

六钨酸盐有机胺杂化衍生物与 SARS-CoV 3CL^{pro}相互作用的分子动力学模拟

邵 琛¹, 王建萍¹, 杨国春¹, 苏忠民^{1,2}, 胡冬华¹, 孙家锤²

(1. 东北师范大学化学学院功能材料化学研究所, 长春 130024;

2. 吉林大学理论化学研究所理论化学计算国家重点实验室, 长春 130023)

摘要 采用分子动力学模拟方法, 在分子水平上探讨六钨酸盐有机杂化衍生物潜在的抗 SARS 病毒活性. 3CL^{pro} 主蛋白酶是冠状病毒复制和转录过程中起关键作用的功能蛋白, 因此采用 SARS-CoV 3CL^{pro} 作为靶标进行抗 SARS 病毒的药物设计. 使用 Insight II 软件包中的 Biopolymer, Discover 3, Profile-3D 和 Affinity 等模块, 研究 POMs/3CL^{pro} 相互作用的结合位点和作用性质. 研究其能量变化规律, 探讨了多酸化合物对 SARS 病毒可能的抑制机理. 研究表明, POMs 与 3CL^{pro} 在酶的催化活性位点处有较强的结合力. 形成的复合物主要以静电相互作用相结合, 氢键相互作用对复合物的相对稳定性有一定影响. 对于 POMs/3CL^{pro} 复合物, 有机胺基团取代的 POMs 所带负电荷比未取代体系的高, 比 3CL^{pro} 的结合能更高, 这与 POMs 的相关量子化学计算结果吻合.

关键词 SARS; 3CL^{pro}; 多金属氧酸盐; 分子动力学; 对接

中图分类号 O641

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)01-0165-05

实验证实引起严重急性呼吸系统综合症(SARS)的病原体是一种冠状病毒. SARS-CoV(SARS 冠状病毒)是一种正链 RNA 冠状病毒. SARS-CoV 的质粒由六种蛋白组成: 核壳蛋白(N)、棘刺蛋白(S)、膜蛋白(M)、包膜蛋白(E)、聚合酶以及 3CL^{pro} 水解蛋白酶. 序列分析结果表明, 可被确认的共有 18 种来源不同的完整基因组, 各基因组间虽然有变异, 但程度并不大, 并且其主要蛋白酶 3CL^{pro} 在 SARS 基因组中相对保守, 而且研究表明 3CL^{pro} 是 SARS-CoV 的主要功能蛋白, 在病毒的复制和转录过程中水解病毒所编码的聚合肽为 pp1a(分子量 486000)和 ORF1b(分子量 790000). 这两种聚合肽起到贯穿性的重要作用. 3CL^{pro} 水解这两种聚合肽同时释放出不同功能的多肽, 因此 3CL^{pro} 可以被当作抗 SARS 药物设计的关键性靶标^[1~5]. 实验结果证实, SARS-CoV 3CL^{pro} 的催化活性位点是 Cys145/His41^[6,7].

POMs 是一类丰富的无机簇合物体系, 由于具有显著的化学、物理特性而广泛地应用于医学、催化、材料科学等领域^[8~10]. POMs 同时表现出很强的高效低毒的生物活性. 另一方面, POMs 普遍具有纳米尺寸及球状结构, 并且有些 POMs 几乎与可溶于水的有抗 HIV-1P 活性的富勒烯衍生物有完全相同的功效^[11]. 文献[8, 12~15]讨论了杂多蓝化合物如 PW, SiW, PMo 和 SiMo, 结果表明, 一些 POMs 具有低毒性和高抗 HIV 活性. 二钛取代的 α -keggin 结构的十钨酸盐也表现出显著的抗 HIV-1 活性和抑制 3CL^{pro} 活性^[16~18]. 有机胺基团取代的六钨酸盐体系的桥氧原子有更高的负电荷^[19,20], 有利于作为配体与受体以静电作用和氢键作用方式相结合. 所以继续研究有机无机杂化体系作为抑制剂方面的潜在应用价值具有非常重要的意义.

本文将钨六酸盐有机杂化衍生物的 8 种配体选为 SARS-CoV 3CL^{pro} 抑制剂的候选物, 并对配体与受体的结合能分别进行了比较, 分析了氢键、静电相互作用和活性位点关键残基的相关信息, 讨论了二者间的相互作用机理. 所有模拟过程使用 Insight II 软件包^[21] 在 SGI 03800 工作站上执行.

