

- therapeutics [J]. *Kidney Int*, 2006, 69(2): 213-217.
- [6] Eddy A A. Progression in chronic kidney disease [J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2005, 12(4): 353-363.
- [7] 方静, 谌贻璞, 张嫩. 通过共培养观察被马兜铃酸活化后的肾小管上皮细胞对成纤维细胞的作用 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2004, 20(5): 321-324.
- [8] 赵宗江, 张新雪, 傅博, 等. 肾康注射液对肾小管上皮细胞 LLC-PK1 分泌纤维连接蛋白的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2001, 24(1): 32-34.
- [9] 赵宗江, 傅博, 陈香美, 等. 肾康注射液对肾小管上皮细胞 LLC-PK1 分泌层粘连蛋白的影响 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2001, 2(9): 505-507.
- [10] 赵宗江, 张新雪, 傅博, 等. 肾康注射液对肾小管上皮细胞 LLC-PK1 分泌 IV 型胶原的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2000, 7(4): 200-202.
- [11] 赵宗江, 张新雪, 师锁柱, 等. 肾康注射液延缓 5/6 肾切除大鼠慢性肾功能衰竭进展的机理探讨 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2000, 6(10): 16-20.
- [12] 刘玉宁, 王立红, 郭立中, 等. 肾康注射液对肾小球系膜基质作用的血清药理学研究 [J]. *中国中医药科技*, 2005, 12(4): 223-224.
- [13] 王立红, 刘玉宁, 郭立中, 等. 肾康注射液对糖尿病肾病大鼠细胞外基质影响的实验研究 [J]. *中国中医药科技*, 2005, 12(2): 77-79.

连翘苷 D 和凝血因子 Xa 相互作用的分子动力学模拟

金丽媛^{1,2}, 张士俊², 刘冰妮², 徐为人^{2*}, 刘巍², 刘鹏², 汤立达³

- (1. 天津医科大学基础医学院, 天津 300070; 2. 天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193;
3. 天津药物研究院 天津药代动力学与药效动力学省部共建国家重点实验室, 天津 300193)

摘要:目的 阐明连翘苷 D (FTD) 与凝血因子 Xa (FXa) 活性位点的动态相互作用过程, 为设计新药提供参考依据。方法 利用 FXa 蛋白与其原始配体 (RPR) 的合理复合物结构作参照物, 通过对接获得了 FTD 与 FXa 的复合结构。采用分子动力学方法模拟了两个复合物在水溶液中 500 ps 运动轨迹, 考察配体与受体在动态相互作用过程中的变化过程。结果 RPR 依靠氢键作用与受体 S1 区域和中间部保持稳定的匹配状态, 以非极性的芳香基与 S4 区域 (Tyr99、Phe174、Trp215) 形成了很好的空间匹配。FTD 与受体相互作用方式不同, 与受体的 S1 区域作用较弱, 相对而言与 S4 区域及中间部的作用较强, 导致在相互作用的过程中被受体排斥出来。结论 通过配体与受体动态相互作用模拟研究表明, 作为 FXa 的抑制剂与受体 S1 区结合的部分结构应该相对刚性, 能与受体形成较强的氢键, 在 S4 区需要一定的疏水性和芳香性, 在中间部分需要一定量的氢键来帮助固定配体。

关键词: 连翘苷 D; 凝血因子 Xa; 分子动力学; 动态相互作用

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2009)04-0592-05

Molecular dynamic simulation of interaction between coagulation forsythoside D and factor Xa

JIN Li-yuan^{1,2}, ZHANG Shi-jun², LIU Bing-ni², XU Wei-ren²,
LIU Wei², LIU Peng², TANG Li-da³

