

functional characterization of eight CYP3A4 protein variants [ J ]. *Pharmacogenetics* , 2001 , 11( 5 ) : 447 - 458 .

CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos [ J ]. *J Pharmacol Exp Ther* , 2001 , 299( 3 ) : 825 - 831 .

[ 17 ] Dai D , Tang J , Rose R , et al . Identification of variants of

## 三维定量构效关系和同源分子模拟在细胞色素 P450 研究中的应用

李 恩综述 李 燕审校

( 中国医学科学院/中国协和医科大学药物研究所 , 北京 100050 )

摘要 : 细胞色素 P450( CYP450 ) 是参与各种外源物和内源物代谢的重要酶系 , 研究该酶与底物或抑制剂的相互作用对于阐明药物作用机制及疾病预防、治疗具有重要意义。CYP450 对药物代谢的选择性不仅与底物本身密切相关 , 还与酶活性位点血红蛋白中的特殊氨基酸残基排列分布对底物的特异性识别有关。在人 CYP450 的晶体结构未知的情况下 , 三维定量构效关系、药效团及同源分子模拟被认为是目前深入研究酶活性位点的有效工具。

关键词 : 细胞色素 P450 ; 三维定量构效关系 ; 同源分子模拟 ; 药效团

中图分类号 : R914.5 ; Q559+ .9 文献标识码 : A 文章编号 : 1001-0971( 2004 )06-0356-04

20 世纪 90 年代以来 , 开展了众多关于细胞色素 P450( CYP450 ) 亚型活性位点及其底物相关性的研究。而今 , 探讨应用理化参数来解释人 CYP450 不同亚型的功能差别又成为热点<sup>[ 1 ]</sup>。在人膜结合 CYP450 晶体结构尚未得知的前提下 , 三维定量构效关系( 3-D quantitative structure-activity relationships , 3D-QSAR )、药效团( pharmacophore ) 和同源分子模拟( homology molecular modeling ) 等研究手段就显得尤为重要<sup>[ 2 ]</sup>。目前 , 利用 3D-QSAR 可获得化合物作为 CYP450 底物及其抑制剂的必要条件 , 而化合物的药效团取决于其理化性质的三维空间分布、配体的功能基团及酶结合部位特异性参数(  $K_m$  ,  $K_i$  或  $IC_{50}$  ) 等。同源分子模拟可利用已知晶体结构的细菌 CYP102 和兔 CYP2C5 血红蛋白为模板来构建人 CYP450 的分子模型<sup>[ 3 ]</sup>。本文将对上述方法在研究 CYP450 中的进展进行综述。

### 1 基本概念

#### 1.1 三维定量构效关系

定量构效关系( QSAR ) 是研究系列化合物的活性与其结构、物理化学或拓扑性质的特征关系 , 通过统计学处理 , 以数学模型( 方程式 ) 或三维图形表达这种量变规律。3D-QSAR 则是以药物分子的三维结

构特征为基础处理药物分子三维空间中静电分布、立体性、氢键和疏水键等与生物活性之间的定量依存关系。广泛应用的 3D-QSAR 计算方法之一是比较分子场分析法( CoMFA ) , 其理论依据为药物分子与受体的相互作用是可逆的、非共价结合的弱作用力 , 如静电引力、氢键、疏水作用和范德华力等。系列化合物在与同一受体结合时 , 上述力场具有相似性。3D-QSAR 在酶的晶体结构还未知的情况下可以对酶的活性部位进行解释和考察。与传统的 QSAR 方法相比 , 3D-QSAR 考虑了生物活性分子的三维构象性质 , 即在 QSAR 中引入与生物活性分子三维结构信息有关的参数作为变元 , 因而能精确地反映生物活性分子与受体作用的真实情况 , 更深刻地揭示药物-受体的相互作用机制。

#### 1.2 药效团

药效团是指系列化合物产生药理作用时的最小结构单元 , 可反映分子结构的相似性 , 是认识和分析构效关系的重要概念。分子模型和计算机图形学的发展 , 使人们进一步认识到分子的相似性和多样性不仅仅是二维结构所致 , 更取决于空间性质的相似性和多样性 , 如分子在空间的形状、功能基在空间的分布等。所以 , 药效团又被定义为药物分子与受体产生药效作用时最基本的结构单元在空间的配置。