收稿日期: 2006-09-06.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20373009, 20573016)、长江学者和创新团队发展计划和东北师范大学自然科学基金(批准号: 20060305)资助.

联系人简介: 苏忠民, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事量子化学与功能材料化学研究. E-mail: zmsu@nenu.edu.cn

1 计算模型与方法

1.1 3CL^{pro}的平衡构象

SARS-CoV 3CL^{pro}的活性位点和三维晶体结构的相关信息由实验获得. SARS-CoV 3CL^{pro}的结构信息表明,它具有两个亚基,并以互相垂直方式存在.而且每个亚基都有三个主要的结构域,其中结构域 I 和 II 由反平行 β 折叠构成,结构域 III 由 5 个 α -螺旋构成,并形成反平行球状构象.

3CL^{pro}的晶体结构坐标由 PDB 库下载(PDB 编码 1UK4). 3CL^{pro}由 A 和 B 两个亚基构成,每个亚基含有 306 个氨基酸^[22]. 用 Biopolymer 模块进行坐标修复,并适当地优化和修饰侧链残基以减少它们与周围原子在几何学上的不合理碰撞. 首先采取最陡下降法优化 500 步;再用共轭梯度法优化 500 步^[23];设置 pH = 7.6^[24],然后再包两层厚度为 1 nm 的水分子膜,并固定外层水分子,以保证在升温退火模拟过程中蛋白质分子在水溶液环境中有足够的构象转变空间;最后在 ESFF 力场^[25]下用 Discover 3 模块^[26]优化. 由 600 K 缓慢降至 300 K,降温梯度为 100 K,共进行 20 ps 的退火模拟,每步平衡温度循环中分子动力学计算后均设置分子力学计算. 冷却后即在 0 K 进行 500 步分子力学优化. 能量收敛后的 3CL^{pro}最终构象用作后续分析结构. 最终水溶液中 3CL^{pro}的平衡构象如图 1 所示.

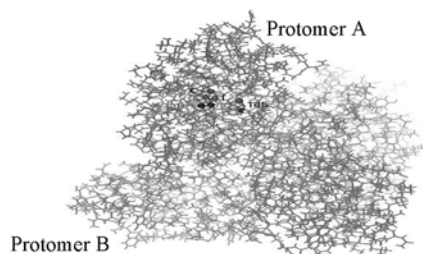


Fig. 1 Structure of dimer of SARS 3CL^{pro}

The catalytic residues of Cys145 and His41 are represented in ball-and-stick.

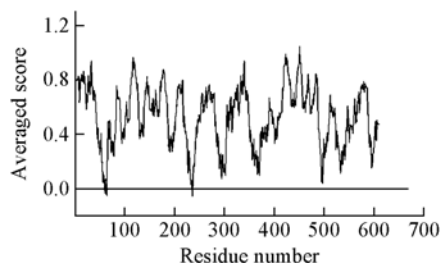


Fig. 2 Profile-3D evaluation of modeling of the 3CL^{pro}

优化后构象用 Profile-3D 模块进行评价^[27],评价结果如图 2 所示. 由图 2 可以看出,大部分残基的模拟是合理的,仅有 Arg-A60, Ser-A62, His-A64 和 Lys-A236 残基模拟的合理性较差,这可能是因为在模拟过程中这些疏水性残基未能与溶剂进行很好的隔离. 但这些残基远离酶的活性位点,所以它们的不合理模拟并不影响后续的研究.

1.2 POMs 化合物的筛选

最近,我们研究了 8 种钼六酸盐有机杂化衍生物配体的电子性质、氧化还原性质、质子化性质及稳定性. 结果表明,桥氧有很强的亲核活性^[19,20]. 对于 8 种配体:母体 $[\text{Mo}_6\text{O}_{19}]^{2-}$ 、顺式二 2,6-二甲基苯胺取代、反式二 2,6-二甲基苯胺取代、顺式二 2,4-二甲基苯胺取代、2,6-二甲基苯胺取代、反式二 2,6-二甲基-4-苯乙炔基苯胺取代、顺式二 2,6-二甲基-4-苯乙炔基苯胺取代,分别命名为配体 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8. 配体 7 的结构如图 3 所示. 8 种配体的三维结构见图 4.

