ET_B 受体拮抗剂三维药效团的构建*

□杨　珍　张燕玲　乔延江**

（北京中医药大学中药信息工程研究中心/北京市"中药基础与新药研究重点实验室"　北京　100102）

摘　要：本文以对在 CHO 细胞中表达的人类 ET_B 受体有拮抗作用的 28 个化合物为训练集，利用 Catalyst 计算所得 ET_B 受体拮抗剂的最优药效团模型由两个氢键受体、一个芳环基团和一个疏水基团组成。最优模型的 Fixed cost、Total cost 和△Cost 值分别为 114.792、136.967 和 38.081。训练集化合物活性的实测值与预测值相关系数为 0.870，偏差值为 1.198，有效活性命中率 A%和综合评价指数 CAI 值分别为 84%和 2.389。该模型对测试集化合物也有较好的预测能力，所命中测试集化合物的实际活性值和预测活性值的线性相关系数为 0.736。研究结果表明所构建的药效团模型具有一定的可靠性，可以用来进行数据库的搜索，寻找新型的 ETB 受体拮抗剂。

关键词：心血管疾病　ET_B 拮抗剂　三维药效团

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2012.04.007

随着世界人口老龄化程度的加剧，心脑血管疾病已逐渐成为目前倍受社会关注的问题之一[1]。内皮素（Endotholin, ET）是目前发现的体内最强的缩血管物质之一，广泛存在于全身多个系统中，在调节机体多个系统的正常生理功能方面起着重要作用，通过多种途径参与了心脑血管疾病的发生和发展过程，与多种心脑血管疾病，如高血压、心肌梗死、脑梗死等密切相关。因此内皮素受体是临床治疗心脑血管疾病的一个重要"靶"。

内皮素受体分为 ET_A、ET_B 和 ET_C 3 种，其中 ET_B 受体在血管中分布较为普遍，如大鼠冠状动脉、静脉的血管内皮细胞和血管平滑肌细胞，以及毛细血管的血管内皮细胞等。ET_B 的分布特点提示它不仅参与调节动脉血管的收缩[2]，还参与调节心肌细胞收缩和舒张[3]。ET 受体拮抗剂已被用于治疗心力衰竭和肺动脉高压等疾病，主要是选择性或非选择性的 ETA 受体拮抗剂，但是最近一些有关 ET 受体拮抗剂治疗心力衰竭的临床研究结果令人失望，同时也唤起了对 ETB 受体功能认识的渴望[4]。因此，对 ET_B 受体拮抗剂的研究具有一定的意义。

通过研究一系列活性化合物的构效关系，并结合构象分析总结出对活性起重要作用的原子基团及其空间关系，即为药效团模型[5]。药效团模型法是从活性化合物结构出发，最大限度利用已有分子的三维结构信息进行药物分子发现的方法[6,7]。本课题组尝试将药效团的研究引入中药及天然产物研发

收稿日期：2012-07-09

修回日期：2012-08-13

*　科学技术部国家支撑计划项目（2008BAI51B01）：中药有效成分群辨识技术研究，负责人：张宏桂；国家自然基金项目（81173522）：点线面三维模拟活血化瘀中药防治冠心病的作用机制研究，负责人：乔延江；北京中医药大学自主课题（2011-CXTD-11）：中药信息工程，负责人：乔延江；北京中医药大学自主课题（2011-JDJS-12）：活血化瘀中药治疗冠心病的作用机制研究，负责人：张燕玲。

**　通讯作者：乔延江，本刊编委，教授，博士生导师，北京中医药大学副校长，主要研究方向：中药信息工程，中药质量控制，Tel：010-84738620，E-mail:yjqiao@263.net。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

领域，已经建立了从三维药效团的确定、建模，以及三维构象搜索的较详尽的研究系统[8,9]。

一、计算方法

ETB 受体拮抗剂药效团的研究采用了 Accelrys 公司的 Catalyst 软件包进行药效团模型研究[10]，使用系统 Catalyst4.11，所有运算均在 IBM Z Pro 图形工作站上完成。所用主要模块包括 View Compound Workbench、View Hypothesis Workbench、Hypothesis Generation Workbench。

