

## 基于全新药物设计方法的木姜子属酰胺类化合物 5-LOX 抑制剂筛选研究

夏侯真如<sup>1</sup>, 薛孟祺<sup>1</sup>, 汪欣怡<sup>2</sup>, 字慧敏<sup>1</sup>, 文政琦<sup>3</sup>, 李碧桃<sup>3\*</sup>, 杨靖华<sup>1\*</sup>

1. 云南大学教育部自然资源药物化学重点实验室, 云南省天然产物转化与应用重点实验室, 云南大学化学科学与工程学院, 云南 昆明 650091
2. 昆明医科大学第一临床医学院, 云南 昆明 650500
3. 昆明医科大学第一附属医院, 云南 昆明 650500

**摘要:** **目的** 采用基于分子对接及从头设计的方法从木姜子属酰胺类化合物中寻找潜在的 5-脂氧合酶 (5-lipoxygenase, 5-LOX) 抑制剂并改造提高其预期活性。**方法** 通过文献资料收集了木姜子属植物中现已分离鉴定的酰胺类化合物 10 个。应用分子对接技术, 通过与 5-LOX 抑制剂筛选相关的蛋白结晶的对接分析, 筛选出木姜子属植物中最优的酰胺类化合物。再以该化合物为基础进行分子库扩充, 并通过对该分子库进行类药规则和 ADMET 筛选, 选择其中排名前五的分子进行从头设计碎片生长, 最后再从设计结果中筛选出更优的 5-LOX 潜在抑制剂。**结果** 通过分子对接分析筛选出了木姜子属植物中最优的酰胺化合物 *N*-反式-3,4-亚甲基肉桂酰-3-甲氧基酰胺, 利用类药规则和 ADMET 筛选出 9 个相对符合药理毒理性质要求的类似分子, 采用从头设计方法筛选出了打分值较高的候选化合物 6 个, 并初步阐释了优良 5-LOX 抑制剂可能的活性残基结合情况。**结论** 木姜子属中酰胺类化合物及其衍生物可能通过抑制 5-LOX 来发挥抗炎活性作用, 相对于传统筛选和改造, 分子对接和从头设计技术节约了大量的资源, 为新型 5-LOX 抑制剂的研发提供了一定的参考。

**关键词:** 木姜子属; 酰胺类化合物; 5-LOX 抑制剂; 分子对接; 从头设计; *N*-反式-3,4-亚甲基肉桂酰-3-甲氧基酰胺

**中图分类号:** R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)21-6961-10

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.21.005

## Vitual screening of 5-LOX inhibitors of amide compounds from *Litsea* plants based on novel drug design method

XIA HOU Zhen-ru<sup>1</sup>, XUE Meng-qi<sup>1</sup>, WANG Xin-yi<sup>2</sup>, ZI Hui-min<sup>1</sup>, WEN Zheng-qi<sup>3</sup>, LI Bi-tao<sup>3</sup>, YANG Jing-hua<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Medicinal Chemistry for Natural Resource, Ministry of Education; Yunnan Provincial Key Laboratory of Natural Product Transformation and Application; School of Chemical Science and Technology, Yunnan University, Kunming 650091, China
2. No. 1 School of Clinical Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500, China
3. First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650500, China

**Abstract: Objective** To find potential 5-lipoxygenase (5-LOX) inhibitors and improve the expected activity of amide compounds from *Litsea* plants based on molecular docking and de novo design. **Methods** A total of ten amide compounds isolated and identified from *Litsea* plants were collected in the literature. The molecular docking technique was used to screen the optimal amide compound in *Litsea* plants by docking analysis of protein crystals associated with 5-LOX inhibitor screening. Then expanding the molecular library based on the compound, selecting the top five molecules to perform de novo design fragment growth by performing drug-like rule and ADMET screening on the molecular library, and finally screening out a more optimal 5-LOX potential inhibitor from the design result. **Results** The optimal amide compound *N*-trans-3,4-methylenecinnamyl-3-methoxytyramine in *Litsea* plants was

收稿日期: 2023-03-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82160661); 国家自然科学基金资助项目 (81960629); 国家自然科学基金资助项目 (21662040); 云南省创新团队 (202005AE160005); 云南省应用基础研究项目 (2017FD122)

作者简介: 夏侯真如 (1995—), 男, 安徽人, 在读硕士, 研究方向为天然药物化学。Tel: 18325790633 E-mail: 546552125@qq.com

\*通信作者: 李碧桃 (1971—), 女, 云南人, 主任医师, 主要从事儿童体格生长发育、儿童营养、儿童神经心理发育、儿童早期发展研究工作。E-mail: 1827023387@qq.com

杨靖华 (1971—), 女, 云南人, 博士, 教授, 主要从事天然药物化学研究工作。E-mail: yangjh@ynu.edu.cn

screened out by molecular docking analysis. A total of nine similar molecules relatively meeting the requirements for pharmacological and toxicological properties were screened out by the drug-like rule and ADMET. A total of six candidate compounds with high scoring values were screened out by the de novo design method, and the possible active residue binding of excellent 5-LOX inhibitors was preliminarily explained. **Conclusion** Amides and their derivatives in the *Litsea* plants may exert anti-inflammatory activity by inhibiting 5-LOX. Compared with traditional screening and modification, molecular docking and de novo design technology save a lot of resources. This study provides a certain reference for the research and development of new 5-LOX inhibitors.