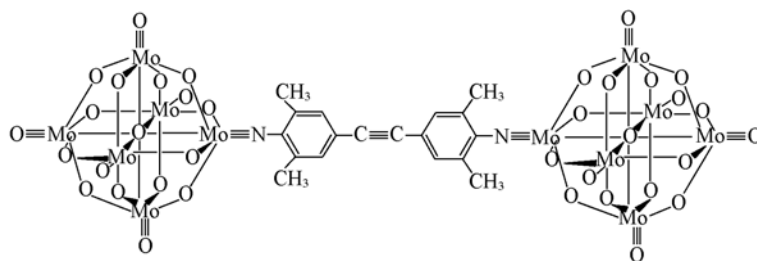


Fig. 3 Structure of ligand 7

1.3 POMs 与 SARS-CoV 3CL^{pro}的对接

设置只有受体的活性口袋内残基为柔性,将其余残基固定其坐标,配体设置为刚性. 大量的生物信息研究结果表明, SARS-CoV 3CL^{pro}的活性位点是 His 41/Cys 145^[28]. 8 种 POMs 分别被对接到 SARS-CoV 3CL^{pro}活性位点上. 用 Insight II 软件包的 Affinity 模块进行对接模拟并得出十几个有局域能量极小值构象的轨迹^[29]. 而酶与抑制剂复合物的最低能量构象选作进一步研究的对象.

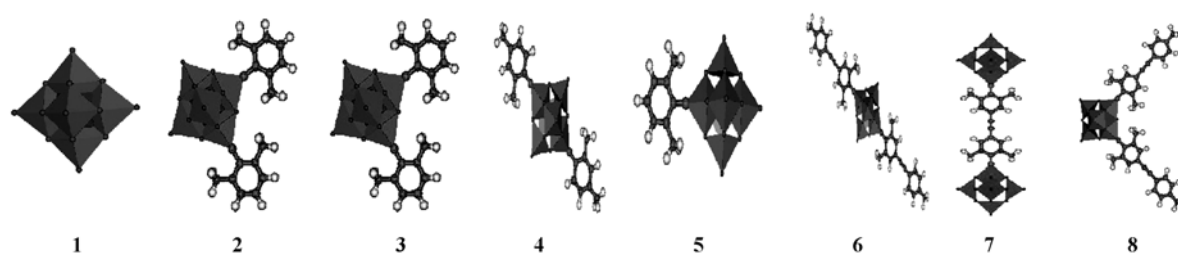


Fig. 4 Three-dimensional structure models of the eight ligands, rendering ball-and-stick style for organic substitutions and polyhedron style for POMs

2 结果与讨论

用 Insight II 软件包的 Affinity 模块对 8 种钼六酸及其有机杂化衍生物进行对接模拟, 结果见图 5. 由图 5 可以看出, 8 种配体与 3CL^{pro} 受体在活性位点处均有相互作用. POMs 与 3CL^{pro} 的催化残基 His 41/Cys 145 形成氢键. POMs 与 SARS-CoV 3CL^{pro} 形成的配体-受体相互作用降低了复合物的能量, 并改变了催化残基的构象, 这样就会影响酶的催化活性.



Fig. 5 Structures of POMs /SARS-CoV 3CL^{pro} complexes

With 3CL^{pro} rendering ribbon style.

8 种 POMs 与受体 3CL^{pro} 的结合能如表 1 所示. 由表 1 可见, 所有 8 种配体-受体复合物的静电能均降低, 这表明带高负电荷的 POMs 抑制剂与带正电荷的残基确有相互作用. 由于线型取代配体的尺寸大于活性口袋的尺寸, 即不符合锁钥原理, 所以线型取代配体与受体形成的氢键个数少于直角位取代配体形成的氢键个数; 其次, 在空阻相差不多的情况下负电荷较高的配体与受体可形成较多的氢键. 这可能是 8 种复合物体系稳定性排序的原因. 而且强的静电相互作用足以克服空间立构能, 从而使总能量为负值, 即总能降低. 在虚拟筛选中结合能是一个很重要的判断标准. 文献[30,31]用 AG7088 作为参考分子对 SARS-CoV 3CL^{pro} 进行的基于分子对接的虚拟筛选研究, 结果表明, AG7088 与 3CL^{pro} 间的结合能为 -63.42 kJ/mol, 此值远高于 POM/3CL^{pro} 复合物的结合能值, 这表明 POMs 比 AG7088 与 3CL^{pro} 具有更高的结合力. 而且与未被取代的多酸配体相比, 其结合能亦高出很多, 稳定性更高. 依据总结和能变 Δ_2 越负稳定性越高原则, 还可以由表 1 得出 8 种配体与 3CL^{pro} 形成的复合物稳定性顺序如下: $2 > 5 > 7 > 8 > 1 > 3 > 4 > 6$.

