

• 研究论文 •

## 诺氟沙星-DNA 复合物的分子动力学模拟

马国正<sup>\*,a</sup> 蒋勇军<sup>b</sup> 俞庆森<sup>b</sup>

(<sup>a</sup> 华南师范大学化学与环境学院 广州 510006)

(<sup>b</sup> 浙江大学宁波理工学院药物分子设计与营养工程重点实验室 宁波 315100)

**摘要** 采用分子模建的方法构建了诺氟沙星-DNA 复合物的初始结构, 通过 2 ns 的分子动力学(MD)模拟研究表明: 诺氟沙星能够和双螺旋 d[ATATCGATAT]<sub>2</sub> 形成稳定的复合物, 药物分子可紧密结合在 DNA 的小沟区域, 并且能够与 DNA 的鸟嘌呤碱基形成两个稳定的氢键. 在分子水平上提供了诺氟沙星直接与双螺旋 DNA 相互作用的结构及复合物的动态变化情况.

**关键词** 诺氟沙星; DNA; 分子模建; 分子动力学模拟

## Molecular Dynamics Simulation of the Norfloxacin-DNA Complex

MA, Guo-Zheng<sup>\*,a</sup> JIANG, Yong-Jun<sup>b</sup> YU, Qing-Sen<sup>b</sup>

(<sup>a</sup> School of Chemistry & Environment, South China Normal University, Guangzhou 510006)

(<sup>b</sup> Key Laboratory for Molecular Design and Nutrition Engineering of Ningbo City, Ningbo Institute of Technology, Zhejiang University, Ningbo 315100)

**Abstract** Molecular dynamics (MD) simulations were used to investigate the interaction of norfloxacin with the DNA oligonucleotide d[ATATCGATAT]<sub>2</sub>. The initial binding structure was built with molecular modeling based on the experimental results. A 2 ns MD calculation was performed to study the norfloxacin-DNA complex and the results indicated that norfloxacin was inserted in the minor groove of DNA, binding to the region of duplex TCGA bases. The possible H-bonds between carbonyl and carboxyl group of norfloxacin and amine group of the guanine base support a minor-groove complex for the compound in GC DNA sequence. Molecular dynamics studies complement the structural analysis and provide a clear picture of the norfloxacin-DNA complex.

**Keywords** norfloxacin; DNA; molecular modeling; molecular dynamics simulation

喹诺酮是一类重要的化学合成抗菌素, 具有抗菌谱广、活性强、毒副作用低及临床高效等特点, 目前已经发展到第四代. 其中, 诺氟沙星作为第三代喹诺酮类的代表药物, 在临床上有着非常广泛的应用.

许多研究小组对喹诺酮药物抗菌作用的机理进行了广泛的研究, 并一致认为: DNA 促旋酶(细菌的拓扑异构酶 II)是喹诺酮类药物作用的主要靶位, 也是其作用机理的中心, 但是喹诺酮抗菌素并不是直接作用于 DNA 促旋酶而是作用于 DNA<sup>[1]</sup>. 对喹诺酮药物与 DNA 相互作用的

研究已经开展了很多工作<sup>[2-8]</sup>, 其中 Shen 等<sup>[2,3]</sup>提出了药物-核酸相互作用的协同结合模型, 该模型指出: 在 ATP 供能情况下, DNA 促旋酶诱导引发产生特异性的单链 DNA 结合口袋, 喹诺酮药物通过氢键、 $\pi$ - $\pi$  堆积以及疏水相互作用与单链 DNA 相结合; Palumbo 等<sup>[5,7]</sup>提出了通过镁离子桥联药物与单链核酸的结合模型, 该模型指出: 喹诺酮药物与单链 DNA 的结合过程中, 镁离子起着重要的间接作用.

以上两种模型都是喹诺酮药物与单链 DNA 的相互

\* E-mail: gzma@scnu.edu.cn

Received July 3, 2006; revised August 28, 2006; accepted October 23, 2006.

