

论 著
(药学研究)基于分子模拟技术的核因子 κ B 蛋白解离阻滞化合物
筛选

梁佳龙, 刘飞远, 孙智勇, 刘建青

【摘要】 目的 筛选一种可以切断核因子 κ B 蛋白(NF- κ B)解离功能的先导化合物。 **方法** 构建 NF- κ B 的抑制蛋白 I- κ B 与内源性配体之间的药效团模型,使用分子对接、动力学模拟技术,找到具有可抑制 NF- κ B 解离作用、可应用于紫外线损伤修复的先导药物。 **结果** 经过分子动力学模拟,证实 276 号化合物与 I- κ B 蛋白结合稳定,可阻断 NF- κ B 解离。 **结论** 276 号化合物作为 NF- κ B 解离阻滞剂,可用于开发抗紫外线损伤药物的深入研究。

【关键词】 分子模拟;核因子 κ B 蛋白;药效团;分子对接;虚拟筛选;分子动力学

【中图分类号】 R914.2 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2022)02-0167-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2022.02.012

Screening of NF- κ B dissociation blocking compounds based on molecular simulation technologyLIANG Jia-long¹, LIU Fei-yuan¹, SUN Zhi-yong¹, LIU Jian-qing²

(1. Medical Security Center, No. 946 Hospital of People's Liberation Army Ground Force, Yining 835000, Xinjiang, China; 2. School of Biological Science and Technology, Baotou Teachers College, Baotou 014030, Inner Mongolia, China)

【Abstract】 Objective To find a compound that can block the dissociation function of NF- κ B. **Methods** We constructed a pharmacophore model between I- κ B protein and endogenous ligands, screened compound databases, and used molecular docking and molecular dynamics simulation methods to identify lead compounds that potentially inhibited NF- κ B dissociation, and analyzed the mode of binding between it and the receptor protein. **Results** The screened compound No. 276, molecular dynamics simulation showed that it formed a stable interaction mode with I- κ B protein and blocked the dissociation process of NF- κ B. **Conclusion** Compound 276 may be a potential NF- κ B dissociation blocker. This research lays a theoretical foundation for the next step in the research and development of anti-UV damage drugs.

【Key words】 molecular simulation; NF- κ B; pharmacophore; molecular docking; virtual screening; molecular dynamics

0 引 言

高原地区强紫外线辐射导致各类皮肤问题严重影响、困扰驻地群众、官兵的身心健康和工作、生活质

量。有研究报道,喀喇昆仑高原进驻官兵皮肤患病率高于平原地区进驻者,达到 54.29%^[1]。诱发紫外线损伤的因素众多,其中核因子 κ B 蛋白(NF- κ B)是其中之一。NF- κ B 蛋白作为细胞中的核转录因子^[2-3],通常在细胞质中,以二聚体的形式存在^[4],处于非活化态。机体在受到细菌、病毒感染^[5],紫外线照射^[6-7],发生免疫、炎症和应激反应时^[8],抑制物 I- κ B 可被激活并被泛素依赖性蛋白酶所降解^[9-10],从而释放出 NF- κ B,其进入细胞核内可以激活靶基因的

基金项目:国家自然科学基金(81760590);全军后勤科研计划面上项目(CIJ20J027)

作者单位:835000 伊宁,解放军陆军第九四六医院医疗保障中心(梁佳龙、刘飞远、孙智勇);014030 包头,包头师范学院生物科学与技术学院(刘建青)

通信作者:孙智勇, E-mail: szy_1979@sina.com

转录^[11],影响细胞的分化和发育^[12],诱发细胞的无限增殖从而导致癌症。本研究旨在应用分子模拟技术寻找一种可以切断 NF- κ B 解离功能的先导化合物,为研发抗紫外线损伤药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 数据来源 Studer 等^[13]课题组的研究发现一种内源性化合物具有 NF- κ B 解离阻滞功能,其在蛋白质晶体结构资料数据库 (Research Collaboration for Structural Bioinformatics, Protein Data Bank, 简称 RCSB PDB) 中编码是 6SH6。

1.2 实验软件 使用 Discovery Studio 3.5 (DS3.5) 软件进行全部分子模拟计算。

1.3 药效团模型的构建 为提高药效团模型对化合物数据库筛选的精度和成药性^[14],本研究药效团模型以基于配体-受体相互作用模式进行构建。在 DS3.5 软件中, π - π 堆积的判断条件为两组结构几何中心相互之间的距离在 5.5 Å 之内,且两组芳香环几何平面之间几何中垂线夹角在 50° 以内,氢键的判断条件为两组结构几何中心之间的距离在 3.8 Å 之内。