#### 1.3 同源分子模拟

同源分子模拟 , 又称为比较模拟法( comparative

modeling)或是知识基础模拟法(knowledge-base modeling),可快速模拟蛋白质的三级结构。该方法主要是利用现有的结构作为模板,应用计算机建立原子水平的分子模型来模拟分子结构及行为,进而模拟分子体系各种物理和化学性质。一般认为,目标蛋白质(target protein)序列和模板(template)之间的相似性越高,所模拟结构的正确性和可信度也越高。通过定点突变实验可验证同源分子模拟的结果。

## 2 三种方法在 CYP450 同工酶研究中的应用

### 2.1 CYP1A2

CYP1A2 是 CYP450 超家族中成员,可受多种外源性物质调控,如被某些选择性 5-HT 重摄取抑制剂和抗心率失常药物所抑制<sup>[4]</sup>。最早关于人类 CYP1A2 的 3D-QSAR 研究是利用 44 个喹诺酮类抗生素对咖啡因的三甲基化反应抑制百分率作为探针,运用 SYBYL 和 ALCHEMY 软件完成。应用 INSIGHT II 对 16 个天然黄酮类抑制剂对咖啡因的  $N_3$ -甲基化抑制的 QSAR 分析表明,影响此类化合物作用的主要因素是体积与表面积的比率。同时,羟基的数目与抑制强度成反比,而自由羟基的糖基化数目也会减弱抑制作用。此外,对 12 个杂环胺类化合物的 QSAR 分析表明,应用 COMBINE 和 GOLPE 软件可以比较配体-蛋白结合物和单独的蛋白结构。以上方法为深入了解氢键、疏水键或大体积基团提供了帮助<sup>[5]</sup>。

同源模拟研究显示,在底物咖啡因的  $N_3$ -甲基化反应中,利用定点突变可证实 CYP1A2 活性位点上氨基酸残基的重要性。底物通常被包围在三个苏氨酸(Thr)残基氢键所在位置,在此位置还存有底物与芳香氨基酸残基的  $\pi$ - $\pi$  叠加,其中苯丙氨酸(Phe)和色氨酸(Trp)两个芳香氨基酸残基都是表达人类 CYP1A2 时定点突变的靶位<sup>[6]</sup>。

### 2.2 CYP2B6

CYP2B6 的 3D-QSAR 研究多以药效团片段的方式来表述分子特征,如氢键供体/受体原子、疏水部分、起正/反作用的取代基团,最终结果以重要的活性片段在三维空间的位置表示。结果表明,底物的三个疏水基团和一个氢键受体是与活性位点结合所必需的<sup>[7]</sup>。三个疏水区域与一个氢键受体的距离分别为 0.53、0.31 和 0.46 nm,药效团对化合物  $K_m$  值的预测与实测结果具有较好的一致性( $r = 0.85$ )。此外,在底物与酶蛋白的结合中,疏水性和静电特征

也是与药效团密切相关的因素。3D-QSAR 分析方法还可利用球形分子表面的三维化学信息描述分子表面特征。正静电作用、分子表面特征、疏水性和提供氢键的能力被列为重要的参考因素。因此,一个分子的形状和静电特征被简化为单一的数字向量,最终的构效关系结果以线性方程来表示。两种方法对结构片段选择的相似性提示两种方法在某些程度上存在一致性。

通过对 CYP2B6 和 S-甲基苯妥因相互关系的研究,可观察活性部位的接触是如何催化底物  $N$ -去甲基化。底物与酶之间氢键和  $\pi$ - $\pi$  叠加的取向决定了底物  $N$ -去甲基化反应在血红蛋白中发生的相对位置。定点突变实验表明,互补氨基酸的多样性结合对底物与 CYP2B 超家族结合的重要性<sup>[6]</sup>。