- (1. College of Basic Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China;
3. Tianjin State Key Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Abstract : Objective To illuminate the dynamic interactive mode between coagulation factor Xa (FXa) active site and forsythoside D (FTD), in order to supply some advices for the design of new drugs. **Methods** To make FXa protein receptor and its initial ligand (RPR) as a reasonable compound and obtain a compound structure of FTD and FXa by using molecular docking. In order to investigate the interaction of the ligand and receptor during the dynamic state, 500 ps molecular dynamics simulation was chosen to estimate their binding mode. **Results** RPR remained stable matching state with S1 domain and middle part of the receptor depending on hydrogen bond, formed fine spacial matching with S4 (Tyr99, Phe174, and Trp215) relying on nonpolarity aromatic groups. The interaction style of FTD and receptor is different from RPR, it had weak role with S1 domain but had relatively strong action with S4 and middle part, as a

* 收稿日期: 2008-07-22

基金项目: 科技部支撑项目 (2007BA141B00); 天津市支撑项目 (07ZCKFSH00300)

作者简介: 金丽媛 (1982—), 女, 天津人, 硕士研究生, 主要从事药理学研究。Tel: 13612062511 E-mail: jinliyuan2006@163.com

* 通讯作者 徐为人 Tel: (022) 23003529 E-mail: xwrtj@yahoo.com.cn

result the ligand was repelled from the receptor. **Conclusion** Through the dynamic simulation of the interaction of ligand and receptor, it suggested that part of the structure of FXa inhibitor which can combine with S1 domain of receptor should be relatively rigid and it can form strong hydrogen bond with receptor. In the S4 domain of the receptor, it needs some hydrophobic, aromatic groups, and some hydrogen bond in the middle part to help fix the ligand.

Key words: forsythoside D (FTD); coagulation factor Xa; molecular dynamics; dynamic interaction

凝血因子 X (coagulation factor X, FX) 是一种维生素 K 依赖的丝氨酸蛋白酶^[1], FX 位于内、外源性凝血途径的交汇处^[2,3], 内源性途径形成的 FIXa、FVIIIa、Ca²⁺、磷脂复合物和外源性途径形成的 FVIIa、TF、Ca²⁺ 复合物都可激活 FX, 使其转化为 FXa^[4]。FXa 与 FVa、Ca²⁺、血小板因子 III (PF3) 形成凝血酶原复合物, 可激活凝血酶, 触发凝血级联反应的发生^[5,6]。由于 FXa 在凝血途径中的重要位置, FXa 抑制剂成为抗凝治疗新药开发中很有吸引力的靶点。

目前, 利用计算机辅助设计, 对药物作用机制及药物作用靶点进行虚拟评价, 为进一步实验研究提供线索, 这将提高新药发现效率, 降低研发成本, 是新药研发领域的新的热点之一^[7,8]。本课题组从蛋白质数据库 (Protein DataBank, PDB) 中选取编号为 1FOR 的 FXa 晶体结构作为受体, 以分子对接的方法对天津药物研究院的天然药物活性成分数据库进行虚拟筛选, 发现连翘苷 D (forsythoside D, 简称 FTD) 与 FXa 具有较好的结合模式, 为了提高理论的预测精度, 在对接结果的基础上, 以 1FOR 的原始配体 (简称 RPR) 为参考, 利用分子动力学模拟研究 FTD 与 FXa 的动态相互作用。

1 方法

1.1 分子动力学模拟^[9]: 1FOR 的晶体结构中含有原始配体 RPR, 直接作为 RPR 与 FXa 相互作用模拟的起始结构。将 1FOR 的原始配体删除后, 以原始配体为参考位置, 利用 Maestro 8.0 的 Glide 模块的默认方法把 FTD 对接进入 1FOR 的活性中心, 作为 FTD 与 FXa 相互作用模拟的起始结构。采用 Maestro 8.0 软件包的 impact 模块, 将两个起始结构分别浸入 6 nm × 5 nm × 5 nm 的水盒子 (简单点电荷模型, SPC) 中, 力场为 OPLC-2005, 模拟温度为 300 K, 步长为 1 fs, 周期边界条件为 7 nm × 6 nm × 6 nm, 水分子限制为刚性水分子, 采用 verlet 算法, 在该温度下充分平衡后, 每隔 1 000 fs 记录一次轨迹, 共记录 500 ps 的模拟轨迹。

