

木犀草素抑制肝纤维化关键蛋白PTK2的分子机制：基于分子对接与动力学模拟的研究

黄明涛^{1,2}, 冉滨瑜^{1,2}, 廖海琳², 蒋凌风^{2*}

¹广西中医药大学研究生院, 广西 南宁

²广西中医药大学中医药壮瑶医药研究院, 广西 南宁

收稿日期: 2025年11月18日; 录用日期: 2025年12月1日; 发布日期: 2026年2月14日

摘要

目的: 本研究旨在通过计算模拟方法, 探究叶下珠的主要活性成分之一木犀草素与肝纤维化相关蛋白蛋白酪氨酸激酶2(PTK2)之间的相互作用机制, 评估其作为PTK2抑制剂的潜力。方法: 采用分子对接技术预测木犀草素与PTK2的最佳结合模式与亲和力; 进而利用分子动力学模拟评估复合物在100 ns内的结构稳定性、动力学行为及关键相互作用; 最后通过MM-PBSA方法计算结合自由能并进行残基能量分解分析。结果: 分子对接显示木犀草素与PTK2具有高亲和力(最佳结合能为-8.0 kcal/mol), 并稳定结合于其活性口袋。分子动力学模拟表明, 复合物结构稳定, 木犀草素在结合口袋内无显著位移。结合自由能计算($\Delta G_{\text{bind}} = -68.815 \text{ kJ/mol}$)证实结合为自发过程, 且能量分解揭示结合主要由范德华力(疏水相互作用)驱动, 并辅以关键的氢键网络。残基贡献分析进一步识别出ILE-428、LEU-553和CYS-502等为关键“热点”残基。结论: 理论计算预测表明, 木犀草素能够通过PTK2活性口袋形成稳定复合物而高效抑制其活性, 这为阐释木犀草素的抗肝纤维化作用机制提供了分子水平依据, 并为其作为先导化合物的优化提示了方向。

关键词

木犀草素, PTK2, 分子对接, 分子动力学模拟, 结合自由能

Molecular Mechanism of Luteolin's Inhibition of PTK2, a Key Protein in Liver Fibrosis: A Study Based on Molecular Dynamics Simulation

Mingtao Huang^{1,2}, Binyu Ran^{1,2}, Hailin Liao², Lingfeng Jiang^{2*}

*通讯作者。

文章引用: 黄明涛, 冉滨瑜, 廖海琳, 蒋凌风. 木犀草素抑制肝纤维化关键蛋白 PTK2 的分子机制: 基于分子对接与动力学模拟的研究[J]. 药物化学, 2026, 14(1): 64-75. DOI: 10.12677/hjmce.2026.141007

¹Graduate School, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning Guangxi

²Institute of Traditional Chinese and Zhuang-Yao Ethnic Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning Guangxi

Received: November 18, 2025; accepted: December 1, 2025; published: February 14, 2026

Abstract

Objective: This study aimed to investigate the interaction mechanism between luteolin, one of the primary active components of *Phyllanthus urinaria*, and Protein Tyrosine Kinase 2 (PTK2), a protein associated with liver fibrosis, using computational simulation methods, and to evaluate its potential as a PTK2 inhibitor. **Methods:** Molecular docking was employed to predict the optimal binding mode and affinity between luteolin and PTK2. Subsequently, Molecular Dynamics (MD) simulations were used to assess the structural stability, dynamic behavior, and key interactions of the complex over 100 ns. Finally, the binding free energy was calculated using the MM-PBSA method, followed by per-residue energy decomposition analysis. **Results:** Molecular docking revealed that luteolin exhibits high affinity (optimal binding energy: -8.0 kcal/mol) for PTK2 and stably binds within its active pocket. MD simulations indicated that the complex structure remained stable, with no significant displacement of luteolin within the binding pocket. The binding free energy calculation ($\Delta G_{\text{bind}} = -68.815$ kJ/mol) confirmed that the binding is a spontaneous process. Energy decomposition revealed that the binding is primarily driven by van der Waals forces (hydrophobic interactions), supplemented by a critical hydrogen bond network. Per-residue energy contribution analysis further identified ILE-428, LEU-553, and CYS-502 as key “hotspot” residues. **Conclusion:** Theoretical calculations predict that luteolin can effectively inhibit PTK2 activity by forming a stable complex with its active pocket. This provides a molecular-level basis for explaining luteolin’s anti-hepatic fibrosis mechanism and suggests directions for optimizing it as a lead compound.

Keywords

Luteolin, PTK2, Molecular Docking, Molecular Dynamics Simulation, Binding Free Energy

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

在肝纤维化的研究中，蛋白酪氨酸激酶 2(PTK2) (又称为 Proline-rich tyrosine kinase 2)在活化的肝星状细胞(HSCs)中高表达，并通过介导下游信号通路促进 HSCs 的活化和增殖，从而驱动肝纤维化进程。研究表明，靶向抑制 PTK2 的活性已成为抗肝纤维化药物研发的重要方向。首先，PTK2 在 TGF- β 诱导的 HSCs 活化中扮演关键角色。研究发现，TGF- β 处理可以上调 HSCs 中 α -SMA、I 型胶原、NOX4、CTGF、TGF- β 1 和 Smad7 的表达，而 FAK 家族成员的抑制能够抑制 TGF- β 介导的纤维化信号通路[1]。此外，PTK2 的激活与肝纤维化的关联在 CCl₄处理的小鼠和具有显著纤维化或肝硬化的患者肝样本中得到了证实[1]。其次，FAK 信号通路在 HSCs 的机械转导过程中也起着重要作用。研究还揭示了 FAK 在 HSCs 活化中的其他分子机制。例如，MFAP4 通过与 HSCs 膜上的整合素 α v β 3 结合，激活 FAK/PI3K/NF κ B 信号通路，从而促进 HSCs 的活化和存活，最终加剧肝纤维化[3]。同时，IGF2BP1 通过稳定 TUBB4B

mRNA, 促进 HSCs 的活化, 而 TUBB4B 通过激活 FAK 信号通路诱导肝纤维化[4]。所以, PTK2 在 HSCs 活化和肝纤维化进程中具有重要作用, 其通过多种信号通路的相互作用促进 HSCs 的活化和增殖。靶向抑制 PTK2 及其相关信号通路的活性, 可能为肝纤维化的治疗提供新的策略和靶点。这些研究为理解 PTK2 在肝纤维化中的作用机制提供了新的视角, 并为未来的药物开发奠定了基础。