国家自然科学基金(No. 20173050)资助项目.

作用模型, 近年来, Kim 等<sup>[9~12]</sup>采用荧光法以及圆二色谱技术研究了诺氟沙星与小牛胸腺 DNA 以及氧氟沙星与 B-型 DNA 的相互作用, 结果表明: 诺氟沙星在没有 ATP 供能和镁离子存在的情况下, 和双螺旋 DNA 有明显的结合; 药物分子平面和 DNA 螺旋轴夹角为  $65^{\circ} \sim 85^{\circ}$ ; 诺氟沙星与 DNA 鸟嘌呤碱基之间有明显的相互作用, 结合在 DNA 的小沟区域. 由此, Kim 等提出诺氟沙星是与双螺旋 DNA 而非单链 DNA 直接作用结合, 是一种非经典的小沟结合模式.

由于没有药物-DNA 促旋酶-DNA 三元复合物晶体结构的存在, 从分子水平上对喹诺酮药物直接作用于 DNA 的认识受到了限制. 为此, 我们在前人实验的基础上, 构建了诺氟沙星-DNA 复合物的结构, 并且用分子动力学模拟的方法动态地考察了此复合物结构的变化, 对更加充分了解喹诺酮药物与 DNA 的相互作用以及明确喹诺酮抗菌作用的机理有积极的意义.

## 1 模型和计算

### 1.1 模型及力场参数

诺氟沙星药物的几何构型(如图 1a 所示)根据剑桥晶体数据库中有关喹诺酮类药物的晶体结构进行构建, 并采用 Gaussian 03 程序在 HF/6-31G\*水平进行构型优化. 双螺旋 DNA 为 AMBER 程序产生的 B-型 DNA 片段, 选 d[ATATCGATAT]<sub>2</sub>, 含有两个 GC 碱基对. 药物-DNA 复合物初始构型由 DS Modeling 程序构建. 对 DNA 螺旋采用 CURVES 程序<sup>[13]</sup>进行结构分析. 所有计算都是在 PC-CLUSTER 上完成的.

药物-DNA 复合物的初始构型在 Kim 等的实验基础上构建, 将诺氟沙星分子对接在 DNA 双螺旋 GC 碱基对附近, 距离 DNA 小沟底部 0.3 nm 左右. 以药物分子平面近似平行于 DNA 碱基, 羰基正对 DNA 的 G 碱基的方向嵌入 DNA 的小沟区域. 构建出的初始构型如图 1b 所示.

药物分子力场采用 HF/6-31G\*方法计算静电势, 用 Amber 自带的 RESP 电荷拟合程序计算诺氟沙星部分电荷, 不存在的范德华非键参数用 Antechamber 程序产生.

### 1.2 分子动力学模拟

所有的分子动力学模拟都采用 Amber 7 程序包中的 Sander 模块. 采用 FF-02 力场来模拟 DNA 复合物和溶剂体系. 模拟温度为 300 K, 复合物体系用 Na<sup>+</sup>中和至电中性, 质心周围包 0.8 nm 水分子, 水溶液采用显性 TIP3P 模型. SHAKE 算法用来限制所有含氢键的伸

