测定体系稳定可靠, 蛋白浓度测定准确。

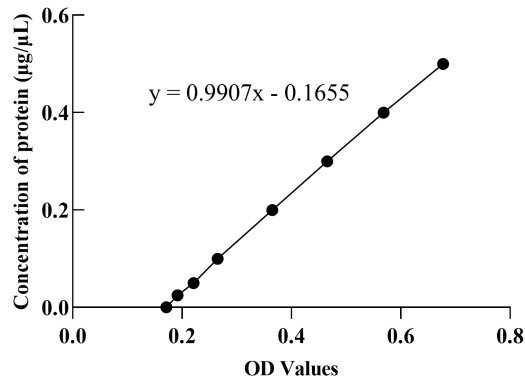


图 3-6 BAC 法测定蛋白浓度标准曲线

Figure 3-6 Standard curve for determining protein concentration via BAC

表 3-7 蛋白浓度检测结果

Table 3-7 Results of protein concentration detection

样品名称	平均 OD 值	计算浓度 (mg/mL)	原始浓度 (mg/mL)
Name	Average OD value	Concentration	Original concentration
E-1	0.2967	0.1284	1.28
E-2	0.2404	0.0726	0.73

2.7.1.3 蛋白表达情况验证

利用 Western Blot 法对 PcnWAS 蛋白的表达情况进行验证, 结果如图 3-7(a) 所示。结果显示, 样品中 PcnWAS 蛋白呈阳性表达, 说明纯化后的蛋白溶液含有 PcnWAS 蛋白。

进一步采用考马斯亮蓝法检验蛋白的纯化情况, 结果如图 3-7(b) 所示。目的条带较其他条带颜色较深, 说明纯化后蛋白溶液中 PcnWAS 蛋白含量较高。

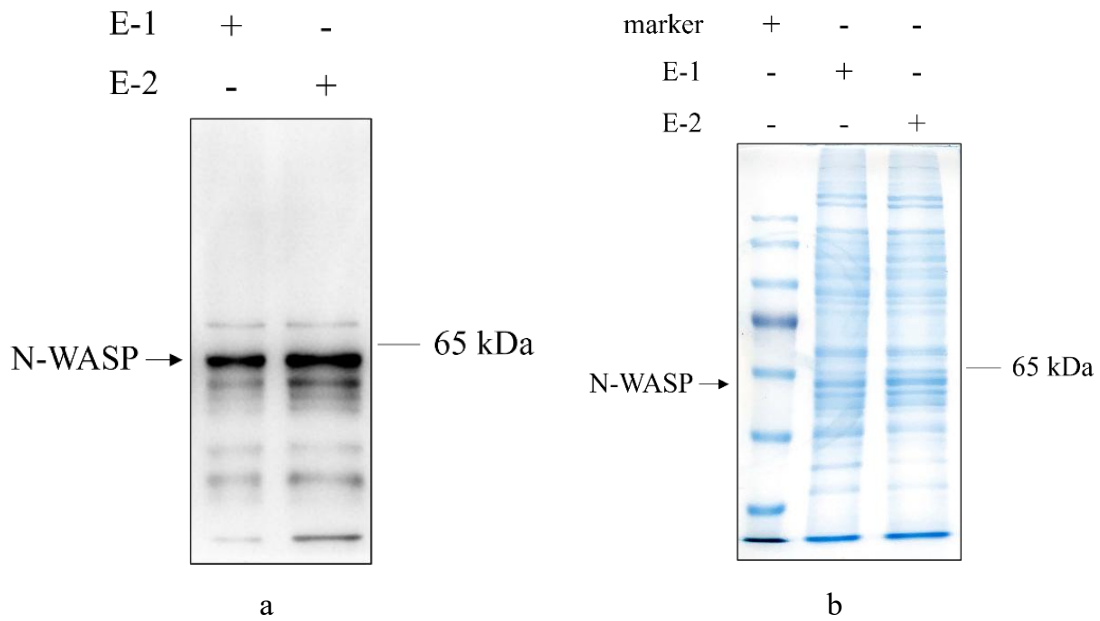


图 3-7 PcnWAS 蛋白表达情况及纯化效果验证

Figure 3-7 Expression of protein PcnWAS and validation of its purification effect

2.7.2 等温量热滴定 (ITC) 结果分析

ITC 试验结果显示, 将目标化合物海藻酸钾和硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸滴定至靶标蛋白 PcnWAS 溶液中后, 反应体立刻系出现了热量变化, 混乱度增加, 具体表现体系为产生放热的趋势, 这样的趋势与苦葛皂苷 A 与 PcnWAS 蛋白结合后的情况相同(图 3-8)。进一步统计了体系中的结合常数和混乱度的变化情况, 结果如表 3-8 所示。结果表明海藻酸钾和硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸与靶标蛋白 PcnWAS 均有一定的结合能力, 其与海藻酸钾、硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸的结合常数分别为 $2.17 \pm 0.51 \times 10^{-4} / \text{M}$ 和 $2.08 \pm 0.94 \times 10^{-4} / \text{M}$ 。

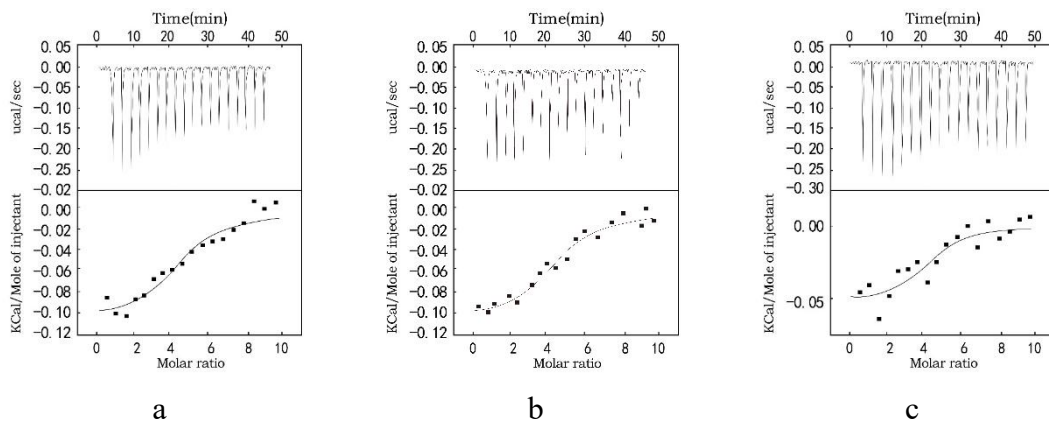


图 3-8 目标化合物滴定 PcnWAS 蛋白量热结果分析

Figure 3-8 ITC results of protein PcnWAS and target compounds

注：a 表示海藻酸钾，b 表示硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸，c 表示苦葛皂苷 A

Note: The treatment of a, b and c are potassium alginate, thionicotinamide-adenine-dinucleotide and pedunsaponin A respectively

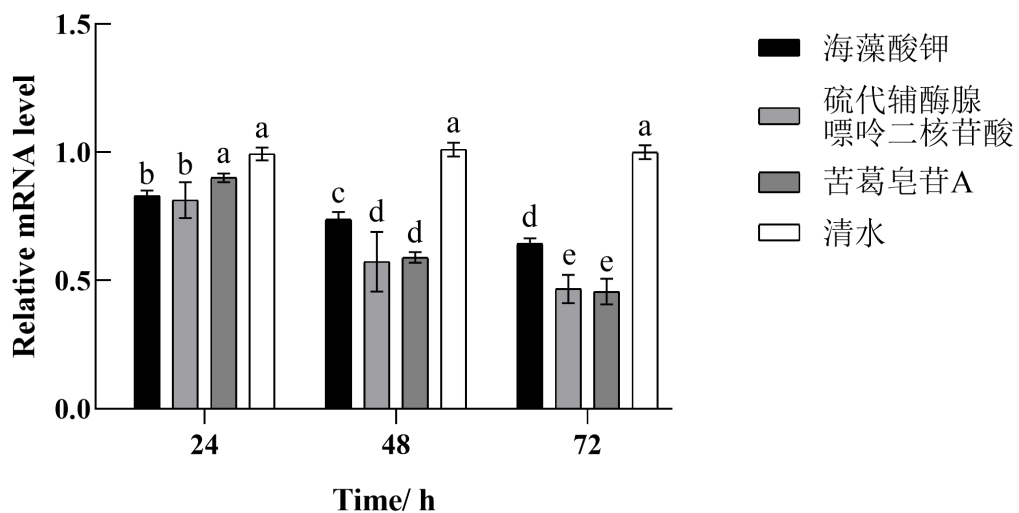
表 3-8 目标化合物滴定 PcnWAS 蛋白结合参数统计

Table 3-8 Combined parametric statistics of target compound titration PcnWAS

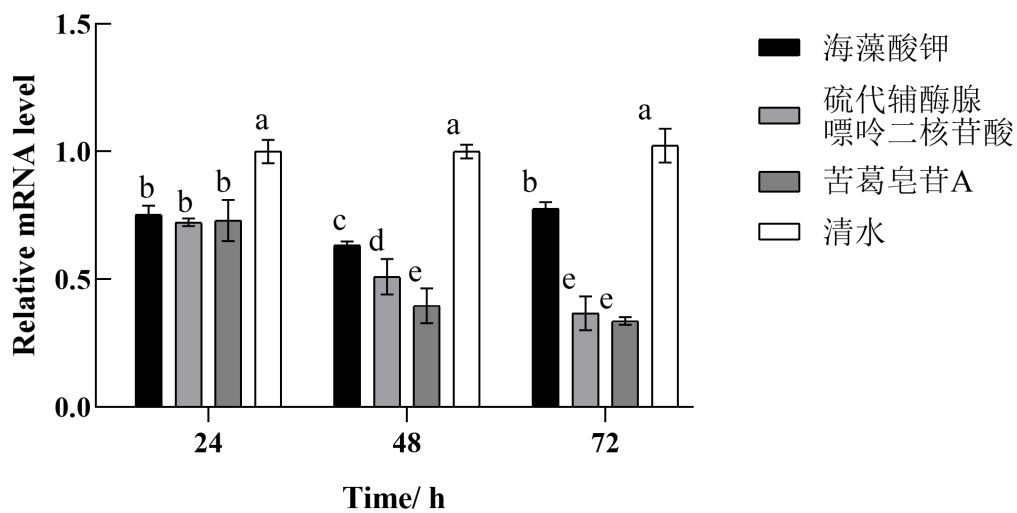
化合物 Compound	结合常数 Kb ($\times 10^{-4}/M$)	混乱度 ΔS (cal/mol/deg)
海藻酸钾 Potassium alginate	2.17 ± 0.51	16.31
硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸 Thionicotinamide-adenine-dinucleotide	2.08 ± 0.94	15.17
苦葛皂苷 A Pedunsaponin A	2.98 ± 1.74	18.62

2.8 目标化合物对靶标蛋白基因表达量的影响

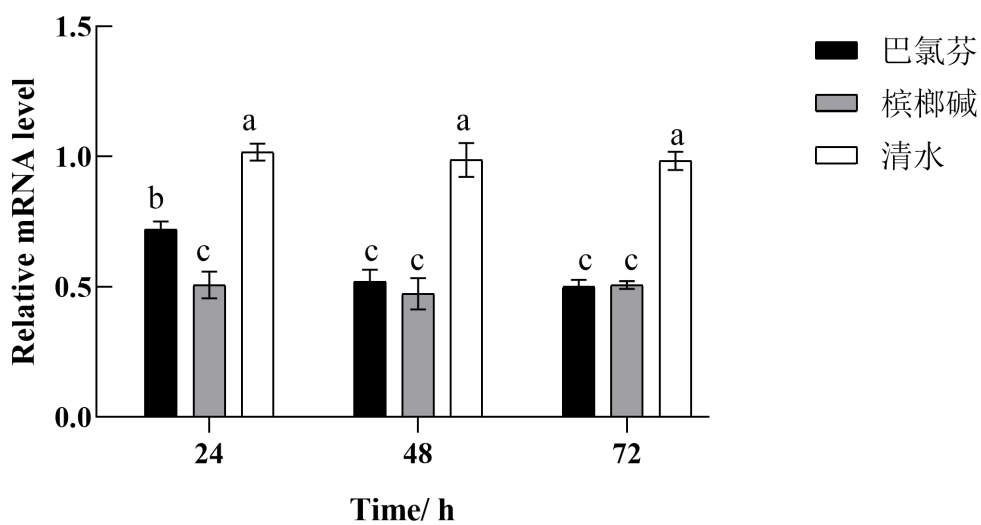
海藻酸钾、巴氯芬和硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸分别处理福寿螺 24、48 和 72 h 后，检测靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 基因表达量情况，结果如图 3-9 所示。qPCR 试验结果表明，海藻酸钾、巴氯芬和硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸可以导致福寿螺靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 的基因表达量下降，这种趋势与苦葛皂苷和巴氯芬处理后该蛋白基因的表的变化趋势相同。然而对于 PcnWAS 蛋白，海藻酸钾处理福寿螺后前 48 h，该蛋白基因表达量显著下降，48 h 后该蛋白的基因表达量开始逐渐恢复至初始状态。



a



b



c

图 3-9 目标化合物处理后不同时间点靶标蛋白相对 mRNA 表达量

Figure 3-9 Relative mRNA level of PcAdv (a), PcnWAS (b) and PcRoo (c) genes at different treatment times after target compounds treated

注：同一张图片中标记的不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Different lowercase letters indicate statistically significant differences at the 0.05 probability level.

