

基于药效团模型与正负效应双靶标分子对接策略挖掘 TPH1 抑制剂相关的中药活性分子

史海龙, 史永恒, 王川, 程怡, 黄月, 刘继平, 王斌(陕西中医药大学, 陕西 西咸新区 712046)

摘要: **目的** 基于药效团模型与正负效应双靶标分子对接策略挖掘色氨酸羟化酶 1(Tryptophan hydroxylase-1, TPH1)抑制剂相关的中药活性分子。**方法** 搭建药效团模型、类药性筛选、药代动力学预测、双靶标分子对接、分子动力学模拟于一体的药物筛选平台, 从 TCM@TAIWAN 数据库中发现新型 TPH1 候选抑制剂。**结果** 命中分子 ZINC85626251、ZINC85626260 实验数据均表现出良好的抑制活性及类药性, 预测命中分子可有效抑制胃肠道相关的 TPH1 活性, 但对中枢神经系统相关 TPH2 活性抑制作用较小, 并精准预测靶标与命中分子的结合自由能及相互作用方式。**结论** 整合多种计算机虚拟筛选技术挖掘 TPH 抑制剂, 从天然产物中挖掘到 2 个缓解肠易激综合征相关痛症的潜在的活性分子 ZINC85626251、ZINC85626260。

关键词: 药效团模型; 分子对接; 分子动力学模拟; 色氨酸羟化酶; 抑制剂; 肠易激综合征; 痛症; 潜在活性分子

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2021)07-0959-10

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.07.009

Mining TPH1 Inhibitors from Traditional Chinese Medicine Using Pharmacophore Model and The Dual-targets Molecular Docking with Positive and Negative Effects

SHI Hailong, SHI Yongheng, WANG Chuan, CHENG Yi, HUANG Yue, LIU Jiping, WANG Bin (Shaanxi University of Chinese Medicine, Xixian New Area 712046 Shaanxi, China)

Abstract: Objective Mining Tryptophan hydroxylase-1 (TPH) inhibitors from traditional Chinese medicine using pharmacophore model and the dual-target molecular docking with positive and negative effects. **Methods** A computer virtual drug screening platform integrating pharmacophore model, drug-like screening, ADME prediction, dual-target molecular docking, and molecular dynamics simulation was built to discover potential TPH1 inhibitors from TCM@TAIWAN database. **Results** Two candidate molecules ZINC85626251, ZINC85626260 were screened from the database TCM@TAIWAN, both of them were predicted with good inhibitory activity and drug-like properties. Results of the docking scoring showed that, each candidate molecule has strong inhibitory effect on the gastrointestinal related target TPH1; but the inhibitory effect on the target TPH2 is weak, which effectively avoids the negative effect of central nervous system-related TPH2 enzyme activity inhibition. Finally, highly precise binding free energy between THP1 target and candidate chemical compound and various energy contributions were determined by molecular dynamics simulation and MM/PBSA algorithm. **Conclusion** A variety of computer virtual screening technologies were comprehensively integrated to discover novel TPH inhibitors, and two potential active molecules that can relieve pain associated with irritable bowel syndrome were discovered from natural products.

Keywords: Pharmacophore model; molecular docking; molecular dynamics simulation; tryptophan hydroxylase; inhibitor; irritable bowel syndrome; pain; potential active molecule

收稿日期: 2020-12-25

作者简介: 史海龙, 男, 博士, 博士后, 副教授, 研究方向: 计算机辅助药物设计及生物大分子模拟。Email: shi112@sntcm.edu.cn。通信作者: 王斌, 男, 博士, 教授, 研究方向: 防治心血管疾病的方药研究。Email: wangbing812@126.com。

基金项目: 陕西省中医管理局中医药科研课题(JCMS003); 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2019JQ-401); 陕西中医药大学创新团队项目(2019-YL13)。

5-羟色氨酸(5-hydroxytryptophan, 5-HT)信号通路在内脏痛觉高敏感、肠动力异常等效应产生中扮演着重要角色^[1], 科学家们期待以此为突破口, 寻求针对肠易激综合征、溃疡性结肠炎等胃肠道疾病的治疗策略。色氨酸羟化酶(tryptophan hydroxylase, TPH)使色氨酸羟化, 使色氨酸转化为5-HT, 这是5-HT生物合成途径的起始步及限速步, 因此TPH是治疗或缓解5-HT相关肠易激综合征(Irritable bowel syndrome, IBS)痛症的关键靶标^[2]。哺乳动物TPH普遍存在两种亚型, 其中人类的两种亚型基因TPH1/TPH2分别位于11号、12号染色体上, DNA序列一致性高达71%^[3]。然而, TPH1在胃肠道等消化道上皮组织中表达, TPH2主要在中枢神经系统的神经细胞中表达^[4], 因此利用TPH1组织表达特异性研发特异性抑制剂, 阻断消化系统内5-HT合成, 可发挥IBS镇痛止痛的疗效。目前已有TPH1抑制剂类药物上市^[5], 但临床用药中发现仍然存在诸多问题, 如长期服用可能导致毒副作用甚至耐药性, 或引发脑部中枢5-HT合成阻断^[6], 因此亟需研发新型TPH1抑制剂。

近几年的高分辨率TPH1/TPH2结晶三维结构的成功解析, 极大地推动了基于靶标受体活性口袋结

构的计算机辅助药物分子设计研发。目前IBS适应症药物研发主要围绕着TPH1为靶标开发新型单一抑制剂/拮抗剂, 未涉及TPH2酶活抑制的负效应。基于以上思考, 本文从挖掘中药天然产物的药效成分为突破口, 搭建药效团模型、类药性筛选、药代动力学(absorption、distribution、metabolism、excretion, ADME)预测、双靶标分子对接、分子动力学模拟, 结合自由能计算于一体的虚拟药物筛选平台, 挖掘潜在的TPH1抑制剂。

1 材料与方法

1.1 药效团的构建与验证 采用Discovery Studio 2016中HypoGen模块^[7]构建基于配体结构的药效团模型。从文献中挖掘整理38个TPH1抑制剂^[8-9], 兼顾化合物骨架的多样性以及半数抑制常数(IC₅₀)跨越4个数量级, 挑选其中17个化合物组成训练集, 见图1; 其余化合物为测试集, 见图2。

基于HypoGen算法构建10个药效团模型, 运用测试集分子活性预测, 依据拟合值(Fit value)、活性预测值(Pred IC₅₀)、误差值(Error value)等评估药效团模型优劣^[12], 然后采用95% Fischer随机检验法再次评估^[13]。