叶下珠是一种传统中药, 在亚洲多个国家被用于治疗肝脏疾病, 其保肝抗纤维化活性已被多项研究证实[5][6]。木犀草素作为叶下珠的主要活性成分之一, 已被广泛研究其在抗肝纤维化中的潜在作用。研究表明, 木犀草素通过抑制多种激酶和调控多条信号通路, 能够有效地发挥抗肝纤维化效应。研究表明, 木犀草素通过抑制 TGF- β 1 诱导的 Smad2 和 AKT 磷酸化, 减少了肝纤维化的发生[7]。这种多靶点、多通路的调控机制, 使得木犀草素在抗肝纤维化治疗中具有广阔的应用前景。然而, 木犀草素是否直接作用于肝纤维化的关键靶点 PTK2, 以及二者间的具体分子相互作用机制, 目前尚不清楚。基于此, 本研究提出科学假设: 木犀草素可能通过直接靶向 PTK2 的活性口袋, 特异性结合并抑制其激酶活性, 进而阻断相关促纤维化信号通路, 这可能是其发挥抗肝纤维化作用的重要分子机制之一。

为验证此假设, 本研究综合运用计算化学方法: 首先采用分子对接技术预测木犀草素与 PTK2 的结合模式与亲和力; 随后进行 100 ns 的分子动力学模拟, 从动态角度系统评估复合物的结构稳定性、柔性及相互作用演化; 最后利用 MM-PBSA 方法计算结合自由能, 并分解各残基的贡献, 从而在原子水平上揭示木犀草素与 PTK2 结合的分子基础, 为将其开发为新型 PTK2 抑制剂提供理论指导。

2. 材料与方法

分子对接研究使用 AutoDock Vina 1.1.2 软件完成。通过 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)下载配体(木犀草素, Luteolin) Mol2 格式结构。蛋白酪氨酸激酶 2 (PTK2, PDB ID 为 1MP8)从 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载 PDB 格式结构, 再通过 PyMOL 对蛋白配体移除水分子、去残基。于 AutoDock Tools 1.5.7 进行加氢(配体加极性氢, 受体加全氢)、电荷计算和非极性氢组合, 配体和受体分子均转换为 PDBQT 格式, 设置好盒子参数后生成 config 文件, 于 AutoDock Vina 1.1.2 进行分子对接, 并使用 PyMOL 软件将结果可视化。选择该结构(PTK2, PDB ID 为 1MP8)的理由在于: (1) 其分辨率较高(1.60 Å), 能提供准确的原子坐标; (2) 为磷酸化状态下的激酶结构, 更接近生理活性构象; (3) 包含完整的激酶结构域, 且无其他小分子配体干扰, 适合用于分子对接研究。使用 AutoDock Tools 1.5.7 进行分子对接。对接盒子中心坐标定义为活性口袋关键残基(如 ILE-428)的质心, 盒子大小设置为 22.5 Å × 22.5 Å × 22.5 Å, 以确保完全涵盖整个活性口袋区域。

分子动力学模拟采用 GROMACS 2022.2 进行。蛋白质使用 Amber14SB 力场, 溶剂为 TIP3P。小分子以 antechamber 生成 AM1-BCC 电荷并赋予 GAFF2 原子类型, 经 ACPYPE 转换为 GROMACS 拓扑, 离子参数与 TIP3P 兼容(Joung-Cheatham)。将复合物置于截角十二面体盒中, 蛋白外表面至盒边界的最短距离 ≥ 1.2 nm, 加入 TIP3P 水并补加 Na⁺/Cl⁻中和体系至 0.15 M。体系首先采用 Steepest Descent 能量最小化(至 $F_{\max} < 1000 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-1}$), 随后在 298 K 下进行 200 ps 的 NVT 和 NPT 分阶段平衡。生产期在 NPT 条件下运行 100 ns, 时间步长 2 fs, Verlet 截断。库仑相互作用采用 PME, 范德华相互作用与库仑截断半径均为 1.2 nm, 所有涉及氢键采用 LINCS 算法进行约束, 温度与压力分别由 Nose-Hoover 与 Parrinello-Rahman 维持 298 K 与 1 bar。轨迹每 10 ps 输出一次, 模拟后使用 GROMACS 工具及 VMD/PyMOL 进行结构与相互作用分析。为检验模拟结果的稳健性, 在主要 100 ns 模拟基础上, 我们增加了两次独立的 100 ns 重复模拟, 所有模拟均采用相同的参数设置。体系构建与模拟流程同原文。轨迹分析基于三次重复模拟的平均结果。结合自由能计算使用最后一次重复模拟中 20~100 ns 的稳定轨迹段。计算采用 GMX-MMPBSA 工具, 计算中使用广义玻恩(GB)模型(igb = 5)处理极性溶剂化能, 其中溶质(蛋白质 - 配体复合

物)的内部介电常数(ϵ_{in})设置为 1, 溶剂水的介电常数(ϵ_{out})设置为 80。熵对结合自由能的贡献($-T\Delta S$)采用准谐近似方法进行估算。

3. 结果与讨论

3.1. 分子对接结果与复合物结构分析

Table 1. Molecular Docking Results of Luteolin with PTK2

表 1. 木犀草素与 PTK2 分子对接结果

Mode	Affinity (kcal/mol)	Dist from RMSD l.b.	Best mode RMSD u.b.
1	-8.0	0.000	0.000
2	-7.8	1.400	2.785
3	-7.7	2.217	6.689
4	-7.7	1.916	7.082
5	-7.4	1.946	6.705
6	-7.3	2.171	7.110
7	-7.1	2.368	7.026
8	-7.1	2.990	4.152
9	-6.9	2.501	3.968