3 小结与讨论

本章节试验对虚拟筛选获得的目标化合物的杀螺效果进行了生物活性测试，结果表明虚拟筛选获得的化合物海藻酸钾、巴氯芬和硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸可以导致福寿螺死亡。在这些化合物引发福寿螺产生中毒症状的具体表现包括代谢异常、血蓝蛋白含量降低、鳃部纤毛脱落等。以上结果说明，通过虚拟筛选的方法可以获得新的杀螺化合物。

然而，在对福寿螺的毒杀效果方面，与作为对照的探针化合物苦葛皂苷 A 和槟榔碱相比，通过虚拟筛选获得的化合物对福寿螺的毒杀效果相对较弱，在相同的剂量下，作为理论上能与靶标蛋白结合更为紧密的化合物却不能导致福寿螺大量死亡，分析其原因主要有以下几点，首先，化合物作用有害生物的机制十分复杂，除去本研究中选择的靶标蛋白外，可能存在其它生物靶标，这些靶标共同作用，最终导致福寿螺的死亡；其次，在生物体内，小分子化合物的代谢速度明显高于大分子化合物。作为小分子物质，目标化合物海藻酸钾和巴氯芬在福寿螺体内的代谢速度较快，当福寿螺鳃部接触到目标化合物时，福寿螺开始出现中毒症状，当其进入与鳃部相连的血淋巴系统时，体内的免疫防御反应迅速启动，虽然这些目标化合物均能和靶标蛋白结合，但在相对较短的时间内就可以被代谢掉。根据 qPCR 检测结果，PcnWAS 蛋白的基因表达量在海藻酸钾处理后出现了先降低后升高的现象，印证了这种推测；另外该现象也提示可能出现了药物脱靶效应，这也可能是导致筛选出的化合物海藻酸钾无法大量杀死福寿螺的原因之一。

本研究在利用单个靶标分别进行化合物筛选的过程中，发现于对照化合物苦葛皂苷 A 类似，海藻酸钾和硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸与靶标蛋白 PcAdv 和 PcnWAS 均具有较好的结合能力，这样的结果从侧面证明了这些化合物具有多靶标协同作用以达到杀灭福寿螺的趋势。这样的策略这在医药研发领域被称作“多

靶标药物”，并且已经得到了广泛的应用。比如抗高血压和治疗心肌梗塞的药物奥马曲拉是针对血管紧张素转化酶和中性内肽酶的双重抑制剂，同时这两个酶也是治疗高血压和心肌梗死的药物的常见靶标^[129]；治疗乳腺癌的药物拉帕替尼是 EGFR 和 HER2 激酶抑制剂^[130]；治疗慢性髓细胞白血病的药物伊马替尼是 Abl、酪氨酸激酶和 c-KIT 激酶的抑制剂^[131]。在农业领域，有关多靶标农药也有一定的报道，如大连理工大学 Li 等基于发现的 20 个具有致死表型的关键酶，成功解析了 OfHex1、OfchtII、OfChi-h、OfChtII、BmCDA1、BmCDA8、OfchtIII、OfChtIV 等 8 个晶体结构，并发现了 10 余个基于 OfHex1、OfchtII、OFCHTII 等关键酶的复合物晶体，进一步通过虚拟筛选发现了部分化合物可与上述多个蛋白相互作用，这为多靶标农药的开发和筛选提供了依据^[132]。由此可见，在进一步的研究中，可以参考相关研究，通过算法的优化，从多靶标的角度针对福寿螺靶标蛋白 PcAdv 和 PcnWAS 进行药物筛选。

相关研究表明，药物对不同靶标蛋白的亲合力以及占有量存在一定的比例，只有在理想的比例下才能开发出高效的药物，然而体内水平的疗效和体外水平的受体亲合力比值之间的关系非常复杂，化合物在不同组织分布程度不同以及不同组织蛋白密度不同等因素都将会影响蛋白亲和力的理想比例。例如治疗精神病的药物氯氮平，该药的靶标为多巴胺受体 D4、5-HT2A 受体和多巴胺受体 D2。研究表明，该药物对多巴胺受体 D4 以及 5-HT2A 受体的亲合力比对多巴胺 D2 受体的亲合力更低，且当多巴胺 D2 受体的占有率达到 60-70%时足以产生非典型性的抗精神病效果，然而在 5-HT2A 受体在占有率较高时，如果 D2 受体的占有率过高，非典型性疗效将会丧失^[133-135]。这样的研究结果提示我们，下一步还需进行化合物与靶标蛋白间亲合力比例的调整和研究。另外，在精神疾病药物和抗癌药物领域，药物的脱靶效应也是目前存在的关键问题。例如多个单胺类 GPCR 受体和转运体结合的精神病药物也会与肾上腺素能 GPCR 受体结合从而导致心血管副作用^[136]。尽管存在其他作用因素的影响，但不可否认的是，作为计算机辅助药物设计的起点，虚拟筛选获得的化合物海藻酸钾、巴氯芬和硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸对福寿螺的死亡率和生理状态产生了一定的影响，是潜在的杀螺先导化合物。

目前并未有利用虚拟筛选方法进行杀螺剂筛选的研究,本试验通过虚拟筛选获得了对福寿螺生理代谢有明显影响的先导化合物海藻酸钾、巴氯芬和硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸。以上研究结果进一步证明了福寿螺 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 蛋白可以作为杀螺剂的作用靶标进行农药筛选和开发。化合物的功能是由其结构决定的,接下来应进一步分析各种化合物结构与杀螺活性之间的关系,以期杀螺化合物的精准筛选和设计提供理论支撑。

第四章 基于分子共同特征的杀螺剂药效团模型构建 及 3D-QSAR 研究

构效关系指的是具有生理活性物质的化学结构与其生理活性之间的关系，是药物化学的主要研究内容之一。为了研发更高效的农药，有关农药化学结构与其生物活性间关系的研究一直是农药学的核心问题。

为了获得具有更高活性的杀螺化合物，本章以多种杀螺化合物的结构及其杀螺活性为基础，以苦葛皂苷 A 为模板，从药效团模型以及 3D-QSAR 的角度探究了苦葛皂苷 A 化学结构与杀螺活性间的关系，并以此为基础进行杀螺剂设计，以期能够获得新颖的杀螺化合物结构。

1 材料与方法

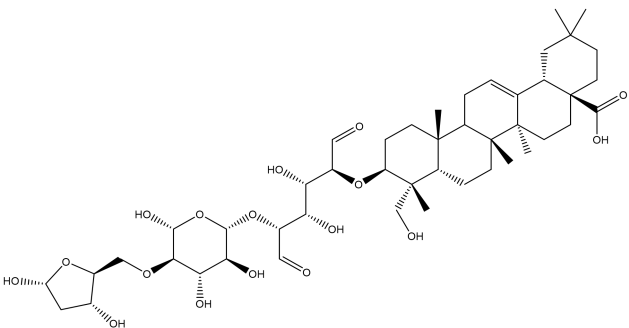
1.1 供试材料

1.1.1 化合物 3D 结构

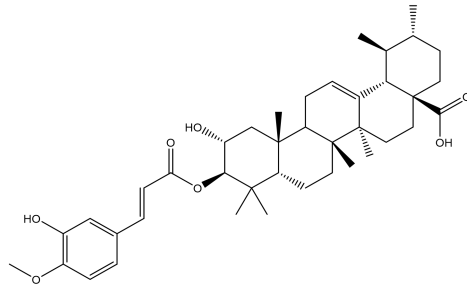
根据试验基础，检索具有杀螺化合物及活性信息，并在 DrugBank 数据库中下载化合物的 3D 结构，本章中构建药效团模型的化合物及其杀螺活性水平均来自文献^[102,104,137-143]，化合物具体的结构式与活性情况如表 4-1 所示。

表 4-1 化合物结构及杀螺活性情况

Table 4-1 Structure and activity of molluscicidal compounds

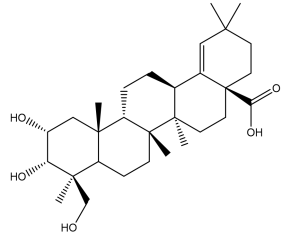
编号 No.	结构式 Structural formula	毒力值 (mg/L) LC ₅₀
1		239.00

