

文章编号:1674-2869(2014)08-0010-06

# γ-氨基丁酸受体同源模建及与黄酮类化合物的分子对接

巨修练,钱 程

1. 武汉工程大学化工与制药学院,湖北 武汉 430074;  
2. 绿色化工过程教育部重点实验室(武汉工程大学),湖北 武汉 430074

**摘 要:**为研究更有效的 γ-氨基丁酸受体激动剂,以海兔烟碱乙酰胆碱结合蛋白(PDB 登记号 2XY5,0.194 nm)作为模板,运用同源模建的方法构建人 γ-氨基丁酸 A 型受体模型,并利用拉氏图和分子动力学分析验证其模型的合理性.将 41 个黄酮类化合物与模建的人 γ-氨基丁酸 A 型受体进行对接研究,对接打分与实测活性值相吻合.黄酮类化合物与人 γ-氨基丁酸 A 型受体对接结果显示,黄酮类化合物的母环分别与 190 位酪氨酸和 140 位酪氨酸形成共轭,降低体系能量并使体系稳定,验证了模型的合理性.此外,3 位对黄酮类化合物活性的影响至关重要,尤其引入硝基时活性明显提高.38 号化合物的对接打分最高,也说明相应的增加取代基个数有利于提高该类化合物活性.

**关键词:**黄酮类化合物;γ-氨基丁酸受体;分子对接

**中图分类号:**R914.2

**文献标识码:**A

**doi:**10.3969/j.issn.1674-2869.2014.08.002

## 0 引 言

黄酮类化合物(如图 1)具有突出的抗焦虑效果,且不引起肌肉松弛、健忘等副作用.这些重大发现推动了对选择抗焦虑、亲和力高的配体研究.6-溴黄酮相对于黄酮对 GABAA 受体的苯二氮唑结合位点的亲和力增加了近 10 倍<sup>[1]</sup>.6-溴黄酮和 GABAA 的竞争结合参数是 1.6~2.0(通过加入或不加入 GABA 时测量而得的 6-溴黄酮和苯二氮唑结合位点的作用值比),与地西洋很类似,具有完全激动剂的药理学特征<sup>[2]</sup>.当引入硝基时甚至会得到更有效的配体,6,3'-二硝基黄酮与苯二氮唑位点结合力更强,其  $K_i$  值取值范围为 17~50 nmol/L,它具有极有效的抗焦虑和肌肉松弛作用.6-溴-3'-硝基黄酮相对于双硝基类似物,对 GABAA 受体苯二氮唑结合位点的亲和力稍有增加,对苯二氮唑位点同样具有选择性<sup>[3]</sup>.这类化合物的抗焦虑作用尽管比 6,3'-二硝基黄酮稍差,但仍比地西洋的抗焦虑作用强.由于黄酮类化合物药理学选择性及其自身对 GABAA 受体苯二氮唑结合位点的活性低,使得对其衍生物的研究有了一个很大的飞跃,同时也对 GABAA 受体苯二氮唑结合位点选择性有了新的认识,促进了黄酮类化合物的发展.

本研究采用海兔乙酰胆碱结合蛋白(2XY5)作为模板,对人  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  GABAA 受体进行模建并能量优化,利用分子对接进一步指导研究.此外,从对接结果

进行分析,发现黄酮类化合物的 3' 位对活性影响很大,且增多取代基团也会提高活性,进而为更好的设计黄酮类化合物提供了理论依据.

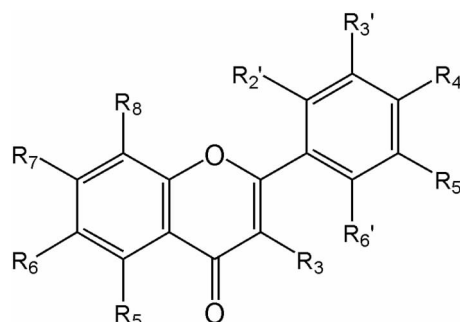


图 1 黄酮类化合物的基本结构

Fig. 1 Structure of flavonoid

## 1 实验部分

本研究的所有计算实验都是通过 SYBYL-X1.2 软件(Tripos Inc.)完成,若无特别介绍,参数均采用缺省值.