1.2 配体分子结构变化分析: 起始位置时参考配体

RPR 和 FTD 的分子约呈直角形, 为了观察配体本身在分子动力学过程中的变化情况, 在轨迹中每隔 25 ps 选出一幅轨迹, 共 21 幅轨迹, 根据图 1 定义的 C4382、C4393、C4408 3 个原子形成的三角形的变化考察 RPR 的结构变化, 其夹角设为 β , 采用类似的方法定义 FTD 分子夹角 γ 。

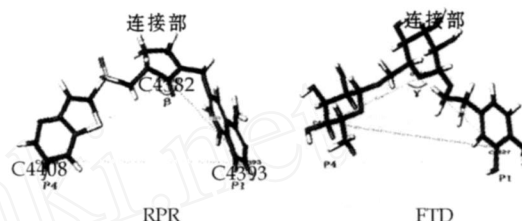


图 1 配体分子的三维结构和分子夹角的定义

Fig. 1 Structure of ligands and definition of angles for molecules

1.3 受体活性区域的结构变化分析: 为了观察受体本身在分子动力学过程中的变化情况, 在轨迹中每隔 25 ps 选出一幅轨迹, 共 20 幅轨迹, 参考文献报道的活性区域氨基酸残基, 取 C1600 (Val1213)、C1610 (Trp215) 和 C1420 (Asp189) 3 个点构成了一个三角形, 以两两间距离考察 S1 区的变化, 采用 C671 (Tyr99)、C1286 (Phe174)、C1615 (Trp215) 3 个点之间的距离考察 S4 区的变化, 见图 2。

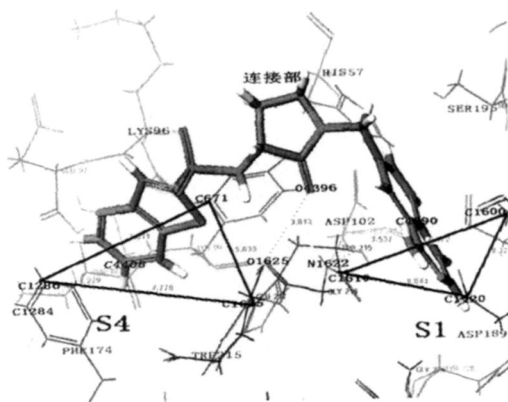


图 2 受体 S1 和 S4 活性区域的代表性原子定义

Fig. 2 Selected atoms for description of active domain S1 and S4

配体与受体相互作用的分析: 为了分析配体与

受体在分子模拟过程中的动态相互作用,分别在配体和受体 S1 区、中间体和 S4 区上各选适当的一个原子,形成 3 个原子对,以其距离考察配体与受体之间的相互作用。RPR 选择的原子为:P1 区的 C4390、连接部的 O4396、P4 区的 C4408;FTD 选择的原子为:P1 区的 C4428、连接部的 O4404、P4 区的 O4396,这两个配体的对应原子在空间位置上非常接近。受体选择的原子为 S1 区的 N1622、中间体的 O1625、S4 区的 C1284,见图 3。