2



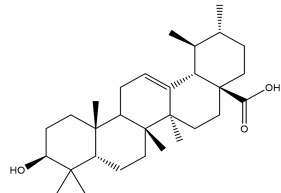
35.5

3



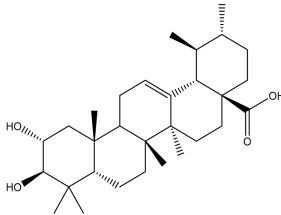
42.6

4



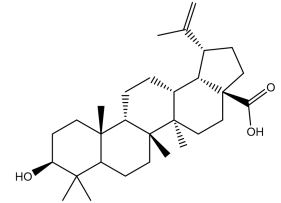
79.6

5



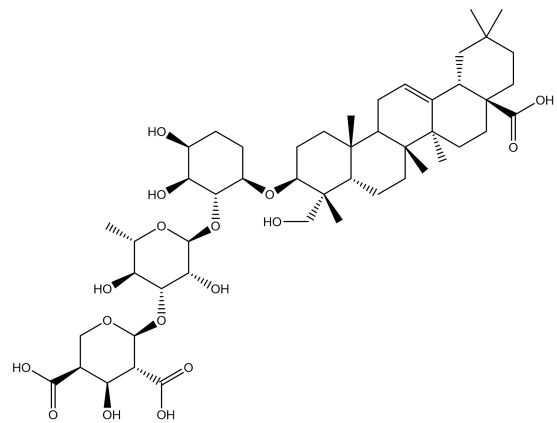
27.3

6



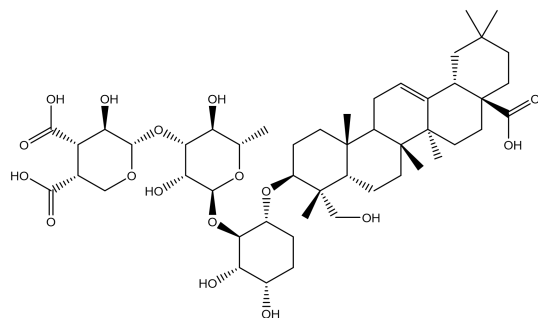
127.4

7



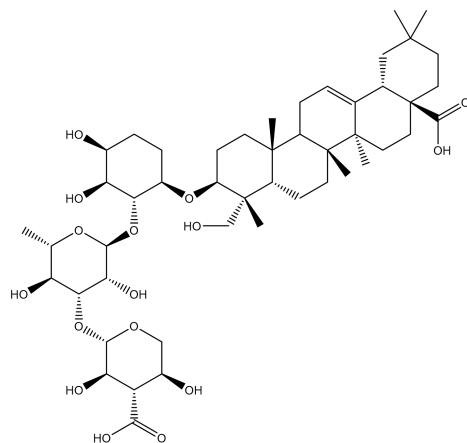
5.56

8



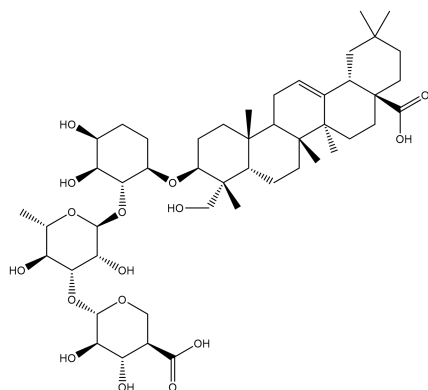
4.97

9



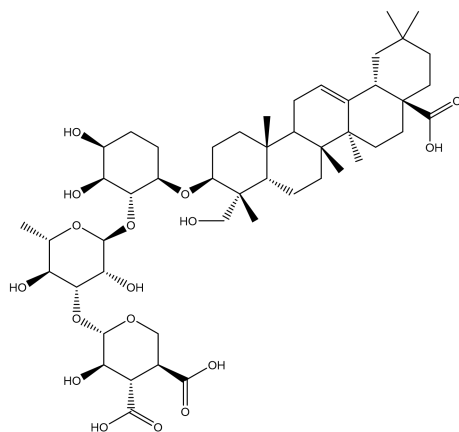
5.48

10



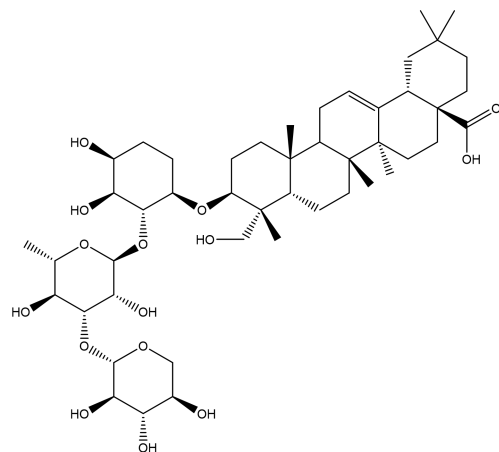
4.91

11



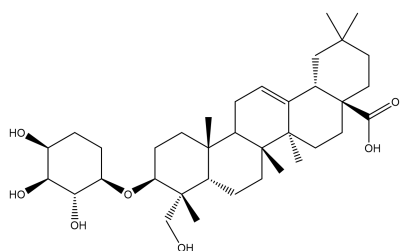
4.97

12



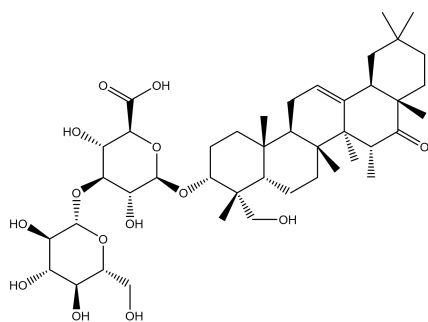
6.02

13



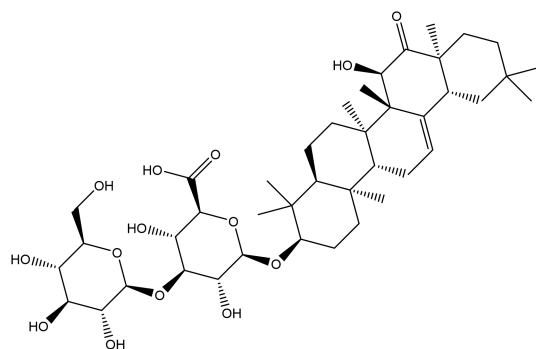
8.14

14



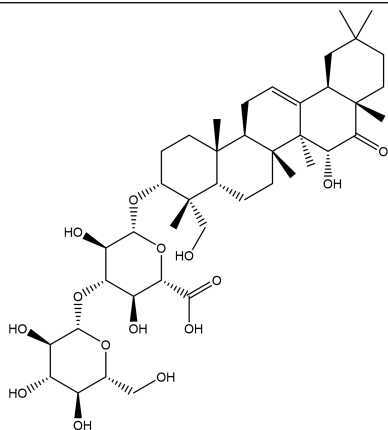
3.89

15



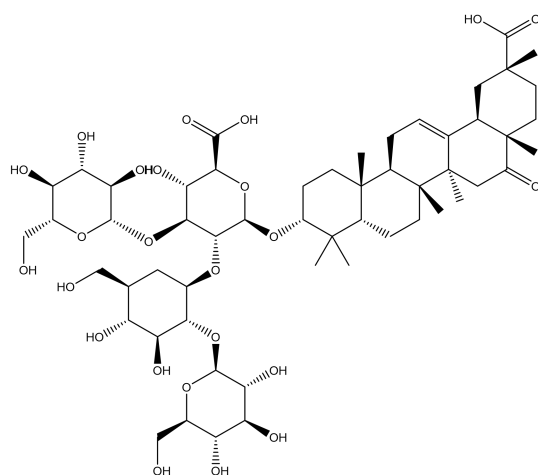
4.25

16



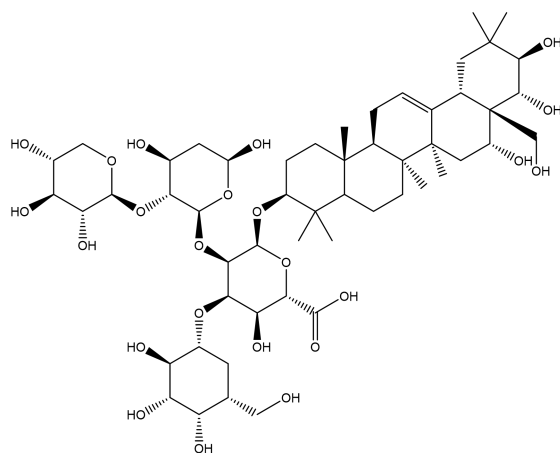
35.16

17



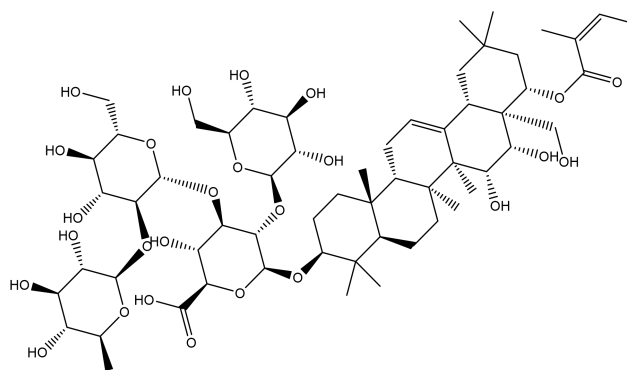
26.25

18



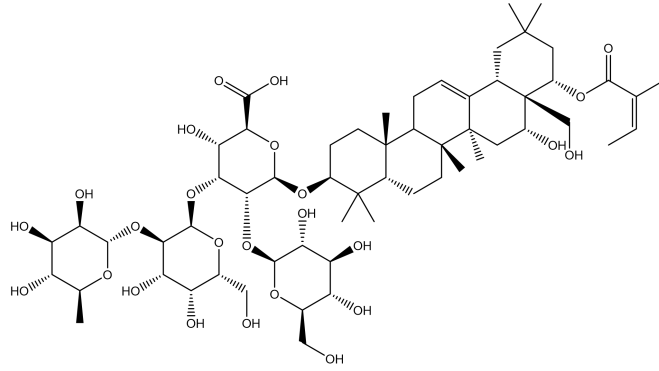
2.31

19



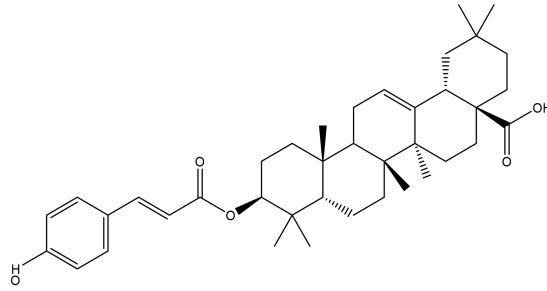
5.81

20



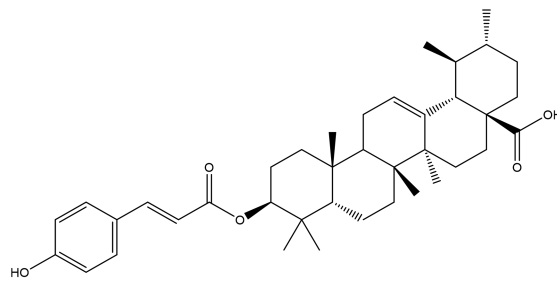
7.42

21



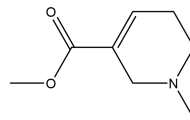
113.35

22



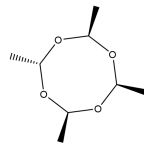
108.72

23



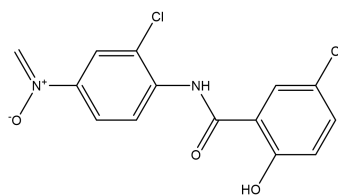
2.12

24



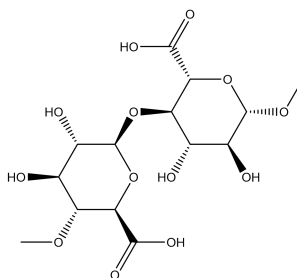
1.26

25

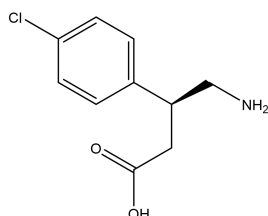


0.45

26



27



16.2437

1.1.2 主要软件

本章所用到的主要软件如表 4-2 所示。

表 4-2 软件列表

Table 4-2 Softwares used in this section

功能	软件名称
Function	Name
药效团模型构建	Discovery Studio
3D-QSAR	SYBYL-X
化合物结构优化	3D Chem
格式修改	OPEN Babel GUI

1.2 试验方法

1.2.1 基于分子共同特征的杀螺剂药效团模型构建

1.2.1.1 训练集分子准备

首先在 Discovery Studio 软件中对小分子的 Principal 和 MaxOmitFeat 属性进行定义。打开 Add Attributes 对话框，添加这两个属性，以 0, 1 和 2 三个数值对每个小分子的不同属性进行定义。各属性设定值对应的意义如表 4-3 和表 4-4 所示。

表 4-3 Principal 属性定义分子的活性水平标准及描述

Table 4-3 Standard and descriptions for defining the activity level of molecules using

Principal attribute			
数值	活性水平	设定标准	描述内容
Value	Level	Standard	Description
2	有活性	$LC_{50} < 20\text{mg/L}$	参考分子，分子中所有化学特征在构建药效团模型时都需要考虑
1	中等活性	$20\text{mg/L} \leq LC_{50} \leq 150\text{mg/L}$	定位药效团特征元素时需要考虑该化合物的空间构象
0	非活性	$LC_{50} > 150\text{mg/L}$	该分子在定位药效团特征元素时不考虑，用于选择性地定义排除体积

表 4-4 MaxOmitFeat 属性定义及描述

Table 4-4 Standard and descriptions for attribute MaxOmitFeat

数值	描述内容
Value	Description
0	构建的药效团模型中所有特征元素都必须与化合物匹配上
1	构建的药效团模型中允许有 1 个特征元素不与化合物匹配
2	构建的药效团模型中所有特征元素都无需与化合物匹配

1.2.1.2 药效团特征元素的选取

在窗口中显示所有化合物的结构，在 Pharmacophore 模块中编辑药效团特征，并生成特征图谱。在特征选择的过程中，需要根据实际情况选择合适的特征元素，本研究选择的特征元素为氢键受体 HB ACCEPTOR、氢键供体 HB DONOR、疏水键 HYDROPHOBIC、负电离子中心 NEG IONIZABLE、正电离子中心 POS IONIZABLE 和芳香环中心 RING AROMATIC。

1.2.1.3 基于分子共同特征的药效团模型构建

采用 HypoGen 算法，在 Pharmacophore 模块中构建 Common Feature

Pharmacophore, 输入全部的化合物结构, 将 Conformation Generation 设置为 BEST, 构象上限数 Maximum Conformation 设置为 200, 能量阈值 Energy Threshold 设置为 10, 其它参数选择默认。设置成功后运行程序。

1.2.2 基于具有公共骨架化合物的 3D-QSAR 及分子设计研究

1.2.2.1 数据库的建立

本试验需要分别建立训练集和测试集两个数据库, 其中训练集包括化合物 1 号、2 号、3 号、4 号、5 号、7 号、9 号、10 号、11 号、12 号、13 号、14 号、15 号、18 号、19 号、20 号、21 号和 22 号, 测试集包括化合物 16 号和 17 号。化合物及其编号参照表 4-1 所示, 建立数据库的具体操作方法如下。

首先打开 SYBYL-X 软件, 新建一个数据库。完成数据库的建立后, 开始向里添加化合物。鼠标点击 File 菜单下的 Import File 选项, 在弹出的对话框中选择存放化合物的文件路径, 选中 mol2 格式的化合物文件, 在 Files of Type 一栏中选择 Molecule, 点击 OK 即可将该文件在 SYBYL-X 中打开。