**Key words:** *Litsea* Lam.; amide compounds; 5-LOX inhibitor; molecular docking; de novo design; *N-trans*-3,4-methylenecinnamyl-3-methoxytyramine

炎症是机体必不可少的一种免疫反应，是机体应对外界刺激的一种自动防御机制。一般来说，炎症的发生对机体是有益，它能够在各种不利条件下维持组织内的稳态。但另一方面，其是以短暂的组织功能下降为代价，这又可能导致体内平衡的改变。因此炎症是机体与致炎因子之间损伤与抗损伤的斗争，炎症的病变以抗损伤反应为主，但也会对机体造成不同程度的损伤<sup>[1]</sup>。

研究表明，许多炎症反应过程实质上主要是由一系列被称作炎症介质的内源性化学因子或生物大分子介导来实现的，它们影响到整个炎症过程。所谓炎症介质是指在致炎因子作用下，由局部组织细胞释放，或来源于血浆，参与并诱导炎症发生发展的生物活性物质<sup>[2]</sup>。白细胞三烯(leucotriene, LT)，即白三烯(LTA<sub>4</sub>、LTB<sub>4</sub>、LTC<sub>4</sub>、LTD<sub>4</sub>、LTE<sub>4</sub>、LTF<sub>4</sub>等)是一种非常重要的炎症介质，其中LTC<sub>4</sub>、LTD<sub>4</sub>、LTE<sub>4</sub>均含有1个半胱氨酸残基(cysteine)，故统称为cysLTs，被认为是过敏反应的慢反应物，在炎症级联反应中具有重要作用地位。脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)是白三烯合成中最为重要的酶，其在人体中包含5-LOX、15-LOX等亚型，其中15-LOX主要是通过最终催化形成脂氧素来调节炎症反应，而5-LOX则是炎症反应中白三烯形成的主要来源<sup>[3]</sup>。目前5-LOX作为炎症反应中的重要靶点，已有针对该靶点的药物上市。其中已上市的药物如齐留通和ABT-761等在临床上对炎症反应，尤其是哮喘类疾病已显示出良好的治疗效果，但其有一定的肝毒性<sup>[4]</sup>，且半衰期很短，药动学性质也较为不利<sup>[5]</sup>。因此，新型5-LOX抑制剂的研究越来越受到人们的关注。

木姜子属*Litsea* Lam.植物作为樟科(Lauraceae)常绿乔木或灌木中种类最多的属之一，在我国南方和西南温暖地区有广泛的分布<sup>[6]</sup>。木姜子属植物在民间有较为悠久的用药历史，在传统医学中被用于治疗风寒湿痛、跌打损伤、糖尿病等各种疾病，其中抗炎疗效在医书中具有广泛的记载，如山鸡椒作

为萆澄茄使用，具有温中散寒、消肿止痛的功效；豺皮樟具有对关节炎、腰腿疼痛的良好疗效；木姜子则可用于治疗风寒湿痛、跌打止痛等<sup>[7]</sup>。针对木姜子属植物的化学成分，国内外学者已经展开过一些研究<sup>[8]</sup>。研究表明，木姜子属植物中的酰胺类具有良好的抗炎活性，比如Lee等<sup>[9]</sup>的动物实验验证了15个酚酰胺能够通过抑制脂质过氧化反应，增强抗氧化酶活性，来降低肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和核因子(nuclear factor-kB, NF-kB)从而降低一氧化氮的生成。由于在前期分子对接筛选研究中发现木姜子属植物中的酰胺类对5-LOX靶点具有良好的抑制活性，因此本研究选用与5-LOX抑制剂筛选相关的3种不同来源的蛋白结晶，对木姜子属植物中的酰胺类化学成分进行分子对接分析，筛选出其中最优的酰胺类化合物，并以其为骨架进行分子库扩充。再通过对该分子库进行类药规则和ADMET筛选，并以筛选结果前5位的分子进行从头设计的碎片生长，最后从中筛选出更优的5-LOX潜在抑制剂，并初步阐释其活性残基结合情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 平台与软件

本研究所有工作均在Microsoft Windows 10 Professional操作系统中完成，采用ChemOffice Professional 20.0程序(珀金埃尔默公司)中的ChemBioDraw模块和ChemBio 3D模块、Molegro公司的Molegro Virtual Docker 6.0(MVD)软件、Accelrys公司的Discovery Studio 2016(DS)。参数设置除特殊指明外均为默认值。

### 1.2 分子对接

**1.2.1 受体数据库的组建** 从RCSB PDB数据库(<http://www.rcsb.org/>)搜索并下载与5-LOX抑制剂筛选相关的3种不同来源的蛋白结晶，分别针对大豆sLOX-3(1JNQ)、哺乳动物15-LOX(1LOX)、智人源5-LOX(3V99)<sup>[10]</sup>，其结构PDB编号及原

配体与主要靶点残基作用情况见表 1。这 3 种蛋白结晶获取相对容易, 有助于与后期活性验证进行匹配, 其中大豆同工酶 (sLOX-1、sLOX-2、sLOX-3) 是药物筛选常见酶, 研究发现 sLOX-1 与智人源 LOX 酶有较高的氨基酸序列同一性, 其有些抑制剂在抑制智人源 LOX 酶上更为有效<sup>[11]</sup>, 但其 PDB 数据库中晶体结构 (1YGE) 缺少原配体复合, 因此选择相似的 sLOX-3 晶体结构 (1JNQ) 作为研究对象, 并且 Somvanshi 等<sup>[12]</sup>报道了姜黄素等已知抑制剂与 sLOX-3 结合的解理常数和与智人源 5-LOX 的较为相似, 有助于增加确定抑制剂的可能性; 哺乳动物 15-LOX 的氨基酸序列中与智人源 5-LOX 具有类似的疏水腔, 这在所有花生四烯酸催化酶中都是保守的, 而与 5-LOX 的特异性区域相比较, 有助于确