### 2.3 CYP2C9

第一个 CYP2C9 的 QSAR 研究结果发表于 1996 年。研究对象包括以  $\alpha(S)$ -11( $R$ )-环香豆素为活性类似物刚性模板的 27 个化合物。研究假设芳香结合部位和空间位阻部位是沿着环香豆素  $\alpha(S)$  碳氢键轴线,而底物上两个与酶结合的阳离子部位与芳香氨基酸结合部位和催化部位附近的 I-螺旋都很重要。将测试集(testing set)化合物作为训练集(training set)时,药效团也大体保持一致。运用三个训练集建立三个催化部位模型的研究表明,氢键受体和氢键供体/受体分别为 0.34 和 0.57 nm,而疏水区域到氢键受体的距离为 0.3~0.58 nm<sup>[8]</sup>。上述结论与 CoMFA 模型有较好的一致性<sup>[9]</sup>。定点突变实验提示,110 位和 114 位的 Phe 残基与芳香结合区域有关,精氨酸(Arg<sup>105</sup>)与结合底物阳离子的阴离子结合部位有关。同源模拟结果表明,氢键和芳香氨基酸结合决定了已知部位氧化反应的取向,而酶蛋白的丝氨酸(Ser)残基与底物的选择性密切相关<sup>[6]</sup>。

### 2.4 CYP2D6

CYP2D6 是人 CYP450 超家族中具有显著多态性的同工酶。第一个 3D-QSAR 研究建立的 CYP2D6 底物模型包括一个位于共平面芳香环上的碱性氮原子,距氧化位点 0.5 nm 或 0.7 nm。1991 年,Islam 发展了这个模型,提出碱性氮原子与氧化部位距离为 0.5~0.7 nm。另一个小分子 QSAR 模型由 Koymans 于 1992 年建立。模型假定:蛋白内的一个羧酸酯基团的存在使底物分子内的碱性氮原子和氧化部位的距离有利于氧化反应,明确了蛋白中的 Arg 残基与底物碱性氮原子之间的氢键方向。此外,这个模型

还可设计新型选择性底物用于高通量筛选。

在 CYP2D6 同源模拟研究中发现,底物与酶 Arg 之间的离子键对结合很重要,而底物与酶之间的氢键及  $\pi$ - $\pi$  共轭的影响也是不容忽视的。定点突变证明了研究结果的可靠性<sup>[6]</sup>。

药效团和同源模拟相结合的工作也有所发展<sup>[10]</sup>。模型由一个包含两个药效团(氧原子位的脱烷基氧化作用部位,氮原子位的脱烷基作用部位)的化合物嵌入基于细菌 CYP450 晶体结构构建的蛋白所构成。此模型首次将药效团模拟(原子间的交叠和重复性的起始位点)与同源模拟(空间相互作用和可能参与结合的特异性氨基酸)相结合,并成功地预测类型众多的化合物代谢。由于抑制模型的总体标准与底物模型的标准很相似,因此可合并底物模型和抑制模型。

## 2.5 CYP2E1

已知 CYP2E1 参与多种化学毒物和致癌物代谢,如小分子溶剂和低分子量麻醉剂等。以往研究认为,底物的分子大小可限制其与活性部位的结合,而 3D-QSAR 研究则证明了静电效应(长距离识别)、空间效应(底物大小)和疏水效应(底物表面相互作用)的重要性。人 CYP2E1 与烷基苯类化合物相互作用的研究结果提示,活性部位拓扑结构的几何模型中活性位点开放于血红蛋白吡咯环 A 和 D 上方 1 nm 处<sup>[11]</sup>。大鼠体内 12 个挥发性含氯化合物研究表明,底物分子到达活性部位要经过一个长疏水通道。最近研究表明,乙醇、氟烷、异烟肼和吡唑的解离常数为  $0.011 \sim 167 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[12]</sup>,上述研究结果与以往所假设的长通道一致。

底物与酶  $\pi$ - $\pi$  叠加和氢键的联合作用可协助底物分子进入血红蛋白上方的氧化部位。虽然定点突变研究尚无相应的依据,但已有报道 Thr 残基及氢键对底物结合和催化反应速度是至关重要的<sup>[6]</sup>。

## 2.6 CYP3A4

1997 年 Smith 等利用以细菌 CYP102 结构作为模板的同源模拟研究详细地描述了 CYP3A4 活性位点的结构特征。根据研究辛醇和环酰胺所得的分配系数,假设 CYP3A4 底物和活性部位的结合与亲脂性有关。底物药效团包含两个氢键受体、一个氢键供体和一个疏水基团。将分子引入 CYP3A4 活性部位的同源模拟模板中发现,大多数底物或抑制剂通过氢键与酶天门冬酰胺(Asn<sup>74</sup>)残基结合。据此得出的药效团包括五个部分:分别为三个疏水基团、一