修改完化合物的名称后, 需要对分子结构做进一步的优化。点击菜单栏里的 Compute, 在下拉菜单中选择 Minimize Molecule。在弹出的对话框中点击 Minimize Details 和 Modify 即可根据实际需要设定优化方法 (Minimization method)、收敛条件 (Termination option)、最大循环次数 (Maximum iterations) 以及电荷 (Charge) 等参数。本研究中的具体操作为, 选择 Gasteiger-Hückel 方法计算分子电荷, 在 Tripos 力场下使用 Powell 方法进行优化。最大循环次数为 1000, 能量收敛条件为最低能量变化小于 0.05 kcal/mol, 其余参数缺省。修改完参数后点击 OK, 进行能量优化, 最后需要逐一将化合物添加到数据库中。

1.2.2.2 分子叠合

打开 SYBYL-X 软件, 点击菜单栏中的 File, 在 Database 一栏中选择 Align Database。在弹出的对话框中 Database to Align 一栏中选择用于叠合的化合物文件。在 Common Substructure 栏中选择用于叠合的公共骨架, 本研究选择自动进行公共骨架检索。

在 Grid Orientation 项选择 Inertial, Put Info 项选择 New Database, 接着在 Align 项选择 All Molecules, 然后点击 Apply 开始进行分子叠合。程序结束后点

击菜单栏中的 View，在下拉菜单中选择 Transformation，点击 Freeze All，进行结果查看与导出。

1.2.2.3 电子表格的生成

点击菜单栏中的 File，在下拉菜单中点击 Import File。在弹出的对话框中找到数据库文件所在路径，选择用于生成电子表格的数据库文件，并在 Files of Type 下拉选项中选择 Database。点击 OK 即可生成电子表格。

在空表头处，点击鼠标右键，在弹出的菜单中点击 Add Empty Column；在弹出的对话框中输入数据的名称，数据类型选择 Number，点击 OK，之后将生物活性数据复制粘贴至相应位置。

1.2.2.4 格点的添加

在空白表头处点击鼠标右键，在菜单中选择 Add a Computed Column。如果建立 CoMFA 模型，则在弹出的对话框中选择 COMFA，点击 OK；如果建立 CoMSIA 模型，则选择 COMSIA。

建立 CoMFA 模型时首先需要在弹出的对话框中将立体场和静电场的阈值均设为 30.0 kcal/mol，其他参数均为缺省值。点击 Add Column，计算并添加格点。

建立 CoMSIA 模型时首先需要在弹出的对话框中选择分子场类型，本研究中选择了氢键供体场、氢键受体场、立体场、静电场和疏水场。衰减因子设为 0.3。点击 Add Column 开始添加格点。

1.2.2.5 PLS 分析

选中生物活性数据列 (pLC_{50}) 和 CoMFA 列；在电子表格中的菜单栏选择 QSAR，并在下拉菜单中点击 Partial Least Squares。

在弹出的对话框中，设置 Components 值为 6；关闭 Use SAMPLES；在 Validation 栏中勾选 Leave-One-Out；勾选 Column Filtering，并设为 2.0；在 Scaling 项中选择 CoMFA Standard，设置完成后，点击 Do PLS，开始进行交叉验证。验证结果将存为以 Analysis Name 命名的 pls 格式文件。

对 CoMSIA 模型进行 PLS 分析时，操作类似。在点击 QSAR 前，选中生物活性值 (pLC_{50}) 与全部 5 种分子场数值即可。

1.2.2.6 等势图的生成

点击菜单栏中的 QSAR，在下拉菜单中选择 View QSAR，点击 CoMFA 即弹出 CoMFA 等势图参数设置对话框；点击 CoMSIA 则弹出 CoMSIA 的对话框。在对话框的 TYPE OF FIELD TO DISPLAY 栏中勾选 PLS Analysis，选择常规回归分析 (StDev*Coeff)。接着在 CONTOUR SPECIFICATIONS 栏中，选择 Contour by: Contribution, Display as: Solid。

每种分子场在没有特殊要求的情况下，Favored 截断值均设为 80.0，Disfavored 截断值均设为 20.0。

1.2.2.7 生物活性值的预测

选中电子表格的空列，点击鼠标右键，在下拉菜单中选择 Add A Computed Column，在弹出的对话框中选择 Predict，点击 OK；选择用于预测的电子表格，点击 OK。程序运行结束后选择用于计算预测值的模型，点击 OK，系统将会自动计算并将预测结果填入表格中，并创建等值线图。

1.2.2.8 杀螺化合物的设计及活性预测

根据 1.2.2.7 中创建的等值线图，从疏水场、氢键供体场、氢键受体场、立体场和静电场的角度，对模板化合物苦葛皂苷 A 的侧链基团进行改造，获得新的杀螺化合物的分子结构。并根据该方法对新设计出的化合物的生物活性进行预测。

1.2.2.9 杀螺化合物与靶标蛋白结合能计算

采用柔性分子对接法，计算设计出的杀螺化合物与靶标蛋白的结合能，具体方法同第二章 1.2.5。

2 结果与分析

2.1 基于分子共同特征的药效团模型构建

在 Discovery Studio 中打开叠合的化合物文件，对全部化合物进行药效团特征元素检索，结果如图 5-1 (a) 所示。结果表明，这些化合物中含有 3 种关键的药效团特征元素，包括疏水作用基团、氢键受体基团和氢键供体基团。

采用 HypoGen 算法对获得的药效团特征元素进行简化，并计算药效团特征元素间的距离，结果如图 4-1 (b) 所示。结果显示，药效团模型包含 4 个化学特征，即 2 个疏水作用基团和 2 个氢键受体基团，这些特征元素对于化合物具有杀

螺活性而言最为重要。化合物的药效团特征与活性具有一定的几何约束关系，疏水作用基团与两个氢键供体基团和两个氢键受体的间的距离比例为 13.624: 10.516: 5.895。

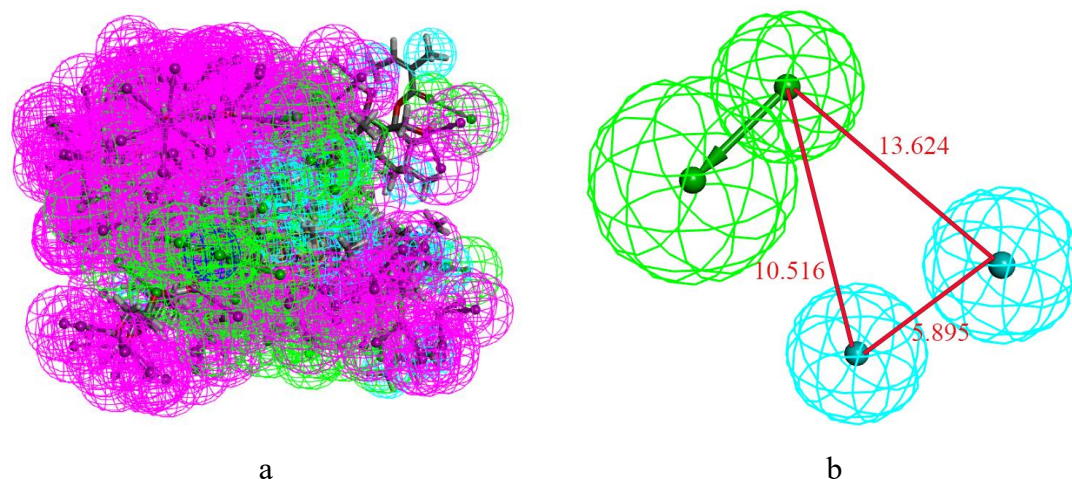


图 4-1 化合物药效团特征元素分析及构建的药效团模型

Figure 4-1 Analysis of characteristic elements of compound pharmacophores and construction of pharmacophore models

注：绿色部分表示疏水作用基团，蓝色部分表示氢键受体基团，紫色部分表示氢键供体基团

Note: Hydrogen bond receptor features shows in green region, hydrophobic structure features shows in blue region and hydrogen bonding donor group shows in violet reigon

2.2 基于具有公共骨架化合物的 3D-QSAR 研究

2.2.1 分子叠合

在构建 3D-QSAR 模型时，选用苦葛皂苷 A（14 号化合物）作为模板分子，将全部分子的共有骨架作为固定的结构，进行分子叠合，使它们的立体场差别最小。但分子 6 和 8 无法完成叠合，因此在后续模型构建中只用到了 20 个化合物分子。20 个化合物的分子叠合情况如 4-2 所示。

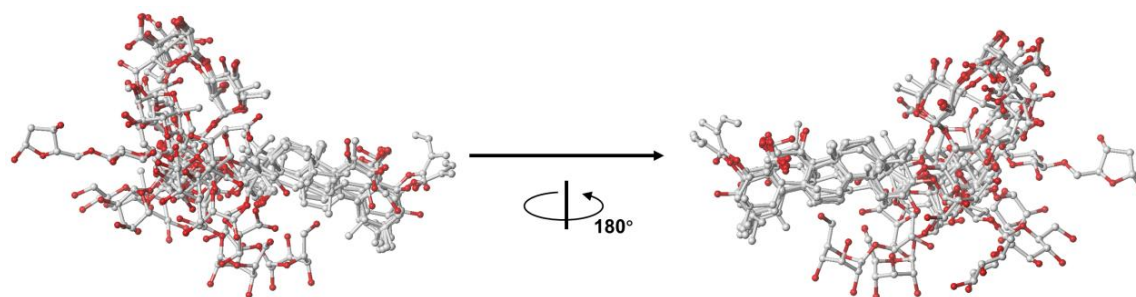


图 4-2 化合物分子叠合结果

Figure 4-2 Results of compound stacking

2.2.2 CoMFA 和 CoMISA 模型的建立

CoMFA 和 CoMSIA 模型的各项统计学参数如表 4-5 所示。就 CoMFA 模型而言，交叉验证相关系数和非交叉验证相关系数分别是 0.898 和 0.932，F 检验值相对较低，仅为 64.977，尚在可靠范围内。上述参数均表明，CoMFA 模型具有较好的预测能力。对测试集中分子进行活性预测，相关系数为 0.946。CoMFA 立体场贡献率为 45.7%，静电场为 54.3%，可见该类化合物周围的立体场和静电场对苦葛皂苷及其类似物发挥杀螺活性有重要的影响。而 CoMSIA 模型的交叉验证相关系数和非交叉验证相关系数分别是 0.924 和 0.987，标准误差较小，仅为 0.051，说明该模型具有良好的预测能力。

表 4-5 CoMFA 和 CoMSIA 模型的统计参数

Table 4-5 Statistical parameters of models CoMFA and CoMSIA

模型参数 Parameters	模型 Model	
	CoMFA	CoMSIA
最佳主成分	6	6
留一法交叉验证相关系数	0.898	0.924
标准误差	0.042	0.051
非交叉验证相关系数	0.932	0.987
F 检验值	64.977	143.157
非交叉验证相关系数的概率	0.000	0.000

	测试集的预测相关系数	0.946	0.951
	立体场	0.457	0.245
	静电场	0.543	0.219
分子场贡献度	疏水场	—	0.123
	氢键供体场	—	0.245
	氢键受体场	—	0.168

2.2.3 CoMFA 和 CoMSIA 模型的线性关系

对基于 CoMFA 和 CoMSIA 模型预测得到的 pLC_{50} 与通过实验测定的活性值进行了相关性分析, 结果如图 4-3 所示, 二者相关性系数分别为 0.946 和 0.946。优良的线性相关性 (r^2 均大于 0.9) 再次证明了苦葛皂苷 A 及其类似物在结构和杀螺活性方面具有明显的线性相关性, 且这两种模型均具有良好的预测能力, 可以为后续试验提供理论支撑。

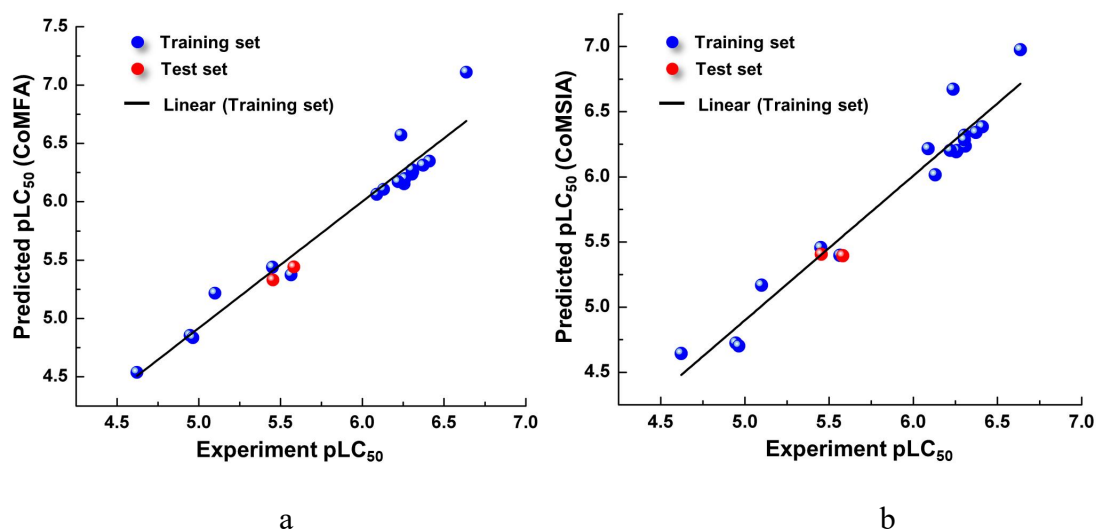


图 4-3 CoMFA (a) 和 CoMSIA (b) 模型预测 pLC_{50} 值与实验值的相关性

Figure 4-3 Correlation between predicted values and actual values of CoMFA (a) and CoMSIA(b)

