

细胞色素酶 2D6 的分子对接以及分子动力学研究

王靖方^①, 张成城^②, 魏冬青^{②*}

① 中国科学院上海生命科学研究院, 系统生物学重点实验室生物信息中心, 上海 200031;

② 上海交通大学生命科学与技术学院, 生物信息与生物统计系, 上海 200240

* 联系人, E-mail: dqwei@sjtu.edu.cn

2008-11-20 收稿, 2008-12-19 接受

国家高技术研究发展计划生物信息专项(编号: 2007AA02Z333)和国家自然科学基金(批准号: 30870476, 20773085)资助项目

摘要 细胞色素酶 P450 是人体内重要的药物代谢酶。通常, 这类酶在其结构中都含有一个亚铁血红素分子, 并且负责代谢超过 90% 的已知药物分子。细胞色素酶 2D6 是这类酶中的重要一员, 它负责代谢大约 20%~30% 的已知药物分子。利用分子对接和分子动力学模拟的方法, 研究了细胞色素酶 2D6 的结构特征以及其与药物分子之间的相互作用。并且发现, 细胞色素酶 2D6 活性位点中的 Glu216, Asp301, Ser304 和 Ala305 在其与药物分子的相互作用中有着重要的作用。它们可以形成一个或者多个氢键来固定药物分子。同时其活性位点中的 Phe120 可以通过形成一定的 Π - Π 相互作用来识别和固定药物分子。这些发现有助于进一步了解细胞色素酶 2D6 的结构特征, 特别是其活性位点附近的结构特征, 理解细胞色素酶 2D6 代谢药物的机理。同时, 由于细胞色素酶 2D6 存在着单核苷酸多态性, 所得到的结果可以为个性化医疗提供一定的理论基础。

关键词

细胞色素酶
分子对接
分子动力学模拟
药物代谢机理
个性化医疗

细胞色素酶 P450(Cytochrome P450, CYPs), 隶属于血红素蛋白质超家族, 并且主要负责人体内的药物代谢^[1,2]。这类酶参与外源性物质的代谢和内源性物质的氧化、还原过程^[3]。细胞色素酶 P450 被认为已经存在了超过 350 万年, 在细菌、真菌以及各种动植物体中均可以发现其存在的痕迹。值得注意的是, 由于这类酶存在单核苷酸多态性(SNPs), 它们对于同一药物分子的代谢对于不同人群有着不同的代谢速率^[4]。根据携带不同的 SNPs, 我们可以将人群分成三类, 即“差的”或者“慢的”药物代谢体 PM (poor metabolisers), “强的”或者“快的”药物代谢体 EM (extensive metabolisers) 和 “过强的”或者“过快的”药物代谢体 UEM (ultra extensive metabolisers)。在某些情况下, 后两个药物代谢体能够导致死亡。因此, 针对不同药物代谢体, 设计和开发不同的药物分子从而实施个性化医疗显得至关重要。作为实现个性化药

物设计和个性化医疗, 我们就必须了解药物代谢酶的结构, 至少是其活性位点附近的结构, 以及其所代谢的药物分子的结构和它们之间的相互作用^[5-7]。

本文的研究重点是细胞色素酶 2D6。它是人体细胞色素酶家族中重要的一员, 虽然只占人体细胞色素酶总含量的 1%~2%, 但是细胞色素酶 2D6 能够代谢超过 20% 的已知药物分子。至今为止, 科学家们已经做出了许多努力和尝试来研究细胞色素酶 2D6 的结构。普遍认为, 在细胞色素酶 2D6 的活性位点中, Glu216 和 Asp301 对于识别和引导代谢底物进入和结合到活性位点有着重要作用^[8]。此外, 由于大多数细胞色素酶 2D6 所能代谢的底物分子中都含有至少一个芳香环, 其活性位点中的 Phe120 或者 Phe483 就可以与之形成一定的 Π - Π 相互作用, 而从稳定结合构象^[9,10]。在本文的研究中, 通过将 5 种已知药物分子对接到细胞色素酶 2D6 的晶体结构 (PDB 编号 2F9Q)