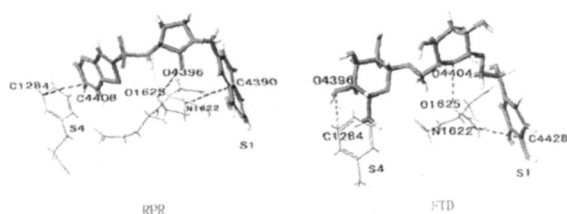


图 3 描述配体与受体相互作用的原子对的示意图

Fig. 3 Selected atom pairs for description of ligand-receptor interaction

2 结果

2.1 配体与受体动态相互作用过程中配体分子结构的变化:如图 1 所示,RPR 和 FTD 分子都是由 P1、P4 以及中间的连接部构成,P1 与 P4 成一角度,很像字母“L”,两者在三维空间的叠合性较好,大部分文献报道^[6,10,11],中间的连接部只起到连接 P1 和 P4 的作用,与蛋白质受体的活性位点无直接作用。如图 4 所示,RPR 分子起始夹角 β 约为 100° ,分子动力学模拟的过程中在 $80^\circ \sim 120^\circ$ 变化,平均夹角为 98.8° ,有一定的波动。而 FTD 分子起始夹角 γ 约为 120° ,在 $100 \sim 400$ ps 保持在 160° 左右,而后有所下降,但最终夹角增大到 148.1° ,FTD 的平均夹角为 148.3° ,表明 FTD 分子的柔性较大,在与受体的相互作用过程中容易变形,模拟前后的叠合结构见图 5。

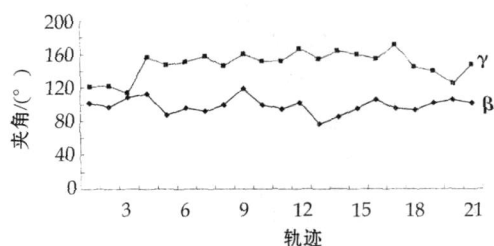


图 4 配体分子在动态模拟过程中的夹角变化

Fig. 4 Effects of ligand-receptor interactions on molecule angles

2.2 配体与受体动态相互作用过程中受体活性区域结构的变化:FXa 的活性区包括 3 部分,S1 区域

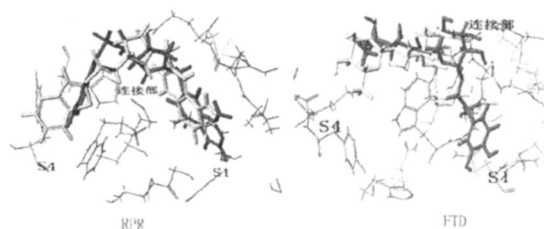


图 5 分子模拟起始和终点时配体结构的叠合比较图

Fig. 5 Alignment of initial and final structure of molecular simulation

是一个狭窄的裂隙,有一个疏水墙,Asp189 位于区域的底部,在这个区域里,带正电荷的基团可与天门冬氨酸的侧链形成盐键。S4 区域含有 3 个芳香族的氨基酸:Phe174、Trp215 和 Tyr99,以疏水作用为主。中间体(对应配体连接部)有催化三联体(catalytic triad site, CT)包括 Ser195、His57 和 Asp102,据报道 Ser195、Gln192 和 Arg143 的侧链可充分暴露,便于和抑制剂的结合^[12,13]。由于中间部分为主要暴露的部分,本研究主要考察配体与受体相互作用过程中 S1 和 S4 的变化。如图 6 所示,在 RPR 的诱导下,受体的 S1 区域三边距离在约 100 ps 时有短暂的增大,其后两边一直处在延长约 0.2 nm 的状态,总体上保持稳定;受体 S4 区域相对 S1 区域则变化比较大,在约 50 ps 后,区域距离波动比较频繁,中期时突然增大后又突然减小,但后期保持稳定,表明配体对 S1 区域影响较稳定,能够使区域空间适当扩大,对 S4 区域影响的波动较大。在 FTD 诱导下,受体 S1 区域在 25 ps 后两边各延长了约 0.4 nm,一边略有缩短,总体保持稳定;S4 区域在 250 ps 以内变化较小,其后突然增大并加大波动,表明 FTD 对受体的影响大于 RPR。综合两个配体的结果,受体 S1 区是比较刚性的区域,S4 区是比较柔性的区域。