2.2.4 CoMFA 和 CoMSIA 模型的活性预测值

表 4-6 列出了对训练集和测试集化合物分子活性的 CoMFA 和 CoMSIA 模型预测值。预测值 (Pred.) 和实验值 (pLC_{50}) 间的绝对偏差 (Res.) 均小于 1 mg/L, 且个别结果与实验值 (如 2、11、20) 基本一致。较准确的预测结果再次表明,

所建立的 CoMFA 和 CoMSIA 模型具有良好的稳定性和预测能力,可以用于评价该类化合物分子的活性。虽然 CoMFA 模型的总体预测能力略低于 CoMSIA 模型,但其预测相关系数绝对值仍然较大。两种模型相互参考,互为补充,可以为苦葛皂苷 A 进一步结构优化提供指导。

表 4-6 CoMFA 和 CoMSIA 模型的活性预测结果

Table 4-6 Activity prediction results of CoMFA and CoMSIA

编号	LC ₅₀ (mg/L)	pLC ₅₀	CoMFA			CoMSIA				
			Pred.	Dev.	Dev. ratio	Pred.	Dev.	Dev. ratio		
训练集	1	239.00	4.622	4.538	-0.084	-1.82 %	4.645	0.023	0.49 %	
	2	35.5	5.450	5.439	-0.011	-0.24 %	5.457	0.007	0.15 %	
	4	79.6	5.099	5.217	0.118	2.31 %	5.168	0.069	1.35 %	
	5	27.3	5.564	5.373	-0.191	-3.43 %	5.398	-0.166	-2.98 %	
	7	5.56	6.255	6.153	-0.102	-1.63 %	6.193	-0.062	-0.99 %	
	8	4.97	6.304	6.237	-0.067	-1.06 %	6.319	0.015	0.24 %	
	9	5.48	6.261	6.199	-0.062	-0.99 %	6.203	-0.058	-0.93 %	
	10	4.91	6.309	6.255	-0.054	-0.86 %	6.236	-0.073	-1.16 %	
	11	4.97	6.304	6.275	-0.029	-0.46 %	6.284	-0.020	-0.32 %	
	12	6.02	6.220	6.172	-0.048	0.77 %	6.203	0.127	2.04 %	
	13	8.14	6.089	6.064	-0.025	-0.41 %	6.216	0.127	2.08 %	
	14	3.89	6.410	6.348	-0.062	-0.97 %	6.384	-0.026	-0.41 %	
	15	4.25	6.372	6.314	-0.058	-0.91 %	6.341	-0.031	-0.49 %	
	18	2.31	6.636	7.110	0.474	7.14 %	6.976	0.340	5.12 %	
	19	5.81	6.236	6.573	0.337	5.40 %	6.673	0.437	7.01 %	
	20	7.42	6.130	6.106	-0.024	-0.39 %	6.015	-0.115	-1.88 %	
	21	113.35	4.946	4.855	-0.091	-1.84 %	4.725	-0.221	-4.468 %	
	22	108.72	4.964	4.835	-0.129	-2.60 %	4.703	-0.261	-5.26 %	
	测试集	16	35.16	5.454	5.329	-0.125	-2.29 %	5.406	-0.048	-0.88 %
		17	26.25	5.581	5.442	-0.139	-2.49 %	5.394	-0.187	-3.35 %

2.2.5 3D-QSAR 模型等值线图分析

2.2.5.1 CoMFA 等值线图的分析

图 4-4 所示为化合物 14，即苦葛皂苷 A 的 CoMFA 模型的等值线图，等势线截断比为 80% : 20%，a 和 b 分别代表立体场和静电场。图 4-4a 中，黄色色块代表使此处基团的体积增大，会降低分子的活性；绿色代表分子活性会随着此处基团体积地增大而增大。如图 4-4b 所示，在红色色块处添加带负电的基团，会使分子的活性增大；在蓝色的色块处添加带正电的基团，也可以增大分子活性。立体场的贡献值为 45.7%，静电场的贡献值为 54.3%，各场贡献比重相差不大，设计分子时，同时考虑这两个场的活性位点影响。

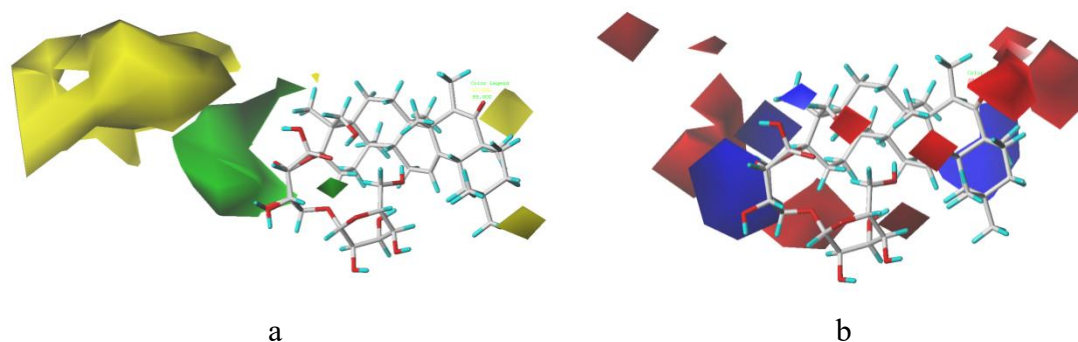


图 4-4 苦葛皂苷 A 的 CoMFA 等值线图

Figure 4-4 CoMFA contour map of pedunsaponin A

注：a 表示立体场，b 表示静电场

Note: Figure a and b represent steric and electrostatic field respectively

2.2.5.2 CoMSIA 等值线图的分析

图 4-5 为化合物 14，即苦葛皂苷 A 的 CoMSIA 模型的等值线图，等势线截断比为 80% : 20%。图 4-5a 中，黄色色块代表使此处基团的体积增大，会降低分子的活性；绿色代表分子活性会随着此处基团体积地增大而增大。如图 4-5b 所示，在红色色块处添加带负电的基团，会使分子的活性增大；在蓝色的色块处添加带正电的基团，也可以增大分子活性。图 4-5c 的疏水场中，黄色色块表示在该处引入疏水性基团有利于分子活性的增强；相反，灰色色块表明在该处继续引入疏水性基团的不利于分子活性的提高。图 4-5d 的氢键供体场中，紫色色块代表增加氢键供体有利于活性的提高。而在图 4-5e 的氢键受体场中，红色区域表

示憎氢键受体区，与氢键供体场分析一致；而紫色色标表示嗜氢键受体区，表明在此处引入含氢键受体原子的基团可适当提高活性。

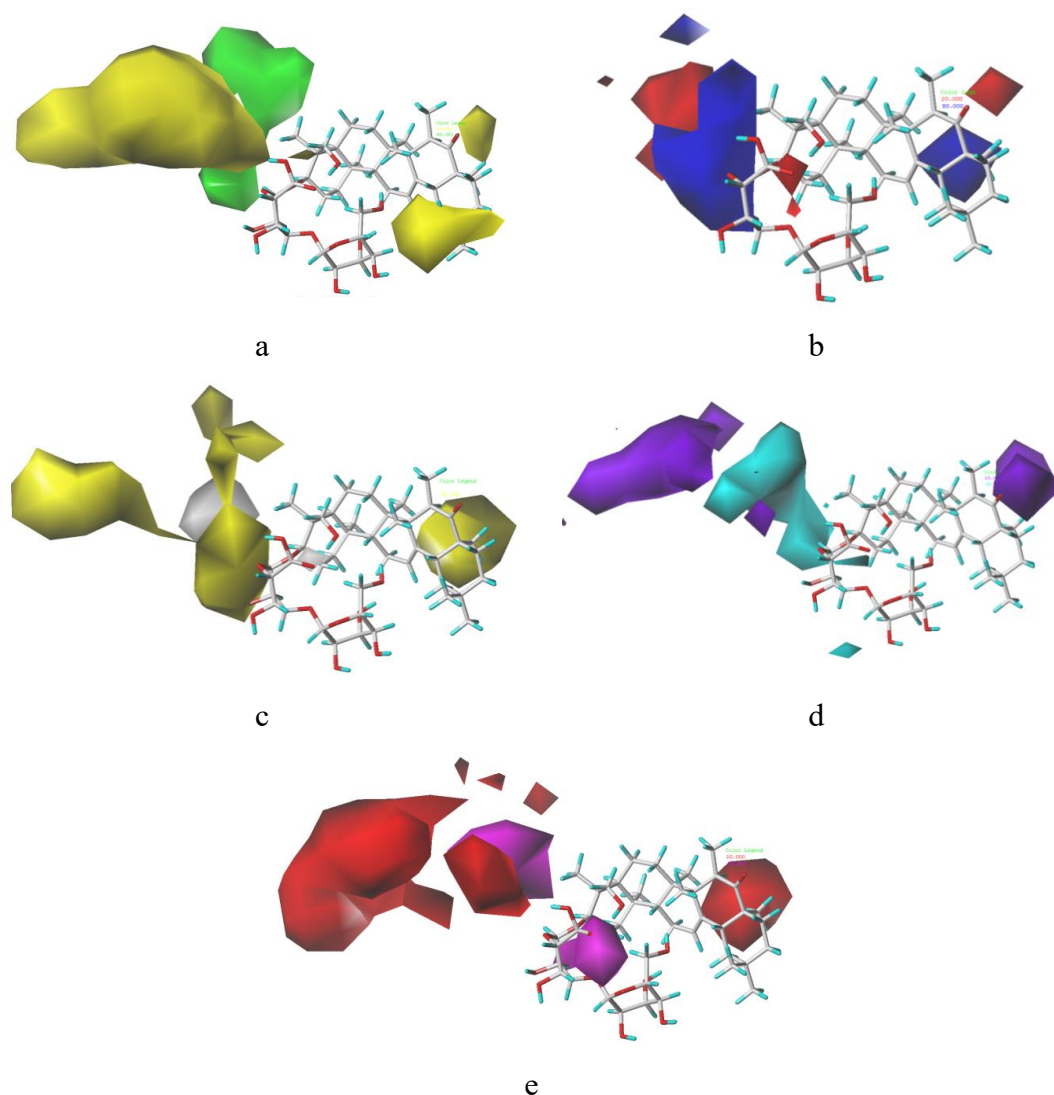


图 4-5 苦葛皂苷 A 的 CoMSIA 等值线图

Figure 4-5 CoMSIA contour map of pedunsaponin A

注：a 表示立体场，b 表示静电场，c 表示疏水场，d 表示氢键供体场，e 表示氢键受体场

Note: Figure a-e represent steric, electrostatic, hydrophobic, donor field and acceptor field respectively

2.3 杀螺化合物的设计及活性预测

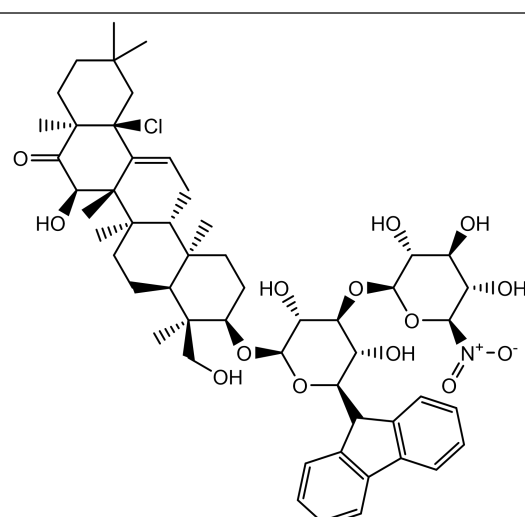
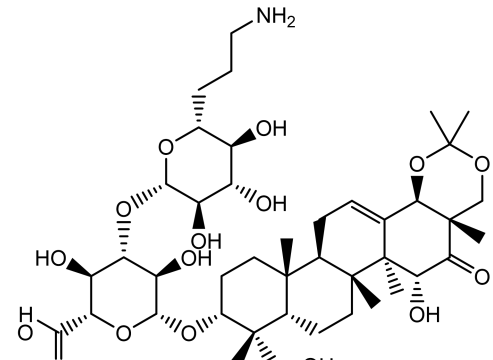
以药效团模型和 3D-QSAR 的研究结果作为设计思路，将苦葛皂苷 A 作为模板定向设计杀螺化合物，通过引入电性合适的基团、合适的空间结构，最终获得