的活性位点中,再经过一定时间的分子动力学模拟优化,就得到了细胞色素酶与5种药物分子相互作用的模型,从而进一步阐述了 Phe120, Glu216, Asp301 和 Ala305 等关键氨基酸在识别和引导药物分子结合到活性位点中所起到的重要作用. 本文所得到的这些研究结果对于开展个性化药物设计、研究以及个性化医疗有着重要的指导意义.

1 计算模拟方法

1.1 分子对接

在我们的模拟中,分子对接的工作是利用软件 AutoDock 3.0.3 来完成的^[12,13]. 其结果可以被用来研究细胞色素酶 2D6 与 5 种已知药物分子的相互作用. 在我们的分子对接过程中,药物分子是可以自由运动的,而蛋白质分子的结构则被固定从而保持不变. 通过软件的计算,随机变化药物分子在体系内的坐标,从而可以产生一系列不同的构象. 每当产生一个新的构象,我们都会利用遗传算法在三维的对接盒子中寻找其与蛋白质分子的最佳结合构象^[14]. 这种算法可以通过计算最优化的范德华势能和静电势能来寻找药物分子和蛋白质分子的最佳结合构象. 同时,这种方法也被用来研究细胞色素酶 2C19^[15,16]、木糖还原酶^[17,18]以及禽流感病毒 H5N1^[19], 在一定的时间范围内,为这些蛋白质和酶的结构研究以及相应的药物设计提供了良好的理论基础.

1.2 分子动力学模拟

在分子对接中所得到的药物分子与蛋白质分子的最佳结合构象还会进一步被分子动力学模拟所优化. 我们利用 GROMACS 3.3.1 软件辅以 GROMACS S96 43a2 力场参数和周期性边界条件来进行分子动力学模拟^[20]. 用来对接到细胞色素酶 2D6 上的 5 种药物分子的拓扑结构、电荷和其他立场参数是在线服务器 PRODRG 生成的^[21]. 在分子动力学模拟开始之前,体系中的所有原子都被放入到 SPC 水溶液环境

下. 并且加入了适量的钠离子来平衡体系中多余的负电荷从而来进行能量优化步骤. 在此之后,将体系中蛋白质原子固定并且平衡一段时间. 然后,将体系中所有原子缓慢升温至 310 K 从而来进行 600 ps 的分子动力学模拟,进而优化分子对接所得到的结果. 本文所涉及的所有分子动力学模拟都是在常温常压下完成的,其耦合时间常数分别是 0.1 ps 和 1.0 ps. 由于是在水溶液环境下来进行的模拟,所以其等温压缩率被设定为 4.5×10^{-5} /bar. 所有模拟的时间步长为 2 fs, 并且每隔 1 ps 记录一次数据.

2 结果和讨论

2.1 分子对接结果

利用分子对接,我们成功的将 5 种已知药物分子对接到细胞色素酶的活性位点上,并且将其最佳结合能量(如表 1 所示)的构象提取出来进行下面的操作和分析. 细胞色素酶 2D6 结合口袋的结构特性对于其与底物的结合有着重要的意义. 如图 1 所示,我们将细胞色素酶 2D6 活性位点附近的亲水和疏水表面用蓝色和绿色表示出来,并且标记了其在天然状态下残基 Phe120, Asp301, Ala305 和 Glu216 的位置. 从图中我们就可以找出细胞色素酶 2D6 倾向于代谢