### 1.1 人 $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABAA 受体同源模建

1.1.1 同源模建简介 大多数受体蛋白的三级结构尚未解析,并且同源蛋白在进化过程中保持着结构保守性,利用同源蛋白作为模板来构建受体蛋白是一种有效的方法<sup>[4]</sup>.常用的软件有两类:一是利用蛋白质分析软件来预测,例如 SWISS-MODEL 主要用于预测蛋白质的高级结构,它通过同源建模的方法可对未知序列的三级

收稿日期:2014-06-30

作者简介:巨修练(1959-),男,陕西乾县人,教授,博士,博士研究生导师.研究方向:药物构效关系.

结构进行预测;另一类是对蛋白的结晶进行 X-衍射、核磁共振技术及冷冻电镜等方法获得结构信息,将已知的蛋白质立体结构为模板,利用相关软件构建已知序列的蛋白高级结构,例如 SYBYL, Discovery Studio, Modeller 都是比较常用的软件。

1.1.2 同源模建 a. 序列选择 为了模建目标受体人 α1β2γ2GABAA 受体,首先通过 Swiss-Prot/TrEMBL 数据库筛选出合适的亚基序列:人 α1 亚基(蛋白质序列号:P14867),β2 亚基(蛋白质序列号:P47870),γ2 亚基(蛋白质序列号:P18507),然后对以上 3 种亚基进行编辑.考虑到所构建的受体在跨膜区,所以删去膜内环区与膜外结合区域的氨基酸序列。

b. 模板选择 模板在同源模建中起关键作用,它直接影响靶结构的质量,并对结果起决定性作用<sup>[5]</sup>.由于膜介蛋白晶体结构较难获得,且当前结构解析技术直接决定了膜介蛋白结构的分辨率,因此已解析的三维结构膜蛋白数目十分有限.本实验中,采用海兔乙酰胆碱结合蛋白作为模板(PDB 登记号 2XYS,0.194 nm)<sup>[6]</sup>。

c. 构建亚基 首先采用 SYBYL-X1.2 中的 Biopolymer 模块中的 compare sequences 将靶标序列与模板序列进行比对(sequence alignment),从而生成 MSF (multiple sequence format) 文件<sup>[7]</sup>.然后再将 Model Proteins 中的 ORCHES-TRAR 模块中导入 MSF 文件,将模板结构与靶序列的三维结构进行结构比对.最后构建靶肽链的结构,包括搜索环区,识别结构保守区域(structure conserved regions,SCR)和添加侧链。

d. 模型组合 将人 α1β2γ2 受体与模板 2XYS 进行比对,需要将前者的 α1 亚基 β2 亚基 γ2 亚基分别叠合到 2XYS 为模板的各个亚基上,以顺时针方向(β2)(γ2)(α1)(β2)(γ2)构建人 α1β2γ2GABAA 受体,如图 2 所示。

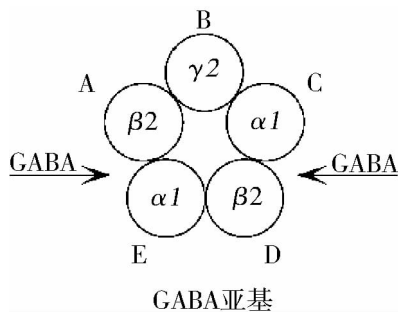


图 2 人 α1β2γ2 GABAA 亚基对应示意图  
Fig. 2 Subunit of human α1β2γ2 GABAA

e. 模型的优化与修正 因为只有运用分子动力学与分子力学的方法对受体进行修正,才能验证

受体的可靠性.因此,本实验选取立体场 AMBER7 FF99<sup>[8]</sup>,运用共轭梯度法优化体系能量梯度的 RMS 小于 5 kcal/mol/nm,并通过分子动力学(molecular dynamic, MD)优化模型,以检验模型的稳定性.计算条件设置为 300 K 恒温,每 2.5 ps 采样一次轨迹数据,步长 1 fs,计算总长为 500 ps。