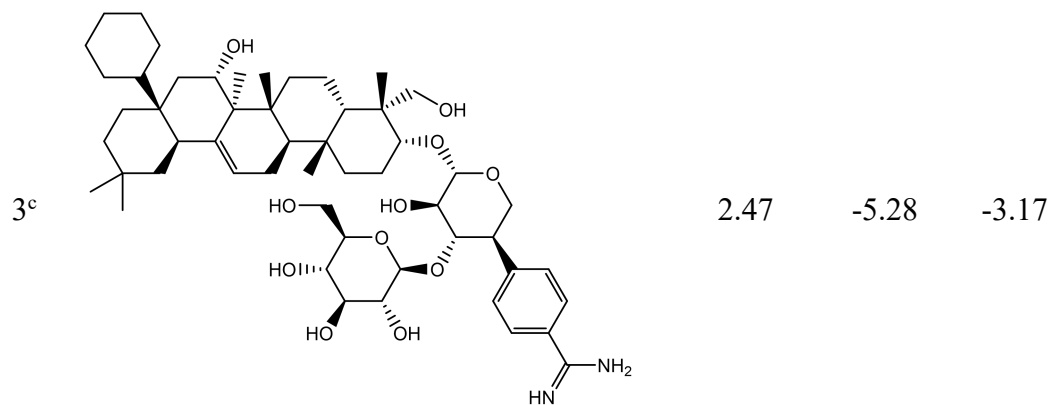
了以下 3 种在理论上具有更高杀螺活性的化合物。进一步利用本章 2.2.3 中建立的 CoMSIA 线性回归模型对设计出的化合物进行活性预测，各化合物的结构式及预测活性如表 4-7 所示。

进一步研究了这些化合物与靶标蛋白 PcAdv 和 PcnWAS 的结合能力，计算其与靶标蛋白的结合能，结果如表 4-7 所示。结果显示与靶标蛋白对接后，整个体系的结合能均出现了下降的趋势，这表明，新设计出的 3 个化合物与靶标蛋白 PcAdv 和 PcnWAS 均有较好的结合能力，具有开发为杀螺活性化合物的潜质。

表 4-7 潜在的高活性杀螺化合物及其预测活性

Table 4-7 Potential molluscicidal compounds and their predictive activities

化合物 Compound	预测活性 (mg/L) Predictive activity	结合能 (kcal/mol) Binding energy	
		PcAdv	PcnWAS
			3.16
	2.91	-6.19	-2.94



^a (6*R*,6*aS*,6*bR*,9*R*,12*aR*)-10-(((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-(9*H*- 芴 9- 基)-3,5- 二 羟 基 -4-(((2*R*,3*R*,5*S*,6*S*)-3,4,5-三羟基-6-硝基四氢-2*H*-吡喃-2-基)氧) 四氢-2*H*-吡喃-2-基) 氧)-14*b*- 氯 -6- 羟 基 -9-(羟 甲 基)-2,2,4*a*,6*a*,6*b*,9,12*a*- 七 甲 基 -2,3,4,4*a*,6,6*a*,6*b*,7,8,8*a*,9,10,11,12,12*a*,12*b*,13,14*b*-十八氢苈-5(1*H*)

^b (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-4-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-6-(3-氨基丙基)-3,4,5-三羟基四氢-2*H*-吡喃-2-基)氧)-3,5-二羟基-6-(((4*aS*,6*R*,6*aS*,6*bR*,8*aS*,9*R*, 10*R*,12*aR*,12*bR*,14*bR*)-6-羟基-9-(羟甲基)-2,2,4*a*,6*a*,6*b*,9,12*a*- 七 甲 基 -5- 羰 基 -4*a*,5,6,6*a*,6*b*,7,8,8*a*,9,10,11,12,12*a*, 12*b*,13,14*b*-十六氢-4*H*-噻吩[1,2-*d*][1,3] 二噁英-10-基)氧) 四氢-2*H*-吡喃-2-羧酸

^c 4-((3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-6-(((4*R*,6*aR*,6*bS*,7*S*,14*bR*)-8*a*- 环 己 基 -7- 羟 基 -4-(羟 甲 基)-4,6*a*,6*b*,11,11,14*b*-六甲基-1,2,3,4,4*a*,5,6,6*a*,6*b*,7,8,8*a*,9,10,11,12,12*a*,14,14*a*,14*b*-二十氢吡喃-3-基)氧)-5-羟基-4-(((2*R*,3*R*,5*S*,6*R*)-3,4,5-三羟基-6-(羟甲基) 四氢-2*H*-吡喃-2-基)氧) 四氢-2*H*-吡喃-3-基)苯并咪唑

3 小结与讨论

本研究首先采用 Discovery Studio 中的 HypoGen 算法建立了杀螺化合物的药效团模型，使用 18 个结构多样性的训练集化合物，最终获得了具有参考意义的药效团模型。药效团最直接的用途是用来判断一个分子是否具有某一类的药效特征。近年来，利用药效团模型进行筛选或改造化合物的研究逐年增多，这种方法已经成为发现先导化合物的重要手段之一，如 Shawky 等^[144]利用 17 个已知活性的小分子化合物建立的药效团对 SPECS 数据库进行了虚拟筛选，最终获得了 1 个对癌细胞 MCF-7、A2780 和 HT29 具有抑制作用的化合物；Tian 等^[145]通过构建药效团对模板化合物进行改造，获得了 1 个 COVID-19 病毒 PLpro 受体抑制剂。

这些研究表明,通过构建药效团模型,并以此为基础进行药物合理设计是可以获得新的目标化合物的,而且利用这种方式具有高效、准确的特点,接下来应当利用该模型进行分子设计,以期能够获得其它具有杀螺活性的化合物。

从药物化学的角度来看,活性分子中的微小化学变化就可使其活性发生巨大的改变,不论是基本骨架、立体构型、活性基团抑或是侧链长短均能够与药理作用之间产生特定的关系,这种情况就为先导化合物的优化工作奠定了基础。显然,这种明显不一致的原因必须包括基础构效关系的根本差异。本试验通过构建苦葛皂苷 A 及其类似物 3D-QSAR 模型,系统性地分析了五环三萜类及皂苷类化合物结构与杀螺活性之间的关系,研究结果显示从立体场、静电场、疏水场、氢键供体场、氢键受体场的角度均可以对苦葛皂苷 A 进行相关结构的优化,从而提高杀螺活性。

进一步,从化合物设计的角度入手,结合本研究建立的药效团模型和 3D-QSAR 模型进行了分子设计,最终获得了 3 个潜在的高活性五环三萜类和皂苷类杀螺化合物结构。五环三萜类化合物作为中药中一类重要的化学成分目前在医学领域已经得到了一定的关注和研究,特别是其在抗肿瘤方面的效果^[146]。在杀螺剂的研发方面,目前已有该类化合物茶皂素(商品名为螺威),被登记批准应用于有害螺类的防治,用 4%的螺威可湿性粉剂后 3 天,田间防效可达 83%^[147]。苦葛皂苷 A 作为五环三萜类化合物,与螺威具有相同的分子骨架结构,且同样对福寿螺表现出了明显的毒杀作用,而苦葛皂苷 D、苦葛皂苷 E 等化合物与苦葛皂苷 A 仅在侧链基团方面表现出了差异,但在杀螺活性方面却并未表现出较高的活性,以上结果说明苦葛皂苷 A 及其类似物在结构与杀螺活性方面存在关联^[137,138]。因此,在下一步的研究中,我们对这 3 个化合物的合成路线进行研究,以期能获得新的高活性杀螺化合物。

第五章 总结

1 结论

本文以福寿螺靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 为基础，多角度系统性地开展了基于靶标蛋白的杀螺剂设计研究，得到的主要结论如下：

以靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 为受体进行基于刚性分子对接的虚拟筛选后继续进行柔性分子对接筛选可以作为虚拟筛选获得杀螺先导化合物的方法。

化合物海藻酸钾、巴氯芬和硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸是潜在的杀螺先导化合物，对福寿螺的死亡率和生理代谢方面均能够产生影响，具体表现为耗氧率、排氮率降低，氧氮比失衡；血蓝蛋白含量降低；鳃部结构被破坏，纤毛脱落；靶标蛋白基因表达量降低。

巴氯芬、硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸、苦葛皂苷 A、槟榔碱等杀螺化合物在结构与杀螺活性之间存在一定的相关性，从化学特征元素的角度而言，疏水作用基团和氢键受体基团对于化合物具有杀螺活性而言最为重要，且化合物的药效团特征与活性具有一定的几何约束关系。

苦葛皂苷 A 等五环三萜类化合物在结构与杀螺活性方面存在线性相关性，从立体场、静电场、疏水场、氢键供体场和氢键受体场的角度对分子进行修饰获得了 3 个潜在的杀螺化合物结构。

2 创新点

目前没有以福寿螺鳃和血细胞的蛋白作为靶标的杀螺剂的相关研究或报道，本研究利用鳃部靶标蛋白 PcAdv、PcRoo 及血细胞靶标蛋白 PcnWAS 为靶标开展了杀螺剂设计研究，因此本研究具有真正意义上的原创性。

本研究以福寿螺靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 为基础，发现了巴氯芬、硫代辅酶腺嘌呤二核苷酸、海藻酸钾等一系列具有杀螺活性的化合物，目前并未见这些化合物具有杀螺活性的研究或报道。

本研究利用 3D-QSAR 的方法设计出了 3 个杀螺化合物的结构，这些化合物的化学结构新颖，尚属首次报道，该研究结果对新作用靶标农药的创制具有重要

的理论指导价值。

3 展望

本论文基于福寿螺靶标蛋白 PcAdv、PcnWAS 和 PcRoo 系统地开展了杀螺剂筛选和设计研究，由于时间、技术和设备的限制，仍存在一些问题有待继续研究：

第一，在虚拟筛选方面，本研究仅选用了公共数据库 DrugBank，化合物数量较少，因此在后续研究中可以使用 ZINC、PubChem 等化合物数量较多的数据库进行二次虚拟筛选，以期获得其它具有杀螺活性的化合物。

第二，对于构建的药效团模型可以进一步进行虚拟筛选，以验证模型的可靠性。同时也应对 3D-QSAR 分析获得的化合物结构与杀螺活性间的关系进行试验验证。

第三，与对照化合物苦葛皂苷 A、槟榔碱相比，本研究获得的杀螺化合物效果较弱，分析其原因可能是这些探针化合物的靶标蛋白较多，还存在其它未被发现的靶标蛋白，因此在后续研究中还应该继续对福寿螺体内潜在的靶标蛋白进行研究。

第四，本文设计出的潜在的高活性杀螺化合物的合成路线并未探明，因此在后续研究中应对这些化合物的合成路线进行研究，以期能获得高活性的杀螺化合物。

参考文献

- [1] 李荣, 孟晶, 赵若春, 等. 2022年新药研发发展态势[J]. 生命科学, 2023, 35(1): 80-87.
- [2] 李玺源. 新型靶向 STING 抗肿瘤药物的研发及机制研究[D]. 上海: 中国科学院大学(中国科学院上海药物研究所), 2022.
- [3] 庄世宏. 小花假泽兰杀菌作用研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
- [4] 曹艺明. 抗 EV-A71 病毒药物靶标及候选药物的筛选与验证[D]. 济南: 山东中医药大学, 2021.
- [5] 徐盼. 基于蛋白质动态的关键靶标药物设计及作用机制研究[D]. 上海: 中国科学院大学(上海药物研究所), 2020.
- [6] 程姣. 基于组织特异表达基因的药物靶标发现[D]. 厦门: 厦门大学, 2019.
- [7] Nurk S, Koren S, Rhie A, et al. The complete sequence of a human genome[J]. Science, 2022, 376(6588): 44-53.
- [8] 耿律. 药物发现新策略的发展及在白血病靶标中的应用[D]. 上海: 上海交通大学, 2015.
- [9] 曹茂启, 王珏, 罗骏, 等. 分子对接技术在天然产物小分子与靶标蛋白相互作用中的研究进展[J]. 广东化工, 2019, 17(9): 117+138.
- [10] 郜瑞, 赵霞霞, 李发荣. 药物靶标发现的技术[J]. 药物生物技术, 2009, 16(1): 5.
- [11] Li H, Kasam V, Tautermann C S, et al. Computational method to identify druggable binding sites that target protein-protein interactions[J]. Journal of Chemical Information & Modeling, 2014, 54(5): 1391-1400.
- [12] Lin Z, Amako Y, Kabir F, et al. Development of photolenalidomide for cellular target identification [J]. Journal of the American Chemical Society, 2022, 144(1): 606-614.
- [13] Shashank K S, Mamatha H R, Prashantha C N, 等. 多种类型癌症基因表达数据的 Meta 分析以预测生物标志物和药物靶标[J]. 计算分子生物学, 2015, 12(4): 19-25.