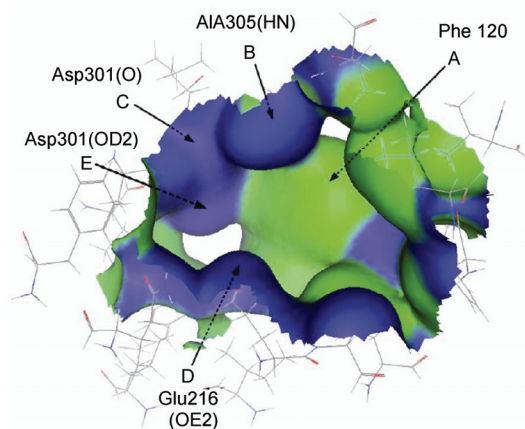


图 1 细胞色素酶 2D6 活性位点亲水和疏水表面示意图

表 1 通过分子对接估算的 5 种已知药物分子与细胞色素酶 2D6 的相互作用能量(单位: kcal/mol)

药物分子	分子间作用能	扭转能	结合能
Alprenolol	-10.63	+2.49	-8.14
Bufuralol	-10.57	+1.56	-9.02
Propafenone	-12.78	+3.42	-13.06
Propranolol	-10.66	+1.87	-10.76
Metoprolol	-10.72	+2.80	-7.91

芳香类化合物的原因: 底物中的芳香环可以与细胞色素酶 2D6 活性位点附近的氨基酸形成多种作用力, 比如可以与残基 Phe120 中的芳香环形成一定的 π - π 相互作用, 而这类底物中的其他原子, 如氧原子和氮原子, 可以与残基 Glu216, Asp301 和 Ala305 形成一个或者多个氢键, 从而较好地将底物固定在活性位点附近。

在这里, 我们以细胞色素酶 2D6 与药物分子 Metoprolol 的相互作用为例来解说其代谢药物的机理, 如图 2 所示。正如前文所述, 残基 Phe120 在活性位点中的主要作用是识别细胞色素酶 2D6 所代谢的特定底物并且将它们固定在其活性位点附近。一些实验证明, 这个残基还能够提升细胞色素酶 2D6 代谢药物的选择性, 当然有时候残基 Phe483 可以代替它的这一功能。对于细胞色素酶 2D6 来说, Glu216, Asp301 和 Ala305 是其活性位点附近负责与相应底物分子形成氢键的主要残基。为了更加深入地了解这些残基在细胞色素酶 2D6 代谢药物过程中所发挥的作用, 它们与 5 种已知药物分子所形成氢键的键长和键角被列举在表 2 中。从中我们可以发现, 残基 Asp301(O_D₂)和 Glu216(OE₂)能够交替地与所有的 5 种药物分子形成一定的氢键相互作用。而它们所形成氢键的键长较短, 键角较大, 这说明这些氢键与其他氢键相比具有较高的键能, 在细胞色素酶 2D6 与药物分子结合的过程中有着重要的作用。

2.2 分子动力学模拟结果

我们采用了 600 ps 的分子动力学模拟来优化分子对接所得到的细胞色素酶 2D6 与药物分子相互作用的模型。同时, 我们还计算了细胞色素酶 2D6 活性位点内, 在药物分子结果的过程中起着重要作用的氨基酸与药物分子上相应基团的距离, 如图 3 所示。

我们可以发现, 这些距离与之前分析所得到的结论是一致的。

3 结论

细胞色素酶 2D6 是细胞色素酶蛋白质家族中的重要一员。在细菌、真菌和各种动植物体内, 这种细胞色素酶主要与外源性物质的代谢和内源性物质的氧化还原过程有着密切的关系。在人体内更是如此, 细胞色素酶 2D6 参与了至少 20% 的已知药物分子代谢。本文采用了分子对接和分子动力学模拟方法研究了 5 种已知药物分子与细胞色素酶 2D6 的相互作用, 建立了相应的细胞色素酶 2D6 代谢药物的分子模型。我们发现, 在细胞色素酶 2D6 的活性位点内, 残基 Ph120 和 Phe483 在识别其做代谢的特定底物以及引导底物结合在活性位点的特定部位上有着重要的作用。此外, 酶与药物分子之间的氢键基本上都是由残基 Glu216, Asp301 和 Ala305 来形成的, 特别是前两者的骨架氧原子。我们的这些发现与现有的实验数据是一致的, 并且可以揭示细胞色素酶代谢药物分子的机理。同时, 为个性化药物设计和研发以及个性化医疗提供了一定的理论基础。