定抑制剂的选择性; 智人源 5-LOX 的 PDB 数据库相关晶体结构较多, 这里选用具有配体复合物的 3V99, 其与稳定纯酶结晶 (3O8Y) 具有足够的结构相似性, 抑制剂留有足够的空间停靠在活性中心腔中<sup>[10]</sup>。对这 3 种蛋白质晶体结构进行删除水分子和辅因子的处理, 经 Molegro Virtual Docker 6.0 (MVD) 软件进行氨基酸残基修补, 并选择对应原配体位置为中心, 选择半径 1.2 nm 的残基为活性残基, 并将其定义为结合口袋空腔, 最后保存为 PDB 格式备用。

**1.2.2 配体数据库的组建** 通过文献检索收集, 已知目前从木姜子属植物中分离得到的酰胺类化合物共有 10 个<sup>[8]</sup> (图 1), 将其二维结构绘入 ChemBioDraw 软件中, 并通过 ChemBio 3D 将其转化为三维结构, 并采用 MMFF94 算法对其能量进行最低优化, 其中

表 1 原配体与主要靶点残基作用情况

Table 1 Interaction between protoligand and main target residue

| PDB 编号 | 原配体名称   | 氢键作用          | 其他相互作用  |
|--------|---------|---------------|---|
| 1JNQ   | EGT_871 | His523、Gln716 | His518、His523、Gln514、Gln716、Ile572、Ile575、Leu773、Phe576 |
| 1LOX   | RS7_841 | -             | His545、Leu597   |
| 3V99   | ACD_702 | -             | Gln363、Phe177   |

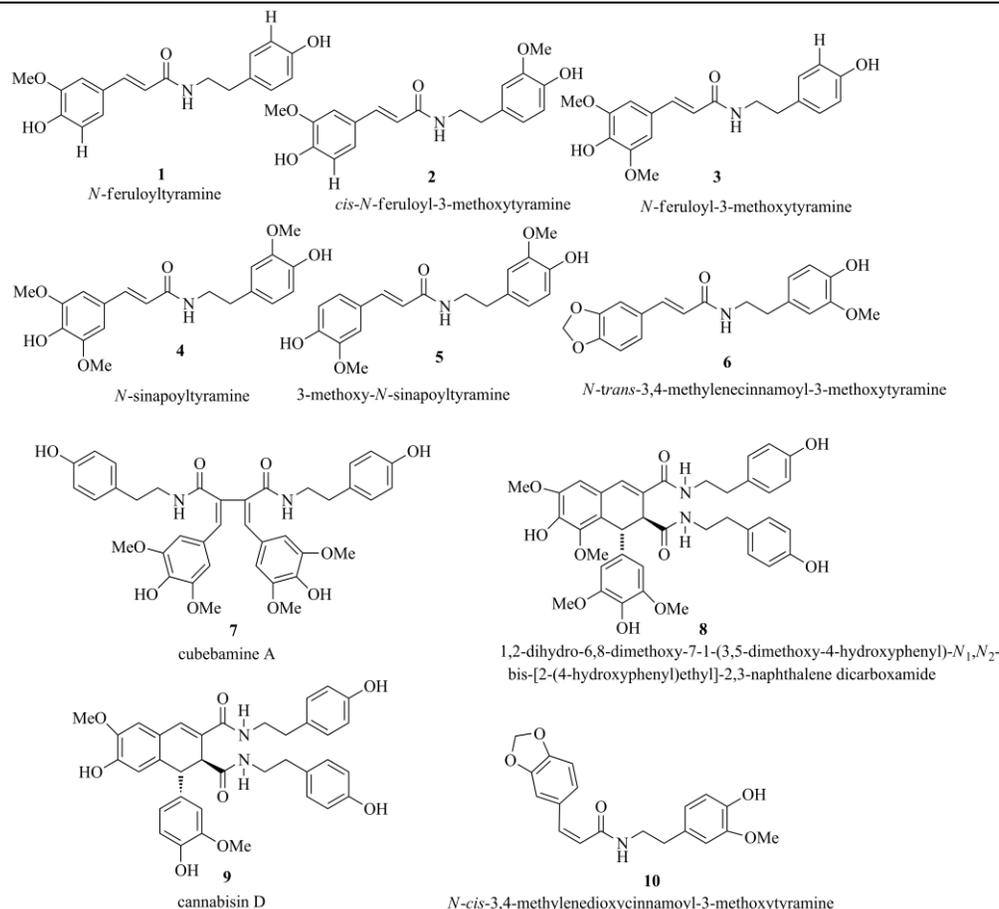


图 1 木姜子属植物中分离获得的酰胺类化合物

Fig. 1 Amides isolated from *Litsea* plants

最大迭代次数设置为 5000 次, 最大 RMS 梯度设置为 0.5, 保存为 mol2 格式作为分子对接的配体分子集。

**1.2.3 对接方法可行性验证** Molegro Virtual Docker 6.0 (MVD) 在半柔性对接精度方面高于市面上的绝大多数软件, 在于其能够通过不同打分函数和搜索算法的组合来获取针对受体蛋白的对接方法<sup>[13]</sup>。因此, 将含有原配体的蛋白晶体复合结构中的原配体抽离, 然后利用 ChemBio 3D 中的 MMFF94 算法对其进行能量最低优化, 再按照设定参数对接回原结合口袋, 基于不同打分函数和搜索算法的组合, 反复进行尝试, 从而获取重现性较好的对接方法。

**1.2.4 分子对接参数设置** 将上述组建完成的受体和配体分别导入 Molegro Virtual Docker 6.0 (MVD) 中, 并设置配体始终保持柔性, 搜索算法运行次数 100 次, 其余参数保持不变。靶点蛋白 1JNQ 结合空腔坐标位置为 X: 20.36、Y: 3.30、Z: 19.87; 靶点蛋白 3V99 结合空腔坐标位置为 X: 18.38、Y: -78.70、Z: -33.89; 靶点蛋白 1LOX 结合空腔坐标位置为: X: -27.12、Y: 151.87、Z: 56.97。