个距其 0.42 ~ 0.71 nm 的氢键受体及另一个距其 0.52 nm 的氢键。另一类根据奎宁羟化反应抑制强度  $IC_{50}$  值来构建的药效团模型由四个部分组成:包括三个氢键受体和一个距其中两个氢键受体 0.81 ~ 0.163 nm 的疏水基团。模型  $IC_{50}$  的预测值与实测值之间表现出良好的相关性( $r = 0.91$ )。将两个模型相结合可发现两个疏水基团为氢键受体所分隔,说明 CYP3A4 中存在类似氢键供体的区域或位点<sup>[13]</sup>。最近,研究人员利用一种遗传联合的最小二乘法(genetic algorithm-based partial least squares, GA-PLS)发展了传统的 CYP3A4/QSAR 模型。通过研究 53 个结构各异的化合物对 CYP3A4 代谢 7-苯氧基-4-三氟甲基-香豆素的抑制作用,发现了五个结构对于 QSAR 模型是很重要的,并且分子大小也对药物-CYP3A4 的相互作用产生影响<sup>[14]</sup>。

同源模拟结果显示,酶与底物之间氢键和  $\pi$ - $\pi$  叠加可决定底物的取向,使底物的 N-H 基团位于血红蛋白的氧化部位上方<sup>[6]</sup>。

## 3 结语

综上所述,多种 3D-QSAR 模型已经建立并应用于 CYP450 底物或抑制剂研究。3D-QSAR、药效团、同源分子模拟等方法在 CYP450 研究中的应用,为进一步探讨 CYP450 酶系作用机制(包括酶的催化活性中心、酶促反应的限速步骤、酶与底物的共价结构等)提供了更广阔的空间。这些方法已被应用于预测临床药物-药物相互作用,选择安全的给药剂量。该模型构建方法还可根据 CYP450 原型模板,建立应用于其他有关吸收、分布、代谢、排泄的模型。制药工业亦应用此类方法来预测有较好开发前景的化合物,筛选新型化合物的生物活性及寻找生物制药的新型催化剂<sup>[15]</sup>。

虽然 3D-QSAR、药效团、同源分子模拟等方法优点众多,但是不可避免地具有某些局限性。因为这些方法毕竟是根据有限的实验数据,应用一些数学/物理模型来模拟客观事实,很可能出现遗漏现象,并且不能处理生理相关性,所以还不能取代以实验现象为基础的分析方法。为了弥补缺陷,在预测结果的同时,相应的实验研究还是必不可少的。随着模拟技术的不断完善及多学科的综合运用,更多关于人 CYP450 的问题必将得到令人信服的解答<sup>[16]</sup>。