1. 训练集、测试集化合物的选择

本实验选择来源于 The Binding Database*中作用于 CHO 细胞中表达的人类 ET_B 受体（Inhibition of human endothelin B (ET_B) receptor expressed in CHO cells）药理模型的 44 个化合物作为训练集（28 个化合物）和测试集（16 个化合物）。训练集和测试集化合物的结构及活性分别见图 1 和图 2。

2. 构象分析

分子的三维结构在 Catalyst 中的 View compound 模块中完成。考虑到分子与受体作用时构象的柔性问题，同时为了尽可能覆盖每个分子完整的活性作用区域，通过“Best quality conformer generation”模块，对该组化合物进行构象分析，能量间隔为 20 $Kcal \cdot mol^{-1}$，计算所有化合物的多个构象，最大构象数设定为 250 个。

3. 药效团模型的计算及评价

（1）药效团模型的计算。

利用 View Hypothesis Workbench 对训练集化合物搜寻药效特征元素。通过搜寻确定该组化合物均含有氢键受体（Hydrogen-bond acceptor, A），疏水基团（Hydrophobic, H），芳环基团（Ring aromatic, R）等药效特征。根据上述分析，选择氢键受体（A）、疏水基团（H）和芳环基团（R），在 Hypothesis Generation Workbench 中生成药效团模型。考虑到本文选取的化合物分子的活性数据来源于不同作者的多组实验，同时活性检测一般存在较大的误差，因此将活性数据的不确定度（Activity uncertainty）设为 3.0，其它参数采用默认值。计算得出了 10 个得分较高的药效团模型及相应的统计评价得分，对于得分最高的药效团模型采用修改其各药效特征的空间允许误差值（Tolerance, T）为默认值的 0.9 倍、0.8 倍、0.7 倍，进行优化，发现当修改为 0.9 倍时结果较好。其中最佳药效团模型的计算数据见表 1。

（2）药效团模型的评价。

本文采用费用函数△Cost 值、Correlation 值和搜索数据库命中率的方法进行评价。图 3 是药效团数据库搜索的各指标示意图，其中 D 代表数据库中全部化合物的数目，A 表示数据库中活性化合物的数目，Ha 表示药效团模型搜索数据库 A 命中得到活性化合物的数目，Ht 表示药效团搜索数据库 D 命中所有化合物的数目。利用药效团对三维数据库进行搜索，通过一系列命中指数评价药效团的优劣。主要包括有效活性命中率 A%（反映了药效团识别活性化合物的能力，A%值越高，模型识别活性化合物的能力越强），辨识有效性指数 N（反映了药效团模型区分活性化合物和非活性化合物的能力，N 值越大，说明模型区分活性化合物和非活性化合物的能力越强）。为了综合评价 N 和 A%这两个指标，本实验室提出了综合评价指数（Comprehensive Appraisal Index, CAI）。

4. 数据库的搜索

所构建的药效团可以作为三维的提问结构，进行数据库搜索，数据库搜索有两个目的：一是查看所构建的药效团能否命中已知的有 ET_B 拮抗活性的化合物，来评价所构建的药效团；二是可以利用数据库的搜索来寻找新型有 ET_B 拮抗活性的化合物。

为了评价所构建的药效团，本文收集 MDDR（MDL Drug Data Report: Version 2007.2）中具有 ETB 拮抗活性的化合物，并利用这些化合物构建 MDDR-ET_B 数据库。用所构建的药效团搜索 MDDR（即数据库 D）和 MDDR-ET_B（即活性化合物数据库 A）的对药效团进行评价。本文所有数据库的搜索模式均采用“the Best Flexible Search”。

二、结果与讨论

用所得到的 10 个药效团去搜索测试集，对所命中的测试集化合物进行药效特征匹配并预测化合物的活性值，计算所命中化合物实际活性值与预测活性值的线性相关系数（Correltest）。

用训练集、测试集化合物的实际活性值和预测

* http://www.bindingdb.org/bind/index. jsp.