- [14]金辉, 高艳彬, 卢志阳, 等. 差异基因表达谱分析小鼠烧伤早期免疫细胞刺激反应的相关基因靶标[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(12): 1775-1781.
- [15]刘永红. 胡椒酸分子探针的合成及特异性靶标确定的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2018.
- [16]Zhang Y X, Liu W W, Feng W, et al. Identification of 14 differentially-expressed metabolism-related genes as potential targets of gastric cancer by integrated proteomics and transcriptomics[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022,10: 816249
- [17]张璐莹, 高明权, 苏权中, 等. 蛋白质组学技术揭示黄当归醇作用于肝癌细胞中的靶标蛋白[J]. 沈阳药科大学学报, 2021, 38(7): 691-698.
- [18]Fung F K, Zhu Y X, Wong C H, et al. Abstract PO-004: Identification of MLL4 as a novel therapeutic target of pancreatic ductal adenocarcinoma by in-vivo genome-wide RNAi screening [J]. *Cancer Research*, 2020, 80(22): 106-110.
- [19]刘子楠, 黎河山, 宋泉禹. 蛋白质结构预测综述[J]. 中国医学物理学杂志, 2020, 37(9): 1203-1207.
- [20]崔利利. 鉴定蛋白质/多肽结构的新型电化学-质谱联用技术的开发[D]. 长春: 吉林大学, 2021.
- [21]邓静, 马涛, 常自伟, 等. 基于固体核磁共振方法的蛋白质组装体三级结构解析[J]. 物理化学学报, 2020, 36(4): 47-55.
- [22]陶凤英. 利用启发式算法在三级方格网上预测蛋白质结构[D]. 南京: 南京航空航天大学, 2017.
- [23]黄宁桥. 基于深度学习的蛋白质三级结构预测[D]. 湘潭: 湘潭大学, 2020.
- [24]Rafael T M, Rômulo M M, Magnólia C. Homology molecular modeling - perspectives and applications[M]. IntechOpen: 2021.
- [25]杨瑶, 桑延超, 多丽君. 蛋白质三级结构预测的并行化算法[J]. 科技创新导报, 2008(18): 11.
- [26]张贵军, 郝小虎, 周晓根, 等. 一种基于萤火虫算法的蛋白质结构预测从头方法: CN106446604A[P]. 2017.

- [27] Wang Y L, Zhong L I, Qian X H. Comparative and statistical analysis of nAChR sequences: an ab-initio approach to the origin of molecular discrimination[J]. 中国科学通报(英文版), 2012, 57(5): 479-486.
- [28] 邵明富. 蛋白质结构预测的穿线法研究[D]. 北京: 中国科学院大学(计算技术研究所), 2011.
- [29] 尹志刚. 靶向 hURAT1 药物筛选模型的构建及初步应用[D]. 贵阳: 贵州大学, 2019.
- [30] 韦祎. 蛋白质结构预测的 Ab Initio 方法研究[D]. 北京: 中国科学院大学(计算技术研究所), 2009.
- [31] 王超, 朱建伟, 张海仓, 等. 蛋白质三级结构预测算法综述[J]. 计算机学报, 2016(5): 23-26.
- [32] 杨建雄, 刘志辉. 药物靶标在新药研发中的作用[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(3): 750-751.
- [33] 徐大杰. 基于深度生成模型的药物分子设计[D]. 成都: 电子科技大学, 2021.
- [34] 杨昌永. 新型 c-Met ADC SHR-A1403 制备工艺、药效学及药代动力学研究[D]. 南京: 东南大学, 2019.
- [35] 闫祯昕. 基于靶点黄嘌呤氧化酶的抗高尿酸血症药物研发的初步探究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2019.
- [36] 宫莉, 康经武. 基于化学蛋白质组学的药物靶标鉴定[J]. 色谱, 2020(8): 877-879.
- [37] 安明榜. 首个血管紧张素转化酶抑制剂卡托普利的研发之路——基于结构的新药设计理念[J]. 药学与临床研究, 2010, 18(4): 328-330.
- [38] Chen C T, Kesselheim A S. Journey of generic imatinib: a case study in oncology drug pricing[J]. Journal of Oncology Practice. 2017, 13 (6): 353-355.
- [39] 王媛, 周燕子, 朱云颖, 等. 瑞德西韦(Remdesivir)抗冠状病毒应用前景[J]. 中国抗生素杂志, 2020, 45(2): 103-112.
- [40] Megan C. A tale of two antiviral targets — and the COVID-19 drugs that bind them[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2022, 21(1): 3-5.

- [41] Ashutosh Mani. Recent advances in computer aided drug designing[M]. Nova Science Publishers, 2021.
- [42] 于启蒙, 张新超, 孟慧琴, 等. 基于计算机辅助药物设计研究白术挥发油的主要成分作用靶点及药效预测[J]. 化工设计通讯, 2020, 46(10): 152-154.
- [43] 孙银雪. 基于受体和配体的虚拟筛选整合平台研究[J]. 通化师范学院学报, 2015(8): 7-8.
- [44] Jacob O. Spiegel, Jacob D. Durrant. AutoGrow4: an open-source genetic algorithm for de-novo drug design and lead optimization[J]. Journal of Cheminformatics, 2020, 12(7): 46-53
- [45] Bernd A S, Pillunat L E, Böhm A G, et al. Okuläre hämodynamik und gesichtsfeld beim glaukom unter dorzolamid-therapie [J]. Der Ophthalmologe, 2001, 98(5): 451-455.
- [46] Kupferschmidt H, Fattinger K E, Ha H R, et al. Grapefruit juice enhances the bioavailability of the HIV protease inhibitor saquinavir in man[J]. British Journal of Clinical Pharmacology, 2015, 45(4): 355-359.
- [47] Nath N K, Yasuda N, Rabeh W M, et al. Structural elucidation of the neuraminidase inhibitor zanamivir (relenza): creeping and diffusion for polymorph separation[J]. Crystal Growth & Design, 2014, 14(2): 770-774.
- [48] 刘艾林, 杜冠华. 虚拟筛选辅助新药发现的研究进展[J]. 药学学报, 2009(6): 9-13.
- [49] 叶德举, 罗小民, 沈建华, 等. 先导化合物的发现——整合计算机虚拟筛选、化学合成和生物测试方法[J]. 化学进展, 2007, 19(12): 1939-1946.
- [50] 段爱霞, 陈晶, 刘宏德, 等. 分子对接方法的应用与发展[J]. 分析科学学报, 2009(4): 106-110.
- [51] Morris G M, Lim W M. Molecular docking[J]. Methods in Molecular Biology, 2008, 443(1): 365-382.
- [52] Ewing T, Kuntz I D. Critical Evaluation of search algorithms for automated molecular docking and database screening[J]. Journal of Computational

Chemistry, 2015, 18(9):1175-1189.

- [53] Brooks S F. Force display in molecular docking[J]. Journal of Molecular Graphics, 1988, 32(4):231-236.
- [54] 段观福. 基于小分子极化的分子对接及基于结构的药物设计[D]. 上海: 华东师范大学, 2020.
- [55] 俞良发. 靶向 RXR α -CBS 抑制剂的虚拟筛选、设计合成及活性评价和靶向新冠病毒主蛋白酶抑制剂的虚拟筛选[D]. 厦门: 厦门大学, 2021.
- [56] 王目阔. 腺苷 A₁ 受体拮抗剂的多级虚拟筛选研究[D]. 天津: 南开大学, 2020.
- [57] 谭小芹. 基于虚拟筛选和深度生成模型的药物发现与优化研究[D]. 上海: 中国科学院大学(上海药物研究所), 2021.
- [58] 黄琦, 康宏, 张端峰, 等. 基于配体、受体和复合物指纹的虚拟筛选方法比较[J]. 化学学报, 2011, 69(5): 515-522.
- [59] 李晓丹. NTR1 配体化合物的虚拟筛选与优化设计[D]. 天津: 南开大学, 2016.
- [60] 曹冉. 基于受体结构的虚拟筛选在先导化合物发现中的应用[D]. 天津: 天津大学, 2013.
- [61] Hisaki T, Kaneko M, Hirota M, et al. Integration of read-across and artificial neural network-based QSAR models for predicting systemic toxicity: a case study for valproic acid[J]. The Journal of Toxicological Sciences, 2020, 45(2):95-108.
- [62] Banjare P, Matore B, Singh J, et al. In silico local QSAR modeling of bioconcentration factor of organophosphate pesticides[J]. In Silico Pharmacology, 2021, 9(1):34-46.
- [63] Seth A, Roy K. QSAR Modeling of algal low level toxicity values of different phenol and aniline derivatives using 2D descriptors[J]. Aquatic Toxicology, 2020, 228(11):105-127.
- [64] Li Y T, Yao W Q, Zhou S, et al. Synthesis, fungicidal activity, and 3D-QSAR of tetrazole derivatives containing phenyloxadiazole moieties[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2020, 34(13):127-162.
- [65] Harsa T E, Harsa A M, Diudea M V. QSAR and molecular docking studies of

- serotonin derivatives[J]. *Drug Designing & Intellectual Properties International Journal*, 2019, 3(2): 2-9.
- [66] 仝建波, 秦尚尚, 雷珊, 等. 4-羟氨基- α -吡喃酮甲酰胺类似物的 3D-QSAR 及分子对接研究[J]. *原子与分子物理学报*, 2019, 5(3): 12-19.
- [67] 王家哲, 杨艺炜, 任平, 等. 计算机辅助药物设计及其在新农药研发中的应用[J]. *陕西农业科学*, 2019, 65(8): 86-88.
- [68] 郝格非. 农药合理设计的分子基础研究[D]. 武汉: 华中师范大学, 2011.
- [69] 张鹏, 李西文, 董林林, 等. 植物源农药研发及中药材生产中的应用现状[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(19): 3579-3586.
- [70] 黄瑞环, 韩小斌, 刘京, 等. 海洋曲霉和海洋木霉抗植物病原菌活性次级代谢产物研究进展[J]. *江苏农业学报*, 2020, 36(5): 266-275.
- [71] 苏静静. 杀虫剂 DDT: 从宠儿到弃儿[J]. *大众健康*, 2022(2): 38-41.
- [72] 钟启谦. 六六六杀虫剂及其应用[J]. *中国农业科学*, 1953(3): 109-111.
- [73] 申桂英. 禁限用农药名录[J]. *精细与专用化学品*, 2020, 28(1): 12.
- [74] 中华人民共和国农业农村部公告(第 536 号)[J]. *中华人民共和国农业农村部公报*, 2022 (4): 124
- [75] 徐曙, 赵兴增, 周倩, 等. 甘草根中黄酮类化合物的提取, 分离与衍生化及其抑菌活性研究[J]. *植物资源与环境学报*, 2020, 29(6): 34-43.
- [76] 李鹏. 基于蛋白质相互作用网络的药物靶标和药物重定位研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2011.
- [77] 宋宝安, 李向阳. 绿色农药创新研究和原创性靶标的发现[J]. *高科技与产业化*, 2018(12): 41-42.
- [78] 刘少华, 唐蜜. 高通量合成与筛选在新农药创制中的应用[J]. *精细与专用化学品*, 2015(4): 48-50.
- [79] 英君伍, 雷光月, 宋玉泉, 等. 三氟苯嘧啶的合成与杀虫活性研究[J]. *现代农药*, 2017, 16(2): 14-16.
- [80] 李斌, 于海波, 罗艳梅, 等. 乙唑螨腈的合成及其杀螨活性[J]. *现代农药*, 2016, 15(6): 15-16.