分子对接结果见表 1, 木犀草素与靶点 PTK2 表现出较强的结合潜力。最稳定结合模式(模式 1)的结合亲和力为-8.0 kcal/mol, 这是一个非常理想的数值, 通常表明化合物具有显著的生物活性。此外, 排名前九的结合模式其结合能均优于-6.9 kcal/mol, 进一步证实了结合作用的可靠性。结果中一个关键指标是均方根偏差(RMSD), 它用于衡量不同结合模式之间的构象差异。值得注意的是, 模式 2 与最佳模式(模式 1)的构象非常接近(RMSD l.b. = 1.400 Å), 表明该结合姿态较为稳定。然而, 从模式 3 开始, 其 RMSD 上限(u.b.)值显著增大(如模式 4 为 7.082 Å), 这揭示了木犀草素在 PTK2 结合口袋中可能存在多种差异较大的结合取向, 展现了其结合的灵活性。这种构象多样性可能与其多酚羟基结构有关, 允许其与蛋白的不同残基形成氢键等相互作用。综上所述, 对接结果从热力学(高亲和力)和结构学(多结合模式)两个层面共同预测了木犀草素是 PTK2 的一个有前景的抑制剂候选物, 为后续的分子动力学模拟深入探索结合稳定性与机制提供了坚实的基础。

为探究木犀草素(Luteolin)与 PTK2 蛋白的结合模式, 我们进行了分子对接结果可视化分析。结果如图 1 所示, 木犀草素稳定地结合于 PTK2 的活性口袋内。结合模式分析表明, 其结合主要由氢键、疏水相互作用及范德华力共同维持。具体而言, 木犀草素分子中的酚羟基和羰基氧原子与活性口袋内的关键残基 GLU-500、CYS-502 和 ASP-564 形成了较强的氢键网络, 这可能为结合提供了主要的特异性和方向性。同时, 木犀草素的芳香环结构与 LYS-454 残基之间存在 Pi-阳离子相互作用, 并与 ALA-452、VAL-436、LEU-553 和 ILE-428 等非极性残基的侧链形成了广泛的 Pi-烷基疏水相互作用, 这有助于增强结合的亲和力。此外, VAL-484、MET-499、GLN-432 等残基通过范德华力与配体紧密贴合, 进一步巩固了结合复合物的稳定性。

该对接构象揭示了木犀草素通过多重的分子间相互作用与 PTK2 高效结合的结构基础。以此最佳构象为初始结构进行分子动力学模拟, 将有助于在动态水平上进一步验证复合物的稳定性, 并定量分析关键氢键的占据率与相互作用的演化规律。

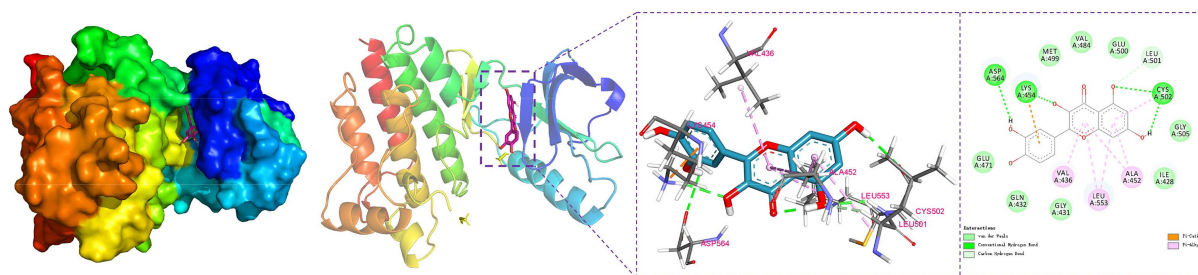


Figure 1. Visualization of the Luteolin-PTK2 protein binding mode

图 1. 木犀草素与 PTK2 蛋白的结合模式可视化

3.2. 稳定性分析

3.2.1. RMSD 分析

为评估木犀草素-PTK2 复合物在 100 ns 分子动力学模拟中的整体稳定性, 我们分析了复合物、蛋白质骨架以及配体的均方根偏差(RMSD)随时间的变化(图 2)。结果表明, 整个体系在模拟后期达到了平衡状态。复合物的 RMSD 在初始 20 ns 内呈现上升趋势, 随后在 20 至 100 ns 期间稳定在 0.25 ± 0.05 nm 的范围内波动, 表明复合物结构已趋于动态平衡。作为受体, 蛋白质骨架的 RMSD 表现出与复合物高度一致的变化趋势, 并稳定在更低的水平(约 0.15 nm), 这提示蛋白质的整体构象在结合配体后保持稳定。尤为重要的是, 配体木犀草素的 RMSD 值始终处于最低水平(<0.1 nm), 且波动极小, 这有力地证明了配体在蛋白质的活性口袋中结合得非常牢固, 没有发生明显的位移或翻转。综上所述, 复合物、蛋白质和配体三者的 RMSD 曲线在模拟中后期均收敛良好, 这说明整个分子动力学模拟体系达到了稳定, 为后续分析相互作用的动态特征提供了可靠的轨迹基础。