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

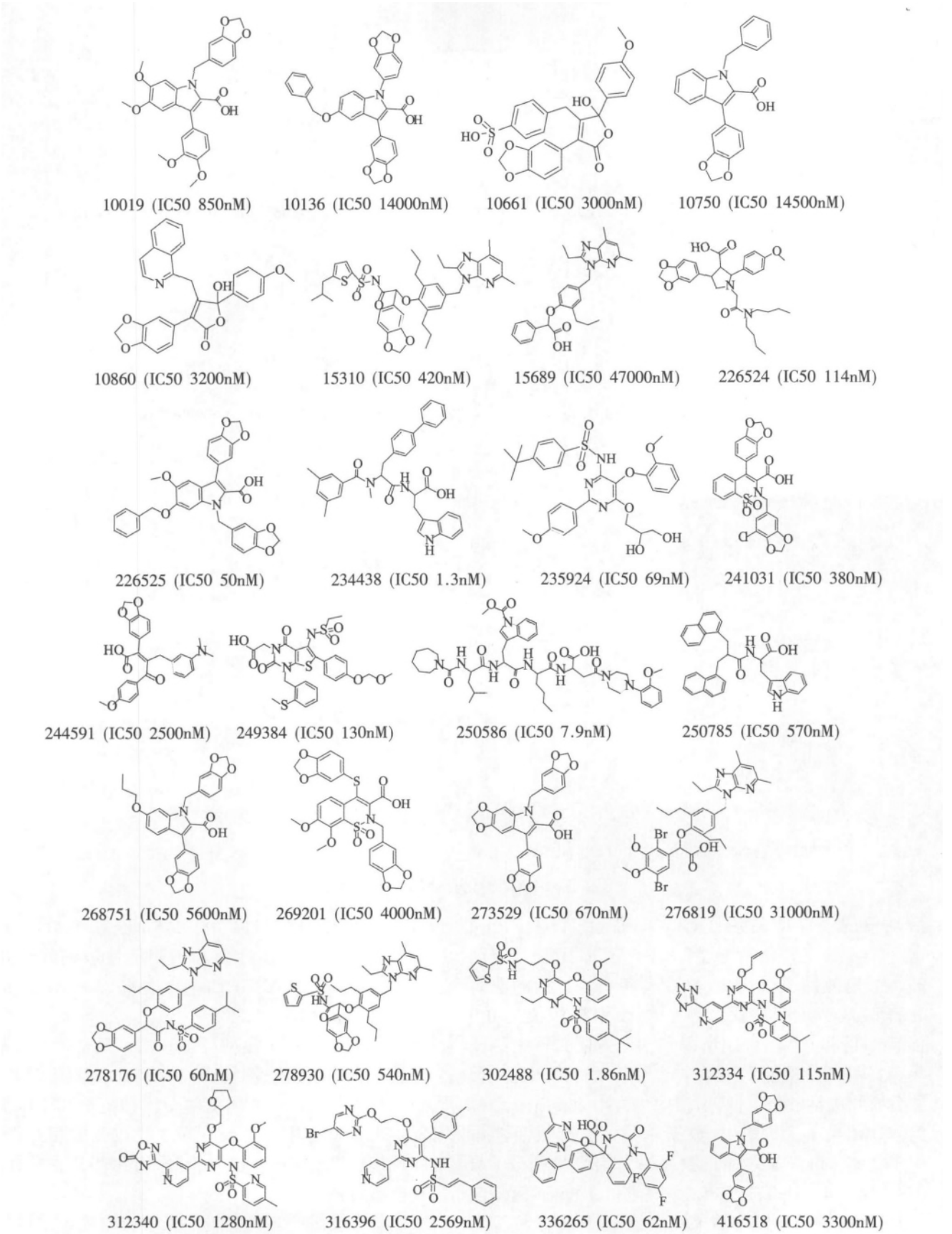

图 1 训练集化合物的结构及活性

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

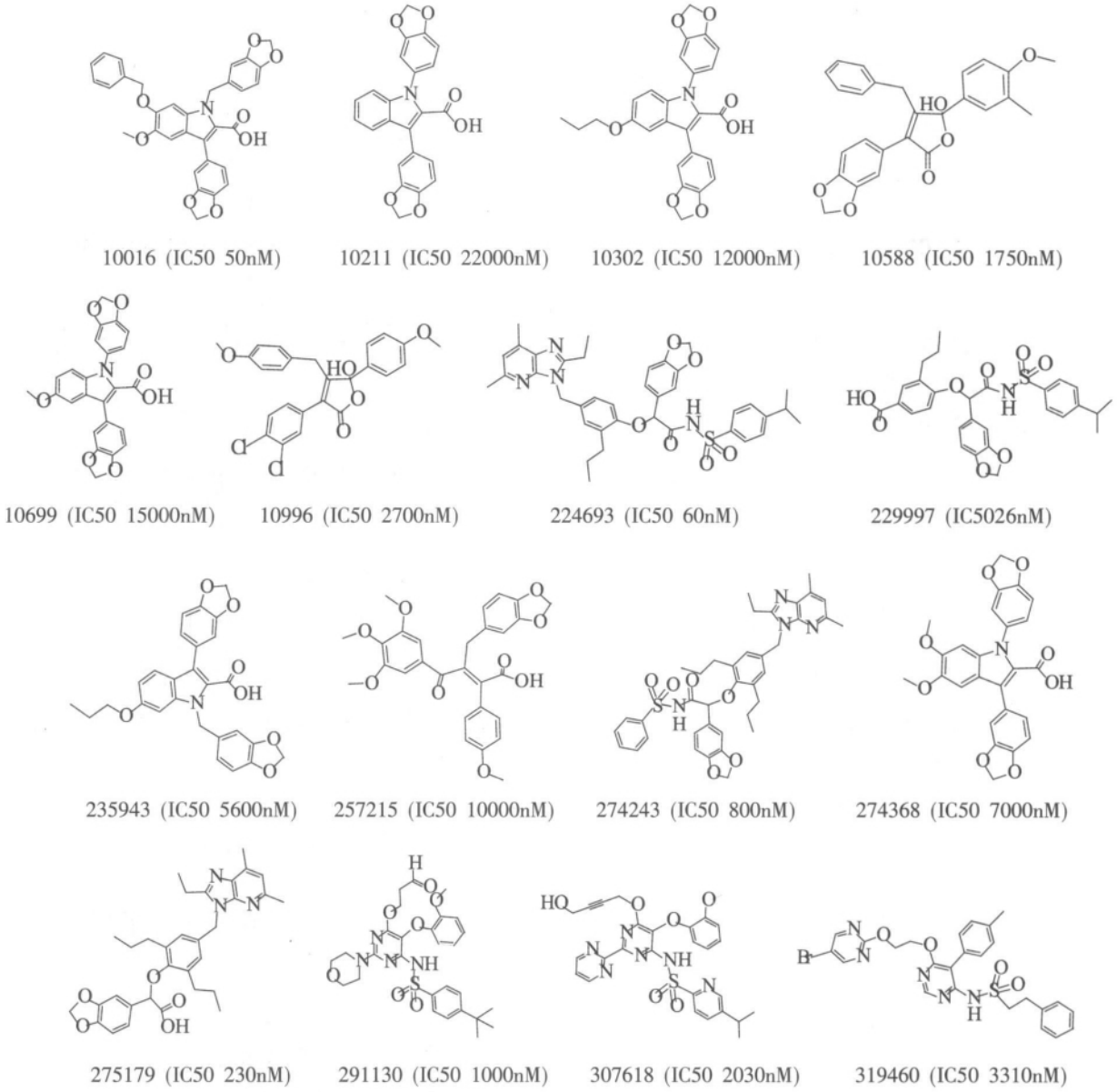

图 2 测试集化合物的结构及活性

活性值的线性相关系数 Correl、$Correl_{test}$ 以及 △Cost 这 3 个参数来评价所产生的 10 个药效团，对较优的 1 号药效团进行优化，修改其各药效特征的空间允许误差 Tolerance 值，分别修改为默认值的 0.9 倍、0.8 倍和 0.7 倍。用所得到的药效团去搜索测试集，对所命中的测试集化合物进行药效特征匹配并预测化合物的活性值，计算所命中化合物的 $Correl_{test}$。搜索 MDDR-ET_B 和 MDDR 数据库并计算有效活性命中率 A%、辨识有效性指数 N 和综合评价指数 CAI（其中 A=147，D=177953）。发现将 Tolerance 值修改为默认值的 0.9 倍时，结果达到最优。所得较优模型的 Total cost 值、Fixed cost 值、Null cost 值和 △Cost 值分别为 136.967、114.792、175.048 和 38.081。训练集化合物的实际活性值和预测活性值的线性相关系数（Correl）为 0.870，$Correl_{test}$、A%、N、CAI 分别为 0.736、84%、2.832、2.389。