## 参考文献

[1] Lewis DF. Structural characteristic of human P450s involved

- in drug metabolism : QSARs and lipophilicity profiles[ J ]. *Toxicology* , 2000 , 144( 1 - 3 ) : 197 - 203 .
- [ 2 ] Cosme J , Johnson EF . Engineering microsomal cytochrome P450 2C5 to be a soluble , monomeric enzyme . Mutations that alter aggregation phospholipid dependence of catalysis , and membrane binding[ J ]. *J Biol Chem* , 2000 , 275( 4 ) : 2545 - 2553 .
- [ 3 ] Lewis DF . Homology modeling of human CYP2 family enzymes based on the CYP2C5 crystal structure[ J ]. *Xenobiotica* , 2002 , 32( 4 ) 305 - 323 .
- [ 4 ] Kobayashi K , Nakajima M , Chiba K , et al . Inhibitory effects of antiarrhythmic drugs on phenacetin *O*-deethylation catalysed by human CYP1A2[ J ]. *Br J Clin Pharmacol* , 1998 , 45( 4 ) 361 - 368 .
- [ 5 ] Lozano JJ , Pastor M , Cruciani G , et al . 3D-QSAR methods on the basis of ligand-receptor complexes . Application of COMBINE and GRID/GOLPE methodologies to a series of CYP1A2 ligands[ J ]. *J Comput Aided Mol Des* , 2000 , 14( 4 ) 341 - 353 .
- [ 6 ] Lewis DF . Molecular modeling of human cytochrome P-450-substrate interactions[ J ]. *Drug Metab Rev* , 2002 , 34( 1/2 ) 55 - 67 .
- [ 7 ] Ekins S , Bravi G . Three-dimensional- quantitative structure activity relationship analysis of substrates for CYP2B6[ J ]. *J Pharmacol Exp Ther* , 1999 , 288( 1 ) 21 - 29 .
- [ 8 ] Ekins S , Bravi G , Binkely S , et al . Three-and four-dimensional-quantitative structure activity relationship ( 3D/4D QSAR ) analyses of CYP2C9 inhibitors[ J ]. *Drug Metab Dispos* , 2000 , 28( 8 ) 994 - 1002 .
- [ 9 ] Zamora I , Afzelius L , Cruciani G . Predicting drug metabolism : a site of metabolism prediction tool applied to the cytochrome P450 2C9[ J ]. *J Med Chem* , 2003 , 46( 12 ) : 2313 - 2314 .
- [ 10 ] Lewis DF , Dickins M , Lake BG , et al . A molecular model of CYP2D6 constructed by homology with the CYP2C5 crystallographic template : investigation of enzyme-substrate interactions.[ J ] *Drug Metabol Drug Interact* , 2003 , 19( 3 ) : 189 - 210 .
- [ 11 ] Lewis DF , Sams C , Loizou GD . A quantitative structure-activity relationship analysis on a series of alkyl benzenes metabolized by human cytochrome P450 2E1[ J ]. *J Biochem Mol Toxicol* , 2003 , 17( 1 ) 47 - 52 .
- [ 12 ] Smith SV , Koley AP , Dai R , et al . Conformational modulation of human cytochrome P450 2E1 by ethanol and other substrates : a CO flash photolysis study[ J ]. *Biochemistry* , 2000 , 39( 19 ) 5731 - 5737 .
- [ 13 ] Ekins S , Bravi G , Wikel JH , et al . Three-dimensional-quantitative structure activity relationship analysis of cytochrome P-450 3A4 substrates[ J ]. *J Pharmacol Exp Ther* , 1999 , 291( 1 ) 424 - 443 .
- [ 14 ] Wanchana S , Yamashita F , Hashida M . QSAR analysis of the inhibition of recombinant CYP 3A4 activity by structurally diverse compounds using a genetic algorithm-combined partial least squares method[ J ]. *Pharm Res* , 2003 , 20( 9 ) : 1401 - 1408 .
- [ 15 ] Ekins S , Berbaum J , Harrison RK . Generation and validation of rapid computational filters for CYP2D6 and CYP3A4 [ J ]. *Drug Metab Dispos* , 2003 , 31( 9 ) : 1077 - 1080 .
- [ 16 ] Hansch C , Mekapati SB , Kurup A . QSAR of cytochrome P450 [ J ]. *Drug Metab Rev* , 2004 , 36( 1 ) : 105 - 156 .

## 靶向缺氧-腺苷 A<sub>2A</sub>受体介导的组织保护机制

黄世杰编译

(军事医学科学院毒物药物研究所,北京 100850)

摘要 : 生理学的假设提示炎症组织的过度损伤源于局部缺氧和细胞外腺苷的累积。腺苷 A<sub>2A</sub>受体和缺氧诱导因子,以延迟、负反馈方式,在降低炎症源过程中起重要作用,因而防止器官的过度损伤。靶向缺氧 A<sub>2A</sub>受体信号通路的各个阶段,提供了具有吸引力的调控炎症的策略。

关键词 : 缺氧 ; 腺苷 ; 炎症 ; 组织保护

中图分类号 : R971<sup>+</sup>.1 文献标识码 : A 文章编号 : 1001-0971(2004)06-0359-03

本文试图确定细胞外腺苷是否能作为内源性,生理性体内免疫反应的调节剂,确定缺氧诱导因子

1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )是否对腺苷受体介导的抑制起作用。遗传学手段和急性炎症模型结合的研究,有助于提供细胞外腺苷作为“信号”和 A<sub>2A</sub>腺苷受体(A<sub>2A</sub>R)作为