

基于计算机模拟技术从中药天然产物库中挖掘色氨酸羟化酶 1 抑制剂

史海龙, 程 怡, 黄 月, 冯雪松, 王月雯, 黄 峰, 晁 旭*

陕西中医药大学, 陕西 西安 712046

摘 要: **目的** 基于计算机模拟技术从中药天然产物库中挖掘色氨酸羟化酶 1 (tryptophan hydroxylase-1, TPH1) 抑制剂。**方法** 搭建分子对接、类药性筛选、药动学预测、分子动力学模拟于一体的药物筛选平台, 从中药系统药理学数据库与分析平台 (traditional chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP) 数据库中挖掘 TPH1 抑制剂。**结果** 川贝酮碱 (TCMSP_ID: MOL009572) 实验数据均表现出良好的 TPH1 抑制活性及类药性, 预测命中分子可有效抑制胃肠道相关 TPH1 活性, 但对中枢神经系统相关 TPH2 活性抑制作用较小; 通过酶活抑制实验验证抑制效应, 并借助分子动力学模拟动态解析结合能变化及各项能量分布。**结论** 整合多种虚拟筛选技术挖掘到缓解肠易激综合征相关痛症的 TPH1 抑制剂-川贝酮碱 MOL009572。

关键词: 分子对接; 分子动力学模拟; 色氨酸羟化酶; 抑制剂; 川贝酮碱

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)10-2968-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.10.005

Exploring potential TPH1 inhibitors from traditional Chinese medicine natural product database based on computer simulation technology

SHI Hai-long, CHENG Yi, HUANG Yue, FENG Xue-song, WANG Yue-wen, HUANG Feng, CHAO Xu

Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China

Abstract: Objective To discover the active molecules with inhibitory activity to tryptophan hydroxylase-1 (TPH1) from traditional Chinese medicine natural product database based on computer simulation technology. **Methods** A drug screening platform, that integrates molecular docking, drug-like screening, pharmacokinetic prediction, and molecular dynamics simulation, was built to discovery TPH1 inhibitors from the TCMSP database. **Results** Chuanbeinone (TCMSP_ID: MOL009572) showed good inhibitory activity to TPH1 and drug-likeness, which can effectively inhibit gastrointestinal related TPH1 enzymes, but had weak inhibitory effect on central nervous system-related TPH2 enzyme activity. Through preliminary verification of enzyme activity inhibition, molecular dynamics simulation is used to accurately predict the free binding energy of THP1 and MOL009572 and various energy contributions. **Conclusion** Chuanbeidone, MOL009572, an active molecule of traditional Chinese medicine that relieves irritable bowel syndrome-related pain, has been screened out through integrated multiple virtual screening technologies.

Key words: molecular docking; molecular dynamics simulation; tryptophan hydroxylase; inhibitor; chuanbeinone

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) 可以使色氨酸的羟基化, 使色氨酸转化为 5-HT。这是 5-HT 生物合成过程中的起

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) 痛症药物的关键靶标^[2]。哺乳动物 TPH 普遍存在 2 种亚型, 其中人类 TPH1 与 TPH2 基因分别位于 11、12 号染色体上, 序列相似性高达 71%^[3]。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

收稿日期: 2021-11-21

基金项目: 陕西省中医管理局中医药科研课题 (JCMS003); 陕西中医药大学创新团队项目 (2019-Y505)

作者简介: 史海龙, 男, 博士, 美国 UNMC 博士后, 副教授, 研究方向为计算机辅助药物设计及生物大分子模拟。E-mail: shl112@sntcm.edu.cn

*通信作者: 晁 旭, 博士, 教授, 研究方向为中医药防治消化系统肿瘤。

表达的组织特异性研发抑制剂，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，但临床用药中仍然存在诸多问题，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^[5]，因此需要研发新型 TPH1 抑制剂。

近几年研究相继解析出高分辨率 TPH 蛋白晶体结构，推动了基于靶标活性口袋结构的计算机辅助药物分子设计，然而国内外 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，未涉及到 TPH2 酶活抑制的负效应。因此本研究搭建类药性筛选、药动学参数预测、双靶标分子对接、分子动力学模拟于一体的药物筛选平台，从中药天然产物库中挖掘 TPH1 抑制剂。

1 材料与计算方法

分子对接均采用 Schrodinger 2018 的 Glide 模块、ADME 参数计算采用 Schrodinger 2018 的 QikProp 模块，隐性溶剂环境的结合自由能计算采用分子力学/广义波恩表面积模型 MM/GBSA^[6]，显

性溶剂环境的结合自由能计算采用分子力场/泊松玻尔兹曼表面积模型 MM/PBSA^[7]，分子动力学模拟采用 Gromacs 2019 与 Gaussian 09 程序包。

人源性的重组表达 TPH1、TPH2 由陕西中医药大学针药结合省级重点实验室朱先伟博士提供；LX-1031 (CAS 945976-76-1, 批号 637958) 购于 abcam 中国上海分公司；川贝酮碱 (CAS 103530-47-8, 批号 20190718) 购于上海同田生物；ELX808 酶标仪 (美国伯腾公司)。

