



论文

二甲基精氨酸二甲胺水解酶-1 的理论研究

孙馨^①, 孙苗^{①*}, 张辉^①, 张桂玲^①, 刘靖尧^②^① 哈尔滨理工大学化学与环境工程学院, 哈尔滨 150080^② 理论化学计算国家重点实验室; 吉林大学理论化学研究所, 长春 130023

*通讯作者, E-mail: miaosun@hrbust.edu.cn

收稿日期: 2009-12-14; 接受日期: 2010-03-08

摘要 运用分子对接和分子动力学方法研究二甲基精氨酸二甲胺水解酶-1(DDAH-1)与其抑制剂亚胺基烯丁基-L-鸟氨酸(L-VNIO)和亚胺基丙基-L-鸟氨酸(Me-L-NIO)的相互作用和结合模式, 并根据实验得到的结论设计了亚胺基苯乙基-L-鸟氨酸(Ph-L-NIO)抑制剂. 结果表明: L-VNIO 比 Me-L-NIO 对 DDAH-1 的抑制效果更强, 这个结果与实验测得 L-VNIO 和 Me-L-NIO 对 DDAH-1 的半抑制浓度 IC₅₀ 值大小一致. Phe75、Asp78、His172、Ser175 和 Asp268 这五个氨基酸残基在三种抑制剂形成的复合物中起到非常重要的作用, 从计算结果推断在这三个抑制剂中我们设计得到的 Ph-L-NIO 对 DDAH-1 的抑制效果最好.

关键词分子对接
分子动力学
DDAH-1
抑制剂

1 引言

在神经传导和调节血管张力等生理学过程中, 一氧化氮(NO)是一种重要的效应分子^[1]. 然而, 游离的 NO 具有高毒性、高自由扩散性和高化学反应活性, 体内如果存在过多的 NO 将会损伤细胞, 所以我们应该严格地控制生成 NO 的一氧化氮合酶(NOS)的活性. 在血液和尿液中 NO 的量增多, 将导致类似于脓毒性休克、偏头痛、炎症和神经衰弱紊乱等疾病^[2, 3]. 如今已经证实 NOS 可被甲基化的精氨酸衍生物一甲基胺-L-精氨酸(MMA)和非对称二甲基胺-L-精氨酸(ADMA)抑制^[4, 5]. 二甲基精氨酸二甲胺水解酶(DDAH, EC 3.5.3.18)在体内可以通过水解代谢游离的内生的精氨酸衍生物 MMA 和 ADMA, 达到调解 NOS 活性的目的^[6].

DDAH 家族存在 DDAH-1 和 DDAH-2 两种亚型, 这两种亚型在体内分布存在差异, 其中 DDAH-1 多存在于以神经型 NOS(nNOS)表达为主的组织如大脑

和肾脏等, 而 DDAH-2 则多存在于以内皮型 NOS(eNOS)表达为主的组织如心脏、血管和肾脏等^[7]. Frey 等^[8]在 2006 年从牛脑中分离纯化出哺乳动物的 DDAH-1 晶体结构. 在此之前, DDAH 的晶体结构都是从细菌中分离和纯化出来的. 目前实验上虽然测定出哺乳动物的 DDAH-1 的晶体结构, 但是关于它和配体形成的复合物的理论研究还很少. 最近, Kotthaus 等^[9]通过实验测得亚胺基烷烃(烯烃)基-L-鸟氨酸衍生物中亚胺基烯丁基-L-鸟氨酸(L-VNIO)对人类 DDAH-1 抑制效果最好, 亚胺基丙基-L-鸟氨酸(Me-L-NIO)最差. 本文利用分子对接和分子动力学方法^[10], 考察 DDAH-1 与 L-VNIO 和 Me-L-NIO 的相互作用和结合模式. 结果表明 L-VNIO 比 Me-L-NIO 与 DDAH-1 结合能力强, 得到了与实验中测得 DDAH-1 抑制剂的 IC₅₀ 值大小一致的结果. 在计算结果的基础上, 我们设计了一种新的亚胺基苯乙基-L-鸟氨酸(Ph-L-NIO)抑制剂, 经过研究发现它与 DDAH-1 的结合能力更强, 希望这能为设计 DDAH-1

的新型抑制剂提供参考.

