

肿瘤坏死因子- α 中药小分子抑制剂的计算机虚拟筛选

朱伟^{1*}, 姚丽梅²

(1. 广东省中医院, 广州 510006; 2. 广东食品药品职业学院, 广州 510520)

[摘要] 目的: 运用计算机虚拟筛选技术快速搜索肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的中药小分子抑制剂。方法: 采用 Accelrys 公司 Discovery Studio 分子模拟软件包(版本 2.5), 对蛋白质晶体结构数据库 PDB 中 TNF- α 与小分子抑制剂(化合物 307)形成的复合物(PDB 代码:2AZ5) 三维结构活性部位进行分析, 通过 ligandfit 模块进行分子对接。运用药代动力学参数预测和毒性预测等模块对分子对接结果进行 2 次筛选。结果: 以原配体(化合物 307)的 Dockscore 值为阈值, 筛选出中国天然产物数据库中 12 个类药性良好的化学成分与 TNF- α 存在较强的相互作用。结论: 该研究结果可促进治疗类风湿性关节炎、炎性肠病等病的新型药物研制。

[关键词] 计算机虚拟筛选; 中药; 肿瘤坏死因子- α

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)13-0199-04

Virtual Screening for Small Molecule Inhibitors of Tumor Necrosis Factor- α Based on Database of Traditional Chinese Medicine

ZHU Wei^{1*}, YAO Li-mei²

(1. Guangdong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510106, China;

2. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China)

[Abstract] Objective: To report the preliminary result of virtual screening small molecule inhibitors of tumor necrosis factor- α (TNF- α) based on the traditional Chinese medicine database. **Method:** Based on the optimized complex structure of TNF- α bound with specific inhibitor (compound 307, PDB code 2AZ5), computer-aided structure-based virtual screening against Chinese Natural Product Database (CNPD) was conducted to determine the occurrence of herb-based TNF- α inhibitors in the software package Discovery Studio (2.5) of Accelrys company. The virtual screening results were further filtered by predictive ADME simulation and predictive toxic simulation. **Result:** According to the dockscore of original inhibitor (compound 307) and the receptor as threshold value, 12 drug-like molecules were predicted to have good interactions with TNF- α . **Conclusion:** It is expected that the TNF- α small molecule inhibitors identified at present study could be helpful for development of new drug to treat rheumatoid arthritis and inflammatory bowel disease.

[Key words] virtual screening; traditional Chinese medicine; tumor necrosis factor- α

肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是一类由单核-巨噬细胞及其他多类细胞合

成、释放,引起全身系统性炎症反应的细胞因子(图 1)。TNF- α 在体内的大量产生和释放则会破坏机体的免疫平衡,与其他炎症因子一起产生多种病理损伤,例如恶病质和败血症休克所致的多器官功能衰竭、类风湿性关节炎、多发性硬化症、炎症性肠病、移植物抗宿主病和骨髓造血紊乱综合征等多种疾病。目前的研究表明应用 TNF- α 的拮抗剂治疗类风湿性关节炎等自身免疫性疾病取得了肯定的效果,

[收稿日期] 20100521(001)

[基金项目] 广东省自然科学基金课题(9151063201000050); 广东省中医药局建设中医药强省科研课题(2008334)

[通讯作者] * 朱伟, 博士, 副研究员, 从事中药物质基础研究, Tel: 020-39318571, E-mail: zhuwei9201@163.com

为这些疾病的治疗提供了一条新的途径^[1-2]。开发新型小分子 TNF- 抑制剂将为许多患者减轻病痛, 本研究采用分子对接方法和 ADMET 预测相结合的方法快速筛选 TNF- 的天然配体, 为小分子 TNF- 抑制剂的研发先导化合物。