1.1 靶蛋白 TPH1/TPH2 结构预处理与对接口袋分析

首先从 PDB 数据库下载的靶蛋白晶体结构，TPH1 选择 3HF8 (PDB_ID)，TPH2 选择 4V06 (PDB_ID)，见图 1；然后采用 Schrodinger 的 Protein Preparation Wizard 模块预处理受体蛋白结构；随后采用 Protein Grid Generation 模块准备靶标 TPH1/TPH2 蛋白活性口袋并产生格点文件，原结晶配体坐标作为格点盒子中心。由于篇幅限制，仅展示靶标 TPH1 与原共结晶配体 LP533401 结合模式及关键残基，见图 2。

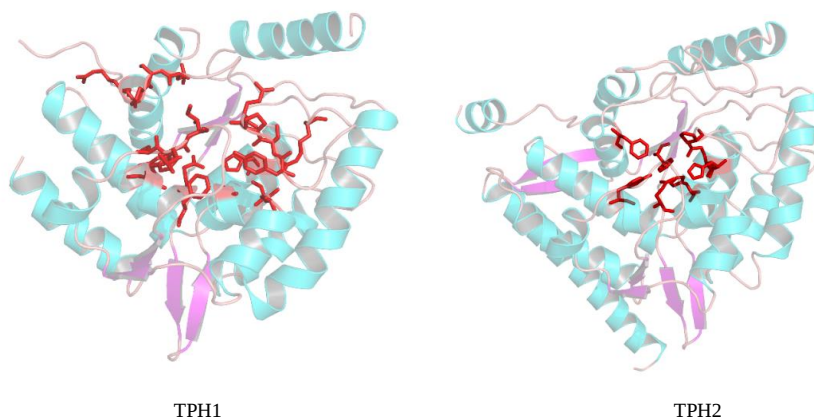
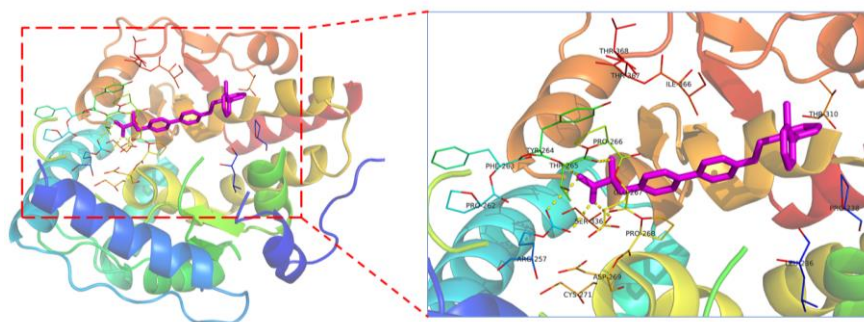


图 1 靶标受体蛋白 TPH1 和 TPH2 活性口袋
Fig. 1 Active pockets of target receptors TPH1 and TPH2



1.2 中药分子化学结构的预处理

中药天然产物数据库 TCMSP^[8] (<https://old.tcmsp-e.com/index.php>) 13 144 个化合物作为配体库。采用 Schrodinger 的 LigPrep 模块对各分子进行加氢、能量最小化、几何优化等处理。在力场 OPLS3 下, 计算 pH 为 7.0±2.0 的化合物离子状态, 搜索合理构象作为对接起始构象, 形成可能的互变异构体。由于 LX-1031 有效抑制 TPH1 酶活性, 因此可作为阳性对照, 用于 5-HT 过表达相关疾病的药物研发, 如腹泻型 IBS^[9]。以同样方式预处理 LP533401、LX-1031, 作为本实验对照组。

1.3 基于类药性评估、分子对接、ADME 预测、结合自由能(隐式溶剂模型)计算的多轮筛选

基于类药性规则“Lipinski Ro5^[10]”和“Verber Ro3^[11]”对中药分子配体库进行首轮筛选, 挑选出 8987 个符合类药性规则的命中分子。

基于受体结构的双靶标 TPH1/TPH2 分子对接进行第 2 轮筛选。首先针对靶标 TPH1 对上一步筛选的化合物库进行高通量虚拟筛选 (high throughput virtual screening docking, HTVS-docking), 并根据 Glide Score 对 HTVS-docking 的输出化合物进行排名。然后提取最高得分前 35% 化合物, 进行靶标 TPH1 标准精度 (standard precision docking, SP-docking) 模式分子对接, 根据 Glide Score 对 SP-docking 的输出化合物再次进行排名。随后提取最高得分前 40% 化合物, 进行 TPH1/TPH2 双靶标高精度 (extra precision docking, XP-docking) 模式分子对接, 以 TPH1 的 Docking score ≤ -33.49 kJ/mol 为筛选阈值, 选取与 TPH1 有较低结合自由能的分子, 再次选取与 TPH2 有较高 Docking score 的化合物, 二者交集最终作为候选分子。

基于 ADME 药动学参数, 采用 Schrodinger 的 QikProp 模块进行第 3 轮筛选, 从相对分子质量 (molecular weight, M_w)、氢键供体 (hydrogen bond donor, HB donor)、氢键配体 (hydrogen bond acceptor, HB acceptor)、溶剂可及表面积 (solvent accessible surface area, SASA)、 K^+ 通道阻断相关 log IC_{50} 系数 (log IC_{50} for blockage of HERG K^+ channels, logHERG)、水溶性系数 (aqueous solubility, logS)、脂水分配系数 [octanol/water partition coefficient, log(O/W)]、口服生物利用度 (oral absorption, OB)、化合物的极性表面积 (PSA,