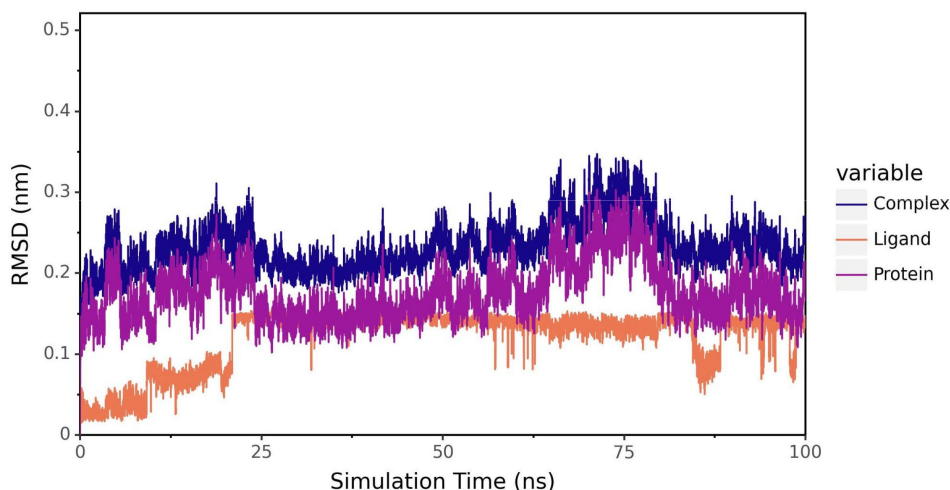


Figure 2. RMSD results of the complex, protein backbone, and ligand

图 2. 复合物、蛋白质骨架以及配体的 RMSD 结果

3.2.2. Rg 分析

为评估木犀草素-PTK2 复合物在 100 ns 分子动力学模拟过程中结构的紧密性与整体构象的稳定性, 我们分析了复合物的回转半径(Rg)。如图 3 所示, 复合物的 Rg 值在整个模拟过程中呈现出规律性的变化: 在最初的 20 ns 内, Rg 值经历了一个上升和调整阶段, 表明复合物结构正在寻找一个稳定的构象状态; 在 20 ns 至约 75 ns 期间, Rg 值在 1.90 nm 至 1.98 nm 的范围内波动, 显示出结构具有一定的动态柔

性；模拟进行至 75 ns 后，Rg 值收敛并稳定在约 1.95 nm 附近，且波动幅度显著减小。这一结果清晰地表明，复合物体系在模拟中后期达到了动态平衡状态。其 Rg 值保持在一个相对较高的水平(与紧凑的球状蛋白相比)，这可能与 PTK2 蛋白本身的结构特性有关。更重要的是，Rg 值的稳定收敛，结合之前 RMSD 的分析结果，共同证明了木犀草素与 PTK2 形成的复合物不仅整体构象稳定，其结构的紧密程度也达到了平衡，为两者之间的持续相互作用提供了稳定的结构环境。

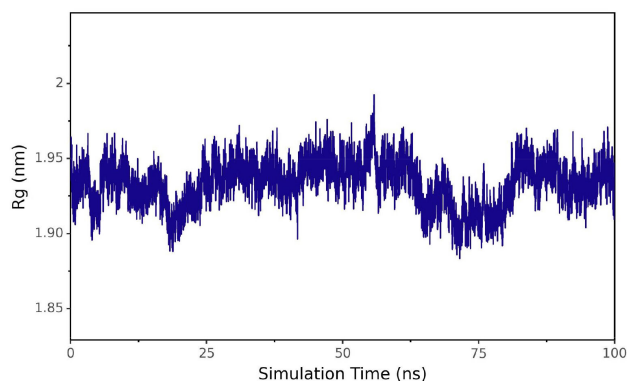


Figure 3. Radius of gyration results of the complex

图 3. 复合物的回转半径结果

3.2.3. RMSF 分析

为探究 PTK2 蛋白在结合木犀草素后各氨基酸残基的局部运动柔性，我们分析了复合物分子动力学模拟轨迹的均方根涨落(RMSF)。如图 4 所示，PTK2 蛋白约 700 个残基的 RMSF 值呈现出显著的不均匀分布。整体来看，大部分残基的 RMSF 值较低(<0.2 nm)，表明蛋白质的核心结构域具有较好的刚性，这通常与稳定的 α -螺旋和 β -折叠等二级结构相关。值得注意的是，在残基编号约 100~150、300~350 以及 500~550 等区间出现了明显的 RMSF 峰值(>0.3 nm)，这些区域通常对应蛋白质表面的环区(loops)或末端，其较高的柔性可能对于蛋白质的构象调整和功能发挥具有重要作用。尤为关键的是，配体木犀草素的结合位点周边残基(例如，对接分析中识别的 GLU-500、CYS-502 等)的 RMSF 值普遍处于较低水平，提示木犀草素的结合可能通过稳定活性口袋的局部构象，进而影响 PTK2 的激酶活性。该 RMSF 分析结果与之前 RMSD、Rg 的分析结论相互印证，共同揭示了木犀草素-PTK2 复合物在整体结构稳定的大背景下，兼具必要的局部柔性，为理解其结合机制提供了动态结构层面的见解。

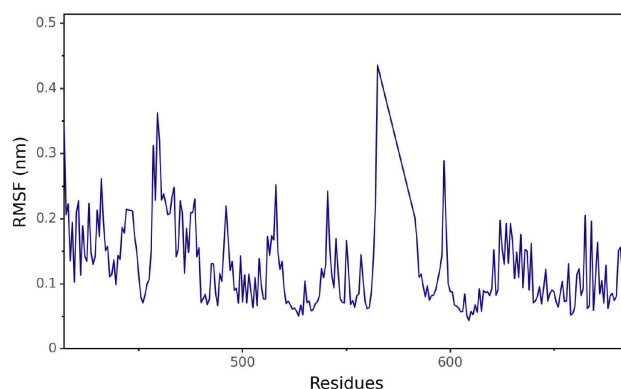


Figure 4. RMSF results from the molecular dynamics simulation trajectory of the complex