从三维药效团模型可以看出，最佳模型含有 4 个特征：两个氢键受体（A）、一个疏水基团（H）和一个芳环基团（R）。表明 ET_B 受体拮抗剂与 ET_B 受体发生识别过程中，主要存在 3 类较强的相互作用，即氢键相互作用、疏水相互作用和环芳香性作用。其模型见图 4。

刘克良等[11]在研究线性三肽类内皮素受体拮抗剂构效关系时发现其具有以下特点：N 端为疏水性

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 化合物与药效团的匹配性

Name	Fit Cnf/Enan	Mapping	Est	Act	Error	Unc
234438	9.92 226	+ [16 27 43 1]	0.91	1.3	−1.4	3
302488	9.21 43	− [37 7 35 36]	4.6	1.9	+2.5	3
250586	8.69 177	− [22 31 65 1]	15	7.9	+1.9	3
226525	6.90 55	+ [14 23 * 20]	950	50	+19	3
278176	7.55 53	− [20 23 44 *]	210	60	+3.5	3
336265	7.26 230	− [20 27 * 18]	410	62	+6.7	3
235924	7.87 40	− [21 17 40 9]	100	69	+1.5	3
226524	7.20 230	+ [13 20 * 11]	470	110	+4.2	3
312334	7.15 37	+ [* 7 39 34]	530	120	+4.6	3
249384	7.32 79	− [40 16 35 *]	360	130	+2.8	3
241031	7.04 56	− [20 24 * 22]	690	380	+1.8	3