Van der Waals surface area of polar nitrogen and oxygen atoms and carbonyl carbon atoms) 等评估, 筛选具有良好类药性质的化合物。具体筛选规则为 M_w 可接受范围小于 650、HB donor 数值可接受范围不大于 5、HB acceptor 数值可接受范围不大于 10、SASA 数值可接受范围为 300~1000、 K^+ 通道阻断相关 log IC_{50} (数值推荐区间低于 -5)、logS 数值可接受范围为 -7.0~0.5、log(O/W) 数值可接受范围为 -2~6.5、OB 低于 50 代表较差, 高于 80 代表较好, PSA 数值可接受范围为 7.0~200.0。

基于 Prime-MM/GBSA 结合自由能预测进行第 4 轮筛选。由于高精度分子对接函数计算仍然无法估算配体-受体复合物结合的溶剂化效应因素, 因此使用隐性溶剂模型下 MM/GBSA 算法优化排序, 进一步提高结合自由能的计算精度。

1.4 分子动力学模拟与 MM/PBSA 结合自由能(显式溶剂模型)

为了从动力学和热力学角度动态分析靶标 TPH1 与命中分子互作模式, 使用 GROMACS 进行分子动力学模拟。蛋白拓扑参数取自 Amber 的 FF03 力场, 由 PDB2GMX 工具获得; 抑制剂的各原子电荷先用 Gaussian 09 在 B3LYP/6-311G** 基组水平计算静电势, 再用 Amber 中的 RESP 电荷拟合程序算出。将复合物放入 1 nm×1 nm×1 nm 的立方体 TIP3P 水盒中, 并加入 Na^+ 和 Cl^- , 中和该系统到 0.15 mol/L NaCl 溶液浓度, 随后进行能量最小化和预平衡, 最后在 26.85 °C (300 K) 进行 50 ns 的分子动力学模拟, 时间间隔为 2 fs, 每 10 ps 保存一次能量和坐标文件。从 25~50 ns 稳定模拟轨迹中提取 250 帧轨迹文件, 计算 MM/PBSA 结合自由能, 并且提取 TPH1-MOL009572、TPH1-LX-1031 两个体系分子动力学模拟 50 ns 最后一帧构象, 解析受体-配体结合模式。

1.5 TPH 酶活抑制测定

命中分子 MOL009572 进行 TPH 酶活抑制的验证性实验。酶活测定缓冲液包含: 60 μmol/L 色氨酸溶液、300 mol/L 6-甲基-四氢蝶呤、200 mmol/L 硫酸铵溶液、7 mmol/L DTT、25 μg/mL 过氧化氢酶、25 μmol/L 硫酸亚铁铵、50 mmol/L MES 缓冲液 (pH 7.0)。25 nmol/L 人源性 TPH1/TPH2 被添加到不同浓度梯度的 MOL009572 溶液中开始反应。使用 4 mm 的石英比色皿荧光分光光度法定量测定酶活性, 激发光波长为 300 nm, 发射光波长为 330 nm, 分别于狭缝宽度在 3 nm 处激发和 5 nm 处发射。

2 结果与分析

2.1 虚拟筛选结果分析

TCMSP 数据库中 13 144 个中药单体化合物进行多轮虚拟筛选, 筛选流程见图 3, 挑选出排名前 10 的命中分子, 它们均具备有较强的 TPH1 结合自由能、较弱的 TPH2 结合自由能、良好的药理学参数、较高的 OB 等, 如表 1、2 所示。进一步参照 LX-1031 的 Prime-MM/GBSA 结合自由能, 以 -57.73 kJ/mol 作为阈值, 筛选得到 2 个抑制剂分子、MOL009572(川贝酮碱, chuanbeinone)、MOL009586(异浙贝母碱, isovorticine), 二者均是来源于川贝母的等甾体生物碱, 结构式见图 4。

2.2 分子动力学模拟轨迹的均方根偏差 (root-mean-square deviation, RMSD) 及结合自由能计算

计算分子动力学模拟 50 ns 时长轨迹的 RMSD 值, 以此检验体系稳定性, 结果见图 5。在模拟运行 15 ns 之后, 所有体系的 RMSD 值均无大幅波动,

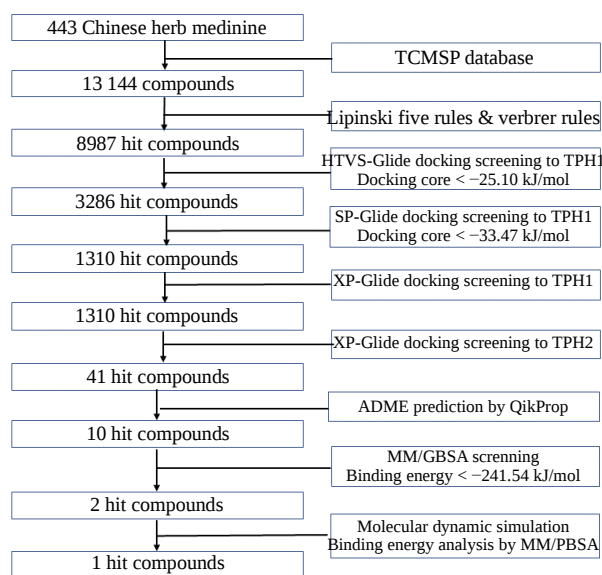


图 3 虚拟筛选流程及结果

Fig. 3 Virtual screening workflow and results

表 1 命中分子 (排名前 10) 双靶标 TPH1/TPH2 对接结合能及 MM/GBSA 结合自由能

Table 1 Dock binding energy and MM/GBSA binding free energy of top 10 hits with dual-target TPH1/TPH2