1.2 分子对接

1.2.1 对接方法 本实验首先利用分子对接法将前面讨论的黄酮类配体化合物与人 α1β2γ2 GABAA 受体蛋白对接.并结合打分函数,研究配体化合物与受体蛋白之间的相互作用,探究结合自由能与实测生物活性的线性关系,同时验证模型的可靠性。

Surflex-docking<sup>[9]</sup>是 SYBYL-X1.2 中的一个模块,可用于计算配体与受体之间的相互作用能,也可用于复合物的结构优化.本研究利用 Surflex-docking 进行分子对接实验.因为受体的结合口袋直接影响分子对接结果,所以定义结合口袋具有十分重要的意义<sup>[10]</sup>.前文中同源模建人的 α1β2γ2GABAA 亚型,选用共晶的 6-氟-3'-硝基黄酮作为活性区域,利用残基模式定义活性结合位点. Surflex-docking 模块中,原型分子(protomol)即我们所称的活性位点.此外,bloat 与 threshold 这两个参数直接影响原型分子的大小与形状.其中,Bloat 影响原型分子渗入蛋白空隙的程度,Threshold 影响原型分子的大小<sup>[11]</sup>。

1.2.2 对接配体分子 通过 SYBYL-X1.2 软件中的 dock ligand 模块,41 种黄酮类化合物(如图 7)对接到模建的 α1β2γ2GABAA 受体中。

Surflex-docking 进行对接实验后,分子配体的对接结果可通过 Cscore 模块显示.打分函数基于受体-配体复合物的结合亲和力,将会考虑熵作用,极性作用,疏水作用,排斥作用,溶剂化作用.最后给出的总分即- $\lg 10 K_d$ , $K_d$  为配体的解离常数.可通过以下函数计算配体与受体的结合自由能(Free Energy of Binding, kcal/mol):

$$\text{Free Energy of Binding} = RT \ln K^{[12-13]}$$

2 结果和讨论

2.1 同源模建

将海兔乙酰胆碱结合蛋白与 α1β2γ2 进行序列比对,得到其同源性(Identity)分别为 19.3%, 19.6%和 16.0%,由此可知:选取的 2XYS 作为人 α1β2γ2 亚基模型是比较合理的.将人 α1β2γ2 GABAA 受体与海兔乙酰胆碱结合蛋白进行序列比对,如图 3 所示。

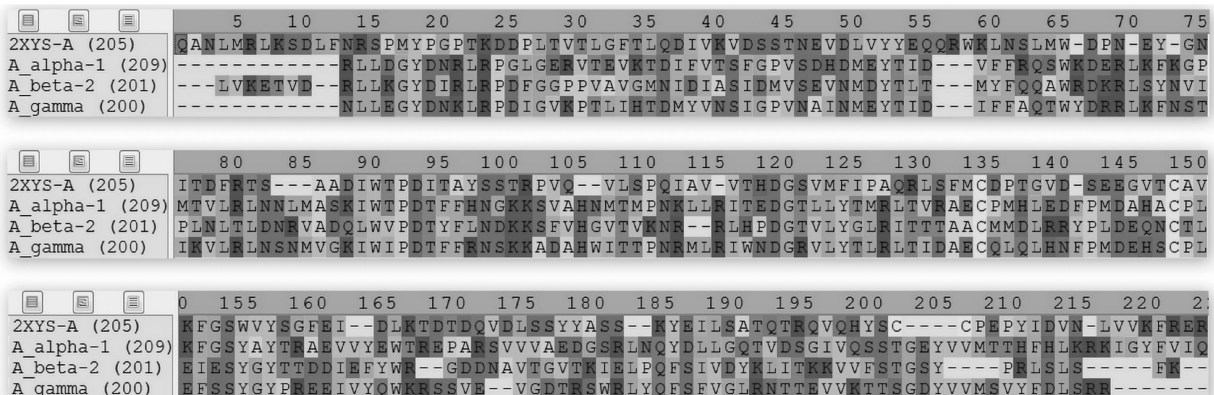


图 3 人  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABAA 受体与海兔乙酰胆碱结合蛋白序列比对图