**1.2.5 结果处理** 对接完成后, 分别以靶点蛋白中原有配体为参照, 对接结果依据 Rerank Score (R-Score) 评价。在对接时, 为了保证打分结果的可靠性, 设置得到每个分子对接结果的前 3 位, 并取其平均值作为最终得分。R-Score 数值为负值, 表征分子与蛋白能够结合, 数值越小, 表征亲和性越大<sup>[14-15]</sup>。根据 R-Score 结果, 筛选出每个靶点蛋白得分排名靠前的化合物。通过对比分析, 获取对 3 种来源的靶点蛋白均有很好的打分数值的化合物。再以此化合物为基本骨架, 通过 Zinc 15 数据库 (<http://zinc.docking.org/>) 进行分子库扩充, 获取类似化合物分子库。

### 1.3 类药规则及 ADMET 筛选

将以分子对接获取的化合物为基本骨架得到的类似化合物分子库, 转化为 3D 结构导入 Discovery Studio 2016 (DS), 调用 Filter by Lipinski and Veber Rules 模块, 勾选 Lipinski Rule of Five 和 Veber Rule 两种规则对该分子库进行筛选。再根据筛选结果, 调用 ADMET descriptors 模块, 勾选 aqueous solubility、blood brain barrier penetration、CYP2D6 binding、hepatotoxicity、intestinal absorption、plasma protein binding 等 6 个筛选方向, 最终获取相对符合药理毒理性质要求的化合物<sup>[16-17]</sup>。

### 1.4 从头设计

**1.4.1 对接准备** 为了减少软件间的系统性误差,

因此从头设计的对接筛选工作将由 DS 2016 进行实现。以通过类药规则和 ADMET 筛选的化合物作为配体, 智人源 (Homo sapiens) 5-LOX 靶点蛋白 3V99 作为受体, 导入 DS 2016, 并用 Prepare Ligands 和 Clean Protein 模块分别对配体和受体进行处理, 然后用 Define Receptor 模块将蛋白分子 3V99 定义为受体蛋白, 并利用 Form Current Selection 模块设置原配体所在位置为活性空腔中心, 半径为 1.2 nm, 最后调用 CDOCKER 模块对接模块, 设置 Pose Cluster Radius 为 0.2 nm, 以保证与 MVD 软件对接参数的一致性, 且使对接构象尽可能具有多样性, 其余参数保持默认<sup>[18]</sup>, 最终对接结果仅保留非离子型构象。

**1.4.2 碎片生长** 对接完成后, 以原有配体为参考, 对接结果依据 -CDOCKER ENERGE 进行评价, -CDOCKER ENERGE 数值越大则对接结果越好, 以每个配体打分最高的构象的数值作为依据。选取对接结果排名前 5 的化合物分别进行分子碎片生长, 调用 De Novo Evolution 模块, 选取默认碎片库进行碎片生长, 共获取 50 个新化合物, 每组 10 个<sup>[19-20]</sup>。

**1.4.3 结果筛选** 将碎片生长所得的 50 个新化合物作为配体, 智人源 (Homo sapiens) 5-LOX 靶点蛋白 3V99 作为受体, 在 DS 2016 中使用 CDOCKER 模块进行分子对接筛选, Pose Cluster Radius 设置为 0.2 nm。对接完成后, 同样以原有配体为参考, 对接结果依据 -CDOCKER ENERGE 进行评价。

## 2 结果

### 2.1 分子对接

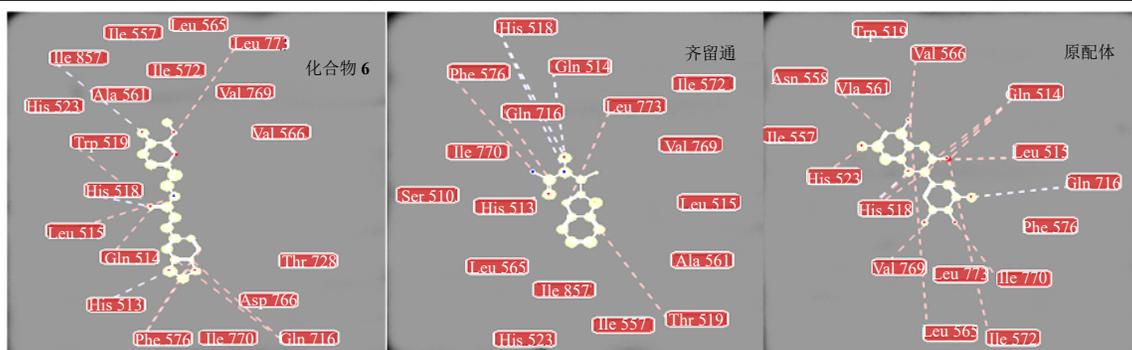
**2.1.1 对接方法可行性验证结果** 选取的 3 个靶点均为含有原配体的蛋白晶体结构, 分别将原配体抽离, 再对接回原有的结合口袋, 计算对接后构象与原配体结构的均方根偏差值 (RMSD 值), 数值小于 0.2 nm, 说明该对接方法针对于此受体蛋白和参数设定可用<sup>[21]</sup>。为了减少系统性误差, 本次均使用打分函数 MolDock Score[GRID] 和搜索算法 GPU Screening (CUDA) 的组合对接方法。

**2.1.2 对接结果** 木姜子属植物中分离得到的酰胺类化合物针对与 5-LOX 抑制剂筛选相关的 3 种不同来源的蛋白结晶 1JNQ、1LOX、3V99 的筛选结果见表 2。通过对比 3 种不同来源蛋白结晶的筛选结果可发现化合物 6 的打分结果均在前 3 位以上, 且优于原配体和上市药物齐留通。以化合物 6 为例, 展示其与 3 种蛋白结晶的 2D 相互作用图, 并通过与原配体和齐留通的 2D 作用图 (图 2) 进行对比,