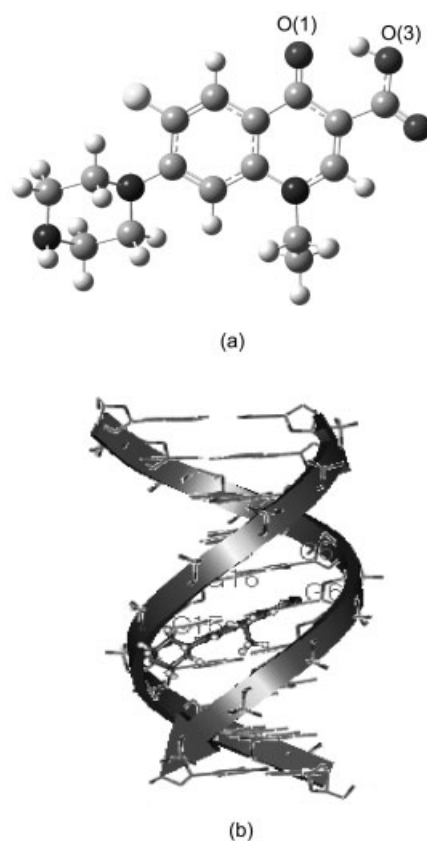


图 1 (a)诺氟沙星分子结构示意图和(b)诺氟沙星-DNA 的初始构型

Figure 1 (a) Structure of norfloxacin and (b) initial geometry of norfloxacin-DNA complex

缩, 模拟步长为 2 fs, 非键对每 10 步更新一次, 非键相互作用截距为 0.9 nm. 分子动力学模拟分为三步: 首先进行 2000 步最陡下降法来消除分子间的高能碰撞, 然后采用  $1.7 \times 10^{21}$  kJ/(mol·m<sup>2</sup>)的谐振力来限制 DNA 和药物分子, 进行 20 ps 的限制性 PME 动力学模拟, 最后进行 2 ns 的非限制性动力学模拟进行数据收集, 每隔 100 步记录一次轨迹文件.

## 2 结果和讨论

### 2.1 复合物结构分析

复合物 MD 模拟中的均方根偏差(RMSD)值是衡量体系是否稳定的重要依据, 图 2 为诺氟沙星-DNA 复合物的 RMSD 随时间变化图. 由图所示, 体系经过 200 ps MD 模拟后达到平衡状态, RMSD 值稳定在 0.25 nm 左右. 此外, 在 200 ps 的 MD 之后, 体系势能也趋向最小值而达到稳定, 从而为诺氟沙星-DNA 复合物能够稳定存在提供了有力的证据.

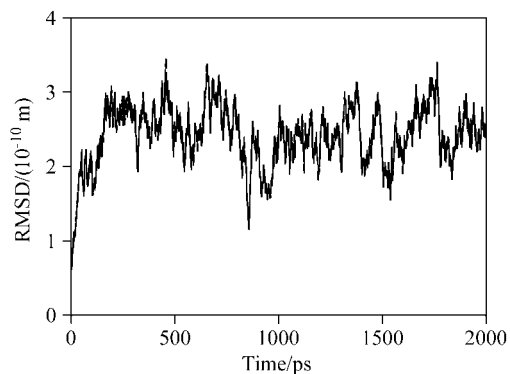


图2 诺氟沙星-DNA 复合物的 RMSD 随时间变化图

Figure 2 Root-mean-square deviation of norfloxacin-DNA complex from the initial structures as a function of time

由于复合物体系 MD 在 200 ps 就达到稳定, 从而采



图3 (a)诺氟沙星-DNA 复合物在 1.0~2.0 ns 的平均结构及(b)诺氟沙星的结合位点示意图

Figure 3 (a) The 1.0~2.0 ns time-averaged structure of norfloxacin-DNA complex and (b) norfloxacin binding to the TCGA region of d[ATATCGATAT]<sub>2</sub> (the possible H-bond is shown by dotted line)

表1 单体 DNA 的扭转角  
Table 1 Torsion angles of free DNA

	Chi	Gamma	Delta	Epsil	Zeta	Alpha	Beta
	C(1')—N	C(5')—C(4')	C(4')—C(3')	C(3')—O(3')	O(3')—P	P—O(5')	O(5')—C(5')
DNA	T	-121.74	50.51	115.22	-175.29	-90.79	173.98
	C	-124.92	51.77	105.83	-171.16	-90.25	-179.75
	G	-105.58	48.68	128.75	-169.23	-109.96	177.49
	A	-114.54	46.54	122.99	-177.65	-90.46	175.42
	A	-116.20	47.26	124.28	-174.25	-89.33	174.33
	G	-103.81	46.06	132.75	-161.25	-125.61	174.24
	C	-122.38	49.79	106.33	-172.83	-84.74	179.26
	T	-121.51	49.01	110.04	-175.51	-90.10	174.61