TCMSP 编号	化合物名称	MM/GBSA 结 合自由能/ (kJ·mol ⁻¹)	TPH1 Glide- XP 分子对接/ (kJ·mol ⁻¹)	TPH2 Glide- XP 分子对接/ (kJ·mol ⁻¹)	InChIKey
MOL009572	chuanbeinone	-64.02	-10.390	-5.240	MWBJDDYEGDW CZ-XFAHYVMYSA-N
MOL009586	isovorticine	-58.36	-10.370	-5.970	IUKLSMSEHKDIIP-NPFKDHJPSA-N
LX-1031	positive control	-57.73	-9.295	-8.704	XNMUICFMGGQSMZ-WIOPSUGQSA-N
LP-534193	proligand	-55.42	-13.993	-12.696	JZWUKILTKYJLCN-XUZZJYLKSA-N
MOL004451	peiminine	-48.86	-10.220	-6.530	IQDIERHFZVCNRZ-MEYDDXOOSA-N
MOL013439	isoagarotetrol	-42.83	-10.060	-7.040	CWMIROLCTHMEEQ-FXUDXRNXSA-N
MOL009589	korseverinine	-41.57	-10.260	-6.590	GPOVTJUXVPPEKR-GNQIZWBHSA-N
MOL009585	imperialine-β-N-oxide	-39.91	-10.570	-7.560	AWVOIAPFKWRZHZ-YUYPDVIUSA-N
MOL010176	cordiline	-32.91	-10.370	-7.960	RKRBZPKEVUKTID-UVCFXTPQSA-N
MOL012295	poststerone	-30.48	-10.250	-5.920	VNLQNGYIXVTQRR-NQPIQAHSSA-N
MOL010502	agarotetrol	-25.40	-10.150	-7.530	CWMIROLCTHMEEQ-YHUYLMFSA-N
MOL000805	polyorusterone f	-22.86	-10.360	-7.970	CCKVCMQVDJEZBL-ZYUWOXQJSA-N

均达到了平衡状态。从 25~50 ns 分子动力学轨迹中提取 250 帧轨迹文件, 计算 MM/PBSA 结合自由能及各种能量贡献情况, 结果见表 3。结合自由能强弱关系为 MOL009572 > LX-1031 > MOL009586 > LP533401, 其中范德华力最有利于命中分子与靶标结合, 并起主导作用; 静电势能、表面溶剂化作用也有利于结合, 但作用力较弱, 而溶剂中极性溶剂化作用不利于体系结合。在 LP-533401 与靶标结合中, 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; 在候选分子 MOL009586 中, 与靶标的范德华力较弱, 而溶剂中的极性相互作用较高, 2 个因素均不利于体系结合, 造成与 TPH1 结合自由能数值偏高。基于以上分析, 选择 MOL009572 作为 TPH1 的抑制分子。

2.3 分子动力学模拟轨迹 RMSD 值解析

计算 15~50 ns TPH1 蛋白骨架原子的均方根波动值 (root mean square fluctuation, RMSF), 结

表 2 命中分子 (排名前 10) 的 ADME 参数预测值

Table 2 Predicted values of ADME parameters of top 10 hits

TCMSP 编号	M_w	溶剂可及 表面积/nm	氢键 供体	氢键 受体	log(O/W)	亲水性 系数	logHERG	表观 Caco2 细 胞渗透率/(nm·s ⁻¹)	OB/%	化合物的极性 表面积/nm
MOL009572	413.64	69.31	1	5.70	4.1	-5.4	-4.7	296.900	95.26	5.46
MOL009586	431.66	71.53	3	6.15	3.7	-5.1	-4.9	163.300	88.02	6.77
LX-1031	538.50	86.39	5	6.25	3.1	-7.1	-6.4	5.679	45.44	13.16
LP-534193	464.70	78.12	7	8.90	0.7	-0.2	-7.6	4.870	30.25	9.76
MOL004451	429.64	68.41	2	6.45	3.5	-4.8	-4.5	146.600	86.15	7.46
MOL012295	362.47	54.52	3	8.15	1.4	-3.1	-2.7	212.300	76.82	10.92
MOL010502	318.33	55.45	3	8.30	0.8	-2.6	-4.8	132.100	69.46	11.91
MOL000805	478.67	73.29	5	8.60	2.8	-4.6	-4.1	107.700	79.81	12.18
MOL013439	376.41	66.54	4	8.10	0.8	-2.6	-5.5	186.400	78.85	11.03
MOL009589	413.64	71.47	2	5.40	4.3	-5.7	-5.0	370.100	100.00	4.76
MOL009585	445.64	70.85	2	7.45	3.7	-4.1	-4.1	480.600	96.77	8.01
MOL010176	413.64	69.82	2	5.40	4.3	-5.4	-4.8	545.700	100.00	4.46