表 2 对接得分结果

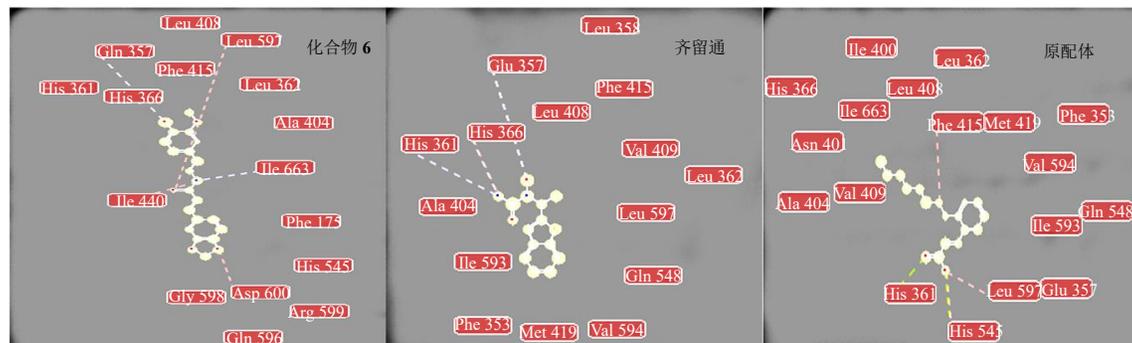
Table2 Docking score results

| 蛋白编号    | 分子编号   | 打分值     | 蛋白编号   | 分子编号    | 打分值     | 蛋白编号 | 分子编号 | 打分值     |
|---------|--------|---------|--------|---------|---------|------|------|---------|
| 1JNQ    | 1      | -106.08 | 1LOX   | 1       | -99.66  | 3V99 | 1    | -98.81  |
|         | 2      | -112.58 |        | 2       | -99.51  |      | 2    | -103.76 |
|         | 3      | -108.49 |        | 3       | -97.69  |      | 3    | -89.07  |
|         | 4      | -101.37 |        | 4       | -111.13 |      | 4    | -103.16 |
|         | 5      | -108.56 |        | 5       | -99.96  |      | 5    | -98.33  |
|         | 6      | -113.22 |        | 6       | -113.42 |      | 6    | -109.65 |
|         | 7      | 460.30  |        | 7       | -45.41  |      | 7    | -116.13 |
|         | 8      | 479.15  |        | 8       | 1.96    |      | 8    | -127.69 |
|         | 9      | 307.37  |        | 9       | -93.10  |      | 9    | -92.10  |
|         | 10     | -114.06 |        | 10      | -105.27 |      | 10   | -95.23  |
| 齐留通     | -76.85 | 齐留通     | -89.72 | 齐留通     | -85.27  |      |      |         |
| EGT_871 | -60.91 | RS7_841 | -88.29 | ACD_702 | -72.06  |      |      |         |

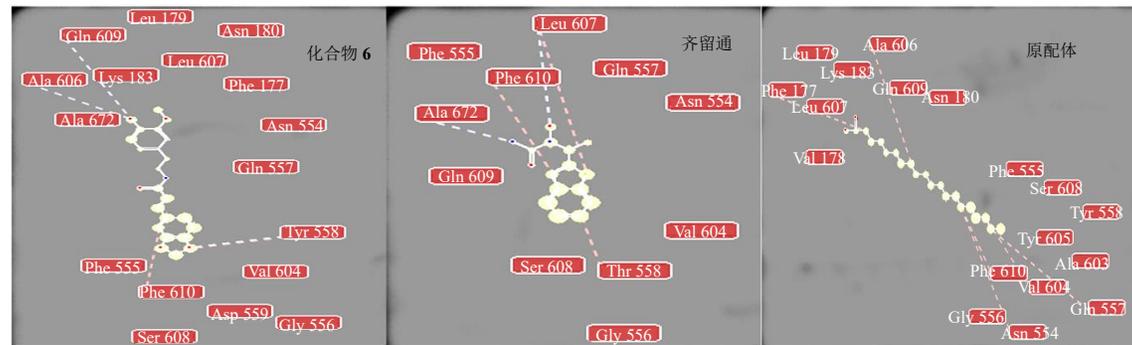


— — 氢键      - - - 空间相互作用      - - - 静电相互作用      ● 相互作用强度

化合物 6 和齐留通以及原配体与 1JNQ 相互作用 2D 图



化合物 6 和齐留通以及原配体与 1LOX 相互作用 2D 图



化合物 6 和齐留通以及原配体与 3V99 相互作用 2D 图

图 2 化合物 6 和齐留通以及原配体与 3 种蛋白受体相互作用 2D 图

Fig. 2 Three protein receptors 2D interaction diagrams with compound 6, Zileuton and protoligand

结果表明主要的结合残基和作用力类似，可以发现 3 者的结合模式较为相似。

## 2.2 类药规则及 ADMET 筛选

以化合物 6 为基本骨架得到的 231 个编号为 Z001~Z231 的类似化合物组成的分子库，导入 DS 2016 进行类药规则和 ADMET 筛选。化合物全数符合药理性性质要求，后经过 ADMET 筛选，筛选表格依

据见表 3，仅展示相对最优的筛选结果，整体结果 ADMET plot 见图 3，仅显示血脑屏障通透性 (blood brain barrier penetration, BBB) 模型和人体肠道吸收性 (human intestinal absorption, HIA) 模型 95% 和 99% 的置信区间，图中每个点代表 1 个预测分子，位于 99% 置信区间以外的分子被认为是不可靠的，最终得到 9 个相对符合毒理性性质要求的化合物，筛选结果见图 4。