- [81]谭海军. 新型邻甲酰氨基苯甲酰胺类杀虫剂环溴虫酰胺及其开发应用[J]. 精细与专用化学品, 2020, 28(2): 31-37.
- [82]石凌波. 巴斯夫杀虫剂 Ventigra™(双丙环虫酯)于美国上市[J]. 现代农药, 2019, 18(2): 6.
- [83]Wasternack C, Hause B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in annals of botany[J]. Annals of Botany, 2013, 111(6): 1021-1058.
- [84]张建平, 张福金, 王振, 等. 氟噻唑吡乙酮对马铃薯晚疫病最低有效防控剂量的研究[J]. 农药学学报, 2020, 22(3): 556-560.
- [85]Camille D, Diabe D, Ilona C, et al. The adipocyte hormone leptin sets the emergence of hippocampal inhibition in mice[J]. eLife, 2018 (7): 324-329.
- [86]Hatamotoa M, Aizawab R, Kobayashi Y, et al. A novel fungicide aminopyrifen inhibits GWT-1 protein in glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis in neurospora crassa[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2019, 156: 1-8.
- [87]Nakao T, Banba S. Broflanilide: A meta-diamide insecticide with a novel mode of action[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2016, 24(3): 372-377.
- [88]吴剑, 宋宝安. 聚焦农药创制热点,研发具有国际竞争力的农药新品种[J]. 中国农药, 2021, 17(10): 3-9.
- [89]Qiao X M, Zhang X Y, Zhou Z D, et al. An insecticide target in mechanoreceptor neurons[J]. Science Advances, 2022, 47(8): 297-314.
- [90]Sparks T C, Lorsbach B A. Perspectives on the agrochemical industry and agrochemical discovery[J]. Pest Management Science, 2017, 73(4): 672-677.
- [91]杨光富. 绿色农药设计与新品种创制[C]. 第十六届全国农药交流会论文集. 2016: 36-37.
- [92]张俊钦. 亚洲玉米螟几丁质酶 3D 模建及其抑制剂的虚拟筛选[D]. 大连: 大连理工大学, 2006.
- [93]陶涛. 棉铃虫多靶标蛋白抑制剂的虚拟筛选[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2020.
- [94]Xie Y, Peng W, Ding F, et al. Quantitative structure-activity relationship (QSAR)

- directed the discovery of 3-(pyridine-2-yl) benzenesulfonamide derivatives as novel herbicidal agents[J]. *Pest Management Science*, 2017, 2(1): 16-19.
- [95]姚婷婷. 基于受体和配体策略的计算机辅助农药生物合理设计研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- [96]蒋丹平. 作用于昆虫鱼尼丁受体和烟碱型乙酰胆碱受体的杀虫剂分子设计[D]. 上海: 华东理工大学, 2015.
- [97]Joshi R C, Martin S R, Saez-Navarrete C, et al. Efficacy of quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins against golden apple snail in the philippines under labortory conditions [J]. *Crop Protection*, 2008, 27(5): 553-557.
- [98]犹昌艳, 杨宇, 胡飞, 等. 五爪金龙中香豆素类物质含量及其对福寿螺、水稻和稗草的影响[J]. *生态学报*, 2014, 34(7): 1716-1724.
- [99]王志高, 谭济才, 刘军. 空心莲子草皂素毒杀福寿螺的试验研究[J]. *上海农业学报*, 2011, 27(1): 80-83.
- [100]张文领, 牟希东, 韦慧, 等. 四聚乙醛亚致死剂量对福寿螺 AchE、GSTs 和 MFO 活性的影响[J]. *植物保护*, 2016, 42(6): 58-62.
- [101]张苏阳, 邢云天, 袁轩, 等. 氯硝柳胺对光滑双脐螺氧化磷酸化的影响[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2022, 40(1): 61-67.
- [102]Yang C P, Tian Y, Lv T X, et al. Histopathological effects of pedunsaponin A on *Pomacea canaliculata*. [J]. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 2018, 148: 151-158.
- [103]Yang C P, Lv T X, Wang B, et al. The damaging effects of pedunsaponin A on *Pomacea canaliculata* hemocytes[J]. *Toxins*, 2019, 11(7): 390-401.
- [104]Yang C P, Wang Y M, Ma Y Q, et al. Research on the molluscicidal activity and molecular mechanisms of arecoline against *Pomacea canaliculata*. [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 246: 114198.
- [105]Yang C P, Zhang Y Y, Zhou Y, et al. Screening and functional verification of the target protein of pedunsaponin A in the killing of *Pomacea canaliculata*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 220: 112393.

- [106]Yang C P, Ma Y Q, Wang B, et al. Identification and functional verification of the target protein of pedunsaponin A in the gills of *Pomacea canaliculata*[J]. Pest Management Science, 2021, 78(3): 947-954.
- [107]Park H, Dovas A and Hanna S. Tyrosine phosphorylation of wiskott-aldrich syndrome protein (WASP) by hck regulates macrophage function[J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(11): 7897-7906.
- [108]Hunter D V, Smaila B D, Lopes D M, et al. Advillin is expressed in all adult neural crest-derived neurons[J]. eNeuro, 2018, 5(5): 17-21.
- [109]Yang J, Liu X, Yue G, et al. Rootletin, a novel coiled-coil protein, is a structural component of the ciliary rootlet [J]. Journal of Cell Biology, 2002,159(3): 431-440.
- [110]Charles S. Bond. TopDraw: a sketchpad for protein structure topology cartoons[J], Bioinformatics. 2003, 19(2): 311-312.
- [111]Zheng W, Zhang C X, Li Y, et al. Folding non-homology proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations[J]. Cell Reports Methods, 2021, 1: 100014.
- [112]Yang J, Yan R, Roy A, et al. The I-TASSER suite: protein structure and function prediction[J]. Nature Methods, 2015, 12: 7-8.
- [113]Yang J Y, Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43: 174-181.
- [114]Yu J, Zhou Y, Tanaka I, et al. Roll: a new algorithm for the detection of protein pockets and cavities with a rolling probe sphere[J]. Bioinformatics, 2010, 26(1): 46-52.
- [115]Morris G M, Huey R, Lindstrom W, et al. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility[J]. Computational Chemistry, 2009, 16: 2785-2791.
- [116]Huey R, Morris G M, Olson A J, et al. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation[J]. Computational Chemistry, 2007, 28:

1145-1152.

- [117]McCullough J, Fey P, Rahman R J, et al. Annotating putative discoideum proteins using I-TASSER[J]. MicroPublication Biology, 2021, 20: 2578-2582.
- [118]Zhang W X, Yang J Y, He B J, et al. Integration of QUARK and I-TASSER for ab-initio protein structure prediction in CASP11[J]. HHS Public Access, 2016, 84: 76-86.
- [119]Jethra G, Mishra A K, Pandey P S, et al. Structure and function prediction of unknown wheat protein using LOMETS and I-TASSER[J]. Indian Journal of Agricultural Sciences, 2012, 82(10): 867-874
- [120]Krautscheid Y, Senning C, Sartori S B, et al. Pharmacophore modeling, virtual screening, and in-vitro testing reveal haloperidol, eprazinone, and fenbutrazate as neurokinin receptors ligands [J]. Journal of Chemical Information & Modeling, 2014, 54(6): 1747-1757.
- [121]Kaplan A L, Confair D N, Kim K, et al. Bespoke library docking for 5-HT_{2A} receptor agonists with antidepressant activity[J]. Nature, 2022, 11(6): 2419-2426.
- [122]张文领, 牟希东, 韦慧, 等. 四聚乙醛亚致死剂量对福寿螺 AchE、GSTs 和 MFO 活性的影响[J]. 植物保护, 2016, 42(6): 59-63.
- [123]Dai L P, Luo W H, Wang W X, et al. Molluscicidal efficacy of nerium indicum cardiac glycosides on *Pomacea canaliculata* and its effects on rice seedling [J]. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31(7): 1918-1924.
- [124]Shen X, Wang Z X, Liu L L, et al. Molluscicidal activity of *Solidago canadensis* L. extracts on the snail *Pomacea canaliculata*[J]. Pesticide Biochemistry & Physiology, 2018, 149(1): 104-112.
- [125]张涛. 海洋原位溶解氧检测仪设计与开发[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- [126]张健, 章文军, 裘琼芬, 等. 氨氮次溴酸钠氧化测定法的改良[J]. 环境科学与技术, 2011, 34(11): 126-129.
- [127]任成林, 田勇, 梁淑珍, 等. 动物组织 H.E.染色石蜡切片技术的改进[J]. 河北北方学院学报(自然科学版), 2007, 23(1): 41-45.

- [128]Nickerson K W, Van-Holde K E. A comparison of molluscan and arthropod hemocyanin-I. circular dichroism and absorption spectra[J]. Comparative Biochemistry and physiology. 1971, 39: 855-872.
- [129]Zanchi A, Maillard M, Burnier M. Recent clinical trials with omapatrilat: new developments[J]. Current Hypertension Reports, 2003, 5(4): 246-352.
- [130]Ho D, Huang J, Chapman J W. Impact of serum HER2, TIMP-1, and CAIX on outcome for HER²⁺ metastatic breast cancer patients: CCTG MA.31 (Lapatinib vs. Trastuzumab)[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2017, 164(3): 341-346.
- [131]Rosée P L, O'Dwyer M E, Druker B J. Insights from pre-clinical studies for new combination treatment regimens with the Bcr-Abl kinase inhibitor imatinib mesylate (Gleevec/Glivec) in chronic myelogenous leukemia: a translational perspective[J]. Leukemia, 2002, 16(7): 1213-1219.
- [132]Li W Q, Ding Y, Qi H T, et al. Discovery of natural products as multitarget inhibitors of insect chitinolytic enzymes through high-throughput screening[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(37): 10830-10837.
- [133]江开达, 李飞, 罗星光, 等. 多巴胺 D4 受体与精神分裂症及氯氮平疗效的关系[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2001(1): 44-45.
- [134]罗星光, 江开达, 顾牛范. 氯氮平对慢性难治性精神分裂症的疗效与 5-羟色胺 2A 受体基因的关系[J]. 中华精神科杂志, 2000(3): 12-15.
- [135]李鹏. 多巴胺 D2 受体 C957T, C939T 基因多态性对精神分裂症患者氯氮平疗效的影响[D]. 长沙: 中南大学, 2010.
- [136]李晓娜. GPCR 结构功能关系研究β-2 肾上腺素受体糖基化、保守二硫键动态性及 arrestin 结合机制研究[D]. 上海: 中国科学院大学(上海药物研究所), 2017.
- [137]Chen H B, Lv T X, Zhang M, et al. Two new compounds from the roots of *Pueraria peduncularis* and their molluscicidal effects on *Pomacea canaliculata*[J]. Journal of Asian natural products research, 2020, 22(2): 144-152.
- [138]Yang C P, Zhang M, Lei B, et al. Active saponins from root of *Pueraria*

- peduncularis* (Grah. ex Benth.) Benth. and their molluscicidal effects on *Pomacea canaliculata*[J]. *Pest Management Science*, 2017, 73(6): 1143-1147.
- [139]Martin R S, Ndjoko K, Hostettmann K. Novel molluscicide against *Pomacea canaliculata* based on quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins[J]. *Crop Protection*, 2007, 27: 310-319.
- [140]Li J, Xu H, Tang W, et al. Two new triterpenoids from the bark of *Eucalyptus exserta* and their molluscicidal and cytotoxic activities[J]. *Fitoterapia*, 2012, 83: 383-387.
- [141]Huang H C, Liao S C, Chang F R, et al. Molluscicidal saponins from *Sapindus mukorossi*, inhibitory agents of golden apple snails, *Pomacea canaliculata*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51: 4916-4919.
- [142]任学祥, 王士梅, 苏贤岩, 等. 甲维盐和四聚乙醛复配对福寿螺的联合毒力测定[J]. *农药*, 2018, 57(11): 855-856+858.
- [143]倪晓萧. 木荷植物提取物杀福寿螺效果及活性物质研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2016.
- [144]Shawky A M, Ibrahim N, Abourehab M A, et al. Pharmacophore-based virtual screening, synthesis, biological evaluation, and molecular docking study of novel pyrrolizines bearing urea/thiourea moieties with potential cytotoxicity and CDK inhibitory activities[J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2021, 36(1): 15-33.
- [145]Tian X Y, Zhao Q F, Chen X H, et al. Discovery of novel and highly potent inhibitors of SARS CoV-2 papain-like protease through structure-based pharmacophore modeling, virtual screening, molecular docking, molecular dynamics simulations, and biological evaluation[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 817715.
- [146]汪海燕, 裴容, 张健萍, 等. 五环三萜齐墩果烷型天然产物抗肿瘤活性研究进展[J]. *生命科学*, 2022, 34(7): 821-829.
- [147]张伟, 李国慧, 贾勇, 等. 4%螺威可湿性粉剂对福寿螺的防治效果[J]. *植物*

医生, 2020, 33(4): 66-69.