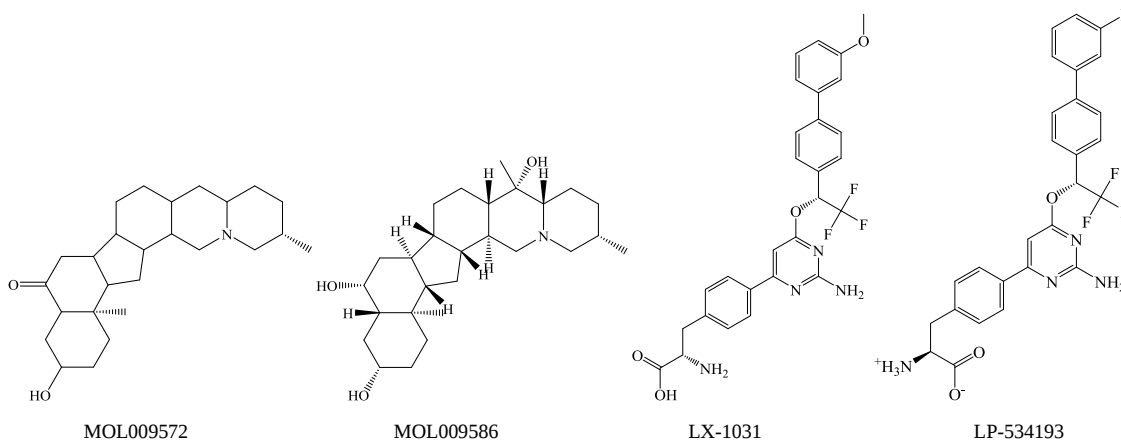


图 4 命中分子和阳性对照分子的化学结构

Fig. 4 Chemical structures of hit and positive control molecules

果见图 6。体系 TPH1-MOL009572、TPH1-LX-1031 中蛋白骨架原子波动变化趋势相似, 氨基酸残基 222~225 区段和 361~371 区段出现较大波动, 无法形成稳定的成键相互作用, 不利于受体-配体复合物的结合, 但是 2 个体系的整体性波动幅度均小于空载体蛋白靶标, 说明 MOL009572、LX-1031 与靶标的结合, 有利于靶标蛋白空间结构稳定。除此之外, 还观察到 2 个体系在氨基酸残基 270~300 区段、310~320 区段出现了较小波动 (RMSF<0.1 nm), TPH1 活性口袋周围氨基酸残基 (Leu236、Pro238、Arg257、Pro262、Phe263、Tyr264、Thr265、Pro266、Glu267、Pro268、Asp269、Cys271、Thr310、Ile366、Thr367、Thr368, 见表 4) RMSD 波动值均小于空受体蛋白 APO、LX-1031 相应的残基位点, 推测

MOL009572 与 TPH1 之间形成了氢键、疏水相互作用、 π - π 堆积作用等, 将 MOL009572 包裹在蛋白活性口袋内, 形成更稳定的受体-配体二元复合物。

2.4 酶活抑制实验结果

如图 7 所示, 分别为 MOL009572 对酶 TPH1、TPH2 活性抑制实验和 LX-1031 对酶 TPH1、TPH2 活性抑制实验, 这 4 组实验数据均由酶动力学实验方法测量得到。图 7-a 的实验数据计算得出, MOL009572 与 TPH1、LX-1031 与 TPH1 二者的体外 IC₅₀ 相同, 均为 210 μ mol/L。图 7-b 的实验数据计算得出, LX-1031 与 TPH2 的体外 IC₅₀160 μ mol/L, MOL009572 与 TPH2 未观察到抑制效果。需要提出说明的是, 以上每个浓度均做 3 次平行重复, 分别取酶抑制活性平均值。此外从图 7-c 实验数据作 Line-weaver-Burk 曲

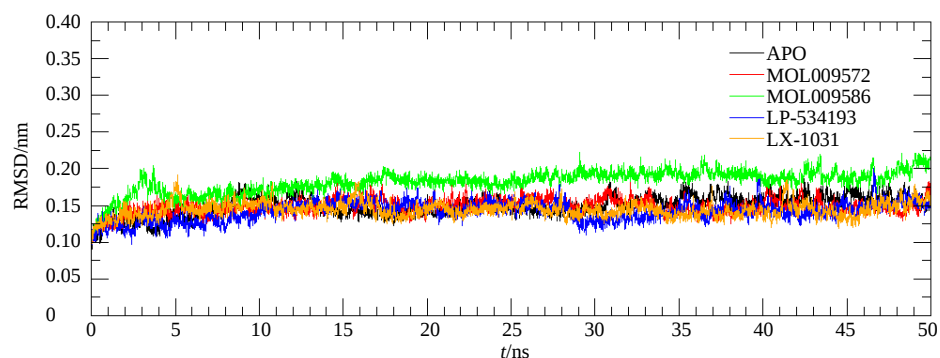


图 5 分子动力学模拟过程中复合物的 TPH1 氨基酸骨架原子随时间变化的 RMSD 值

Fig. 5 RMSD graph of TPH1 protein backbone in all complexes during 50 ns MD simulation

表 3 MM/PBSA 结合自由能

Table 3 Results of MM/PBSA binding free energy

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/(kJ·mol ⁻¹)
MOL009572	-118.498	-175.464	145.446	-13.380	-161.896
MOL009586	-49.148	-93.536	63.835	-5.006	-83.856
LP533401	-76.988	-109.060	156.159	-15.459	-45.349
LX-1031	-177.532	-41.238	112.063	-17.896	-124.602