图 4. 复合物分子动力学模拟轨迹的 RMSF 结果

3.2.4. 质心演变分析

为在动态过程中定量评估木犀草素在 PTK2 蛋白结合口袋内的位置稳定性,我们分析了小分子质心与蛋白质整体质心(Protein-ligand)以及与小分子结合口袋残基质心(Pocket-ligand)之间的距离随时间的变化(图 5)。模拟结果显示,两条距离曲线在初始的~40 ns 内均经历了一定的波动与调整,此后直至模拟结束(100 ns),均收敛于稳定的平衡状态。小分子与结合口袋质心的距离最终稳定在约 0.75 nm 的较低水平,且波动范围极小,这直接证明了木犀草素被紧密地限制在初始对接位点内,没有发生明显的解离或位移。同时,小分子与蛋白质整体质心的距离稳定在约 1.55 nm,其值大于口袋距离,这与理论预期相符,因为蛋白质质心位于分子的几何中心,而结合口袋通常位于蛋白质表面或内部特定区域。该质心距离分析结果表明,在整个模拟过程中,木犀草素稳定地结合于 PTK2 的活性口袋中。这一结果与前述 RMSD、Rg 和 RMSF 的分析结论相互印证,共同从不同角度证实了木犀草素-PTK2 复合物具有良好的结合稳定性。

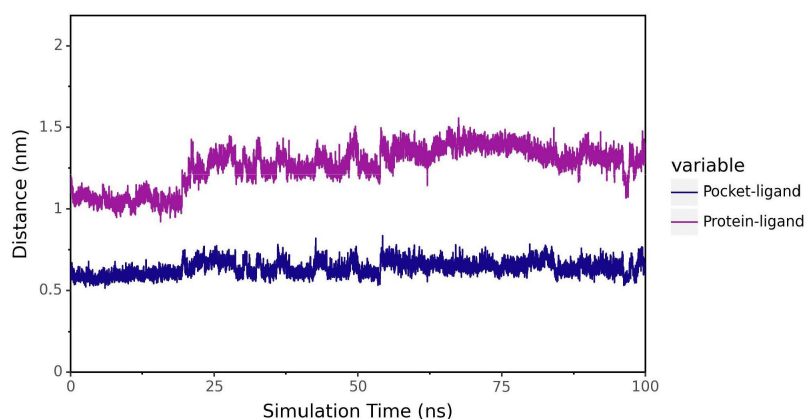


Figure 5. Center-of-mass distance versus time curve of the complex

图 5. 质心“距离-时间”变化曲线

3.2.5. Buried SASA 分析

埋藏溶剂可及表面积(Buried SASA)是表征配体-蛋白复合物界面大小和紧密程度的关键参数。如图 6 所示,木犀草素与 PTK2 结合界面的 Buried SASA 在整个 100 ns 分子动力学模拟中,其值主要分布于 5.0 至 7.8 nm² 的范围内。在模拟的前期(0~40 ns),该值存在一定波动,表明结合界面仍在进行构象调整;在模拟中后期(40~100 ns),Buried SASA 围绕约 6.2 nm² 的平均值进行小幅波动,并呈现出良好的收敛性。这一结果明确显示,木犀草素与 PTK2 蛋白之间形成了一个较大且稳定的埋藏接触界面。较大的 Buried SASA 值(>5.0 nm²)提示二者之间存在广泛的范德华接触和疏水相互作用。而该值在模拟后期趋于动态平衡,则进一步从界面接触面积的角度证实,复合物的结合模式已经稳定,小分子没有从结合口袋中解离或发生重大位移。此结论与前述 RMSD、RMSF 及质心距离的分析结果相互印证,共同支撑了木犀草素与 PTK2 能够稳定结合的结论。

3.2.6. 结合构象叠合分析

为直观展示木犀草素在 PTK2 蛋白结合口袋内的位置稳定性,我们将分子动力学模拟轨迹中不同时间点的蛋白质骨架结构(以卡通图表示)及其结合的木犀草素分子(以棍状图表示)进行叠合,结果如图 7 所示。对蛋白质骨架的叠合分析显示,其核心结构域(特别是活性口袋周围)的构象高度一致,主要柔性区域体现在表面的环区和末端,这与前述 RMSF 分析结果相吻合。最关键的是,所有叠合构象中的木犀草素分子都精确地重叠在初始对接位点,呈现出极高的空间叠合度。这一结果直观地表明,在整个 100 ns 的模拟过程中,木犀草素没有发生结合模式的翻转或从口袋中解离,其与关键残基(如 GLU-500、CYS-502

等)的空间相对位置保持稳定。该结合构象叠合分析从结构可视化层面强有力地证实了木犀草素与 PTK2 结合的稳定性,为前述基于数值(RMSD、RMSF、距离、SASA)的分析结论提供了直观的结构证据,共同支撑了木犀草素是 PTK2 潜在抑制剂的论断。