表 3 ADMET 筛选结果\*

Table 3 ADMET screening results\*

| 分子编号 | 人体肠道吸收性 | 水溶性 (25 °C) | 血脑屏障通透性 | 细胞色素 P450 2D6 抑制性 | 肝毒性   | 血浆蛋白结合率 |
|------|---------|-------------|---------|-------------------|-------|---------|
| Z004 | 0       | 3           | 3       | FALSE             | FALSE | FALSE   |
| Z113 | 0       | 3           | 2       | FALSE             | FALSE | FALSE   |
| Z115 | 0       | 3           | 3       | FALSE             | FALSE | FALSE   |
| Z125 | 0       | 3           | 3       | FALSE             | FALSE | FALSE   |
| Z144 | 0       | 3           | 3       | FALSE             | FALSE | FALSE   |
| Z167 | 0       | 3           | 2       | FALSE             | FALSE | FALSE   |
| Z180 | 0       | 3           | 2       | FALSE             | FALSE | FALSE   |
| Z184 | 0       | 3           | 2       | FALSE             | FALSE | FALSE   |
| Z209 | 0       | 3           | 1       | FALSE             | FALSE | FALSE   |

\*人体肠道吸收性: 0~3 吸收性依次递减; 水溶性 (25 °C): 0~6 溶解性依次增大, 4 为最好情况; 血脑屏障通透性: 0~5 通透性依次降低; TURE or FALSE-是或否

\*human intestinal absorption: the absorptivity decreased from 0 to 3; water solubility (25°C): the solubility increases from 0 to 6, with 4 being the best case; Blood-brain barrier permeability: permeability decreased from 0 to 5; TURE or FALSE- yes or no

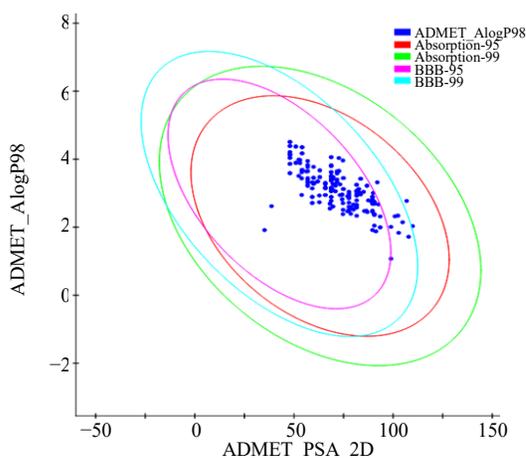


图 3 ADMET 筛选图

Fig. 3 ADMET screening plot

## 2.3 从头设计

在 DS 2016 中，将相对符合药理毒理性性质要求的 9 个化合物作为配体，智人源 (Homo sapiens) 5-LOX 靶点蛋白 3V99 作为受体，进行 CDocker 模块的分子对接筛选，见表 4，并选取 CDocker ENERGE 数值排名前 5 编号为 Z167、Z184、Z180、

Z125、Z004 的化合物作为分子骨架，调用 De Novo Evolution 模块进行碎片生长，获取 5 组化合物共 50 个。再以这 50 个化合物为分子库，进行分子对接筛选，获取潜在的活性分子，见表 5。从表 5 中可以看出 CDocker ENERGE 数值最高的为 Z167-6，考虑实际价值，筛选结果仅展示排名前 6 的分子 (除离子型)，其中数值高于原配体的分子共有 1 个，而高于齐留通的分子共有 2 个 (图 5)。考虑到排名较高的分子均来自与 Z167 和 Z180 的碎片生长，因此展示 2 组分子中排名前 3 的分子 Z167-6、Z167-4、Z180-5 及排名靠后 (负值除外) 的分子 Z167-7、Z180-3、Z180-1 与受体蛋白 3V99 的相互作用 2D 图，并与齐留通和原配体的 2D 作用图进行分析比较见图 6。

## 3 分析与结论

### 3.1 分子对接

从 3 种不同来源蛋白结晶的分子对接筛选结果中发现，木姜子属中酰胺类化合物 6 的 Rerank Score 打分结果均在前 3 位以上，且优于原配体和上市药物齐留通的打分值。并且从 2D 相互作用图中可以



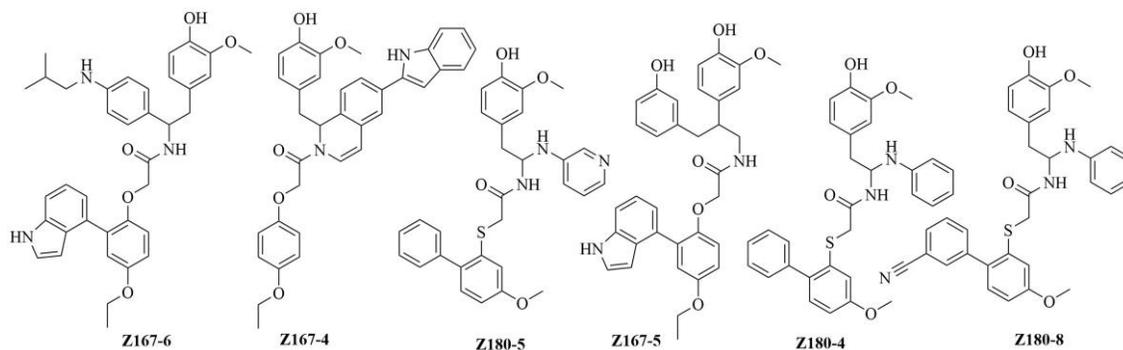
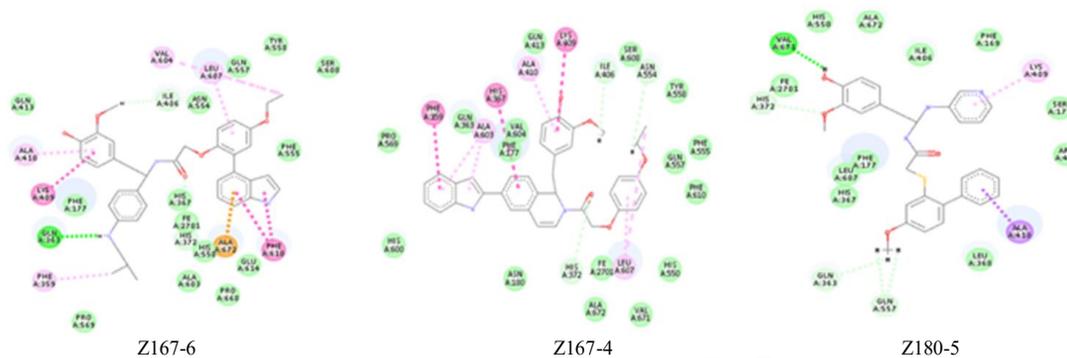