1.4 虚拟筛选 使用加州大学旧金山分校 (UCSF) 的 ZINC15 数据库进行数据库构建,依据成药五规则精简化合物,应用 DS3.5 软件中的 build 3D 数据库工具构建化合物数据库,共得到 10342180 个符合成药 5 规则的化合物的数据库,从中再用药效团模型进行虚拟筛选。

1.5 分子对接 为确定分子对接的算法优劣^[15-16],使用 DS3.5 软件中的 Ligandfit、CDOCKER、Libdock 三种对接方法分别将 6SH6 晶体复合物结构中内源性小分子与受体蛋白质进行对接,验证对接是否能重现 6SH6 中的结合作用模式,选用复现结合作用模式最佳的对接方法^[17-18],进行精密的分子对接实验,以便将对接结果最好的化合物筛选出来。

1.6 分子动力学模拟 将分子动力学模拟的起始状态设定为 1.5 分子对接实验中获得的最优结构,使用 DS3.5 软件中的 solvation 算法模块,模拟细胞质溶液中的状态。使用标准动力学级联 (standard dynamics cascade, SDC) 算法进行分子动力学模拟,设定溶液基准温度为 300K,动态过程选用升温-平衡-降温程序,平衡过程选用恒温恒压参数进行,采样间隔 2fs,动态模拟 500ns 中结合作用模式的动态

变化过程。计算受体蛋白的各氨基酸的均方根涨落 (root mean square fluctuation, RMSF) 值。RMSF 值表示在分子动力学模拟的过程之中氨基酸运动的自由程度。在 DS3.5 软件之中,RMSF 的计算原理是将氨基酸中的各原子作为一个整体,计算其在分子动力学模拟的整体时间之中偏移距离平方之和随时间平均的平方根。

2 结 果

2.1 内源性 NF- κ B 解离阻滞化合物结合作用模式和药效团模型 为寻找具有潜在阻断 NF- κ B 解离过程的药物分子,本研究通过对 6SH6 晶体结构解析可知,其与受体蛋白之间可以形成多组相互之间作用,其三维结构见图 1。其与 I- κ B 蛋白之间相互作用,具体表现为:化合物的嘧啶并咪唑杂环于 204Arg、401Phe 共形成 2 组 π - π 堆积,距离分别为 4.08 Å、4.48 Å,呋喃环上的羟基与 431Asp 形成 1 组氢键,距离为 2.31 Å,两个磷酸残基则分别于 163Gly、164Ser、165Gly、166Lys、167Thr、168Thr 形成氢键相互作用,距离分别是 2.67 Å、3.10 Å、3.10 Å、2.67 Å、2.97 Å、2.93 Å。据此相互作用关系,课题组共构建了 6 个药效团的模型,分别包含了 3 组氢键受体、2 组氢键供体和 1 组 π - π 堆积效应。

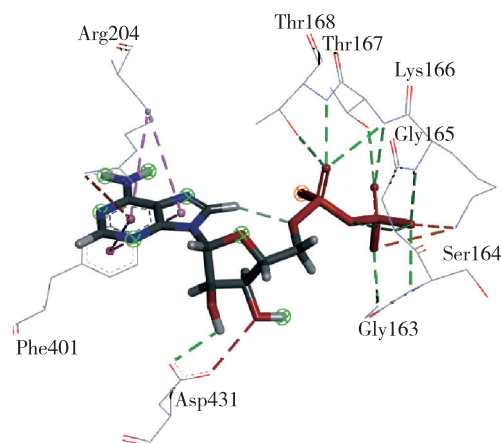


图 1 内源性 NF- κ B 解离阻滞化合物与受体蛋白结合三维结构图

2.2 粗筛结果 使用 ZINC15 化合物数据库对上述构建的药效团模型进行筛选,共筛选出 347 个与药效团模型相符合的化合物。

2.3 对接方法选定与对接结果 对 Discovery Studio3.5 软件中提供的 3 种不同分子对接方法 (Ligandfit、CDOCKER、Libdock) 进行预实验的结果