Table 1 Binding energy between ligand and receptor (kJ/mol) *

Complex	E_{Tot}	Δ	E_{Nonb}	Δ_1	$\Delta_2 (\Delta + \Delta_1)$
3CL ^{pro}	-9728.458		-13646.040		
2/3CL ^{pro}	-9599.786	128.672	-13902.423	-256.383	-127.711
5/3CL ^{pro}	-9615.051	113.407	-13879.552	-233.512	-120.105
7/3CL ^{pro}	-9622.185	106.273	-13868.888	-222.848	-116.575
8/3CL ^{pro}	-9643.968	84.490	-13832.157	-186.117	-101.627
1/3CL ^{pro}	-9706.204	22.254	-13761.877	-115.837	-93.583
3/3CL ^{pro}	-9703.415	25.043	-13759.162	-113.122	-88.079
4/3CL ^{pro}	-9702.576	25.882	-13758.776	-112.736	-86.854
6/3CL ^{pro}	-9699.405	29.053	-13756.351	-110.311	-81.258

* Δ is the difference of space energy; Δ_1 is the difference of nonbond energy; Δ_2 is the total difference from nonbond energy and space energy.

氢键的信息列于表 2 中. 由表 2 可见, 配体 **2**, **5** 和 **7** 均形成 7 个氢键, 但其中桥氧参与形成的氢键在三个配体中分别为 3, 2 和 1 个, 又桥氧所带负电荷较端氧高出近 0.2, 其形成的氢键更稳定, 所以三者与受体蛋白的结合力为 $2 > 5 > 7$. 而配体 **8** 和 **1** 相比仅形成 5 个氢键, 却有较高的结合活性, 这可能是因为配体 **8** 中有 3 个桥氧参与形成氢键, 而在配体 **1** 中仅为两个. 在配体 **3** 和 **4** 中, 虽然均有 2 个桥氧参与形成氢键, 但是由量化计算结果可知, 在配体 **3** 中形成氢键的桥氧所带负电荷高出配体 **4** 的近 0.02, 所以配体 **3** 与受体蛋白的结合力强于配体 **4**. 这与文献[20,21]的结果吻合得很好.

Table 2 Composition of binding site and H-bond distance length in the binding site

Complex	Residues of 3CL ^{pro}	Atoms in ligand	Distance/nm	Complex	Residues of 3CL ^{pro}	Atoms in ligand	Distance/nm	
2/3CL ^{pro}	A41;ND1	O3	2.72	8/3CL ^{pro}	A145;HN	O4	1.78	
	A41;ND1	O6	2.55		A41;HE2	O10	2.20	
	A41;ND1	O10	2.30		A144;HN	O13	2.16	
	A166;HN	O15	1.94		A142;O	O15	2.30	
	A163;O	O16	2.97		A144;O	O17	2.26	
	A164;O	O16	2.74		1/3CL ^{pro}	A41;ND1	O14	2.86
	A145;HN	O17	2.19			A41;ND1	O18	2.59
5/3CL ^{pro}	A41;HE2	O1	2.03	A41;O		O20	2.76	
	A145;O	O2	2.39	A41;ND1		O20	2.31	
	A41;ND1	O4	2.45	A145;O	O22	2.81		
	A41;ND1	O12	2.88	A26;O	O24	2.61		
	A41;HE2	O13	2.46	3/3CL ^{pro}	A41;ND1	O4	2.20	
	A164;O	O17	2.98		A41;HE2	O9	1.12	
	A26;O	O18	2.31		A164;O	O10	2.72	
7/3CL ^{pro}	A145;O	O43	2.71	A41;O	O13	1.94		
	A41;HE2	O43	2.19	4/3CL ^{pro}	A41;ND1	O2	2.87	
	A41;ND1	O53	1.63		A41;O	O11	2.67	
	A26;O	O54	2.67		A25;OG1	O13	2.16	
	A119;OD1	O54	2.95	A25;HG1	O14	2.39		
	A41;ND1	O57	2.74	6/3CL ^{pro}	A41;ND1	O11	2.19	
	A142;O	O65	2.92		A25;O	O13	2.87	