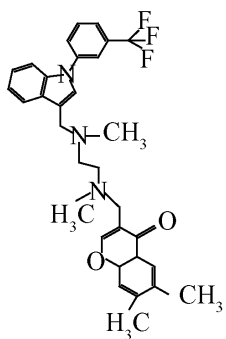


图 1 小分子 TNF- 抑制剂(化合物 307) 化学结构式

1 资料与方法

分子构建、能量优化和对接研究均采用在 Accelrys 公司 Discovery Studio 分子模拟软件包(2.5 版), 在 HP xw6600 图形工作站上完成, 取蛋白质晶体结构数据库 PDB(www.rcsb.org/pdb) 中 TNF- 与小分子抑制剂(化合物 307) 形成的复合物(PDB 代码:2AZ5) 中的化合物 307 活性构象为模板(化合物 307 为世界上首个 TNF- 小分子抑制剂, 分子结构式见图 1)。受体大分子与小分子的处理在对接前先进行一定的处理, 删除受体大分子(2AZ5) PDB 文件中的水分子, 加上极性氢原子, 赋予电荷。中国天然产物数据库^[3-4] 中所有 57 000 多种小分子化合物的三维结构均采用 MMFF 力场进行优化, 并加载电荷。以原配体化合物 307 分子所在的位置作为结合位点, 半径为 0.65 nm 内的所有子结构作为结合位点的活性口袋部分。配体分子在受体活性口袋中的可能构象模式采用 Ligandfit 方法^[5] 进行采集。然后运用系列命令如定义小分子的柔性部位, 设定对接参数在 ligandfit 模块中完成对接, 根据配体-酶相互作用能量大小和几何构型匹配程度确定相互作用强的候选化合物。配体每产生一个新的构象, 就进行配体和受体之间的分子对接。在 Ligandfit 计算中, 最大保存构象设为 100, 其他参数为 Ligandfit 给定的缺省值。蛋白质的结构在对接时保持刚性, 因为每个配体中可旋转单键数目的不同, 所以每个配体得到的结合构象从 2 ~99 个。由于采用的是柔性对接, 因此能够较好地考虑对接过程中配体与受体的构象变化。Ligandfit 模块中的 Dockscore 是对能量、几何形状、化学环境综合评价的参数, 因此采用 Dockscore 作为打分函数来评价对接结果。分子对

接结果运用 ADME Descriptors 模块进行化学成分的吸收、分配、代谢和排除的性质及其机制的研究, 运用 Toxicity prediction(TOPKAT) 模块进行化学成分的毒性预测。

2 结果

笔者对中国天然产物数据库中 57 000 多个小分子化合物进行 TNF- 小分子抑制剂的计算机虚拟筛选, 以原配体(化合物 307) 的打分函数作为一个阈值, 分子对接技术筛选出 86 个与 TNF- 相互作用强的小分子化合物。随后的 ADMET 预测排除了其中 74 个小分子化合物, 最后得到 12 个类药性良好的小分子化合物(表 1)。

表 1 TNF- 中药小分子抑制剂计算机虚拟筛选

化合物	主要来源植物
青藤碱	青风藤、蝙蝠葛、蝙蝠葛根
胀果甘草查耳酮 A	胀果甘草、黄甘草
苦参碱	苦参、山豆根、白刺花、苦豆子、黄叶槐
京尼平苷	栀子、杜仲、干地黄、五色梅、水栀、矮株木
芍药苷	赤芍药、白芍药、草芍药、川芍药、牡丹皮
巴马汀	黄连、华南功劳叶、马尾连、延胡索、天仙藤
熊果酸	车前、赤楠、丹参、连翘、山茱萸、女贞子、
车叶草苷	八仙草、栀子、大车前、鸡屎藤、蓬子菜
齐墩果酸	白花蛇舌草、丁香、大车前、藿香、青叶胆
柯里拉京	珍珠草、油柑叶、老鹳草、蓖麻子、庵摩勒
白矢车菊素	阿拉伯金合欢、白饭豆、番石榴、啤酒花、山楂叶
槲皮素	白果、仙鹤草、三七、石韦、黄花蒿、蒲黄、鱼腥草

3 讨论

1975 年 TNF- 首次被发现, TNF- 主要来源于单核细胞和巨噬细胞, T 淋巴细胞、中性粒细胞、肥大细胞。成熟 TNF- 分子量为 17KD, 以三聚体形式与细胞表面的 TNF- 受体结合。它可以激活 Caspase 蛋白酶、JNK 和转录因子 NF- B 3 条信号通路, 实现其细胞毒性、抗病毒、免疫调节和细胞凋亡等多种生物学功能。TNF- 的促进炎症反应作用对许多自身免疫性疾病, 如风湿性关节炎、炎性肠病、类风湿关节炎等病都起到非常重要作用。TNF- 在自身免疫性疾病中大量表达, 并激活更多炎性相关细胞因子的释放, 从而导致靶器官的损害。因此, 当前治疗自身免疫性疾病的一个新思路就是通过拮抗 TNF- , 减轻 TNF- 诱导的炎症反应。目前主要有 2