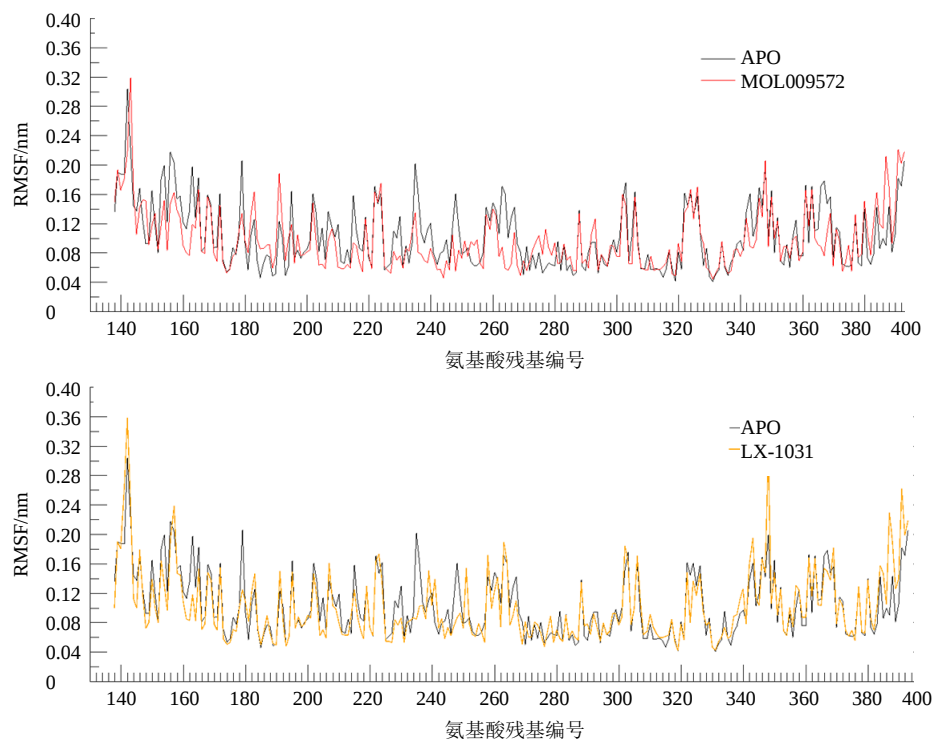


图 6 分子动力学模拟过程中复合物的 TPH1 氨基酸骨架原子随时间变化的 RMSF 值

Fig. 6 RMSF graph of TPH1 protein backbone in all complexes during 50 ns MD simulation

线, 结果表明 MOL009572 显示出竞争性抑制的特点。

2.5 结合模式分析及分子动力学模拟氢键数目解析

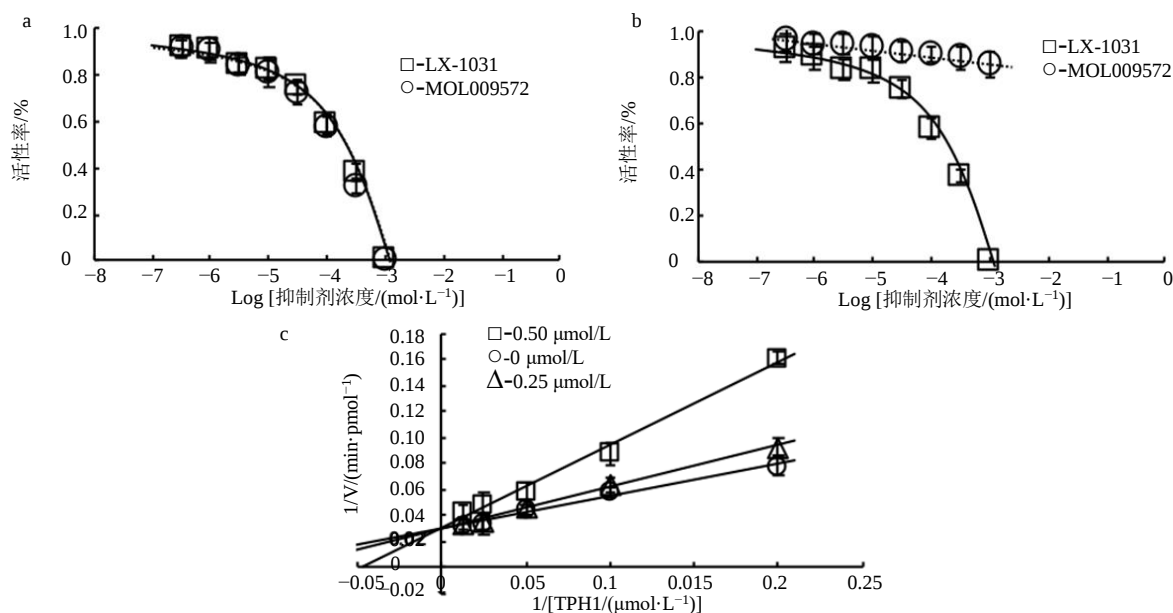
Discovery Studio Visualizer 分析 MOL009572 与

TPH1 互作的主要作用力是氢键、 π -Alkyl 堆积作用, 见图 8。MOL009572 与氨基酸残基 Tyr264 形成常规氢键, 与 Thr265 形成碳氢键, 并且与在 Val232、