2.3 配体和受体相互作用:整个模拟过程中配体与受体间的距离见图 7,RPR 与 S1 区域的 C1622 原子及中间体的 C1625 原子的距离在整个模拟过程中变化较小,处在平衡状态,与 S4 的 C1284 原子的距离变化较大,从 0.4 nm 逐步变成 1 nm,表明在配体与受体的动态相互作用过程中 RPR 与受体的 S1 区和中间体形成了稳定的状态,在 S4 区处在变化较大的状态,因此,RPR 能够覆盖了对 FXa 的活性至关重要的 Ser195、His57 和 Asp102 三联体,抑制 FXa 的活性。

根据对接的结果,FTD 分子能够占据了受体的活性腔,在平衡及动力学模拟的早期,形态上呈现

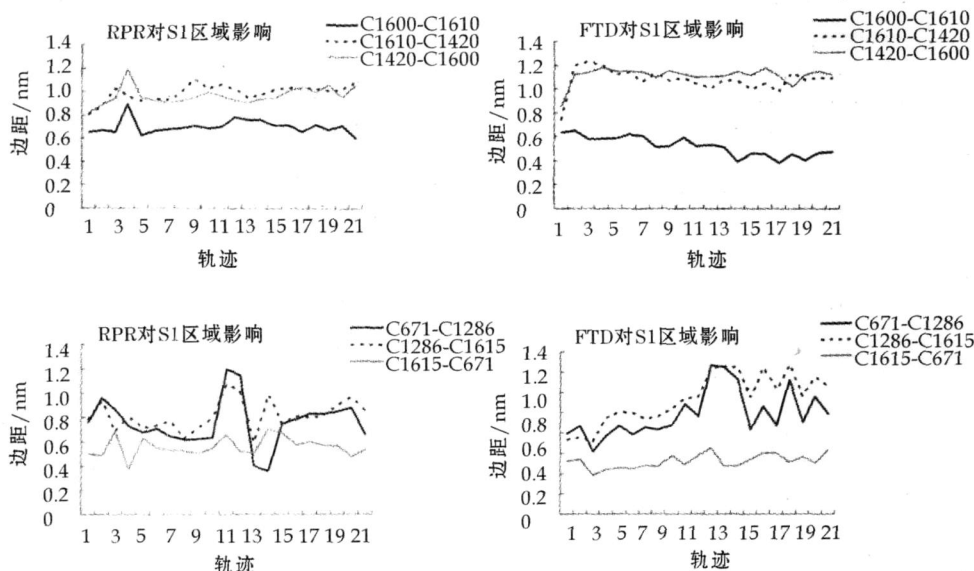


图 6 配体对受体 S1 和 S4 活性区域影响

Fig. 6 Effects of ligands on active domain S1 and S4 of receptor

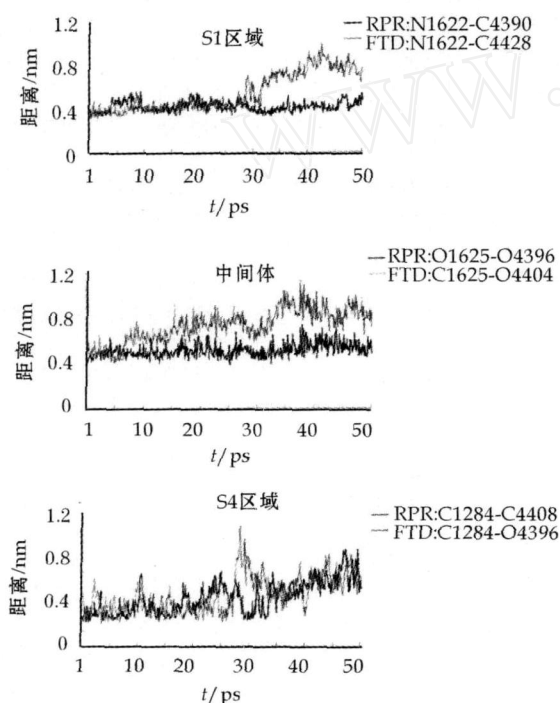


图 7 配体与受体关键点的距离变化轨迹

Fig. 7 Distances of atom pairs between ligand and receptor

“L”型,随着模拟时间的变化,FTD 与受体 S1 区 N1622 原子的距离在约 300 ps 时发生很大的变化,并维持到模拟结束,结合图 5 可知,这种变化是 FTD 分子在受体的作用下发生了变构,形成类似“Z”型结构。FTD 与受体中间体的距离从 50 ps 开始就逐渐加大距离最终平衡在 0.6 nm 左右,与 S4 的距离变化也是 300 ps 开始,从 0.6 nm 左右变化