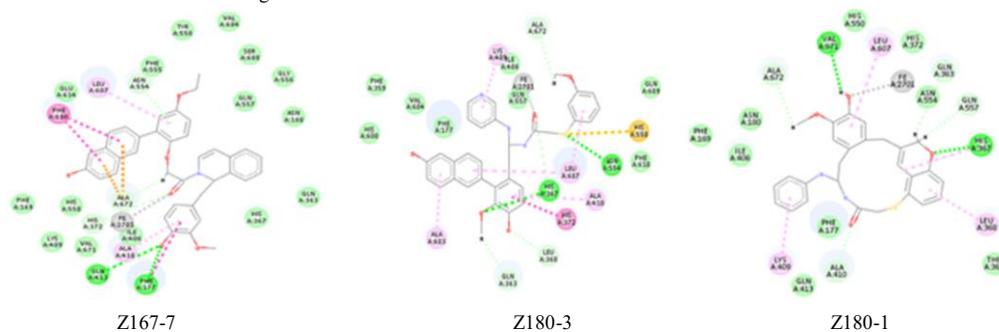
图 5 打分值排名前 6 的分子 (除离子型)

Fig. 5 Molecules with top six scores (except ionic type)



a-Z167-6、Z167-4、Z180-5 与 3V99 相互作用 2D 图

- Van der waals     carbon hydrogen bond/Pi-donor hydrogen bond
- conventional hydrogen bond     Pi-anion     metal-acceptor
- alkyl/Pi-alkyl     Pi-pi stacked/amide-Pi stacked/Pi-Pi T-shaped
- Pi-sigma



b-Z167-7、Z180-3、Z180-1 与 3V99 相互作用 2D 图



c-齐留通、原配体与 3V99 相互作用 2D 图

图 6 3V99 相互作用 2D 图

Fig. 6 3V99 2D interaction diagrams

发现, 在 1JNQ 中, 化合物 6 与蛋白中的活性残基 His518 可以形成氢键, 与 Gln716、Leu716、Leu773 等可以形成较强的空间相互作用, 其结合模式与齐留通和原配体均类似; 在 1LOX 中, 活性残基 Leu362、Leu367、Ile350、Leu597 和 Ile400 组成的疏水腔在所有花生四烯酸催化酶和其类似物中是保守的<sup>[10]</sup>, 而化合物 6 与蛋白中的活性残基 Glu357 可以形成氢键, 与 Leu597、Ile400 具有强空间相互作用, Leu362 具有较弱空间相互作用, 这相较于齐留通和原配体与相应残基的作用情况要强; 在 3V99 中, 活性残基 Tyr181、Ala603、Ala606、His600、Thr364 和 Phe177 被认为是 5-LOX 的特异性区域, 化合物 6 与蛋白中的活性残基 Ala606、Gln609 可以形成氢键, 与 Phe177 具有空间相互作用, 相较于齐留通和原配体的作用情况要强。木姜子属植物中酰胺化合物 6 具有与齐留通和原配体相似的活性残基作用模式, 除此之外其与文献报道的分子对接相关活性残基作用方式类似<sup>[10]</sup>, 并且对于 3 种蛋白的对接打分数值皆排名靠前。因此推测其可能表现有相关的 LOX 酶抑制活性作用, 特别是对智人源 5-LOX 有较大的抑制可能性, 因此以化合物 6 为基础扩展分子库获取了具有相似结构的 231 个化合物, 其中 9 个化合物通过了类药规则和 ADMET 规则筛选, 相对符合药理毒理性质要求。

### 3.2 从头设计

在对 5-LOX 的从头设计研究中, 选取了上述 9 个相对符合药理毒理性质要求的化合物中 -CDOCKER ENERGE 数值排名前 5 的化合物 Z167、Z184、Z180、Z125、Z004 作为分子骨架, 其打分数值均在阳性对照齐留通附近, 其中 Z167、Z184 的打分数值高于齐留通。经过从头设计碎片生长后, Z167 分子衍生物整体打分数值有较大幅度的提升, 其余分子衍生物整体打分数值多有下降。因此对整体分数较高的 2 组衍生物分子 2D 相互作用情况进行分析, 选择其中排名前 3 的分子和排名靠后的分子 (负值除外) 展示。结果显示打分数值较优的衍生物分子或与蛋白结晶 3V99 的活性残基 Ala672 有 Pi-Anion 的静电相互作用, 或与 His372 有 Carbon Hydrogen Bond 的氢键作用、或与 His367 有 Pi-Alkyl 疏水作用, 这与齐留通和原配体的作用模式类似, 而 Ala410、Lys409 等形成的疏水作用、Gln363 形成的氢键作用可能起到稳定作用, 从而提高了打分数值。打分数值较低的衍生物分子也部分显示了以