显示,基于能量最低的 CDOCKER 方法在重复复合物晶体结构相互之间作用模式过程中表现最佳。因此上述通过药效团模型筛选得到的 347 个化合物与 6SH6 蛋白受体进行的分子对接,决定选用 CDOCKER 的算法进行。除去所有原本存在于 6SH6 复合物晶体结构中的配体分子,将蛋白质中的氨基酸残基全部补齐,并将其中的水分子去除,选用 CHARMm 力场作为分子对接的力场,对接区域范围设定为原化合物中心区域半径 10Å 范围,每个化合物对接结果均保留得分最高的 10 个构象。结果显示:276 号化合物在前 10 个打分最高的构象中占了 60%,其中排名第一的化合物结构见图 2。

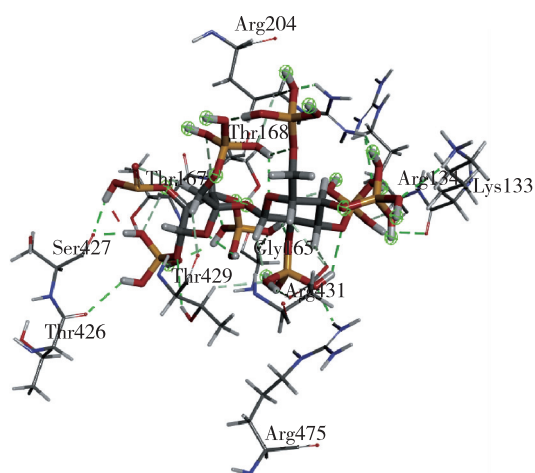


图 2 276 号化合物与与受体蛋白结合三维结构图

将内源性化合物与蛋白结合作用结构图与本研究筛选得到的 276 号化合物与蛋白结合作用结构图进行叠加,从中可见两者处于同一蛋白活性口袋中,具有高度相似的结合作用模式,证实筛选结果有效。见图 3。

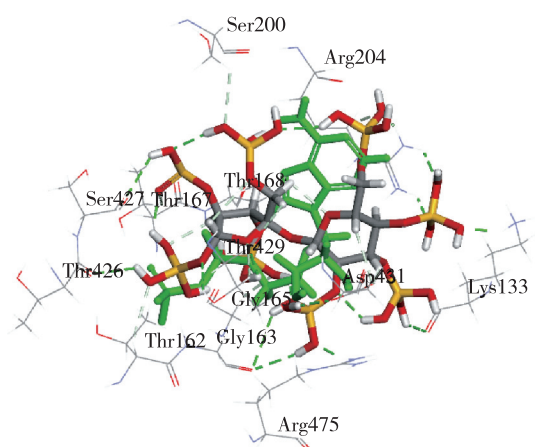


图 3 276 号化合物(灰红)、内源性化合物(绿色)与受体结合三维结构图

276 号化合物结构中的 8 个磺酸基团分别于 Lys133, Arg 134, Gly 165, Thr 167, Thr 168, Arg 204, Thr 426, Ser 427, Thr 429, Asp 431, Arg475, 分别形成了 11 组氢键,距离分别为 2.85Å、2.58Å、2.39Å、2.73Å、2.48Å、2.02Å、2.53Å、1.94Å、2.90Å、2.06Å、2.08Å。

2.4 分子动力学模拟结果 276 号化合物与 6SH6 的分子动力学模拟实验持续约 16 h,体系温度维持在 296.51~302.61 K 之间。受体蛋白的各氨基酸的 RMSF 值见图 4。276 号化合物与受体蛋白结合部位的氨基酸 RMSF 值较小,关键作用部位的结合作用稳定。

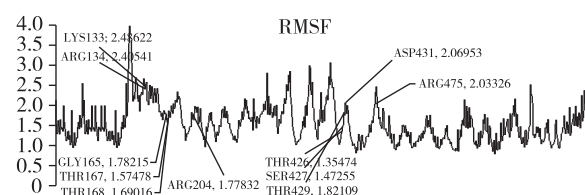


图 4 受体蛋白各氨基酸均方根涨落(RMSF)图

3 讨 论

NF-κB 可被细胞活素、氧自由基、吸入性颗粒、促有丝分裂剂、有毒金属、紫外线照射等激活,在皮肤癌的发生、发展和恶化之中起到了关键的作用。紫外线中的 UVB 照射皮肤后可促使皮肤内氧自由基形成,激活 NF-κB,引起皮肤加速老化,皮肤肿瘤形成和免疫抑制反应导致急性皮肤晒伤。抑制 NF-κB 的活性,是化学药物预防皮肤癌和抗紫外线损伤发展的关键。目前一些 NF-κB 抑制剂已经被运用于皮肤癌治疗过程中,并取得了一定的效果。如何筛选出特异性强、不良反应小的 NF-κB 抑制剂是目前研究的关键。