到 0.8 nm 左右,并维持平衡,总体来看,FTD 像是被受体慢慢地“推”出一定距离。

进一步从氢键作用来分析两个配体与受体相互作用的结果,RPR 和 FTD 都能和受体形成若干氢键,这些氢键的形成会直接影响底物与受体之间的结合,不同的是,两者的氢键数目在分子动力学模拟过程中保持的程度有一定的差异。表 1 和表 2 列出这些氢键的平均长度以及出现次数的百分比。RPR 与受体之间一共形成了 6 个氢键,涉及的残基包括 Gly216、Asp189、Gly219、Gln61,这些氢键只出现在 S1 区域和中间体,S4 区域未见氢键出现,这些氢键很好固定了 RPR 与受体 S1 区和中间体的结合。而 FTD 分子本身含有很多羟基,在动力学过程中共出现了 14 个氢键,但大多不能稳定保持,S1 区的氢键偏少,S4区和中间体处在活性区域的外口上,

表 1 RPR 和受体间氢键的出现频率

Table 1 Frequency of hydrogen bonds between RPR and recetpor

氢键	受体	RPR	距离/ nm	频率/ %
1	O (Asp189)	H4423	0.198 5	99.80
2	O (Gly219)	H4424	0.207 7	99.20
3	O (Gly216)	H4425	0.210 5	19.32
4	O (Gly219)	O4396	0.242 1	19.92
5	O (Gly216)	O4396	0.217 9	88.05
6	O (Gln61)	O4400	0.246 0	12.55

1 和 2 代表 S1 区域出现的氢键; 3~6 代表中间体出现的氢键; S4 区域没有出现氢键

1 and 2 represent hydrogen bonds in S1 domain; 3—6 represent hydrogen bonds in connect part; no hydrogen bonds appeared in S4 domain

表2 FTD和受体间氢键的出现频率

Table 2 Frequency of hydrogen bonds between FTD and receptor

氢键	受体	FTD	距离/nm	频率/%
1	O (Ser195)	H4434	0.229 9	43.71
2	H (Gly219)	H4431	0.265 5	9.18
3	H (Arg222)	H4417	0.257 1	3.19
4	O (Glu147)	H4418	0.251 1	2.79
5	H (Tyr99)	H4404	0.261 5	9.18
6	O (Gly216)	H4418	0.245 2	14.17
7	O (Gly216)	H4414	0.246 3	12.38
8	O (Glu217)	H4416	0.235 6	8.78
9	O (Glu217)	H4418	0.256 2	23.35
10	O (Glu217)	H4414	0.260 5	14.97
11	O (Glu97)	H4397	0.236 2	54.49
12	O (Gly216)	H4434	0.223 0	16.97
13	O (Glu217)	H4434	0.273 0	2.20
14	O (Lys96)	H4397	0.236 9	13.77

1和2代表S1区域出现的氢键;3~10代表中间体出现的氢键;11~14代表S4区域没有出现氢键

1 and 2 represent hydrogen bonds in S1 domain; 3—10 represent hydrogen bonds in connect part; 11—14 represent hydrogen bonds in S4 domain