表 4 分子动力学模拟过程中 TPH1 活性口袋部位关键残基 RMSF 值

Fig. 4 RMSF graph of key residues in active pockets of TPH1 during 50 ns MD simulation

氨基酸残基编号	Apo	MOL009572	LX-1031	氨基酸残基编号	Apo	MOL009572	LX-1031
Leu236	0.160	0.080	0.103	Glu267	0.142	0.108	0.110
Pro238	0.094	0.070	0.084	Pro268	0.091	0.062	0.076
Arg257	0.081	0.059	0.053	Asp269	0.081	0.050	0.050
Pro262	0.107	0.076	0.074	Cys271	0.089	0.056	0.060
Phe263	0.171	0.088	0.189	Thr310	0.078	0.057	0.091
Tyr264	0.161	0.059	0.165	Ile366	0.172	0.088	0.154
Thr265	0.101	0.056	0.076	Thr367	0.178	0.076	0.149
Pro266	0.128	0.066	0.089	Thr368	0.148	0.108	0.138



a-对人源性 TPH1 的抑制效果 b-对人源性 TPH2 的抑制效果 c-不同浓度抑制剂 MOL009572 的初速度的 Lineweaver-Burk 曲线
a-inhibitory effect on human TPH1 b- inhibitory effect on human TPH2 c- Lineweaver-Burk curves of initial velocities of different concentrations of inhibitor MOL009572

图 7 TPH1/TPH2 酶活抑制实验

Fig. 7 TPH1/TPH2 enzyme activity inhibitory test

Leu236、Pro268 形成 Alkyl 相互作用，与 Phe241、Tyr235、Phe318、His272 形成 π -Alkyl 堆积作用，这些作用力促进受体-配体相互结合。如图 9 所示，TPH1 与 LX-1031 的相互作用不仅有氢键，还有 π - π 堆积作用。LX-1031 与残基 Glu317、Ser336、Arg257、Thr265 形成常规氢键，与残基 Tyr235、Arg121 形成碳氢键，同时还与 Tyr235、Phe313、His272 形成 π - π 堆积作用，与 Ile366、Pro268 形成 π -Alkyl 或 Alkyl 相互作用。这些作用力使结合能降低，LX-1031 亲和力增加，与 TPH1 活性部位紧密结合，形成稳定的受体-抑制剂复合物，降低 TPH1 酶的催化活性，从而有效抑制 5-HT 合成。

借助 g-hbond 程序计算 TPH1 与 MOL009572、

LX-1031 之间的氢键数量随时间的变化，统计结果如图 10 所示。总体而言，与 LX-1031 相比，MOL009572 与 TPH1 结合氢键数量近似；其中 MOL009572 氢键数量峰值为 3，均值为 3；LX-1031 氢键数量峰值为 4，均值为 2，说明氢键促使复合物形成稳定构象。在分子动力学模拟 45 ns 之后，LX-1031 与 TPH1 至少存在 3 次氢键相互作用的接触，而 LX-1031 与 TPH1 仅存在至少 2 次氢键相互作用的接触，提示 MOL009572 比 LX-1031 与靶标 TPH1 结合更具优势。