尽管本研究得到的 276 号化合物在对接结果、分子动力学模拟等方面都展现出了其在抑制 NF-κB 解离方面可能具有一定的效果,但这种结果只是基于计算机模拟的结果,其真正是否具有药理活性,还需要动物实验来进行验证,但新药研发是一个长期且投入巨大的工作过程,而利用计算机的辅助筛选技术可以大大降低研究的时间和成本,提高新药

发现的概率,而且随着学术界对 NF- κ B 的蛋白质晶体结构的深入广泛研究,在一定程度上为我们发现 NF- κ B 解离阻滞化合物方面,在筛选的准确性方面,提供了有力的保障。

与 Studer 等^[13]课题组发现的内源性解离阻滞化合物相比,本研究中筛选得到的可能具有解离阻滞作用的 276 号化合物,两者与蛋白的相互作用都是静电相互作用,且都是电中性。虽然静电相互作用是这类分子与蛋白相互作用的关键,但从本研究筛选结果以及 Studer 等^[13]课题组的研究结果看,化合物极性可能不是这类药物筛选的关键,但为了确保筛选结果的准确,后期本研究将对化合物不同极性的结合作用效果进行进一步验证,以期得到更好的先导化合物。

本研究得到的 276 号化合物是基于分子模拟技术的药物理性设计结果,其是否具有 NF- κ B 解离阻滞效果还需要进一步的活性试验。后续可对 6SH6 蛋白进行定点突变,对 Lys133, Arg 134, Gly 165, Thr 167, Thr 168, Arg 204, Thr 426, Ser 427, Thr 429, Asp 431, Arg475 等氨基酸位点进行定点突变,观察其余受体蛋白结合的程度从而初步判断 276 号化合物的生物活性。

通常口服药物分子的相对分子质量不超过 500,而 276 号化合物约为 965.87,且其结构之中包含多个磺酸基的结构,在化合物成药性上存在一定的不足。之所以在打分系统中没有将相对分子质量低于 500 纳入打分系统,主要考虑在虚拟筛选过程中,化合物之间相互作用的稳定性更显得尤为重要。虽然化合物相互作用稳定性强且相对分子质量低于 500 的化合物是最理想的筛选结果,但从本研究中筛选得到的 347 个先导化合物中,相对分子质量低于 500 的先导化合物与受体蛋白之间的结合作用模式均弱于 Studer MK 课题组中的内源性化合物,因此本研究中保留了部分相对分子质量大于 500 的化合物结构。后期,在确保结合作用模式不减弱的情况下,课题组将重点考虑对 276 号化合物的结构进行改造,如考虑削减磺酸基基团,运用质量较轻且结构类似的基团进行替代,以改善其在体

内的 ADMET (Absorption 吸收、Distribution 分布、Metabolism 代谢、Excretion 排泄、Toxicity 毒性)性质。

对于 NF- κ B 解离阻滞化合物的研究,本课题组在现有研究基础上,下一步将对得到的 276 号化合物开展更为深入的理论研究,如:分子轨道能量、关键氨基酸残基的能量差异以及作用力特征等信息,从而对新药研发提供更多的理论支撑,此外建立紫外线损伤大鼠动物模型,尽早开展动物活性实验也是必不可少的工作。

本研究通过构建 NF- κ B 的抑制蛋白 I- κ B 与内源性配体之间的药效团模型,使用分子对接、动力学模拟技术,找到具有可能具有抑制 NF- κ B 解离作用、可用于抗紫外线损伤的先导药物。通过对该先导化合物的结合作用模式进行分析、分子动力学模拟实验,显示 276 号化合物与 I- κ B 蛋白可以形成稳定的作用模式,从而阻断 NF- κ B 的解离。因此,276 号化合物可能是潜在的 NF- κ B 解离阻滞化合物,可能具有抑制外界刺激下细胞的无限增殖等癌变过程的效果。