用 1.0~2.0 ns 间包含 5000 个构象的轨迹文件来提取平均结构. 图 3(a)为 1.0~2.0 ns 的 MD 模拟后复合物体系的平均结构示意图. 由图所示, DNA 的碱基相对初始结构有一定程度的弯曲, 药物分子结合在 DNA 的 TCGA 小沟区域. 和初始结构比较, 诺氟沙星分子进行了一定程度的扭曲和翻转, 分子平面和 DNA 螺旋轴大约成 70° 夹角, 这和实验结果基本一致<sup>[9]</sup>.

DNA 在结合药物分子后, 碱基有不同程度的弯曲, 为了更好地识别这种结合作用, 采用 CURVES 软件计算了单体 DNA 和诺氟沙星-DNA 复合物双螺旋碱基的扭转角. 复合物结构取自 MD 模拟在 1.0~2.0 ns 处的平均结构. 这里我们只列出了诺氟沙星与双螺旋 d[ATATCGATAT]<sub>2</sub> 结合有关的 TCGA 碱基处的扭转角数据, 见表 1 和 2.

表2 诺氟沙星-DNA 复合物的扭转角  
Table 2 Torsion angles of norfloxacin-DNA complex

		Chi	Gamma	Delta	Epsil	Zeta	Alpha	Beta
		C(1')—N	C(5')—C(4')	C(4')—C(3')	C(3')—O(3')	O(3')—P	P—O(5')	O(5')—C(5')
Norfloxacin-DNA	T	-118.59	54.82	120.64	-175.07	-95.97	-62.56	174.78
	C	-118.05	54.48	125.15	-172.82	-93.42	-63.74	172.47
	G	-137.01	54.18	104.82	-171.33	-101.69	-64.99	176.83
	A	-121.71	56.23	124.17	-174.44	-92.74	-64.60	173.57
	A	-118.54	49.75	128.53	-174.51	-100.72	-63.18	178.20
	G	-124.54	40.33	141.47	-172.21	-95.33	-62.89	-179.52
	C	-92.27	53.53	139.68	-108.46	177.89	-82.19	160.93
	T	-112.02	56.05	121.11	-167.57	-90.60	-66.18	167.70

由表 1, 2 可以看出: 药物分子结合后, DNA 的碱基扭转角发生了不同程度的变化, 其中以 GC 碱基对的变化最为明显. TCGA 链的 CG 碱基在 Chi, Delta 角处有较大变化, 其中 C 碱基 Chi, Delta 角的变化大约为  $7^\circ$ ,  $20^\circ$ ; G 碱基为  $32^\circ$ ,  $24^\circ$ . 其它扭转角没有明显变化; AGCT 链的 GC 碱基在 Chi, Delta, Epsil, Zeta, Alpha 以及 Beta 角处都有较大变化, 其中 G 碱基在 Chi, Zeta 角的变化大约为  $21^\circ$ ,  $30^\circ$ , C 碱基在 Chi, Delta, Epsil, Zeta, Alpha, Beta 角的变化大约为  $30^\circ$ ,  $33^\circ$ ,  $64^\circ$ ,  $87^\circ$ ,  $20^\circ$ ,  $19^\circ$ . 对于其它碱基的扭转角变化很小. 由此可见, 药物分子的结合导致了双螺旋 d[ATATCGATAT]<sub>2</sub> 的 GC 碱基发生了较大的扭转, 也说明了药物分子和 GC 碱基有明显的相互作用, 这点已经通过实验得到证实<sup>[9]</sup>.