3 讨论

四川大学华西医学院何菱研究团队等使用分子动力学模拟、结合自由能预测、能量项拆分及丙氨

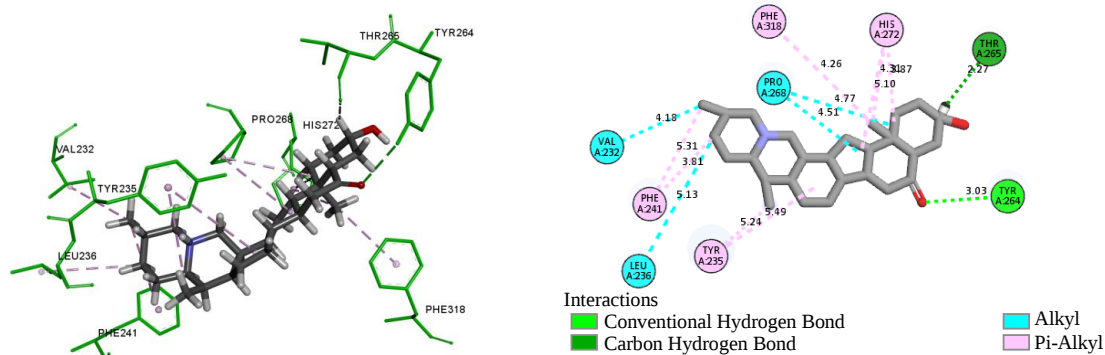


图 8 TPH1 与 MOL009572 相互作用

Fig. 8 Interaction between TPH1 and MOL009572

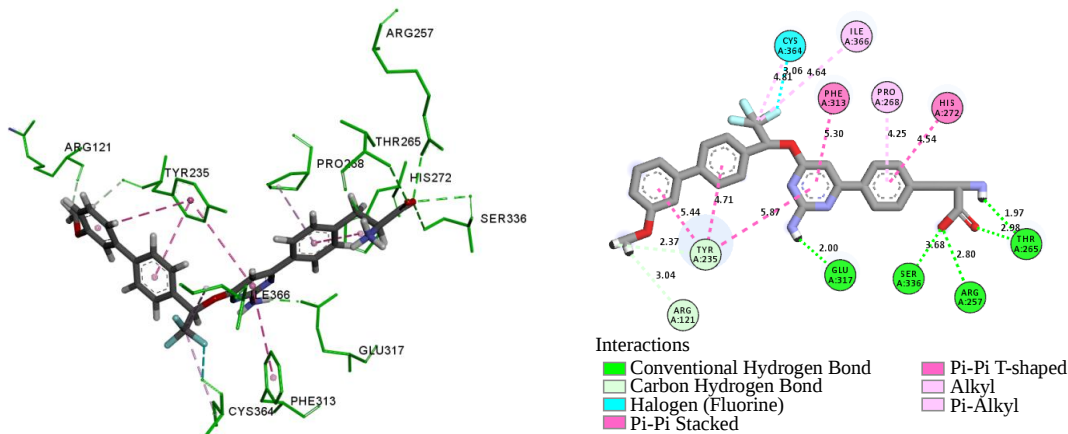


图 9 TPH1 与 LX-1031 相互作用

Fig. 9 Interaction between TPH1 and LX-1031

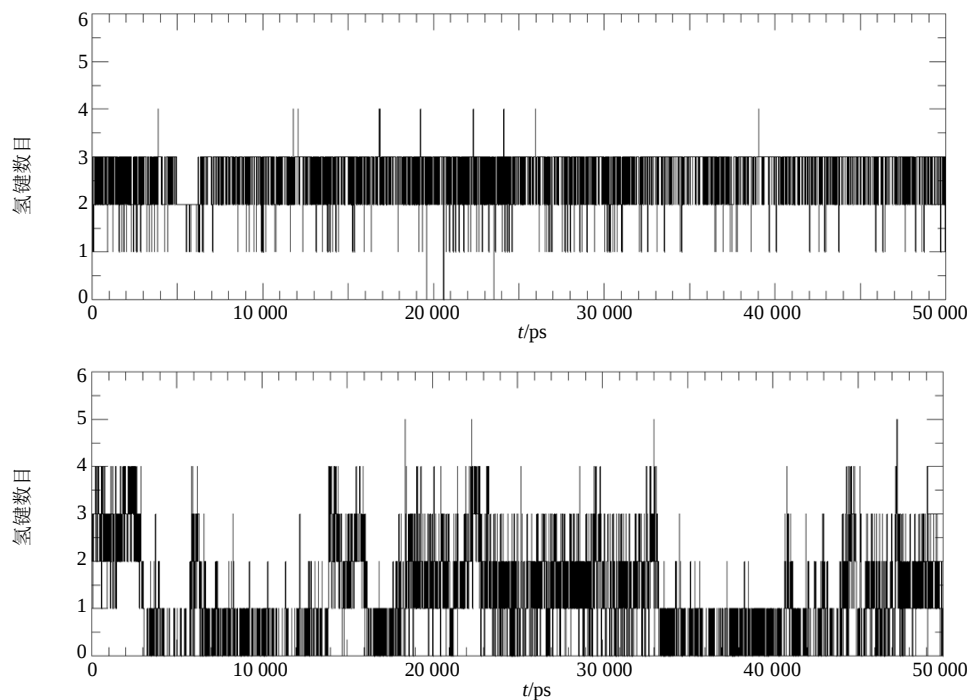


图 10 分子动力学模拟过程中配体小分子与受体蛋白活性口袋形成的氢键数目

Fig. 10 Number of hydrogen bonds formed between ligands and active pockets of receptors during MD simulations

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^[12]。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的阐明一系列已知 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^[13], 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, 预测精度有待提升。

基于上述考虑, 本研究提高从挖掘传统中药库药效成分为突破口, 制定了一套整合类药性筛选、药动学参数预测、双靶标分子对接、结合自由计算的研究策略; 对 TCMSP 数据库进行系统筛选, 找到一种来源于中药川贝母的川贝酮碱(chuanbeinone, TCMSP-ID: MOL009586), 随后进行酶活抑制实验验证, 初步证明其可抑制胃肠道相关 TPH1 酶活性, 并降低了中枢神经系统相关 TPH2 酶活抑制的负效应。最后采用分子动力学模拟技术从原子水平上深度剖析命中分子与靶标 TPH1 相互作用方式, 并且分别在隐性溶剂环境下和显性溶剂环境下计算结合自由能。本研究挖掘 IBS 相关痛症的中草药效分子, 可为研发新型 TPH1 抑制剂提供参考。然而, 本研究还处于药物开发的前期阶段, 尚缺乏药动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。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

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] 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: 1178646919873925.
- [6] Zhang X H, Perez-Sanchez H, Lightstone F C. A comprehensive docking and MM/GBSA rescoring study of ligand recognition upon binding antithrombin [J]. *Curr Top Med Chem*, 2017, 17(14): 1631-1639.
- [7] 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.
- [8] Ru J L, Li P, Wang J N, et al. TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [9] Camilleri M. LX-1031, a tryptophan 5-hydroxylase inhibitor, and its potential in chronic diarrhea associated with increased serotonin [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2011, 23(3): 193-200.
- [10] Lipinski C A, Lombardo F, Dominy B W, et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 46(1/2/3): 3-26.
- [11] Veber D F, Johnson S R, Cheng H Y, et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates [J]. *J Med Chem*, 2002, 45(12): 2615-2623.
- [12] 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.
- [13] 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.

[责任编辑 王文倩]