【参考文献】

- [1] 高钰琪,黄 斌.炎症反应与高原病[J].第三军医大学学报,2016,38(3):215-219.
- [2] Wang ML, Zhong QY, Lin BQ, *et al.* Andrographolide sodium bisulfate attenuates UV-induced photo-damage by activating the Keap1/Nrf2 pathway and downregulating the NF- κ B pathway in HaCaT keratinocytes [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45(2): 343-352.
- [3] 梁 卫,董国刚,刘 梅,等.创伤生肌水凝胶对动物皮肤创伤的愈合作用[J].东南国防医药,2021,23(2):117-121.
- [4] Wang W, Chapman NM, Zhang B, *et al.* Upregulation of PD-L1 via HMGB1-Activated IRF3 and NF- κ B Contributes to UV Radiation-Induced Immune Suppression [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(11): 2909-2922.
- [5] Lee KJ, Park KH, Hahn JH. Alleviation of Ultraviolet-B Radiation-Induced Photoaging by a TNFR Antagonistic Peptide, TNFR2-SKE [J]. *Mol Cells*, 2019, 42(2): 151-160.
- [6] Verma A, Kushwaha HN, Srivastava AK, *et al.* Piperine attenuates UV-R induced cell damage in human keratinocytes via NF- κ B, Bax/Bcl-2 pathway: An application for photoprotection [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2017, 172: 139-148.

- [7] Muthusamy V, Piva TJ. UVB-stimulated TNF α release from human melanocyte and melanoma cells is mediated by p38 MAPK [J]. *Int J MolSci*, 2013, 14(8): 17029-17054.
- [8] Zhang B, Xu J, Quan Z, *et al.* Klotho Protein Protects Human Keratinocytes from UVB-Induced Damage Possibly by Reducing Expression and Nuclear Translocation of NF- κ B [J]. *Med Sci-Monit*, 2018, 24: 8583-8591.
- [9] Xie J, Zheng Y. Myricetin protects keratinocyte damage induced by UV through IkB/NF κ B signaling pathway [J]. *J Cosmet Dermatol*, 2017, 16(4): 444-449.
- [10] 陈月芹, 吴 艳, 黄振平, 等. 姜黄素抑制转录因子- κ B 信号通路影响基质金属蛋白酶在胃肉上皮细胞的表达 [J]. *医学研究生学报*, 2018, 31(10): 1038-1042.
- [11] Glynn KM, Anderson P, Fast DJ, *et al.* Gromwell (Lithospermum erythrorhizon) root extract protects against glycation and related inflammatory and oxidative stress while offering UV absorption capability [J]. *Exp Dermatol*, 2018, 27(9): 1043-1047.
- [12] Rafiq RA, Quadri A, Nazir LA, *et al.* A Potent Inhibitor of Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) and Mitogen Activated Protein (MAP) Kinase Signalling, Quercetin (3, 3', 4', 5, 7-Pentahydroxyflavone) Promotes Cell Death in Ultraviolet (UV)-B-Irradiated B16F10 Melanoma Cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0131253.
- [13] Studer MK, Ivanović L, Weber ME, *et al.* Structural basis for DEAH-helicase activation by G-patch proteins [J]. *Proc Natl AcadSci USA*, 2020, 117(13): 7159-7170.
- [14] 梁佳龙, 张悦弘, 吴永新, 等. 噻唑类葡萄糖激酶激动药的三维定量构效关系与理性设计 [J]. *中国药师*, 2019, 22(9): 1711-1716.
- [15] 刘蒙蒙. 结合虚拟筛选、分子动力学以及 MM-PBSA 方法对昆虫 β -N-乙酰己糖胺酶的新型潜在抑制剂的研究 [D]. 西安: 西北大学, 2013.
- [16] 梁佳龙. 抗 2 型糖尿病药物分子三维定量构效关系研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2017.
- [17] 梁佳龙, 刘吉元, 刘雪英. 噻唑类 11 β -羟类固醇脱氢酶抑制剂三维定量构效关系研究 [J]. *中国药师*, 2017, 20(3): 397-401.
- [18] 王 菲, 刘飞远, 王 毅, 等. 基于药效团模型的 DNA 错配修复化合物筛选 [J]. *中国药师*, 2021, 24(6): 1018-1025.

(收稿日期: 2021-12-01; 修回日期: 2022-02-22)

(责任编辑: 叶华珍; 英文编辑: 朱一超)