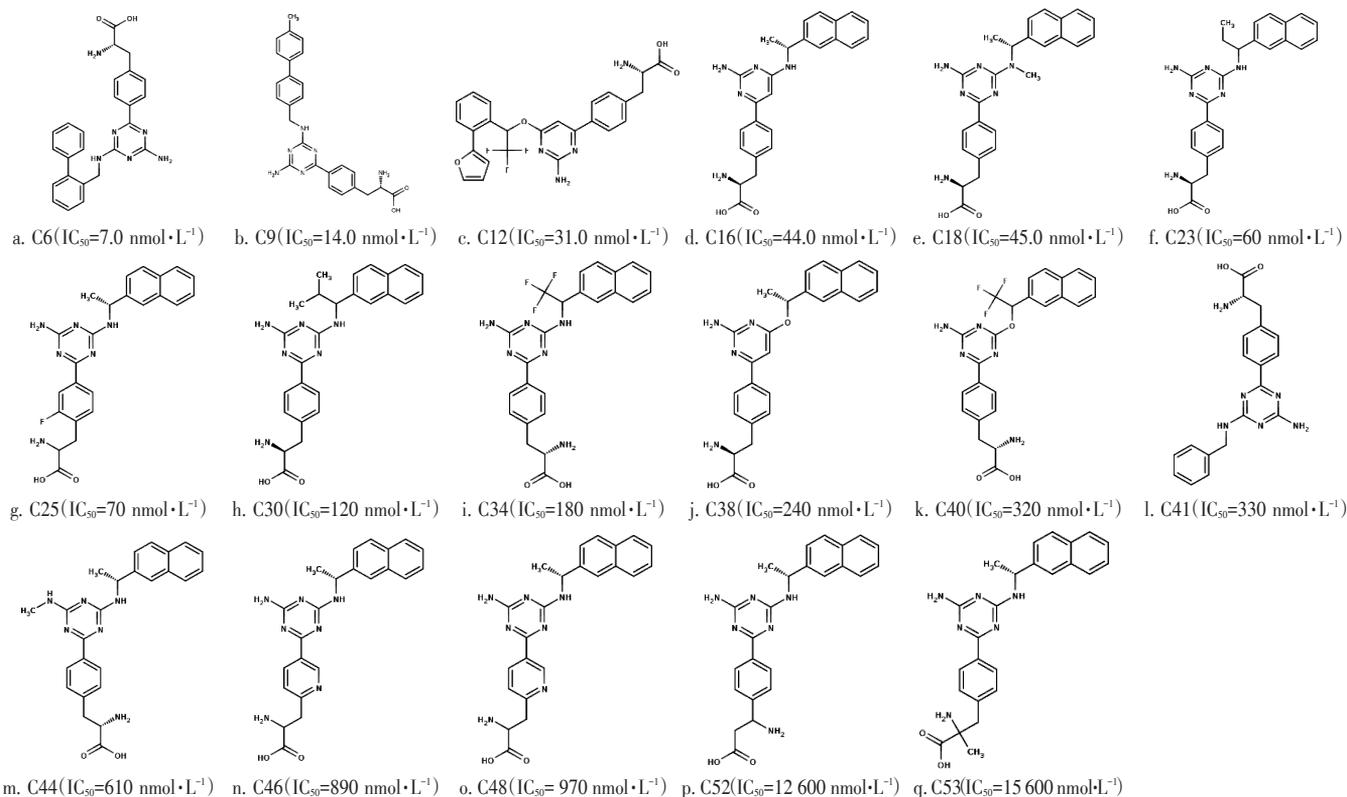


图1 训练集分子的化学结构式及相应IC₅₀值

Figure 1 Chemical structures and molecular properties of the compounds in the training set

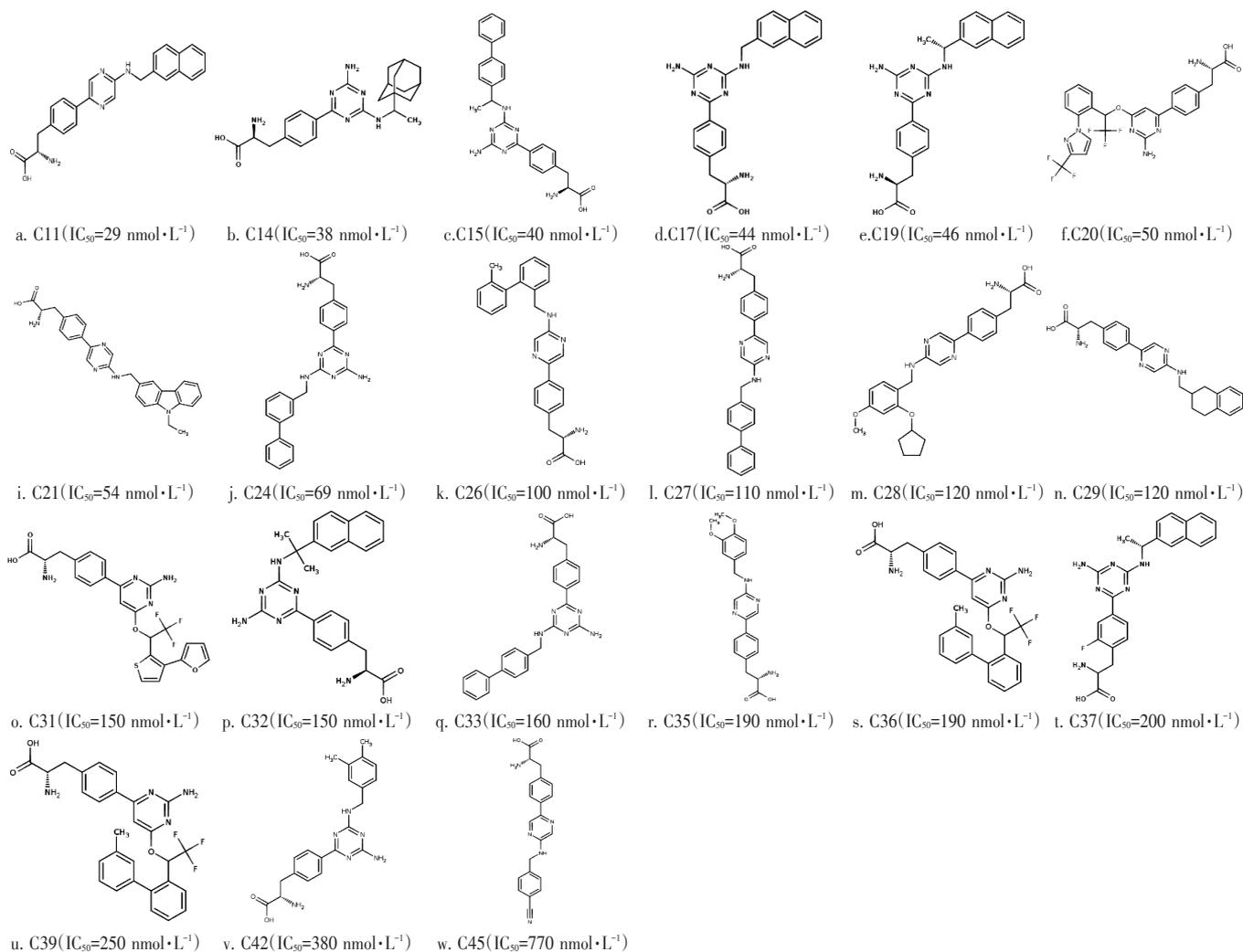


图 2 测试集分子的化学结构式及相应 IC_{50} 值

Figure 2 Chemical structures and molecular properties of the compounds in the testing set

1.2 基于药效团、分子对接、ADME 的多尺度虚拟筛选 台湾中医药数据库 TCM@TAIWAN^[14]是目前全世界最大中药小分子化学结构数据库,由台湾中国医药大学计算与系统生物学实验室创立,涵盖 443 种中药材,共计 39 893 个化合物的化学结构数据库。