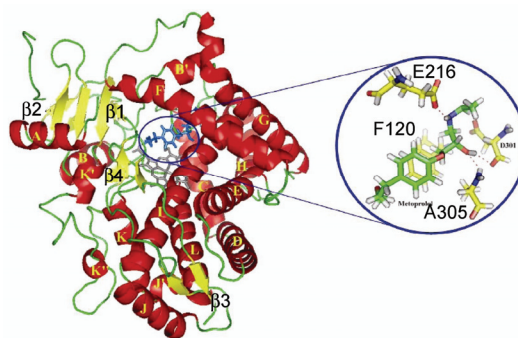


图 2 从分子对接实验得到的细胞色素酶 2D6 与药物分子 Metoprolol 相互作用的示意图

表 2 药物分子与 Glu216, Asp301 以及 Ala305 所形成氢键的键长和键角^{a)} (单位: 键长 Å, 键角°)

氨基酸		1	2	3	4	5
Asp301(O)	键长	2.53	2.23	2.17	2.03	2.15
	键角	78.6	90.4	113.1	117.5	117.7
Ala305(NH)	键长	2.10	2.24	2.30	2.04	2.10
	键角	138.4	137.3	120.7	127.1	120.7
Glu216(OE ₂)	键长	1.78	-	1.89	-	-
	键角	16.28	-	135.5	-	-
Asp301(OD ₂)	键长	-	1.84	-	1.79	1.67
	键角	-	122.7	-	141.6	157.7

a) 其中数字 1~5 分别代表药物分子 Alprenolol, Bufuralol, Propafenone, Propranolol 和 Metoprolol