15310	7.43 59	+ [34 25 35 *]	280	420	−1.5	3
278930	7.43 1	− [32 23 42 *]	280	540	−1.9	3
250785	7.00 126	+ [* 16 41 1]	750	570	+1.3	3
273529	6.52 56	+ [30 18 * 15]	2300	670	+3.4	3
10019	6.88 18	+ [24 29 * 14]	980	850	+1.2	3
312340	7.37 3	− [45 18 22 *]	320	1300	−4	3
244591	7.22 65	+ [8 25 * 7]	460	2500	−5.5	3
316396	7.35 113	− [31 18 26 30]	340	2600	−7.6	3
10661	6.85 50	+ [21 17 * 11]	1100	3000	−2.8	3
10860	6.70 36	+ [17 20 33 *]	1500	3200	−2.1	3
416518	5.84 55	+ [26 14 * 1]	11000	3300	+3.3	3
269201	6.66 53	− [18 37 * 12]	1600	4000	−2.4	3
268751	6.69 53	+ [25 32 * 13]	1500	5600	−3.6	3
10136	5.89 242	− [30 18 * 1]	9800	14000	−1.4	3
10750	5.84 55	+ [18 12 * 1]	11000	15000	−1.3	3
276819	6.65 164	− [3 26 38 *]	1700	31000	−18	3
15689	5.82 18	+ [* 21 31 2]	11000	47000	−4.1	3