FTD与受体S4和中间体的氢键过多,使分子往外拉动,总体上形成了配体被受体推出的效果。

3 讨论

本研究通过分子对接的方法,从中药分子数据库中找出对接结果比较好的天然药物活性成分FTD,为进一步从理论上研究其作为FXa抑制剂的可靠性,采用分子动力学方法以参考配体RPR为对照进行了配体与受体相互作用的动态模拟,经过500 ps的模拟,揭示了其微观相互作用的过程。RPR依靠氢键作用与受体S1区域和中间体保持稳定的匹配状态,以非极性的芳香基与S4区(Tyr99、Phe174、Trp215)形成了很好的空间匹配。FTD与受体相互作用方式不同,与受体的S1区作用较弱,相对而言与S4及中间部的作用较强,导致在相互作用的过程中被受体排斥出来。提示,作为FXa的抑制剂与S1区结合的部分结构应该相对刚性,能与受体形成较强的氢键,在S4区需要一定的疏水性和芳香性,在中间部分需要一定量的氢键来帮助固定配体。由于FXa在凝血途径中处在重要位置,FXa抑制剂成为抗凝治疗新药开发中新的热点靶点。本研究的结果阐明了配体与受体相互作用的微观规律,对于设计新的FXa抑制剂具有指导意义。

本研究发现配体和受体的动态相互作用过程中,配体和受体的结构都发生了一定的变化,这是分子对接没有办法反映的内容,揭示了虚拟筛选中对接计算的不足,提示分子动力学模拟可以更全面反映配体与受体的动态匹配程度,也是进行药物理论设计的一种有效工具。

致谢:上海超算中心和华南理工大学网络计算中心提供计算支持。

参考文献:

- [1] 林建著,王鸿利,邵慧珍. 凝血因子X的研究进展[J]. 国外医学:输血及血液学分册, 1982, 15(1): 2-4.
- [2] Rezaie A R. Kinetics of factor Xa inhibition by recombinant tick anticoagulant peptide: both active site and exosite interactions are required for a slow-and tight-binding inhibition mechanism [J]. *Biochemistry*, 2004, 43(12): 3368-3375.
- [3] Krupiczko M A, Scotton C J, Chambers R C. Coagulation signalling following tissue injury: focus on the role of factor Xa [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(6-7): 1228-1237.
- [4] Zhou J J, Xie G R, Yan X J, et al. *Traditional Chinese medicines: Molecular Structures, Natural Sources and Applications* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- [5] Talele T T, McLaughlin M L. Molecular docking/dynamics studies of aurora A kinase inhibitors [J]. *J Mol Graph Model*, 2008, 26(8): 1213-1222.
- [6] Tauber M, Crowley M, Price D J, et al. Study of a highly accurate and fast protein-ligand docking method based on molecular dynamics [J]. *Concurr Computat*, 2005, 17(14): 1627-1641.
- [7] 林肖惠,徐为人,刘鹏,等. 二氢丹参酮I的降血脂作用研究[J]. 中草药, 2008, 39(9): 1378-1380.
- [8] 王晶晶,刘巍,徐为人,等. 黄酮苷类与表皮生长因子受体结合模式的理论研究[J]. 中草药, 2009, 40(3): 420-423.
- [9] 陈正隆,徐为人,汤立达. 分子模拟的理论与实践[M]. 北京:化学工业出版社, 2007.
- [10] Heine A, Koert U, Klebe G, et al. Understanding binding selectivity toward trypsin and factor Xa: the role of aromatic interactions [J]. *Chem Med Chem*, 2007, 2(3): 297-308.
- [11] Gould W R, Cladera E, Harris M S, et al. Co-crystal structure and inhibition of factor Xa by PD0313052 identifies structurally stabilized active site residues of factor Xa and prothrombinase [J]. *Biochemistry*, 2005, 44(26): 9280-9289.
- [12] Kamata K, Kawamoto H, Honma T, et al. Structural basis for chemical inhibition of human blood coagulation factor Xa [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(12): 6630-6635.
- [13] Brandstetter H, Kuhne A, Bode W, et al. X-ray structure of active site-inhibited clotting factor Xa. Implications for drug design and substrate recognition [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(47): 29988-29992.