DNA 小沟的结构及动力学研究, 对于 DNA-蛋白以及 DNA-药物的分子识别有非常重要的作用. 这里, 我们考察了诺氟沙星结合位点处 TCGA 双螺旋的小沟宽度变化情况, 见图 4. 对 DNA 小沟宽度的定义为: DNA 双螺旋一条链的磷酸氧原子(O1P)<sub>i</sub> 与另一条链的 P<sub>i+3</sub> 的距离减去 0.58 nm (两个磷原子半径)<sup>[14]</sup>.

在图 4 中, 采用 AMBER 程序动态监测了单体 DNA 和诺氟沙星-DNA 复合物的双螺旋 TCGA 处的小沟宽度变化. 如图所示, 在 MD 模拟的 1.0~2.0 ns 时间范围内, 复合物 TCGA 双螺旋的小沟宽度变化平稳, 和单体 DNA 相比较, 小沟的宽度在 TCG 碱基处都不同程度地变窄. 从而也能够说明, 药物分子与 DNA 结合, 主要作用于双螺旋 DNA 的小沟区域. 由于氢键、范德华等力的存在致使药物与 DNA 紧密结合, 使得 TCG 碱基处的小沟宽度有一定程度的变窄.

## 2.2 诺氟沙星结合位点分析

由图 3a 可以看出, 药物分子结合的主要部位位于 DNA 双螺旋的 GC 碱基处, 药物分子的羰基和羧基分别对着 DNA 的两个 G 碱基而哌嗪基则沿着小沟区域向 C 碱基伸展, 氟原子和喹诺酮母环仍保持刚性, 只有环外

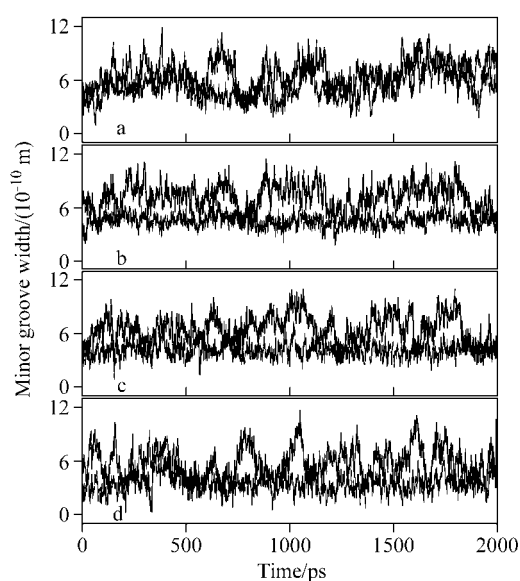


图4 TCGA 双螺旋小沟宽度随时间的变化图

Figure 4 Time-dependent fluctuation of the minor groove width of the TCGA duplex at the (a) A-tract, (b) G-tract, (c) C-tract and (d) T-tract tracts for the free DNA (top line) and DNA-complex (bottom line).

柔性较大的乙基和哌嗪基有一定的角度变化. 诺氟沙星分子经过适当的扭转, 羰基氧和羧基上的羟基氧与 DNA 的 G 碱基上的氨基氢形成了两个很稳定的氢键, 如图 3(b)所示. 通过监测复合物氢键距离的变化(图 5), 诺氟沙星的 O(1)原子与 16 位 G 碱基的氨基 N 原子距离在 0.27~0.32 nm 之间, 平均距离为 0.28 nm, O(3)原子与 6 位 G 碱基氨基 N 原子距离在 0.29~0.35 nm 之间, 平均距离为 0.3 nm. 这两个氢键的存在对复合物的稳定起至关重要的作用.