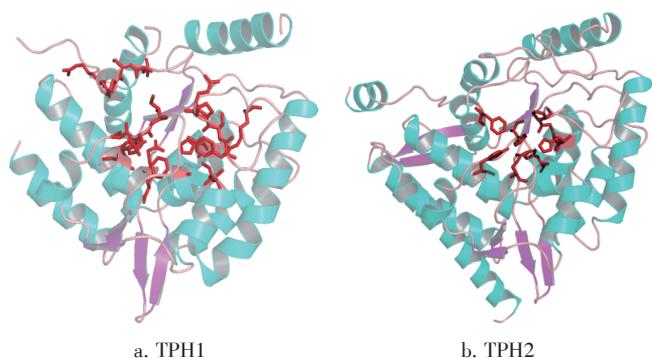
基于药效团模型对配体库进行首轮筛选,运用 Discovery Studio 2016 的 Ligand Pharmacophore Mapping 模块完成,参数设置选用 Flexible/Fast 算法,其余参数设置保持默认值,保留 Fit value 大于 10.0 的化合物。

基于高精度分子对接进行第二轮虚拟筛选,采用 Schrodinger 2018 软件完成。首先,以 Protein Preparation Wizard 模块预处理靶标蛋白结构 TPH1/TPH2,如图 3 所示;然后,以 Protein Grid Generation 模块定义靶标对接区域并产生格点盒子,原配体坐

标确定对接中心;其次,以 Glide-XP 模块进行双靶标 TPH1/TPH2 分子对接计算,筛选与 TPH1 有较低结合能的分子,再筛选与 TPH2 有较高结合能的分子,二者交集作为候选分子。

基于药代动力学参数对候选分子进行再次过滤,采用 Schrodinger 2018 的 QikProp 模块完成,从分子量、氢键供体、氢键受体、溶剂可及表面积、 K^+ 通道阻断相关 IC_{50} 、水溶性、脂水分配系数、口服生物利用度等多个 ADME 参数预测评估。

1.3 分子动力学模拟与结合自由能预测 使用 GROMACS^[15]进行 50 ns 分子动力学模拟。首先,以 TPH1 拓扑参数取自 Amber FF03 力场,由 PDB2GMX 工具获得;然后,对命中分子先用 Gaussian09^[16]在 B3LYP/6-311G** 计算静电势,再用 Amber RESP 电荷拟合计算;随后在 300 K 温度下对复合物进行 1 000 步能量最小化,100 ps NVT 系综平衡,100 ps



a. TPH1 b. TPH2

注：靶标受体蛋白质结构由 Cartoon 模式表示，活性口袋部位由 Red sticks 模式表示，包含距 5Å 距离内氨基酸残基

图 3 靶标受体蛋白 TPH1/TPH2 活性口袋

Figure 3 The active pockets of the target receptor protein TPH1/TPH2

NPT 系综平衡；最后，整个体系进行 50 ns 分子动力学模拟，使用分子力学泊松玻尔兹曼表面积方法 (Molecular mechanics poisson boltzmann surface area, MM/PBSA)^[17]计算体系稳定后的结合自由能。

2 结果与分析

2.1 药效团模型的构建与验证

在 TPH1 与原共结晶配体 LP-533401 结合模式中，LP-533401 嘧啶环的亚氨基作为氢键供体，与 Glu317 羧基上氧原子相互作用形成氢键；其尾部苯环的侧链羧基非常活跃，羰基的 2 个氧原子作为氢键受体分别与残基 Ser336、Arg257、Tyr364、Thr265 形成 2~3 个氢键；其苯环与羧基相连的中部原子基团作为氢键供体，与残基 Gly333、Thr265 形成多个氢键，见图 4。由此推断 TPH1 抑制剂含有疏水作用 (Hydrophobic aliphatic, HY)、芳环中心 (Aromatic ring, RA)、氢键受体 (H-bond acceptor, HBA)、氢键供体 (H-bond donor, HBD) 等药效团特征元素。

基于 HypoGen 算法生成 10 个药效团模型，均包含特征元素：HBA、HBD、RA、HY 或 NEG，Correlation 值均不小于 0.73，见表 1。最佳模型 Hypo1 具有最低总打分值，最佳相关性系数，最高匹配值及最低标准偏差，其特征元素的参数及匹配情况见图 5 与图 6。

Fisher 交叉验证结果表明 Hypo1 产生的数据优于其他 19 个随机模型，见图 7；比较测试集分子实验活性与 Hypo1 预测活性的结果，说明测试集分子预测活性值均在误差允许范围内，回归系数 Correlation 为 0.927 6，见表 2 与图 8。以上验证结果说明 Hypo1 能准确预测分子的活性。

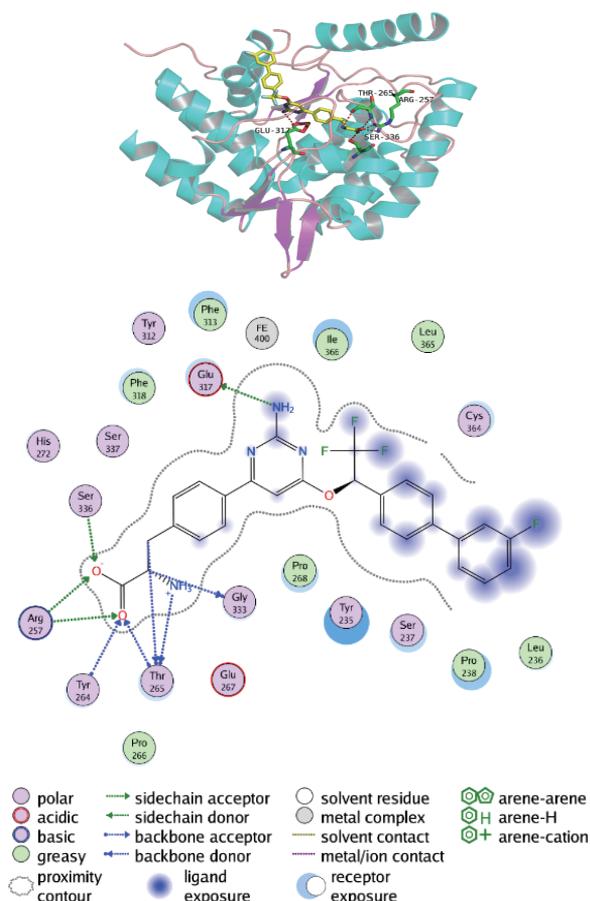


图 4 晶体复合物 3HF8 中靶标受体 TPH1 与原配体 LP-533401 结合模式

Figure 4 The binding mode of the target receptor TPH1 and ligand LP-533401 in the crystal complex(3HF8)

表 1 打分前 10 位的药效团模型的相关信息

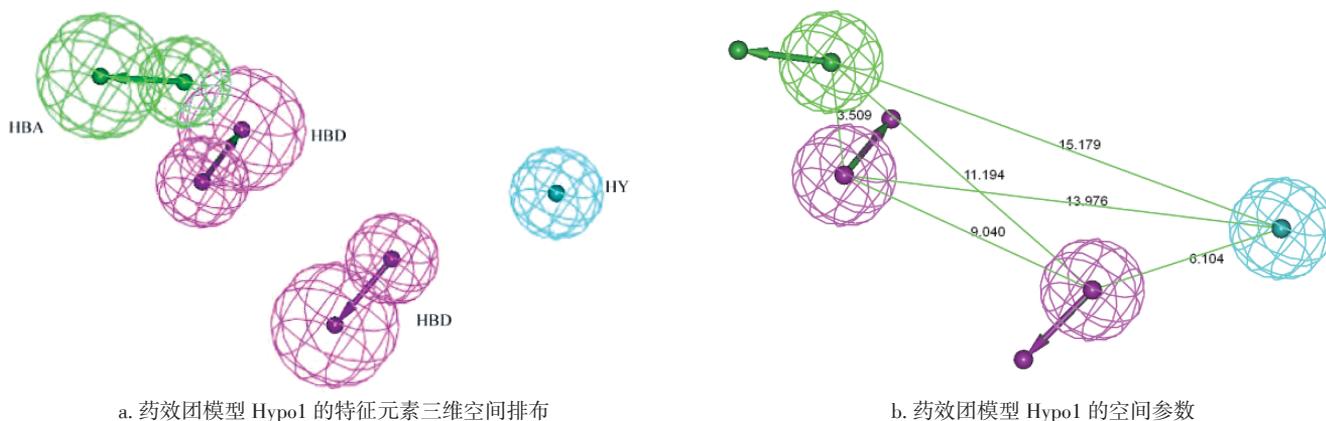
Table 1 Chemical features of the top10 HipHop pharmacophores