种对抗 TNF- α 的药物,一类是抗 TNF- α 的抗体,包括福利美 (infliximab) 和阿达木单抗 (adalimumab),直接中和 TNF- α ,降低 TNF- α ;另一类是可溶性 TNF- α 受体融合蛋白依那西普 (etanercept),通过和 TNF- α 受体的竞争性结合 TNF- α ,达到阻断 TNF- α 激活的炎性信号传导通路。已有的拮抗剂均属于单克隆抗体药物,其主要优点是特异性强,但也存在一些自身的缺点:均为蛋白质多肽类物质,易被蛋白酶分解,在体内不稳定,不能口服;这类药物大量制备和纯化比较困难,价格昂贵,许多患者特别是像我国患者难以承担;多为鼠源性抗体,易引起人体产生免疫反应,出现过敏反应等严重的副作用。如果开发出新型 TNF- α 小分子抑制剂将给许多疾病的治疗带来重大突破,正是因为看到广阔的市场前景,这方面的研究近年来成为研究者关注的焦点。2005 年人们发现了第 1 个 TNF- α 小分子抑制剂(化合物 307,化学名:3-{N,N'-N,N'(1-三氟甲基苯-3-甲基吡啶)甲基乙烷氨基}甲基甲氨}-6-7-二甲基色原酮)^[6],化合物 307 的成功使人们看到了 TNF- α 小分子抑制剂的研发前景,各大制药公司纷纷跟进。

天然活性产物的多样性是创制新型药物的重要来源,自然界生物的多样性决定了天然产物的多样性。天然活性产物多为次级代谢产物,其结构的独特性和新颖性往往决定了生物活性的特异性,因此是发现先导物的重要途径,不少历史上的重要药物如麻黄碱、吗啡等药物均源自于天然产物。但是由于中药成分和作用靶点均十分复杂,如果将各成分分离提纯出来,测其分子结构,并进行相应的药理试验,其工作量巨大,耗时长,成本高,且只能是小规模筛选。计算机辅助分子设计的建立,开拓了新的药物研究领域和方法,从原子和基因水平研究药物——受体相互作用。如果将中药或复方看成天然组合化学库,在目前已知的中药或复方有关化学成分信息基础上,利用计算机虚拟药物筛选技术筛选先导化合物,为实验进行提供重要的信息,这会使得实验具有比较强的导向性,提高药物设计的命中率,同时减少大量人力、物力的投入^[7-11]。

药物与受体分子的分子识别和相互作用,是引发药理活性的原动力。分子识别是由于药物与受体之间存在的互补性所引起的,该互补性包括形状的适配、电性的互补和力场的契合等,互补性也是基于受体三维结构设计新型药物的理论基础。分子对接

(Docking) 是基于受体(三维结构已知)药物设计中的一类重要方法。它是通过模拟药物分子与受体结合部位相互作用并评价结合的强弱优劣来实现药物分子设计的。为了确定结合部位的位置,最常用的方法是从配体—受体复合物的三维结构出发,因为配体在受体的定位,往往是启动生物活性的基源。在对接研究中,首先进行形状匹配,通常是用分子内原子距离配对的方法模拟配体与受体的相互作用。分子对接的评分系统用来评定配体与受体相互作用的优劣,高分值作为入选物,低分值不予入选。与其它的计算机辅助药物设计方法相比较,分子对接方法直接研究配体受体相互作用,具有直观、形象的特点,以及明确的物理意义。同时分子对接方法是从整体上考虑配体与受体相互作用,避免了基于配体的药物设计方法中只能关注配体分子局部,而不能兼顾分子整体性质的缺陷。现在,分子对接是理性药物设计的研究热点之一,分子对接方法在药物的开发研制中已经得到广泛应用,并且取得了一些令人瞩目的成就^[12-13]。