通过对诺氟沙星-DNA 复合物的 MD 模拟结果进行结构分析可以得知: 诺氟沙星分子与双螺旋 d[ATATCGATAT]<sub>2</sub> 相互作用形成了稳定的复合物, 对 MD 平均结构, DNA 双螺旋碱基的扭转角, 以及动态监

测 DNA 小沟宽度变化和复合物形成的氢键, 都说明了药物分子可结合在 DNA 的 TCGA 小沟区域, 主要以氢键形式与 DNA 的两个鸟嘌呤碱基相结合. 从而在分子水平上提供了诺氟沙星与 DNA 直接结合时的结构及动态变化情况.

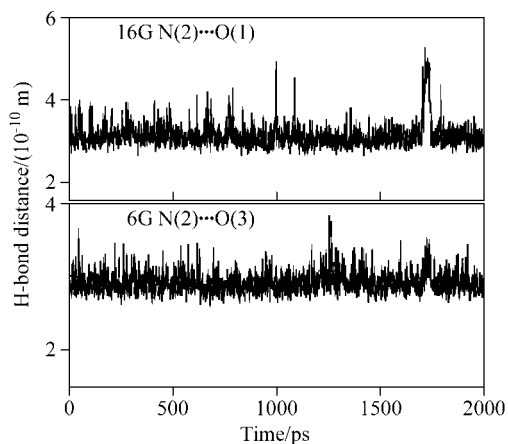


图5 诺氟沙星两个氧原子与 DNA 碱基形成氢键的距离随时间变化图

Figure 5 H-bond distances between some norfloxacin groups and DNA bases as a function of time

### 3 结论

通过在 Kim 等实验的基础上分子模建诺氟沙星-DNA 复合物初始结构, 并进行分子动力学模拟研究表明: 在没有 ATP 提供能量以及  $Mg^{2+}$  存在下, 诺氟沙星分子能够与双螺旋  $d[ATATCGATAT]_2$  紧密结合, 形成稳定的诺氟沙星-DNA 复合物. 诺氟沙星的羰基氧和羧基上的羟基氧可以和 DNA 双螺旋 G 碱基的氨基氢原子形成两

个稳定的氢键. 氢键作用的存在, 对诺氟沙星-DNA 复合物的稳定起了至关重要的作用.

### References

- 1 Shen, L. L.; Pernet, A. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1985**, *82*, 307.
- 2 Shen, L. L.; Baranowski, J.; Pernet, A. G. *Biochemistry* **1989**, *28*, 3879.
- 3 Shen, L. L.; Mitscher, L. A.; Sharma, P. N.; O'Donnell, T. J.; Chu, D. W. T.; Copper, C. S.; Rosen, T.; Pernet, A. G. *Biochemistry* **1989**, *28*, 3886.
- 4 Hanessian, S.; Saladino, R.; Nunez, J. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2333.
- 5 Palù, G.; Valisena, S.; Ciarrocchi, G.; Gatto, B.; Palumbo, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 9671.
- 6 Fan, J. Y.; Sun, D.; Yu, H.; Kerwin, S. M.; Hurley, L. H. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 408.
- 7 Sissi, C.; Andreolli, M.; Cecchetti, V.; Fravolini, A.; Gatto, B.; Palumbo, M. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1555.
- 8 Noble, C. G.; Barnard, F. M.; Maxwell, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 854.
- 9 Son, G. S.; Yeo, J. A.; Kim, M. S.; Kim, S. K.; Holmén, A.; Åkerman, B.; Nordén, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6451.
- 10 Bailly, C.; Colson, P.; Houssier, C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *243*, 844.
- 11 Lee, E. J.; Yeo, J. A.; Lee, G. J.; Han, S. W.; Kim, S. K. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 6018.
- 12 Lee, E. J.; Yeo, J. A.; Jung, K.; Hwangbo, H. J.; Lee, G. J.; Kim, S. K. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *395*, 21.
- 13 Lavery, R.; Sklenar, H. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1989**, *6*, 63.
- 14 Hamerberg, D.; McFail-Isom, L.; Williams, L. D.; Wilson, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10513.

(A0607038 DING, W. F.; ZHENG, G. C.)