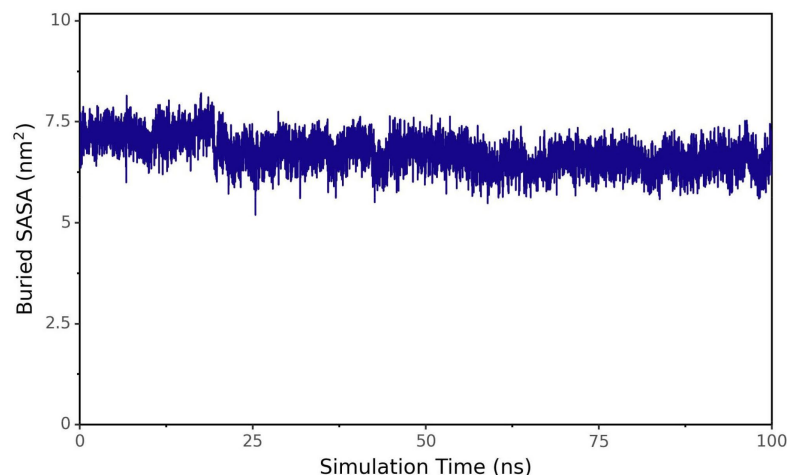


Figure 6. Buried SASA time evolution curve

图 6. Buried SASA 时间变化曲线

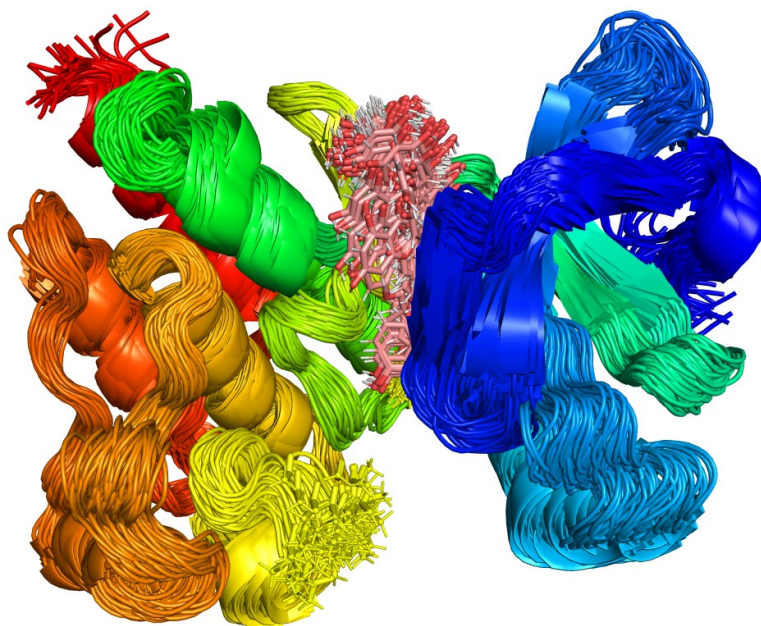


Figure 7. Structural superposition of representative conformations from the 100 ns MD Simulation of the Luteolin-PTK2 Complex

图 7. 木犀草素-PTK2 复合物在 100 ns 分子动力学模拟中的代表性构象叠合

3.3. 小分子与蛋白氢键相互作用分析

氢键是稳定配体-蛋白复合物的关键作用力。为评估木犀草素与 PTK2 之间氢键相互作用的动态稳定性,我们分析了模拟过程中氢键数量的演变(见图 8)。结果显示,在 100 ns 的模拟中,氢键数量在 0 到 3 个之间波动,并始终维持在一定水平(平均值约为 1~2 个)。值得注意的是,氢键数量并未持续保持在最

大值,而是呈现动态形成与断裂的特征,这反映了溶液环境中分子相互作用的真实物理图像。尽管如此,氢键的持续存在表明木犀草素与 PTK2 活性口袋残基(如对接结果提示的 GLU-500、ASP-564 等)之间形成了稳定的静电相互作用网络。这种动态但持续的氢键作用,与疏水相互作用协同,共同确保了配体在结合口袋内的稳定结合。该结果从关键分子作用力的角度,进一步证实了木犀草素-PTK2 复合物的结合稳定性。

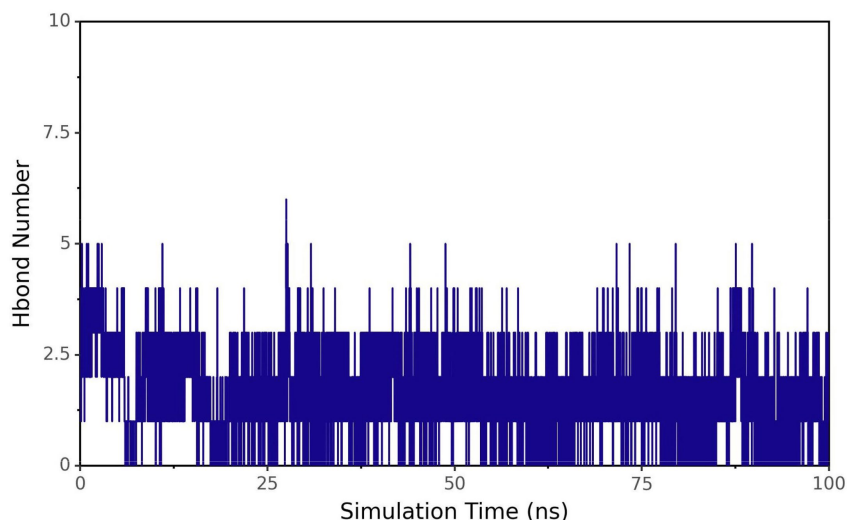


Figure 8. Hydrogen bonds at the Luteolin-PTK2 Binding Interface vs. Time

图 8. 木犀草素与 PTK2 蛋白结合界面氢键数量随时间的变化

3.4. 小分子与蛋白结合的相互作用分析

3.4.1. 静电与范德华力相互作用分析

为定量评估木犀草素与 PTK2 蛋白结合的主要驱动力,我们计算了模拟过程中不考虑溶剂化效应的结合自由能(Binding)及其两个关键组分:范德华力(VDW,包含疏水相互作用)和静电相互作用(ELE),结果如图 9 所示。在 100 ns 的模拟中,总结合能(Binding)在经历约 20 ns 的调整后趋于稳定,其值主要波动于-200 kJ/mol 至-350 kJ/mol 的负值区间。该显著为负的值表明木犀草素与 PTK2 的结合是一个自发过程。对能量分量的分析显示,范德华相互作用(VDW)是结合的主要驱动力,其贡献(约-60 至-150 kJ/mol)远大于静电相互作用(ELE,约-50 至 0 kJ/mol)。值得注意的是,ELE 值在-50 值上下波动,且在某些时刻为正值,这提示蛋白质与配体之间可能存在一定的静电排斥,但其不利影响被强大的范德华吸引力所克服。两种作用力在模拟中后期均达到动态平衡,其叠加效应使得总结合能保持稳定。该能量分析从热力学角度揭示了木犀草素与 PTK2 的结合主要由范德华力(含疏水效应)驱动,并结合能的稳定进一步从能量层面证实了复合物结构的稳定性,与前述结构分析结果相互印证。

3.4.2. 结合能分析

为进一步量化木犀草素与 PTK2 的结合亲和力并揭示其结合驱动力,我们基于分子动力学模拟的稳定轨迹,采用 MM-PBSA 方法计算了结合自由能及其能量分解,结果如表 2 所示。计算得到的总结合自由能(ΔG_{bind})为 -68.815 ± 5.448 kJ/mol,显著负值表明二者结合是一个高度自发的过程,预示着较强的亲和力。能量分解显示,范德华相互作用($\Delta E_{\text{vdw}} = -121.946$ kJ/mol)是结合的最主要驱动力,其贡献占比超过 80%,远高于静电相互作用($\Delta E_{\text{ele}} = -14.852$ kJ/mol)。此外,非极性溶剂化能($\Delta E_{\text{nonpol}} = -15.339$ kJ/mol,