2 理论方法

本文所有的模拟工作都是在 SGI O3800 工作站上完成的, 应用的软件为 Accelry 公司的 Insight II 软件包^[11]. DDAH-1 三维结构由 Lid 区域构象的开与闭分为两种晶体形式, 本文采用的是 Lid 区域构象打开的晶体形式(PDB code: 2CI4). 所有模拟都是在 CVFF 力场^[12](Consistent-Valence ForceField)下进行.

2.1 模型的构建与优化

用 Discover-3 程序对 DDAH-1 三维结构进行优化. 初始结构的优化加入 10 Å TIP3P 球形水分子, 用最陡下降法和共轭梯度法对其优化 5000 步, 优化至能量梯度小于 $4.18 \times 10^{-4} \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$, 对优化后的结构又进行了 1 ns 的常温(310 K)分子动力学模拟, 每隔 1 ps 收集一个构象, 共收集 1000 个构象, 选定能量最低的构象为最终的优势构象见图 1. 根据实验结果和计算结果, 我们发现 L-VNIO 的抑制效果比 Me-L-NIO 强, 经分析认为可能是由于 L-VNIO 中乙烯基比 Me-L-NIO 中甲基的电子离域性强, 因此我们在原有抑制剂基础上设计了一种具有苯环的抑制剂 Ph-L-NIO. 用 Builder 程序设计配体 L-VNIO、Me-L-NIO 和 Ph-L-NIO, 并用 Gaussian03^[13]程序 B3LYP/6-31G(d, p)水平对所有配体初始几何结构(见



图 1 DDAH-1 的优势构象. 圆柱形代表 α -螺旋, 条形代表 β -折叠, 绳状代表 β -转角和无规则卷曲. 可以从图中得知优化后的 DDAH-1 的三维结构具有 10 个 α -螺旋和 11 个 β -折叠

图 2)进行了结构的优化.

2.2 分子对接和动力学模拟

从 Frey 的报道^[8]得知 DDAH-1 的活性口袋主要由以下氨基酸残基构成: Asp72、Phe75、Asp78、Arg97、Arg144、His172、Asp268. 这里将不需再使用任何理论方法进行搜索以便寻找蛋白质的活性位点. 分子对接采用 Affinity 程序, 属于柔性对接, 分子间相互作用能包括静电作用能(E_{ele})和范德华作用能(E_{vdw}). 为了考虑体系柔性对结合模式的影响, 通过动力学模拟对结构进行初步修正, 采用 Discover-3 程序进行动力学模拟. 初始结构的优化将溶剂环境设置为 TIP3P 水模型, 在体系中以配体为中心加入半径为 10 Å 的球形水分子环境, 用最陡下降法和共轭梯度法对三种复合物优化 5000 步. 配体为 L-VNIO 的复合物进行 4 ns 的常温(310 K)分子动力学模拟, 每隔 4 ps 收集一个构象, 共收集 1000 个构象, 配体为 Me-L-NIO 和 Ph-L-NIO 的复合物进行了 1 ns 的常温(310 K)分子动力学模拟, 每隔 1 ps 收集一个构象, 共收集 1000 个构象.