模型	Total cost	ΔCost ^a	Max Fit	RMS ^b	Correlation(r)	Chemical features ^c
Hypo1	83.61	61.87	13.89	1.13	0.944 596	HBA, HBD, HBD, HY
Hypo2	84.26	61.22	13.67	1.18	0.938 580	HBA, HBD, HBD, HY
Hypo3	100.22	45.26	10.93	1.81	0.846 081	HBA, HBD, HBD, HY
Hypo4	100.24	45.24	12.22	1.70	0.870 860	HBA, HBD, HBD, HY
Hypo5	105.04	40.44	9.33	2.04	0.794 225	HBA, HBD, HBD, HY
Hypo6	107.70	37.78	9.98	2.12	0.775 905	HBA, HBD, HBD, HY
Hypo7	107.70	37.78	9.98	2.12	0.775 905	HBA, HBD, HBD, HY
Hypo8	109.97	35.51	8.42	2.18	0.760 996	HBA, HBD, HBD, HY
Hypo9	111.07	34.41	10.73	2.14	0.774 025	HBA, HBA, HY, RA
Hypo10	113.24	32.24	10.56	2.268 19	0.738 350	HBD, HBD, NEG, RA

注：a. ΔCost 是 Total cost 与 Null cost 差值，Null cost、Fixed cost 分别是 145.48、69.44；b. RMS 是标准偏差；c. 功能基团特征

2.2 分子对接参数验证

以原结晶复合物配体 LP-533401 空间坐标作为参照，将 LP-533401 重新对接到 TPH1 活性口袋，比较分子对接前后构象差异。结果表明均方根偏差 (Root mean square deviation, RMSD) 为



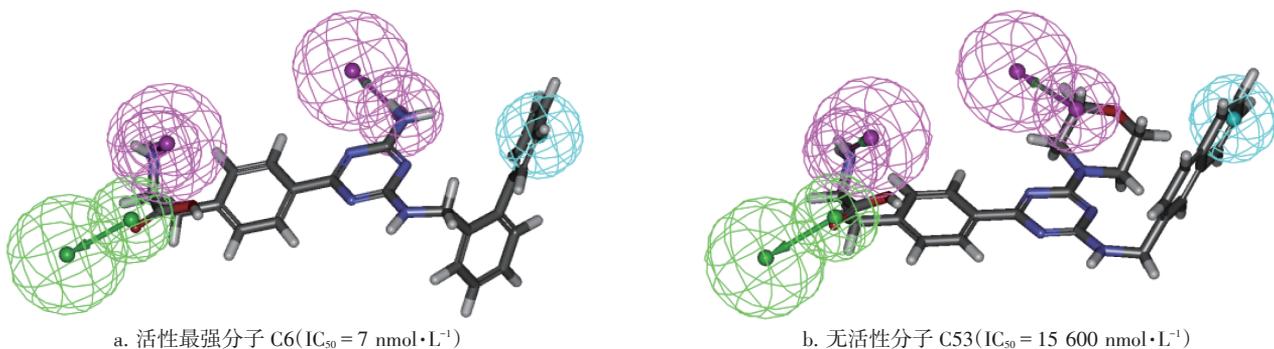
a. 药效团模型 Hypo1 的特征元素三维空间排布

b. 药效团模型 Hypo1 的空间参数

注：绿色球体为氢键受体特征基团，红色球体为氢键供体特征基团，蓝色球体为疏水特征基团；数据单位为 Å

图 5 模型 Hypo1 的特征

Figure 5 The features of the pharmacophore model Hypo1



a. 活性最强分子 C6($IC_{50} = 7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)

b. 无活性分子 C53($IC_{50} = 15\ 600 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)

图 6 模型 Hypo1 与训练集分子 C6、C53 的匹配情况

Figure 6 The match between the pharmacophore model Hypo1 and the representative molecules in training set

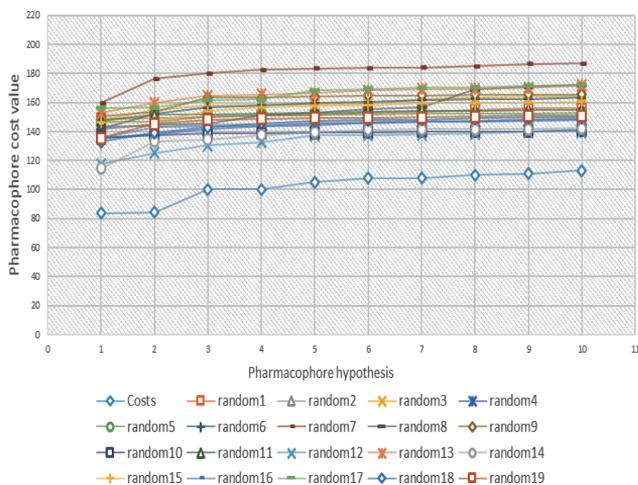


图 7 Fischer 法交叉验证 (选择 95% 的置信区间)

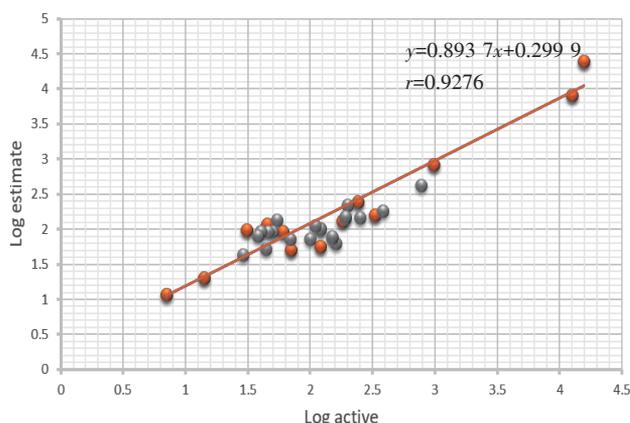
Figure 7 Cross validation by Fischer method (95% confidence interval)

1.368 Å，低 RMSD 值代表高叠合程度。然后，将高活性分子 C6 同样进行分子对接，结果 C6 与 LP-533401 的对接后空间构象和坐标均近似，验证了分子对接参数的设定是合理可靠，可用于后续实验。

表 2 药效团模型 Hypo1 获得测试集分子的实验值与预测值
Table 2 Experimental and predicted values obtained by pharmacophore model Hypo1 in testing set