上作用情况, 进一步证实了优良 5-LOX 抑制剂的结合位点活性残基可能与上述有关。综上所述, 可以推测优良 5-LOX 抑制剂的开发关键点在于与上述活性残基的结合, 其真实药理药效作用及活性情况正待验证中。

现代药物研究中, 分子对接方法和从头设计方法作为基于受体的药物设计方法是计算机辅助药物设计中应用广泛且精度较高的方法。它们通过化学计量学方法模拟药物分子与蛋白受体之间的作用关系, 快速大量筛选得到潜在药物分子, 并根据结合口袋情况针对性进行分子碎片生长, 从而得到更为精准结合力更高的潜在药物分子<sup>[22-23]</sup>。本研究通过分子对接分析筛选出木姜子属植物中酰胺类化合物里最可能拥有 5-LOX 潜在抑制活性的分子, 通过类药规则和 ADMET 规则筛选出 9 个类似骨架的相对符合药理毒理性质要求的分子, 最终通过从头设计碎片生长预测了结合力更高更具活性潜力的衍生物分子, 并推测了 5-LOX 抑制剂的关键结合活性残基情况, 从而为研发 5-LOX 抑制剂类药物提供了一定的参考。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] Medzhitov R. Inflammation 2010: New adventures of an old flame [J]. *Cell*, 2010, 140(6): 771-776.
- [2] Ogawa Y, Calhoun W J. The role of leukotrienes in airway inflammation [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 118(4): 789-798.
- [3] Sharma J N, Mohammed L A. The role of leukotrienes in the pathophysiology of inflammatory disorders: Is there a case for revisiting leukotrienes as therapeutic targets? [J]. *Inflammopharmacol*, 2006, 14(1): 10-16.
- [4] Joshi E M, Heasley B H, MacDonald T L. 2-ABT-S-oxide detoxification by glutathione S-transferases A1-1, M1-1 and P1-1: Implications for toxicity associated with zileuton [J]. *Xenobiotica*, 2009, 39(3): 197-204.
- [5] Braeckman R A, Locke C S, et al. The pharmacokinetics of zileuton in healthy young and elderly volunteers [J]. *Clin-Pharmacokinet*, 1995, 29(2): 42-48.
- [6] 李锡文. 中国植物志 (第 31 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1982: 261.
- [7] 谢宗万, 余友琴. 全国中草药名鉴 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 114-117.
- [8] Wang Y S, Wen Z Q, Li B T, et al. Ethnobotany, phytochemistry, and pharmacology of the genus *Litsea*: An

- update [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 181: 66-107.
- [9] Lee Y T, Hsieh Y L, Yeh Y H, *et al.* Synthesis of phenolic amides and evaluation of their antioxidant and anti-inflammatory activity *in vitro* and *in vivo* [J]. *RSC Adv*, 2015, 5(104): 85806-85815.
- [10] Tsolaki E, Eleftheriou P, Kartsev V, *et al.* Application of docking analysis in the prediction and biological evaluation of the lipoxygenase inhibitory action of thiazolyl derivatives of mycophenolic acid [J]. *Molecules*, 2018, 23(7): 1621.
- [11] Lapenna D, Ciofani G, Pierdomenico S D, *et al.* Inhibitory activity of salicylic acid on lipoxygenase-dependent lipid peroxidation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1790(1): 25-30.
- [12] Somvanshi R K, Singh A K, Saxena M, *et al.* Development of novel peptide inhibitor of Lipoxygenase based on biochemical and BIAcore evidences [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1784(11): 1812-1817.
- [13] 马宏跃, 张启春, 周婧, 等. 黄芩中四种主要黄酮成分与环氧酶-2 的分子对接研究 [J]. *中医药学报*, 2009, 37(6): 71-74.
- [14] Xu S K, Peng H, Wang N, *et al.* Inhibition of TNF- $\alpha$  and IL-1 by compounds from selected plants for rheumatoid arthritis therapy: *In vivo* and *in silico* studies [J]. *Trop J Pharm Res*, 2018, 17(2): 277.
- [15] Santosa H, Putra G S, Yuniarta T A, *et al.* Synthesis and molecular docking studies of *N*'-benzoysalicylhydrazide derivatives as antituberculosis through InHA enzym inhibition [J]. *Indonesian J Pharm*, 2018, 29(4): 198.
- [16] van de Waterbeemd H, Gifford E. ADMET in silico modelling: Towards prediction paradise? [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2(3): 192-204.
- [17] Ajay D, Sobhia M E. Identification of novel, less toxic PTP-LAR inhibitors using in silico strategies: Pharmacophore modeling, SADMET-based virtual screening and docking [J]. *J Mol Model*, 2012, 18(1): 187-201.
- [18] 谷宇, 张栩, 陈艳昆, 等. 基于分子模拟技术筛选大黄、羌活、秦艽的 5-LOX、LTA4H 抑制剂 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(23): 4494-4502.
- [19] 吴景卫. 4-噻唑烷酮类 CDC25 抑制剂的设计与合成 [D]. 天津: 天津医科大学, 2015.
- [20] Jiang Y Y, Gao H W. Pharmacophore-based drug design for potential AChE inhibitors from traditional Chinese medicine database [J]. *Bioorg Chem*, 2018, 76: 400-414.
- [21] Rao S N, Head M S, Kulkarni A, *et al.* Validation studies of the site-directed docking program LibDock [J]. *J Chem Inf Model*, 2007, 47(6): 2159-2171.
- [22] 谢治深, 宋军营, 张振强, 等. 计算机辅助药物设计方法及其在新药研发中的应用 [J]. *河南大学学报: 医学版*, 2019, 38(2): 148-152.
- [23] 翟红梅, 曹长春, 韩永红, 等. 从头药物设计技术 [J]. *北方药学*, 2013, 10(2): 69.

[责任编辑 王文倩]