Fig. 3 Result of sequence alignment between human  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABAA and aplysia californica nAChR

经过比对分子序列,搜索保守区域、构建疏水环区、添加分子侧链、分子动力学优化后,得到人  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  GABAA 的二级结构,如图 4 所示。

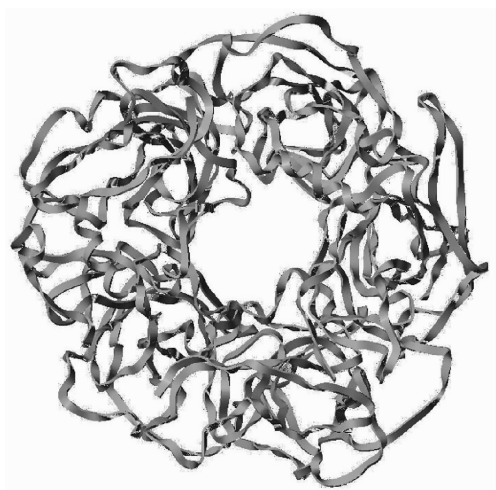


图 4 人  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABAA 受体二级示意图

Fig. 4 Secondary structure of human  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABAA

人  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABAA 受体需要进行结构修正和能量优化.通过 ProTable 验证受体模型的立体化学性质.人  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABAA 的受体模型拉氏构象图如图 5 所示。

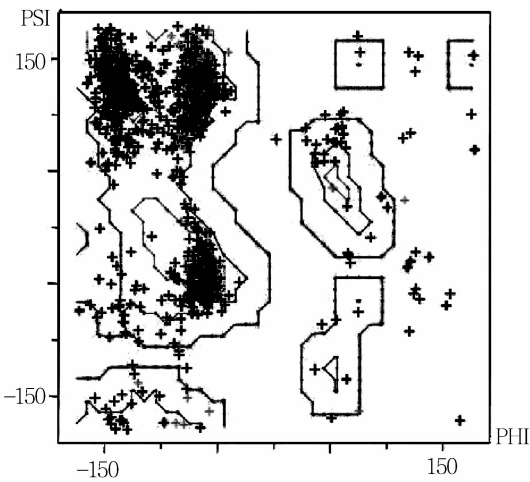


图 5 人  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABAA 受体模型拉氏图

Fig. 5 Ramachandran graph of the human  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABAA receptor

从以上拉氏图可知,大量的氨基酸残基聚集在值为-150 度与-40 度处,人  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  GABA A 受体模型中有 96.76% 的氨基酸残基处于允许区域,验证了模型的合理性.因此,实验中模建的人  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  GABAA 受体模型是可靠的,可用作分子对接实验。

利用 SYBYL-X1.2 的 Dynamics 模块进行分子动力学模拟,人  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  GABA A 受体模型的分子动力学模拟能量-时间图如图 6.经过分子动力学能量优化后,能量-时间图里可知, $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  GABA A 受体模型在前 300 ps 能量变化较大,而后 200 ps 能量比较稳定,通过分子动力学实验,也说明了该模型是可靠的<sup>[14-15]</sup>。

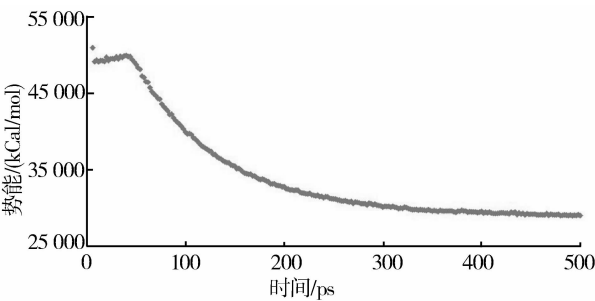


图 6 人  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABA A 受体模型动力学模拟能量-时间图  
Fig. 6 Potential energy with respect to simulation time for dynamics on the human  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABA A receptor

2.2 分子对接

本实验利用分子对接法将黄酮类化合物与人  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  GABAA 受体进行对接.通过上文软件打分函数评价对接结果。

利用 SYBY-X1.2 软件包中 Surflex-docking 模块进行分子对接以及氢键,通过分子对接和打分函数的方法对打分函数进行评价,得到黄酮类化合物与人  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  GABAA 受体的对接得分,如表 1 所示。



由于 13 号分子打分较高,且结构相似性较高具有代表性,故对其与人  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  GABAA 受体对接图(图 7),进行分析.