化合物	Exp IC_{50} /($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Pred IC_{50} /($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Fit value	Error ^a	Exp scale ^b	Pred scale ^c
C11	29	42.74	9.51	1.47	+++	+++
C14	38	79.74	9.24	2.10	+++	+++
C15	40	93.08	9.17	2.33	+++	+++
C17	44	52.41	9.42	1.19	+++	+++
C19	46	93.04	9.17	2.02	+++	+++
C20	50	92.77	9.17	1.86	+++	+++
C21	54	134.10	9.01	2.48	+++	++
C24	69	72.09	9.28	1.04	+++	+++
C26	100	71.61	9.29	-1.40	+++	+++
C27	110	112.30	9.09	1.02	++	++
C28	120	101.54	9.14	-1.18	++	++
C29	120	102.57	9.13	-1.17	++	++
C31	150	78.28	9.25	-1.92	++	+++
C32	150	74.00	9.27	-2.03	++	+++
C33	160	62.63	9.35	-2.55	++	+++
C35	190	152.06	8.96	-1.25	++	++
C36	190	144.01	8.98	-1.32	++	++
C37	200	220.40	8.80	1.10	++	++
C39	250	146.58	8.98	-1.71	++	++
C42	380	184.71	8.88	-2.06	++	++
C45	770	424.50	8.51	-1.81	+	+

注：a. 预测值(Pred)和实验值(Exp)之间的差值；b. 活性分级区间 [“+++” 高活性($IC_{50}\leq 100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), “++” 中等活性($100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1} < IC_{50}\leq 400 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), “+” 低活性或无活性($IC_{50} > 400 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)]



注：红色圆点代表训练集分子，灰色圆点代表测试集分子

图 8 模型 Hypo1 对测试集分子实验活性与预测活性的相关系数

Figure 8 The regression coefficient of the model Hypo1 on the experimental activities and predicted activities in the testing set

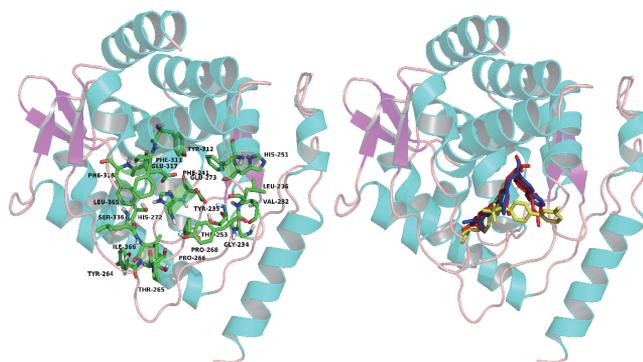
2.3 虚拟筛选结果分析 首先用模型 Hypo1 从 TCM@taiwan 数据库中筛选 TPH1 的潜在抑制剂。以 Fit value ≥ 10.0 为阈值，过滤得到 3 453 个化合物。然后将命中化合物对接到靶标 TPH1/TPH2 活性口袋，筛选同时符合两个条件(①与 TPH1 有较低结合自由能；②与 TPH2 有较高结合自由能)的交集分子，最终命中 11 个化合物，如表 3 所示。命中化合物与模型 Hypo1 匹配值都显著优于 LP-533401，并且与 TPH1 结合能均低于 $-13.40 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ，与 TPH2 结合能均高于 $-8.80 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。表明这些分子对 TPH1 产生较强抑制作用，但对 TPH2 的抑制作用较弱。随后进行 ADME 参数再次筛选，最终找到 ZINC85626251、ZINC85626260，结果见表 4。二者均是来源于中国生姜根茎中，两者属于姜酚类植物化学成分。图 10 显

表 4 命中分子 ADME 参数预测值

Table 4 Predicted values of ADME parameters of hits

ZINC-ID	MW ^a	SASA ^b	HB Don ^c	HB Acc ^d	logPo/w ^e	logS ^f	logHERG ^g	PCaco ^h	%OB ⁱ	PSA ^j
ZINC85626251	461	712.2	4	7.40	3.1	-3.4	-4.6	48.1	75.0	133.6
ZINC85596582	757	1 122.5	10	17.05	0.2	-3.2	-6.2	0.1	0.0	245.1
ZINC85630415	734	1 105.0	5	10.20	6.6	-6.1	-7.5	8.3	56.3	154.8
ZINC85569041	820	1 007.2	7	9.95	6.1	-6.2	-6.9	11.5	42.6	147.9
ZINC85625740	763	1 201.4	5	8.70	8.5	-10.5	-8.2	56.6	69.2	160.4
ZINC85595335	826	1 126.6	8	17.00	3.4	-3.8	-7.0	2.7	15.6	214.8
ZINC85643856	629	899.9	8	22.00	-1.7	-2.4	-6.1	4.6	0.0	237.9
ZINC95910495	504	772.6	7	13.80	-0.5	-2.9	-6.1	2.4	0.0	223.7
ZINC85626260	487	823.1	3	5.70	5.6	-5.7	-5.3	238.8	89.3	112.9
ZINC85509617	631	906.9	9	18.25	-0.6	-2.8	-4.4	0.1	0.0	279.3
ZINC95912363	831	1 181.1	10	25.90	-0.6	-3.1	-5.7	0.2	0.0	298.3
LP-533401	526	847.3	5	5.50	3.3	-7.3	-6.4	5.3	46.4	126.3

注：a. 分子量(可接受区间： <650)；b. 溶剂可及表面积(可接受区间： $300\sim 1\ 000$)；c. 氢键供体(可接受区间： ≤ 5)；d. 氢键受体(可接受区间： ≤ 10)；e. 脂水分配系数(可接受区间： $-2\sim 6.5$)；f. 亲水性(可接受区间： $-7.0\sim 0.5$)；g. K⁺通道阻断相关 IC₅₀值(推荐区间： ≤ -5)；h. 预测的表观 Caco-2 细胞渗透率，单位为 $\text{nm}\cdot\text{s}^{-1}$ ，Caco-2 细胞是肠血屏障的模型，适用于非主动运输(推荐区间： <25 为差； >500 为良)；i. 口服吸收率($<50\%$ 为差； $>80\%$ 为良)；j. 范德华表面的极性氮原子、氧原子和碳基碳原(可接受范围： $7.0\sim 200.0$)



a. 靶标 TPH1 活性空腔的关键氨基酸残基

b. 靶标 TPH1 与配体结合构象叠合

注：a. 绿色棍棒表示 TPH1 活性口袋附近的关键氨基酸残基；b. 蓝色棍棒表示 LP-533401 原晶体中构象，红色棍棒表示 LP-533401 对接后构象，黄色棍棒表示高活性分子 C6 对接后构象

图 9 分子对接的可行性分析验证

Figure 9 Verification on feasibility of molecular docking

示命中分子与模型 Hypo1 药效团特征元素叠合情况。

表 3 命中分子双靶标 TPH1/TPH2 分子对接的能量打分值

Table 3 The docking scores of hits with dual targets TPH1/TPH2

ZINC-ID ^a	Fit value	TPH1 score /($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)	TPH2 score /($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)
ZINC85626251	10.58	-14.28	-8.71
ZINC85596582	10.35	-14.26	-8.80
ZINC85630415	10.17	-14.24	-7.71
ZINC85569041	10.16	-13.86	-7.10
ZINC85625740	10.18	-13.72	-8.58
ZINC85595335	10.54	-13.70	-8.48
ZINC85643856	10.62	-13.55	-8.87
ZINC95910495	10.48	-13.53	-8.80
ZINC85626260	10.49	-13.48	-8.38
ZINC85509617	10.52	-13.46	-7.94
ZINC95912363	10.40	-13.40	-7.77
LP-533401	9.08	-10.52	-7.87