由图 6 可以看出, 配体周围形成氢键的氨基酸有 His41, Glu166, Cys145, Thr26 和 Asn142 等, 这些均属于极性氨基酸残基并易于形成氢键网. 即在 POMs 与 3CL^{pro} 间形成复合物的过程中电荷高低和静电性质是保证酶/抑制剂相互作用的重要因素. 因此, 有机杂化的 POMs 的高负电荷特性使其成为可能的高活性抑制剂.

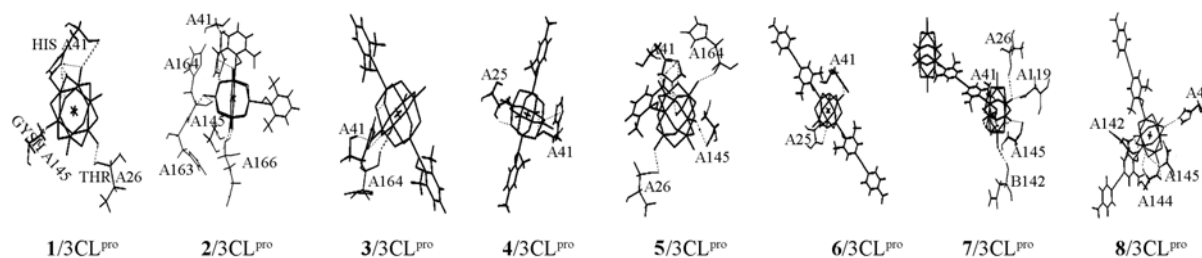


Fig. 6 Key residues and hydrogen bond interactions of POM/3CL^{pro} complexes

参 考 文 献

- [1] Rota P. A., Oberste M. S., Monroe S. S., *et al.*. Science[J], 2003, **300**: 1394—1399
- [2] Kanchan A., John Z., Parvesh W., *et al.*. Science[J], 2003, **300**: 1763—1767
- [3] Liu H. L., Lin J. C., Yih H., *et al.*. Chem. Phys. Lett. [J], 2005, **401**: 24—29
- [4] Peiris J., Lai S., Poon L., *et al.*. The Lancet[J], 2004, **361**: 1319—1325
- [5] Lan Y. C., Liu H. F., Shih Y. P., *et al.*. Infection Gene. Evol. [J], 2005, **5**: 261—269
- [6] Anand K., Palm G. J., Mesters J. R., *et al.*. EMBO J. [J], 2002, **21**: 3213—3224
- [7] Poon L. L. M., Leung C. S. W., Tashiro M., *et al.*. Clin. Chem. [J], 2004, **50**: 1050—1052
- [8] Xiang M. L., Xiao S. X., Yuan Z. R., *et al.*. Chem. Res. Appl. [J], 2000, **2**: 621—625