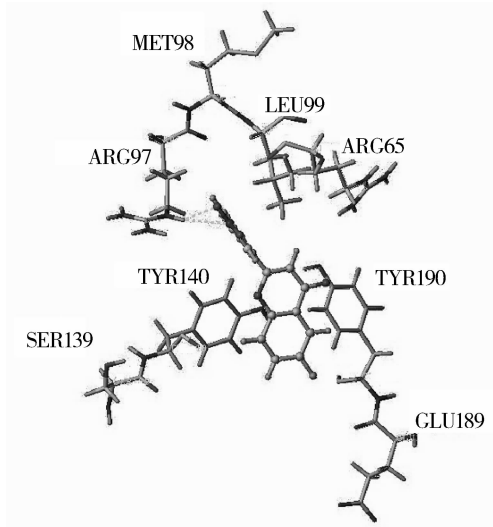


图 7 人  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  GABAA 受体与 6-氟-3'-硝基黄酮对接图  
Fig.7 Human  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  GABAA docking with 6-fluoro-3'-nitro flavonoid

从上图可知,13 号分子 3'位硝基的一个氧原子和氮原子作为氢键受体,与 Arg97(精氨酸)侧链上的亚胺上的氢原子形成氢键,为配体分子与受体结合提供了条件,同时也验证了 3'位对黄酮类化合物活性影响的重要性.而且从空间构象来看,13 号分子的母环与 Tyr190(酪氨酸)和 Tyr140(酪氨酸)的苯环形成共轭,这样能使体系的能量降低,分子稳定,也说明了所建模型的合理性.同时,从表 1 中可以发现,对比 1 号分子与 9 号分子,2 号分子与 10 号分子,3 号分子与 11 号分子,7 号分子与 13 号分子可发现,当 6 位所连基团相同时,将 3'位的氢原子替换成硝基时,对接打分明显提高.同理可看出,将 3'位替换为其他大分子基团时,对接打分也有所提高.且大部分化合物的对接打分与实测活性一致,也验证了模型的可靠性.综上所述,黄酮类化合物 3'位对活性影响很重要.同时,38 号化合物的高得分,可能与较多的取代基提高了与结合口袋的结合能力有关.

### 3 结 语

本研究通过同源模建人  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  GABAA 受体跨膜区的三维结构,并结合分子动力学优化和能量优化,验证了所建模型的稳定性与可靠性.进而将 41 个黄酮类衍生物与该模型进行分子对接实验,通过对接结果的分析,得知当母环 3'位被取代时,分子活性有所增加,其中被硝基取代时,活性提高较大.并从 38 号化合物中得到提示,相应的增加取代基的个数,可能会提高活性,为设计黄酮类化合物提供了理论依据.

### 致 谢

本实验基于武汉工程大学化工与制药学院提供的计算平台,在此表示感谢!