注：a. ZINC database(<https://zinc.docking.org/>)ID number

2.4 结合模式分析 Discovery Studio Visualizer 分析命中分子与 TPH1 的相互作用模式。TPH1 与 ZINC85626251 的主要作用力是氢键和 $\pi-\pi$ 堆积作用，见图 11。ZINC85626251 与 Ser336、Gly333、Leu236、Gly234 形成常规氢键，并且与 Gly333、Leu236 形成双氢键，与 Gly234 形成碳氢键，与 Tyr235 形成 $\pi-\pi$ 堆积作用，与 Phe313、Cys364 形成烷基键相互作用。TPH1 与 ZINC85626260 的相互作用不仅有氢键，还有范德华力，见图 12。ZINC85626260 与 Gly333、Ser336 形成常规氢键，并且同样与 Gly333 形成双氢键，与 His251、Glu273 分别形成双碳氢键，还与 Tyr235 形成 $\pi-\pi$ 堆积作用，与 Phe241、Tyr312、Lue242、Pro238、Ala309 形成烷基键。这些

作用力使结合能降低，亲和力增加，命中分子与 TPH1 催化活性口袋紧密结合，使其丧失酶催化能力。

氢键在生物大分子相互作用中发挥着重要作用，尤其是在酶催化反应中。ZINC85626251、ZINC85626260 与残基 Gly333、Ser336 形成氢键，并且部分形成双氢键。究其原因，命中分子具有较多的氧原子，易与活性口袋氨基酸残基形成氢键，在催化过程中起到稳定受体-配体复合物结构的作用。与 ZINC85626260 相比较，ZINC85626251 表现较高的靶标结合亲和力，其形成 5 个常规氢键、 $\pi-\pi$ 堆积作用；然而 ZINC85626260 仅形成 3 个常规氢键，同样与 Gly333、Ser336 形成氢键，同样与 Tyr235 形成

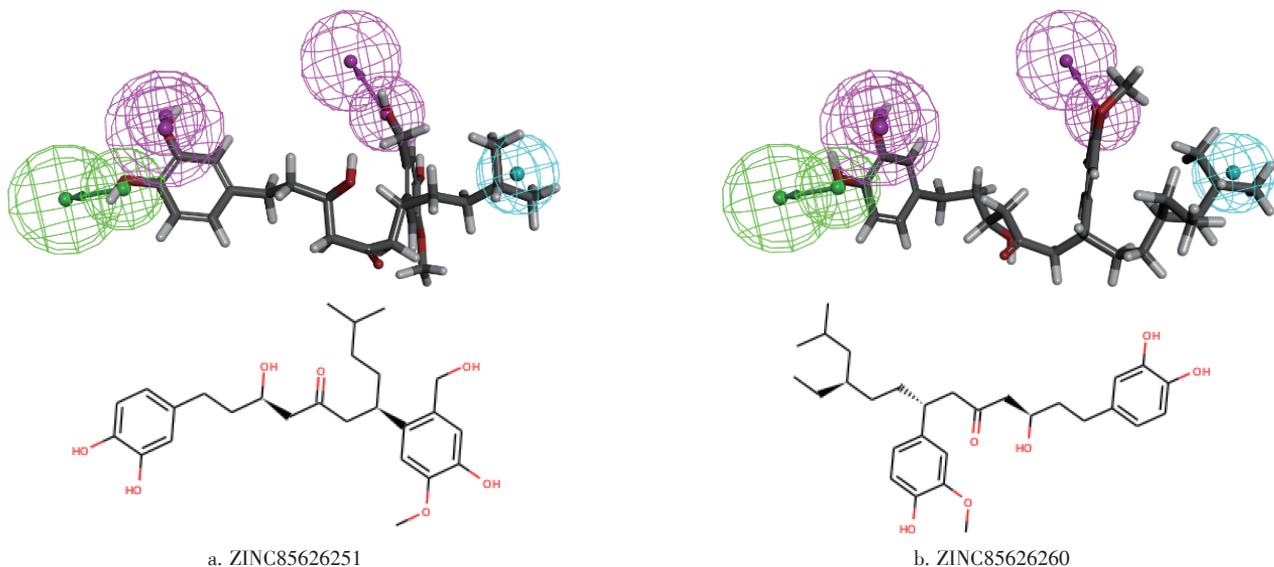


图 10 命中分子化学结构式及模型 Hypo1 叠合情况
Figure 10 The chemical structures of the hits and their fit with the model Hypo1

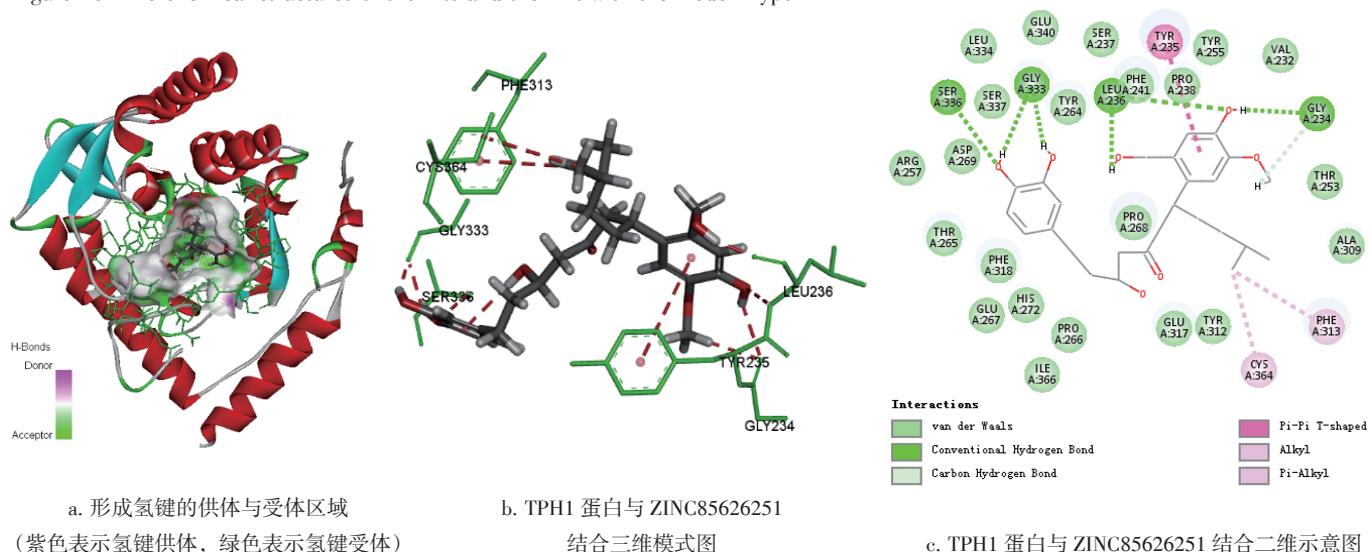


图 11 靶标蛋白 TPH1 与 ZINC85626251 相互作用
Figure 11 The interaction between the target TPH1 and ZINC85626251

π - π 堆积作用。因此，命中分子与靶标的相互作用方式相似，但 ZINC85626251 比 ZINC85626260 可能具有更高的抑制作用。

2.5 分子动力学模拟结果分析 在 50 ns 分子动力学模拟过程中，TPH1-ZINC85626251、TPH1-ZINC85626260、TPH1-LP-533401 3 个体系在 25 ns 之后，其氨基酸骨架原子 RMSD 值均无大幅波动，体系均达到了平衡状态，见图 13。平衡后体系 ZINC85626251-TPH1、ZINC85626260-TPH 中蛋白骨架原子的均方根波动值(Root mean square fluctuation, RMSF)变化趋势相似，残基 222~225 位点、361~371 位点，这两个区段出现较大波动，无法形成稳定的键相互作用，不利于受体-配体复合物的结合，见图 14。但是，命中分子体系的波动强度均略高于原配体 LP-533401 体系，尤其在残基 125~135 位点区