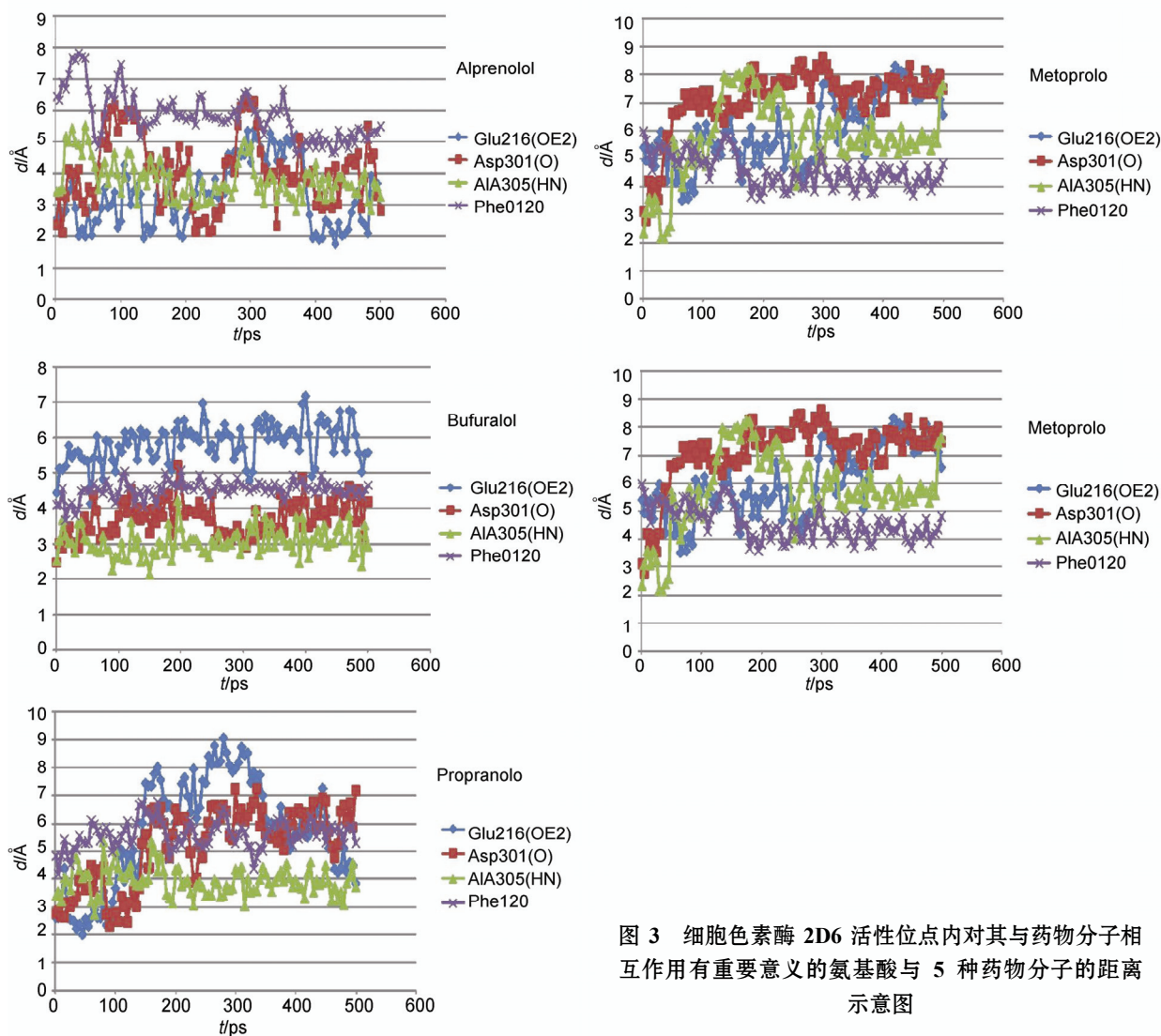


图 3 细胞色素酶 2D6 活性位点内对其与药物分子相互作用有重要意义的氨基酸与 5 种药物分子的距离示意图

参考文献

- 1 Anzebacher P, Anzenbacherova E. Cytochrome P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58: 737—747
- 2 Sono M, Roach M P, Coulter E D, et al. Heme-containing oxygenases. *Chem Rev*, 1996, 96: 2841—2887
- 3 Guengerich F P. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol*, 2001, 14: 611—650
- 4 Williams P A, Cosme J L. Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: Structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol Cell*, 2000, 5: 121—131
- 5 Lewis D F, Jacobs M N, Dickins M. Compound lipophilicity for substrate binding to human P450s in drug metabolism. *Drug Discov Today*, 2004, 9: 530—537
- 6 Kirton S B, Murray C W, Verdonk M L, et al. Prediction of binding modes for ligands in the cytochrome P450 and other heme-containing proteins. *Proteins*, 2005, 58: 836—844
- 7 Stiborova M, Sopko B, Hodek P, et al. The binding of aristolochic acid I to the active site of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 explains their potential to reductively activate this human carcinogen. *Cancer Lett*, 2005, 229: 193—204
- 8 Ito Y, Kondo H, Goldfarb P S, et al. Analysis of CYP2D6 substrate interactions by computational methods. *J Mol Graph Model*, 2008, 26: 947—956