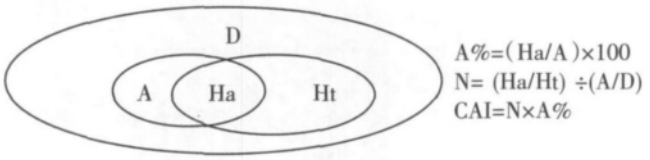

图 3 药效团数据库搜索的各指标示意图

注:CAI 表示 N 和 A%的乘积,CAI 值越高说明所构建的药效团模型越好。

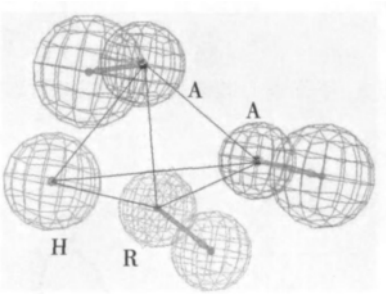

图 4 较优药效团模型

基团;C 端氨基酸最好是芳香性氨基酸。Jens L ttig 等[12]在研究 ET_A 与 ET_B 的结构时,发现 ET-1 序列上的 N 端可以降低配体分子与 ET_A 的亲和,提高 ET_B 的选择性。此研究还发现,ET_A 与 ET_B 显著不同之处是 ET_A 具有一个五氨基酸 (Asp149-His150-Asn151-Asp152-Phe153) 组成的亲水区,而 ET_B 则在

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

相应位点(Pro87-Pro88-Pro89-Cys90-Gln91-Gly92-Pro93-Ile94-Glu95-Ile96-Lys97-Glu98) 为一疏水区。有学者在研究磺酰胺类内皮素受体拮抗剂时得出内皮素受体 ET-1 识别这类化合物应有特定的疏水区和氢键结合点[13]。另有报道内皮素受体结构中由疏水氨基酸组成的六肽尾部对维持 ET 的生物活性是十分重要的[14]。这些研究较好的说明了药效团中应含有氢键受体、疏水基团和芳环基团的特征,与本研究所构建的药效团模型一致,也进一步说明了所构建的药效团模型具有一定的可靠性。

用较优的药效团模型去搜索中药化学成分数据库 TCMD (Traditional Chinese Medicine Database: 2005),通过"the Best Flexible Search"模式搜索得到具有潜在的 ET_B 拮抗作用的化合物。其中命中化合物在 TCMD 数据库所收录的活性中有抑制血小板聚集、扩张血管和抗高血压作用的共 66 个,如命中的丹酚酸 A 在 TCMD 数据库所收录的活性中有抑制血小板聚集的作用;甲基莲心碱在 TCMD 数据库所收录的活性中有抗心律失常、抗高血压、抑制 ET-1 引起的 Ca^{2+}浓度增加、抑制血小板聚集等作用。甲基莲心碱、丹酚酸 A 与较优药效团模型的匹配情况如图 5、图 6 所示,其中 TCMD (2005) 记载甲基莲心碱有 ET-1 拮抗作用,推测该化合物很有可能具有 ET_B 拮抗活性。

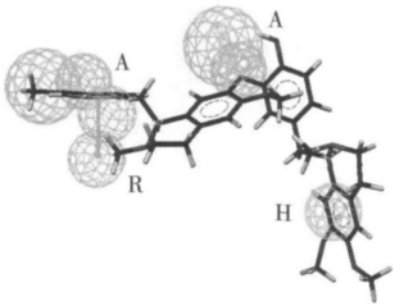

图 5 甲基莲心碱与较优药效团匹配图

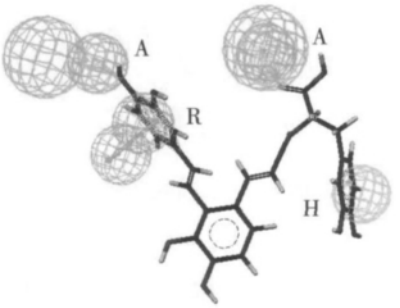

图 6 丹酚酸 A 与较优药效团匹配图

三、结 论

从已知的 ET_B 受体拮抗剂中选择活性较高的化合物作为训练集,利用 Accelrys 公司的 Catalyst 软件包进行计算,构建出较优的 ETB 受体拮抗剂药效团模型,并利用所构建出的较优药效团模型进行数据库的搜索,找到了一些具有潜在 ET_B 拮抗活性的化合物。