段、残基 239 附近区段，推测在命中分子与靶标结合过程中，靶标蛋白构象发生了适度调整，符合酶催化的诱导契合学说。TPH1-ZINC85626251 体系在残基 226~238 位点、308~321 位点、329~335 位点出现了较低波动性，TPH1-ZINC85626260 体系在残基 242~262 位点、268~273 位点、309~321 位点、327~336 位点出现了较低波动性(RMSF<0.1 nm)，这些波动较小的氨基酸残基均位于靶标活性口袋，推测命中分子与靶标之间形成了氢键、疏水相互作用、 π - π 堆积作用等，将命中分子包裹在活性口袋内，形成稳定的受体-配体复合物。

从 25~50 ns 轨迹文件中提取 250 帧，采用 MM/PBSA 方法计算结合自由能及各种能量贡献情况，见表 5。结合自由能强弱关系为：LP-533401 < ZINC85626260 < ZINC85626251，与分子对接结果排

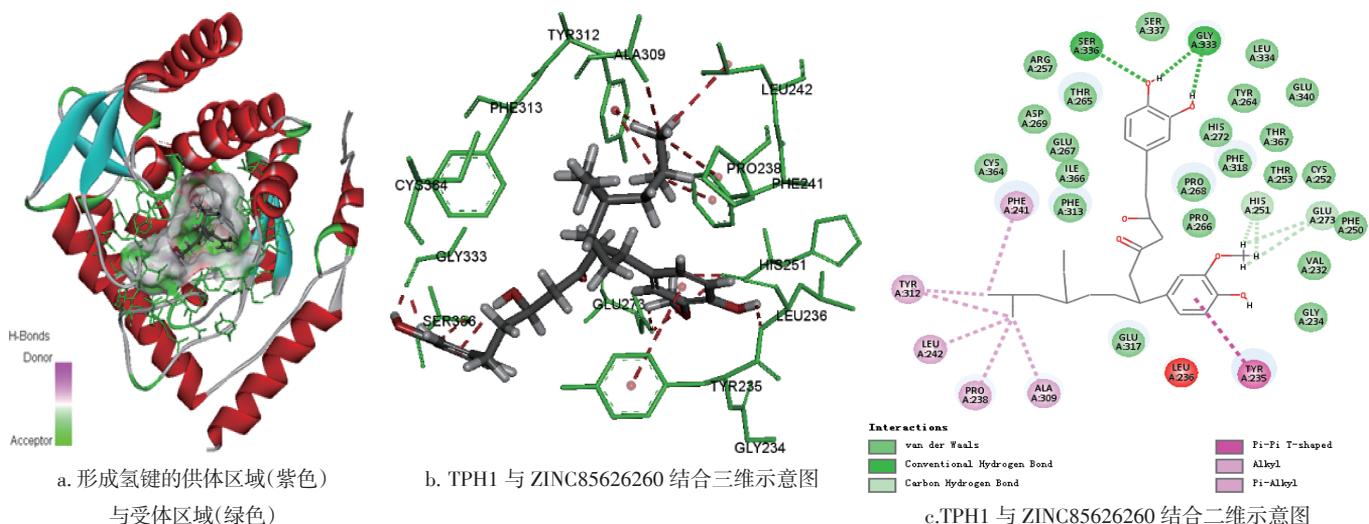


图 12 靶标蛋白 TPH1 与 ZINC85626260 相互作用

Figure 12 The interaction between the target TPH1 and ZINC85626260

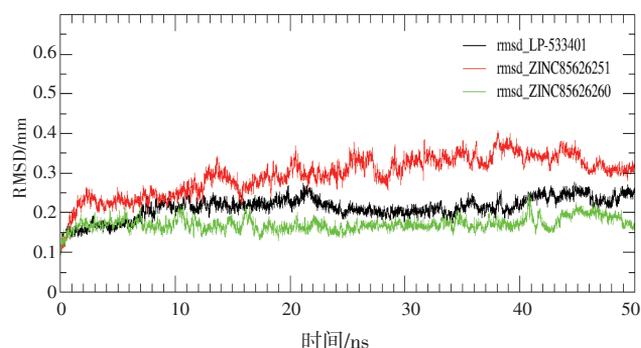


图 13 配体-蛋白质复合物的氨基酸骨架原子随时间变化的 RMSD 值

Figure 13 The RMSD graph of all complexes during 100 ns MD simulation.

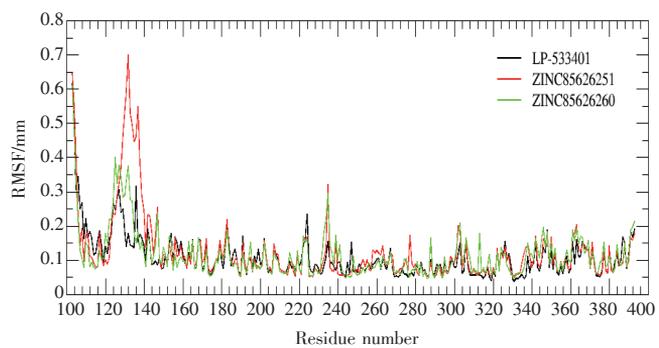


图 14 配体-蛋白质复合物的氨基酸骨架原子随时间变化的 RMSF 值

Figure 14 The RMSF graph of all complexes during 100 ns MD simulation

序一致。对于命中分子, 范德华力最有利于命中分子与靶标结合, 起主导作用; 静电势能、表面溶剂化作用也有利于结合, 但作用力较弱; 而极性溶剂化作用不利于体系结合。然而对于 LP-533401, 静电势能、范德华力均有利于配体和受体的结合, 静电势能处于主导地位; 但是极性溶剂化作用力较强, 不利于体系结合, 这就造成了命中分子、原结晶配体与 TPH1 结合能的较大差异。

表 5 MM/PBSA 计算所得到的结合能量(kJ·mol⁻¹)

Table 5 Results of MM/PBSA methods(kJ·mol⁻¹)

化合物	范德华力	静电势能	极性溶剂化作用	表面溶剂化作用	结合自由能
ZINC85626251	-127.620	-37.807	111.875	-20.431	-73.983
ZINC85626260	-146.236	-21.907	120.407	-20.467	-68.202
LP533401	-76.988	-109.060	156.159	-15.459	-45.349