- 9 Keizers P H, Lussenburg B M, de Graaf C, et al. Influence of phenylalanine 120 on cytochrome P450 2D6 catalytic selectivity regioselectivity: crucial role in 7-methoxy-4-(aminomethyl)-coumarin metabolism. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68: 2263—2271
- 10 Lussenburg B M, Keizers P H, de Graaf C, et al. The role of phenylalanine 483 in cytochrome P450 2D6 is strongly substrate dependent. *Biochem Pharmacol*, 2005, 70: 1253—1261
- 11 Rowland P, Blaney F E, Smyth M G, et al. Crystal structure of human cytochrome P450 2D6. *J Biol Chem*, 2006, 281: 7614—7622
- 12 Huey R, Morris G M, Olson A, et al. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J Comput Chem*, 2007, 28: 1145—1152
- 13 Goodsell D S, Morris G M, Olson A J. Automated docking of flexible ligands: Applications of AutoDock. *J Mol Recognition*, 1996, 9: 15
- 14 Morris G M, Goodsell D S, Halliday R S, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and the empirical binding free energy function. *J Comput Chem*, 1998, 19: 1639—1662
- 15 Wang J F, Wei D Q, Chen C, et al. Molecular modeling of two CYP2C19 SNPs and its implications for personalized drug design. *Protein Pept Lett*, 2008, 15: 27—32
- 16 Wang J F, Wei D Q, Zheng S Y, et al. 3D structure modeling of cytochrome P450 2C19 and its implication for personalized drug design. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 355: 513—519
- 17 Wang J F, Wei D Q, Wang Y H, et al. Insight from modeling the 3D structure of NAD(P)H-dependent D-xylose reductase of *Pichia stipitis* and its binding interactions with NAD and NADP. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 359: 323—329
- 18 Wang J F, Wei D Q, Du H L, et al. Molecular modeling studies on NADP-dependent of *Candida tropicalis* strain xylose reductase. *Open Bioinformatics J*, 2008, 2: 89—96
- 19 Wei D Q, Du Q S, Sun H, et al. Insights from modeling the 3D structure of H5N1 influenza virus neuraminidase and its binding interactions with ligands. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344: 1048—1055
- 20 Berendsen H J C, van der Spoel D, van Drunen R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comp Phys Commun*, 1995, 91: 43—56
- 21 van Aalten D M F, Bywater R, Findlay J B, et al. PRODRG: A program for generating molecular topologies and unique molecular descriptors from coordinates of small molecules. *J Comput Aided Mol Des*, 1996, 10: 255—262

· 动态 ·

小鼠肝脏细胞中 UCP2 的靶向表达可提高对肝损伤的敏感性

虽然肝脏枯否细胞中表达解耦联蛋白-2(UCP2), 但成年人正常肝脏细胞并不表达内源性 UCP2, 而在脂肪肝和肥胖者体内肝细胞却被诱导表达 UCP2. UCP2 与肝脏病变和损伤发生的直接关系目前还不清楚. 中国科学院动物研究所生物膜与膜生物工程国家重点实验室陈佳研究小组与合作者发现, 小鼠肝脏中 UCP2 的靶向表达可以提高其对脂多糖(LPS)和半乳糖胺(GalN)诱导的急性肝损伤的敏感性. UCP2 可以增强质子渗漏, 导致二磷酸鸟苷抑制方式的去耦联. 上述小鼠肝脏的线粒体可出现状态 4 呼吸作用提高、呼吸控制率下降、三磷酸腺苷(ATP)水平下降等表征,

改变了线粒体的生理状态. 进一步研究发现降低的 ATP 水平可以导致 5'AMP 激活蛋白激酶(AMPK)和下游效应分子 c-Jun N 端激酶的激活, 提高了对 LPS/GalN 诱导凋亡的敏感性. 更为重要的是, 研究人员发现抑制 UCP2 的活性可以阻止 LPS/GalN 诱导的 ATP 下降、AMPK 激活和凋亡; 而抑制 ATP 的产生在体内或体外可以促进 LPS/GalN 诱导的细胞死亡. 因此, 肝脏中 UCP2 的靶向表达可能导致有害的线粒体生理变化, 导致细胞死亡增加. 相关研究论文发表在 2009 年 10 月 *Hepatology*, 50(4): 1204—1216 上.

(信息来源: 科学技术部《基础科学研究快报》)