药效团的有效性需要通过药理实验进行验证,以便进一步修正药效团模型,为选择新的高活性化合物提供理论依据。对数据库搜索所命中化合物的活性,采用钙流实验的方法进行验证,该项工作正在进行中。

参考文献

1 Ben C, ChristineH. Antithrombotic drugmarket. *Natrue Reviews Drug Discovery*, 2003, 2:11~12.

2 Wendel-Wellner M, Noll T, K nig P, *et al*. Cellular localization of the endothelin receptor subtypes ET (A) and ET (B) in the rat heart and their differential expression in coronary arteries, veins, and capillaries. *Histochem Cell Biol*, 2002, 118(5):361~369.

3 Nilsson D, Wackenfors A, Gustafsson L, *et al*. Endothelin receptor-mediated vasodilatation: Effects of organ culture. *Eur J Pharmacol*, 2008, 579(1/3):233~240.

4 韩宝石, 盖鲁粤. 心血管系统内皮素 B 型受体研究进展. 医学综述, 2008, 14(12):1799~1801.

5 徐筱杰, 侯延军, 乔学斌, 等. 计算机辅助药物分子设计. 北京:化学工业出版社, 2004:309.

6 郭宗儒. 药物分子设计. 北京:科学出版社, 2005:372~373.

7 Osman, FG. Pharmacophore perception, development and use in drug design. *California: International University Line*, 2000:8~9.

8 张燕玲, 王耘, 乔延江. 中药与天然产物研究中药效团的构建与应用. 世界科学技术-中医药现代化, 2004, 6(4):33~38.

9 张燕玲. 基于三维药效团的活血化瘀中药虚拟筛选方法学研究. 北京中医药大学博士学位论文, 2006:1~21.

10 Yan H, Jiang FC. Pharmacophroe Model Construction of γ-secretase Inhibitor. *Acta Phys Chim Sin*, 2006, 22(3):359.

11 杨菁. 内皮素受体拮抗剂的设计与合成. 军事医学科学院毒物药物研究所博士学位论文, 2008:9.

12 Jens L ttig, Alexander Oksche, Michael Beyermann, *et al*. Structural determinats for selective recognition of peptide ligands for endothelin receptor subtypes ETA and ETB. *Journal of Peptide Science*, 2009, 15:479~491.

13 郭峰, 吉民, 华维一. 内皮素及其受体拮抗剂的研究进展. 中国药物与临床, 2003, 3(4):281~289.

14 李钢. 磺酰胺嘧啶类内皮素受体拮抗剂的构效/构动关系及分子设计. 四川大学博士学位论文, 2005:1~8.

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Pharmacophore Model Generation of ET_B Inhibitors

Yang Zhen, Zhang Yanling, Qiao Yanjiang

(Research Center of Traditional Chinese Medicine Information Engineering/Beijing Key Laboratory of Chinese Pharmaceuticals and drug Innovation, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract: A three-dimensional pharmacophore model of ET_B inhibitors was generated by Catalyst based on 28 ETB inhibitors of human endothelin B (ET_B) receptor expressed in CHO cells. The fitting hypothesis, including two hydrogen-bind acceptors, one ring aromatic and one hydrophobic, had a correlation of 0.870, a root mean square (RMS) deviation of 1.198, a Fixed cost of 114.792, a Total cost of 136.967 and a △Cost of 38.081. The values of effectively active hit A% and comprehensive evaluation index CAI are 84% and 2.389, respectively. The model has been further validated by a test set which shows high correlation of 0.736. The results showed that the pharmacophore is reliable which can be used to screen database and find novel ET_B inhibitors.

Keywords: Cardiovascular disease, ET_B inhibitors, three-dimensional pharmacophore model

（责任编辑:李沙沙　张志华,责任译审:王　晶）

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net