### 参考文献:

- [1] ARGYROPOULOS S V, NUTT D. The use of benzodiazepines in anxiety and other disorders [J]. The journal of the European College of Neuropsychopharmacology, 1999, 9 (6): 407-412.
- [2] VIOLA H, MARDER M, WOLFMAN C, et al. 6-Bromo-3'-nitroflavone, a new high affinity benzodiazepine receptor agonist recognizes two populations of central cortical binding sites [J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 1997, 7 (3): 373-378.
- [3] CRISTINA W, MARIEL M. Flavonoids as GABAA receptor ligands; the whole story [J]. Journal of Experimental Pharmacology, 2012, 4: 9-24.
- [4] MARSHALL G R, MAYER D, NAYLOR C B, et al. Mechanism-based analysis of enzyme inhibitors of amide bond hydrolysis [J]. Progress in Clinical and biological research, 1989, 291: 287-295.
- [5] ZHU Z Y, SALI A, BLUNDELL T L. A variable gap penalty function and feature weights for protein 3-D structure comparisons [J]. Protein Engineering, 1992, 5 (1): 43-51.
- [6] BRAMS M, PANDYA A, KUZMIN D, et al. A structural and mutagenic blueprint for molecular recognition of strychnine and d-tubocurarine by different cys-loop receptors [J]. PloS Biology, 2011, 9 (3): 1100-1034.
- [7] NEEDLEMAN S B, WUNSCH C D. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins [J]. Journal of Molecular Biology, 1970, 48 (3): 443-453.
- [8] WANG J M, WOLF R M, CALDWELL J W, et al. Development and testing of a general amber force field [J]. Journal of Computational Chemistry, 2004, 25 (9): 1157-1174.
- [9] RUPPERT J, WELCH W, JAIN AN. Automatic identification and representation of protein binding sites for molecular docking [J]. Protein Science, 1997, 6 (3): 524-533.
- [10] 巨修练,王黎丽,李科.斑马鱼 A 型  $\gamma$ -氨基丁酸受体同源模建及分子对接 [J]. 武汉工程大学学报, 2013 (6): 20-29.  
JU Xiu-lian, WANG Li-li, LI Ke. Homology modeling and docking of zebrafish  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor [J]. Journal of Wuhan Institute of Technology, 2013 (6): 20-29. (in Chinese)
- [11] CRAMER R D, PATTERSON D E, BUNCE J D. Recent advances in comparative molecular field a-

- analysis (CoMFA) [J]. Progress in Clinical and Biological, 1989, 291: 161-165.
- [12] CORRINGER P J, BAADEN M, BOCQUET N, et al. Atomic structure and dynamics of pentameric ligand-gated ion channels; new insight from bacterial homologues [J]. The Journal of Physiology, 2001, 588 (4): 565-572
- [13] CHEN L G, DURKIN K A, CASIDA J E. Structure model for gamma-aminobutyric acid receptor noncompetitive antagonist binding; widely diverse structure fit the same site [J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2006, 103 (13): 5185-5190.
- [14] MITEVA M A, LEE W H, MONTES M O, et al. Fast structure-based virtual ligand screening combining FRED, DOCK, and Surflex [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2005, 48 (19): 6012-6022.
- [15] CHENG Jin, JU Xiu-lian, CHEN Xiang-yang, et al. Homology modeling of human  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  and house fly  $\beta 3$  GABA receptor channels and Surflex-docking of fipronil [J]. Journal of Molecular Modeling, 2009, 15: 1145-1153.

## Homology modeling and docking with flavonoids of human $\gamma$ -aminobutyric acid receptor

JU Xiu-lian<sup>1,2</sup>, Qian Cheng<sup>1,2</sup>

1. School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China;

2. Key Laboratory for Green Chemical Process (Wuhan Institute of Technology), Ministry of Education, Wuhan 430074, China

**Abstract:** To develop more effective  $\gamma$ -Aminobutyric acid receptor agonist, type A human  $\gamma$ -Aminobutyric acid receptor was built by the homology modeling using the cryo-electron microscopy of the acetylcholine binding protein of *Aplysia californica* as a template. The rationality of the models was confirmed by Ramachandran graph and molecular dynamics. Furthermore, 41 flavonoids were docked into type A human  $\gamma$ -Aminobutyric acid receptor and the docking score fitted with the testing activity. The results of the docking experiment reveal that Tyr140 and Tyr190 conjugated with flavonoids reduce the energy of the system, which demonstrates the rationality of the homology mode. Moreover, position 3' has an important influence on the activity of flavonoids, especially as nitro added. The docking score of number 38 compound is highest, which demonstrates that the increase of substituent brings higher activity of the compounds.

**Keywords:** flavonoid ;  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor ; docking

本文编辑:张 瑞