- [9] Erik D. C. . Rev. Med. Virol[J], 2000, **10**: 255—257
- [10] Erik D. C. . Med. Res. Rev. [J], 2002, **22**: 531—565
- [11] Judd D. A. , Nettles J. H. , Nevins N. , *et al.* . J. Am. Chem. Soc. [J], 2001, **123**: 886—897
- [12] Liu S. X. , Wang L. , Wang E. B. , *et al.* . J. Chin. Rare. Earth. Soc. [J], 1997, **15**: 59—63
- [13] Chen C. N. , Lin C. P. C. , Huang K. K. , *et al.* . Altern. Med. [J], 2005, **2**: 209—215
- [14] Xiang M. L. , Zhao Z. G. , Yuan Z. R. , *et al.* . J. Biomed. Eng. [J], 2002, **2**: 291—297
- [15] He Y. , Lu H. , Siddiqui P. , *et al.* . J. Immunol. [J], 2005, **174**: 4908—4915
- [16] Guan W. , Yan L. K. , Su Z. M. , *et al.* . Inorg. Chem. [J], 2005, **44**: 100—109
- [17] SHAO Chen(邵琛), HU Dong-Hua(胡冬华), SU Zhong-Min(苏忠民), *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2005, **26**(8): 1512—1516
- [18] Hu D. H. , Shao C. , Su Z. M. , *et al.* . J. Inorg. Biochem. [J], 2007, **101**: 89—94
- [19] Yan L. K. , Su Z. M. , Guan W. , *et al.* . J. Phys. Chem. B[J], 2004, **108**: 17337—17343
- [20] Yang G. C. , Guan W. , Su Z. M. , *et al.* . J. Phys. Chem. B[J], 2006, **110**: 23092—23098
- [21] Insight II, Version 2000[CP], San Diego: Accelrys Inc. , 2000
- [22] Yang H. T. , Yang M. J. , Ding Y. , *et al.* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA[J], 2003, **100**: 13190—13195
- [23] Guo C. Z. , Xuan Z. Y. , Chen R. S. , *et al.* . Chin. J. Biochem. Mol. Biol. [J], 2002, **18**: 499—505
- [24] Peiris J. , Lai S. , Poon L. , *et al.* . The Lancet[J], 2004, **361**: 1319—1325
- [25] Barlow S. , Rohl A. L. , Shi S. G. , *et al.* . J. Am. Chem. Soc. [J], 1996, **118**: 7578—7592
- [26] Discover 3 User Guide[CP], San Diego, MSI, 1999
- [27] Luthy R. , Bowie J. U. , Eisenberg D. . Nature[J], 1992, **356**: 83—85
- [28] Anand K. , Ziebuhr J. , Wadhvani P. , *et al.* . Science[J], 2003, **300**: 1763—1767
- [29] Greenidge P. A. , Carlsson B. , Bladh L. G. , *et al.* . J. Med. Chem. [J], 1998, **41**: 2503—2512
- [30] Chen L. , Gui C. , Luo X. , *et al.* . J. Virol. [J], 2005, **79**: 7095—7103
- [31] Lin C. W. , Tsai C. H. , Tsai F. J. , *et al.* . FEBS Lett. [J], 2004, **574**: 131—137

Interactions of $[\text{Mo}_6\text{O}_{19}]^{2-}$ and Its Derivatives Substituted with Organic Groups Inhibitor with SARS-CoV 3CL^{pro} by Molecular Modeling

SHAO Chen¹, WANG Jian-Ping¹, YANG Guo-Chun¹, SU Zhong-Min^{1,2*},
HU Dong-Hua¹, SUN Chia-Chung²

(1. Institute of Functional Material Chemistry, Northeast Normal University, Changchun 130024, China;
2. State Key Laboratory of Theoretical and Computational Chemistry, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract Polyoxometalates (POMs) were proved with the properties of both anti-tumor and anti-HIV. The potential anti-SARS activities of the polyoxometalates $[\text{Mo}_6\text{O}_{19}]^{2-}$ and its derivatives substituted with organic groups were investigated in this paper by molecular modeling method. The 3c like (3CL) protease hydrolyze, namely 3CL^{pro}, is the key protease for virus replication as well as transcription, and thus can be taken as one of the key targets for anti-SARS drug design. InsightII/Dicover 3, affinity, Profile-3D modules were used to explore possible binding locations and properties for POMs/3CL^{pro} interaction. We studied the energy changing trend and investigated the possible inhibiting mechanism of POMs' with SARS-CoV. The results show that POMs bind with 3CL^{pro} in the active site with a high affinity, mainly *via* electrostatic interactions and H-bond interactions. For the POMs/3CL^{pro} complex, POMs substituted with organic groups with higher negative charge are prefer to bind with 3CL^{pro} than non-substituted ones, and this agrees well with relative quantum chemical calculations. Organic substitutions in ligands have an influence on the stability of complexes by steric hindrance. Our study may provide theoretical reference and illustrations to anti SARS-CoV drug design.

Keywords SARS; 3CL^{pro}; Polyoxometalate; Molecular dynamics; Docking (Ed. : Y, I)