代表疏水效应)也提供了显著的有利贡献,其贡献度与静电作用相当甚至略高。然而,极性溶剂化能($\Delta E_{\text{pol}} = 83.322 \text{ kJ/mol}$)产生了巨大的不利影响,这通常是由于带电残基去溶剂化过程中的能量惩罚所致。最终,气相下的分子力学能($\Delta E_{\text{vdw}} + \Delta E_{\text{ele}}$)的有利贡献成功克服了极性去溶剂化的能量惩罚,从而驱动了自发结合。综上所述,木犀草素与 PTK2 的结合主要由范德华力和疏水效应驱动,该结果从热力学角度定量地证实了二者结合的稳定性,与前述结构动力学分析(如低 RMSD、稳定的结合构象)的结论高度一致。

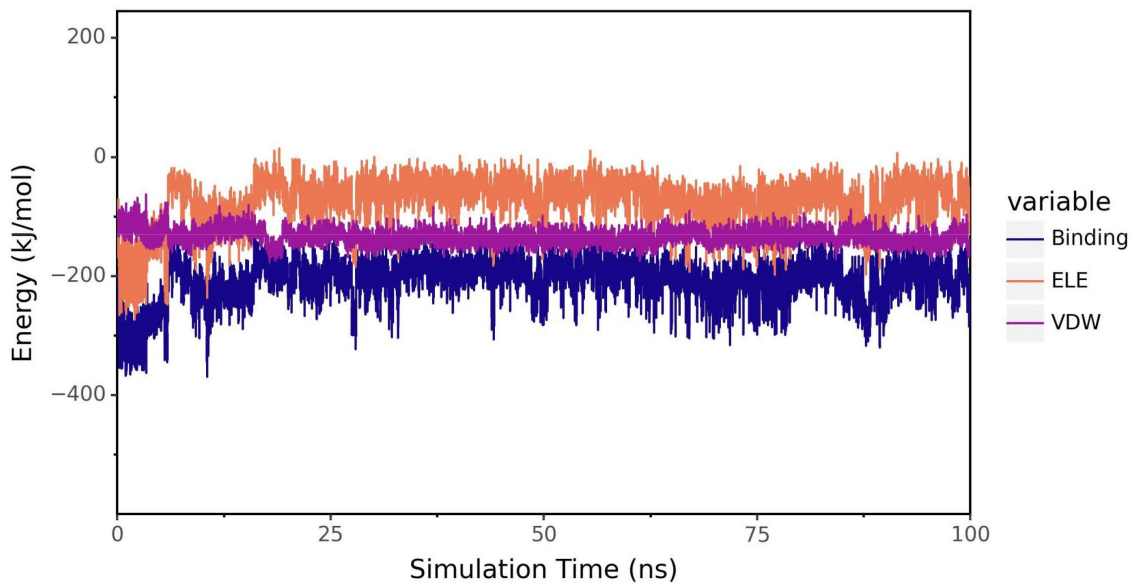


Figure 9. Binding free energy versus time curve
图 9. 结合自由能 - 时间变化曲线

Table 2. Per-residue MM-PBSA Decomposition for the Luteolin-PTK2 Complex (unit: kJ/mol)
表 2. 木犀草素与 PTK2 复合物的 MM-PBSA 结合自由能分解(单位: kJ/mol)

Complex	ΔE_{vdw}	ΔE_{ele}	ΔE_{pol}	ΔE_{nonpol}	ΔE_{MMPBSA}	$-T\Delta S$	ΔG_{bind}^*
Protein-Ligand	-121.946 ± 2.778	-14.852 ± 0.664	83.322 ± 3.47	-15.339 ± 0.156	-68.815 ± 5.448	12.516 ± 2.841	-56.299 ± 6.978

* $\Delta G_{\text{bind}} = \Delta E_{\text{MMPBSA}} - T\Delta S$.

3.4.3. 残基贡献分析

为在分子层面揭示木犀草素与 PTK2 蛋白结合的关键相互作用位点,我们对 MM-PBSA 结合自由能进行了逐残基分解分析,结果如图 10 所示。分析显示,结合自由能的有利贡献主要集中于活性口袋内的多个疏水残基。其中, ILE-428 和 LEU-553 的贡献最为突出(结合能 ΔG 分别低于 -5 kJ/mol 、 -4 kJ/mol),这表明疏水相互作用(范德华力)是结合的主要驱动力,与前述整体结合能分析结论一致。此外, VAL-436, ALA-452, MET-499, LEU-501, CYS-502, LEU-504 等一系列残基也提供了显著的有利贡献,共同在配体周围形成了一个稳定的疏水结合口袋。特别值得注意的是,在分子对接中与木犀草素形成氢键的 CYS-502 也表现出显著的负结合能,这证实了该氢键相互作用在动态结合过程中同样稳定存在,这提示木犀草素可能具备抑制相关激酶的潜力,但也可能影响其选择性,未来优化需关注于此。该残基能量分解图从原子层面直观地展示了木犀草素与 PTK2 结合的关键“热点”残基,揭示了其结合主要由广泛的疏水效应介导,并与特定的氢键相互作用协同,为理解其高亲和力的结构基础提供了直接证据。