一个成功的药物包含了有效性、安全性和药物动力学性质 3 项指标的综合优势。分子对接只考虑受体和配体的作用,而未考虑药物分子的体内过程。药物的体内代谢性质主要包括吸收 (absorption)、分布 (distribution)、代谢 (metabolism)、排泄 (excretion) 等方面,加上毒性 (Toxicity) 合称药物的 ADMET 性质。如果要提高计算机虚拟筛选技术的命中率,除了考虑配体与受体的相互作用外,还要考虑分子的种类药性、毒性、化学稳定性和合成的难易性以及体内转运和代谢分布等药代动力学方面的性质。因为即使目标化合物有很强的受体亲和活性,但如果在生物利用度、体内代谢或毒理测试中落选,基本上将意味着整个药物开发项目的失败,“配体设计不是药物设计”,在这方面很多研究机构和制药公司都有过惨痛的教训^[14-15]。解决失败率较高问题的主要思路之一是在早期对候选化合物的 ADMET 性质进行预测和综合评价,国际上新药研发策略也从过去串行的研究方式向并行方式转变,ADMET 研究显得越来越重要。

本研究者采用分子对接和 ADMET 预测相结合的方法快速筛选出了一批与 TNF- α 相互作用强并且类药性良好的化合物,结果可为治疗类风湿性关节炎、炎性肠病等病的新型药物研制提供宝贵数据,并

有助于揭示药物分子与 TNF- α 的作用机制。

[参考文献]

[1] Scheinfeld N. A comprehensive review and evaluation of the side effects of the tumor necrosis factor alpha blockers etanercept, infliximab and adalimumab[J] . J Dermatolog Treat, 2004, 15 (5) : 280.

[2] 金艳艳, 胡坚. 抗 TNF- α 治疗的最新研究进展[J] . 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21(S1) : 68.

[3] 李洪林, 沈建华, 罗小民, 等. 虚拟筛选与新药发现[J] . 生命科学, 2005, 17(2) : 125.

[4] Shen J H, Xu X Y, Cheng F, et al. Virtual screening on natural products for discovering active compounds and target clues[J] . Curr Med Chem, 2003, 10: 2327.

[5] Discovery Studio, version 2.5. Accelrys Inc. <http://www.accelrys.com>

[6] He M M, Smith A S, Oslob J D, et al. Small-molecule inhibition of TNF-alpha[J] . Science, 2005, 310: 1022.

[7] 朱伟, 陈可冀, 徐筱杰. 计算机药物虚拟筛选技术在中医药领域的应用前景[J] . 中国中西医结合杂志, 2007, 27(3) : 236.

[8] 朱伟, 黄钦, 陈可冀, 等. 11 种结合自由能评价函数对中草药中法尼酯受体的配体预测比较[J] . 计算机与

应用化学, 2007, 24(1) : 94.

[9] 高维娜, 李云, 张瑞, 等. 基于中药数据库的 HIV 抑制剂的筛选[J] . 药学学报, 2006, 41(3) : 241.

[10] 李旭东, 徐筱杰, 胡娟. 基于药效团模型从中草药数据库中搜索 gpIIb/IIIa 受体抑制剂[J] . 物理化学学报, 2008, 24(2) : 307.

[11] 朱伟, 黄钦, 陈可冀, 等. 调脾护心方的化学信息学研究[J] . 中国中西医结合杂志, 2010, 37(2) : 133.

[12] Cozza G, Bonvini P, Zorzi Z, et al. Identification of ellagic acid as potent inhibitor of protein kinase CK2: A successful example of a virtual screening application[J] . J Med Chem, 2006, 49(8) : 2363.

[13] Zhao L Q, Brinton R D. Structure-based virtual screening for plant-based ER α -selective ligands as potential preventative therapy against age-related neurodegenerative diseases[J] . J Med Chem, 2005, 48: 3463.

[14] Oprea T I. Virtual screening in lead discovery: A viewpoint [J] . Molecules, 2002, 7(1) : 51.

[15] Schneider G. Virtual screening: an endless staircase [J] . Nature Reviews Drug Discovery, 2010, 9: 273.

[责任编辑 邹晓翠]