3 讨论

众所周知, 5-HT 是重要的神经递质和旁分泌信号分子, 可介导胃肠道蠕动。目前在胃肠道、血小板、中枢神经系统中均发现 5-HT 的存在, 其中体内大约 95% 的 5-HT 合成、释放均来源于胃肠道, 并且 90% 存在于上皮黏膜的嗜铬细胞中。TPH 主要定位于嗜铬细胞之中, 是 5-HT 整个生物合成过程的限速酶。除此之外, 嗜铬细胞被视为检测化学、机械、病理等刺激的肠道传感器, 一旦肠道黏膜感受到刺激, 会促使嗜铬细胞迅速响应, 主动分泌更多 5-HT, 从而激活定位于肠平滑肌、肠道黏膜层等神经纤维内 5-HT 受体, 引发一系列生物学效应, 如神经递质分泌、内脏痛觉感应、肠道蠕动等。因此在内脏痛觉高敏感、肠动力异常等效应产生中, 5-HT 相关细胞信号通路扮演着重要角色^[18], 科学家们期待以此为突破口寻找治疗胃肠道疾病及其并发症(如肠易激综合征, 溃疡性结肠炎)的更好策略, 而其中的明星分子 TPH 恰恰是治疗或缓解 5-HT 相关痛症药物的一个有效靶点。然而 TPH 存在两种同工酶 TPH1、TPH2, 前者主要存在于胃肠道等消化道上皮组织、松果体以及中枢神经系统, 后者仅在神经细胞中表达, 尤其是中枢神经系统^[19]。因此本研究合理利用 TPH1 组织特异性表达开发新型抑制剂分子, 阻断消化系统内 5-HT 合成, 尽可能有效规避抑制 TPH2 酶活引起的负效应。

Liang 等^[20]使用分子动力学模拟、结合自由能预测、能量项拆分及丙氨酸扫描技术, 研究 TPH1 抑制剂苯丙氨酸衍生物的抑制作用机制。结果表明, 萘

取代基的同分异构体可以与靶标形成不同的结合模式, 但是导致相同酶活抑制效果。随后该团队使用基于配体结构阐明一系列已知 TPH1 抑制剂的定量构效关系, 并提出多元药效团模型的研究策略^[21], 即整合多种 TPH1 抑制剂复合物晶体结构构建药效团模型。该模型成功预测了 32 种苯丙氨酸取代基衍生物的酶活抑制常数。目前国内外内脏痛觉高敏感的药物研发策略大体类似于上述案例, 主要考虑 TPH1 单一靶标的抑制剂, 未涉及到 TPH2 酶活抑制引起的负效应, 筛选策略均较为单一, 预测精度不高。

基于上述考虑, 本研究首先搭建了一套整合药效团模型、类药性筛选、ADME 预测、双靶标分子对接的虚拟药物筛选平台, 然后对 TCM@TAIWAN 数据库进行中药活性分子系统筛选, 找到 ZINC85626251、ZINC85626260, 预测命中分子可有效抑制胃肠道相关 TPH1 酶活性, 并可有效降低中枢神经系统相关 TPH2 酶活抑制的负效应。随后从原子角度深度剖析命中分子与靶标 TPH1 的相互作用方式。最后采用分子动力学模拟技术将 TPH1-ZINC85626251、TPH1-ZINC85626260、TPH1-LP533401 不同体系放入模拟真实生理盐水溶液的水盒中进行分子动力学模拟, 并采用 MM/PBSA 算法精确计算二者结合自由能。本研究从天然产物中挖掘到缓解肠易激综合征相关痛症的潜在的活性分子 ZINC85626251、ZINC85626260, 可为研发新型 TPH1 抑制剂提供参考。但是, 本研究实验内容还处于药物开发的前期阶段, 尚缺乏酶活抑制试验验证、药代动力学评估等实验数据支撑, 后期将联合实验药理学团队, 开展相关生物学活性验证及安全性评价。

参考文献:

- [1] OKATY B W, COMMONS K G, DYMECKI S M. Embracing diversity in the 5-HT neuronal system[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2019, 20(7): 397-424.
- [2] COATES M D, TEKIN I, VRANA K E, et al. Review article: the many potential roles of intestinal serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) signalling in inflammatory bowel disease[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2017, 46(6): 569-580.
- [3] WALTHER D J, BADER M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform[J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66(9): 1673-1680.
- [4] DEL COLLE A, ISRAELYAN N, GROSS MARGOLIS K. Novel aspects of enteric serotonergic signaling in health and brain-gut disease[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2020, 318(1): G130-G143.
- [5] SWAMI T, WEBER H C. Updates on the biology of serotonin and tryptophan hydroxylase[J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*,

- 2018, 25(1): 12–21.
- [6] SCOTTON W J, HILL L J, WILLIAMS A C, et al. Serotonin syndrome: pathophysiology, clinical features, management, and potential future directions[J]. *Int J Tryptophan Res*, 2019, 12: e1178646919873925.
- [7] SUTTER J, LI J, MAYNARD A J, et al. New features that improve the pharmacophore tools from Accelrys[J]. *Curr Comput Aided Drug Des*, 2011, 7(3): 173–180.
- [8] JIN H, CIANCHETTA G, DEVASAGAYARAJ A, et al. Substituted 3-(4-(1, 3, 5-triazin-2-yl)-phenyl)-2-aminopropanoic acids as novel tryptophan hydroxylase inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19(17): 5229–5232.
- [9] SHI Z C, DEVASAGAYARAJ A, GU K, et al. Modulation of peripheral serotonin levels by novel tryptophan hydroxylase inhibitors for the potential treatment of functional gastrointestinal disorders[J]. *J Med Chem*, 2008, 51(13): 3684–3687.
- [10] DEBNATH A K. Pharmacophore mapping of a series of 2, 4-diamino-5-deazapteridine inhibitors of *Mycobacterium avium* complex dihydrofolate reductase[J]. *J Med Chem*, 2002, 45(1): 41–53.
- [11] HE L, DAI R, ZHANG X R, et al. Ligand-based 3D pharmacophore design, virtual screening and molecular docking for novel p38 MAPK inhibitors[J]. *Medicinal Chemistry Research*, 2015, 24(2): 797–809.
- [12] KUROGI Y, GÜNER O F. Pharmacophore modeling and three-dimensional database searching for drug design using catalyst[J]. *Curr Med Chem*, 2001, 8(9): 1035–1055.
- [13] LIN S K. Pharmacophore perception, development and use in drug design[J]. *Molecules*, 2000, 5(7): 987–989.
- [14] Chen Y C. TCM Database@Taiwan: the world's largest traditional Chinese medicine database for drug screening in Silico[J]. *PLoS ONE*, 2012, 6(1): e15939.
- [15] ABRAHAM M J, MURTOLA T, SCHULZ R, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers[J]. *Software*, 2015, 1/2: 19–25.
- [16] WEI L, XIE H, HUANG Y, et al. Application of Gaussian 09/Gaussview 5.0 in analytical chemistry teaching[J]. *Journal of Kunming Medical University*, 2016, 37(10): 134–136.
- [17] KONGSTED J, RYDE U. An improved method to predict the entropy term with the MM/PBSA approach[J]. *J Comput Aided Mol Des*, 2009, 23(2): 63–71.
- [18] KERCKHOFFS A P, TER LINDE J J, AKKERMANS L M, et al. SERT and TPH-1 mRNA expression are reduced in irritable bowel syndrome patients regardless of visceral sensitivity state in large intestine[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 302(9): G1053–G1060.
- [19] GRASBERGER H, CHANG L, SHIH W, et al. Identification of a functional TPH1 polymorphism associated with irritable bowel syndrome bowel habit subtypes[J]. *Am J Gastroenterol*, 2013, 108(11): 1766–1774.
- [20] OUYANG L, HE G, HUANG W, et al. Combined structure-based pharmacophore and 3D-QSAR studies on phenylalanine series compounds as TPH1 inhibitors[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(5): 5348–5363.
- [21] ZHONG H, HUANG W, HE G, et al. Molecular dynamics simulation of tryptophan hydroxylase-1: binding modes and free energy analysis to phenylalanine derivative inhibitors[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(5): 9947–9962.

(编辑: 梁进权)