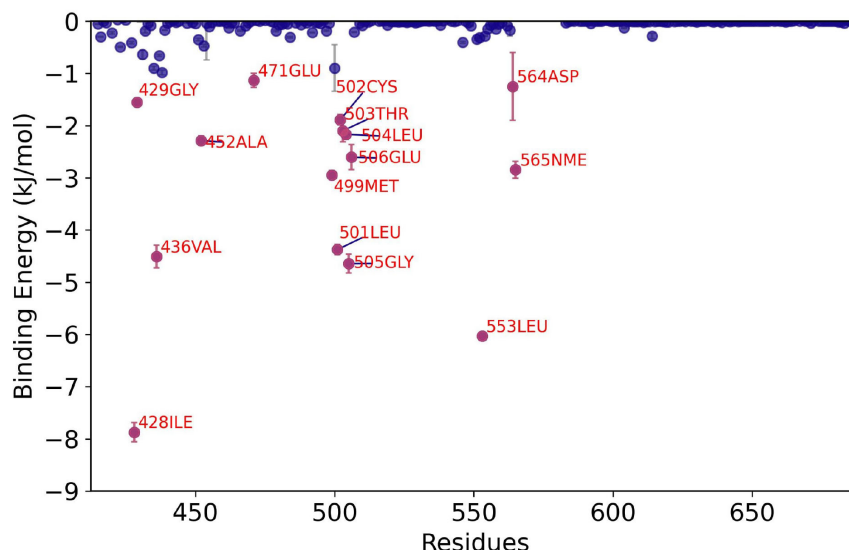


Figure 10. Per-residue Decomposition of the Luteolin-PTK2 Binding Free Energy
图 10. 木犀草素与 PTK2 结合自由能的残基贡献分解

4. 结论

本研究通过整合分子对接、分子动力学模拟与结合自由能计算，系统地阐明了天然产物木犀草素作为蛋白酪氨酸激酶 2(PTK2)潜在抑制剂的高效结合机制与卓越的稳定性。分子对接结果首先预示了木犀草素与 PTK2 结合口袋具有高亲和力(结合能为 -8.0 kcal/mol)。随后，长达 100 纳秒的分子动力学模拟从多个维度验证了这一结合的稳定性：复合物、蛋白质及配体本身的均方根偏差迅速收敛并维持在较低水平；回转半径与埋藏溶剂可及表面积的分析表明复合物结构紧密且结合界面稳定；配体质心与蛋白质活性口袋的距离始终保持在极小范围内波动，直观地证实木犀草素被牢固地限定于结合位点内，未发生解离。此外，残基涨落分析显示，配体的结合有效稳定了活性口袋区域的构象动态。

在作用机制层面，结合自由能计算揭示了木犀草素与 PTK2 的结合是一个由疏水相互作用主导的自发过程。范德华力是驱动结合的最核心贡献项，而动态形成且持续存在的氢键网络则提供了关键的特异性识别。对结合自由能进行残基分解进一步在原子尺度上识别出 ILE-428、LEU-553、CYS-502 等一系列关键“热点”残基，它们共同构成了一个稳定的疏水结合环境，并与配体形成优势互补。

综上所述，本研究通过计算模拟预测木犀草素可能作为 PTK2 的高效抑制剂。然而，必须指出本研究的局限性：作为一项纯计算模拟研究，其结果主要提供理论预测和机制假说，其可靠性仍需后续的体外和体内实验(如结合 assays、细胞水平抑制实验等)进一步验证。此外，计算模型本身(如力场精度、模拟时间尺度)也存在固有近似。尽管如此，本研究从原子水平揭示了木犀草素与 PTK2 的相互作用机制，提示了其结合主要由疏水作用驱动，并为基于结构的先导化合物优化提供了重要的理论依据和精确的改造方向。

基金项目

广西中医药大学 2025 年中国 - 东盟中医药技术创新学院建设专项课题(050250060611)。

参考文献

- [1] Kim, J., Kang, W., Kang, S.H., Park, S.H., Kim, J.Y., Yang, S., *et al.* (2020) Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 Mediates

- Transforming Growth Factor-Beta-Induced Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrosis. *Scientific Reports*, **10**, Article No. 21018. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78056-0>
- [2] Sakai, M. and Yoshimura, R. (2021) Mechanotransduction-Targeting Drugs Attenuate Stiffness-Induced Hepatic Stellate Cell Activation *in Vitro*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **44**, 416-421. <https://doi.org/10.1248/bpb.b20-00815>
- [3] Liu, L., Li, B., Zhang, Y., Nie, Y., Zhang, W., Chen, P., *et al.* (2025) MFAP4 Deficiency Attenuates Liver Fibrosis by Regulating Hepatic Stellate Cell Fate through Inhibition of the FAK/PI3K/NFκB Signaling Pathway. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, **19**, Article ID: 101548. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2025.101548>
- [4] Li, Y., Chen, L., Li, S., Song, H., Chen, Y. and Wang, S. (2024) The M6a Reader IGF2BP1 Contributes to the Activation of Hepatic Stellate Cells through Facilitating TUBB4B mRNA Stabilization. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **39**, 2916-2925. <https://doi.org/10.1111/jgh.16765>
- [5] Ezzat, M.I., Okba, M.M., Ahmed, S.H., El-Banna, H.A., Prince, A., Mohamed, S.O., *et al.* (2020) In-Depth Hepatoprotective Mechanistic Study of *Phyllanthus niruri*: *In Vitro* and *in Vivo* Studies and Its Chemical Characterization. *PLOS ONE*, **15**, e0226185. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226185>
- [6] Balkrishna, A., Sakat, S.S., Ranjan, R., Joshi, K., Shukla, S., Joshi, K., *et al.* (2020) Polyherbal Medicine Divya Sarva-Kalp-Kwath Ameliorates Persistent Carbon Tetrachloride Induced Biochemical and Pathological Liver Impairments in Wistar Rats and in HepG2 Cells. *Frontiers in Pharmacology*, **11**, Article No. 288. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00288>
- [7] Li, J., Li, X., Xu, W., Wang, S., Hu, Z., Zhang, Q., *et al.* (2014) Antifibrotic Effects of Luteolin on Hepatic Stellate Cells and Liver Fibrosis by Targeting AKT/mTOR/p70S6K and TGFβ/Smad Signalling Pathways. *Liver International*, **35**, 1222-1233. <https://doi.org/10.1111/liv.12638>