3 结果与讨论

3.1 构象分析

通过复合物动力学模拟过程得到的所有构象的

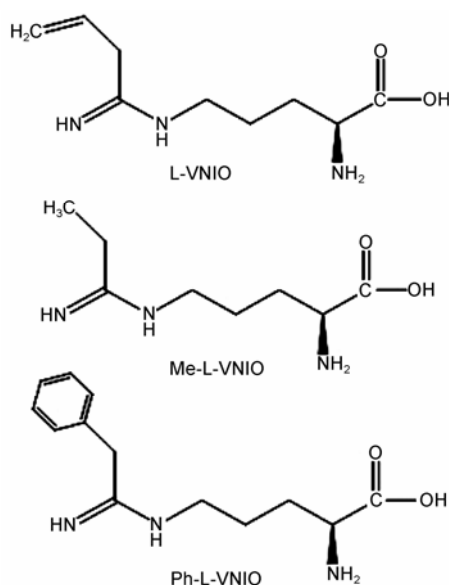


图 2 配体 L-VNIO、Me-L-VNIO 和 Ph-L-VNIO 初始几何结构

所有原子相对其初始构象的均方根偏差 RMSD(见图3)来衡量三种复合物初始构象在动力学模拟过程中保持的程度. 图3显示在 800 ps 后三种复合物所有原子 RMSD 在 2.8 Å 附近波动, 以后的时间内变化不明显, 可以看出体系在动力学模拟过程中已达到稳定, 选取其中一个稳定的构象作为结合模式分析的对象.

3.2 结合模式及相互作用分析

配体与受体能否结合以及结合强度取决于自由能变化^[14]:

$$\Delta G_{\text{binding}} = -RT \ln K_i$$

其中 K_i 是配体对受体的结合常数. 而结合自由能又可表示为:

$$\Delta G_{\text{binding}} = \Delta H_{\text{binding}} - T\Delta S_{\text{binding}}$$

大部分的对接方法都忽略了全部的熵效应, 而

在焓效应中也只考虑配体与受体相互作用能. 相互作用能包括氢键相互作用能($E_{\text{H-bond}}$)、静电作用能(E_{ele})和范德华作用能(E_{vdw}), 而根据所用模拟软件力场的不同, $E_{\text{H-bond}}$ 可以显示表达. 本论文采用的力场就忽略了 $E_{\text{H-bond}}$ 即:

$$E_{\text{total}} = E_{\text{ele}} + E_{\text{vdw}}$$

在抑制剂与酶结合的过程中, 氢键对于维持体系的稳定性起着很关键的作用. 因此, 本论文通过氢键和相互作用总能(E_{total})共同来评价配体与受体的结合强度, 并用 Ludi 程序对 3 种复合物中配体与受体的几何匹配程度进行打分.

采用对接方法得到的 3 种复合物(L-DDAH-1, M-DDAH-1, P-DDAH-1)的构象如图4所示. 图4直观地显示了 3 种复合物的氢键特征.

由图 4(a)可知复合物 L-DDAH-1 中 L-VNIO 与 DDAH-1 共形成 2 个氢键, 分别是 His172 咪唑基上的

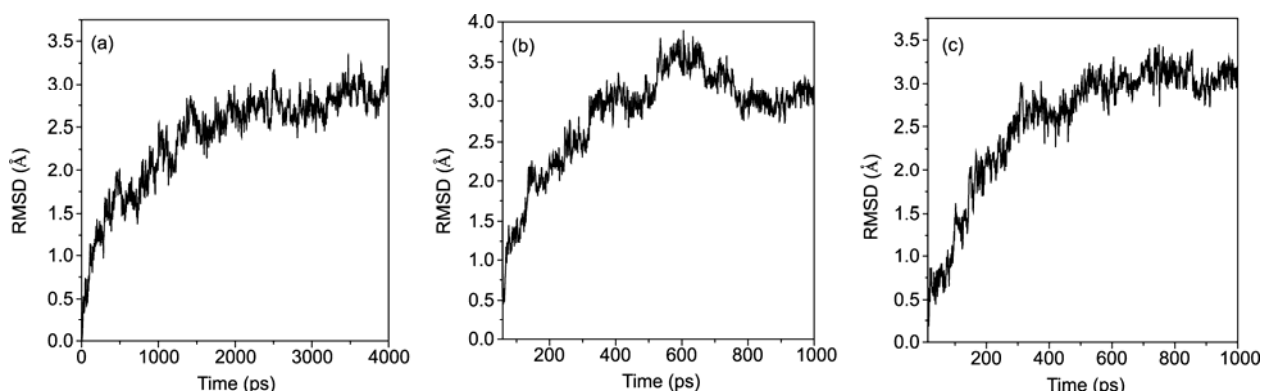


图3 复合物 L-DDAH-1(a)、M-DDAH-1(b)和 P-DDAH-1(c) RMSD 随时间的变化

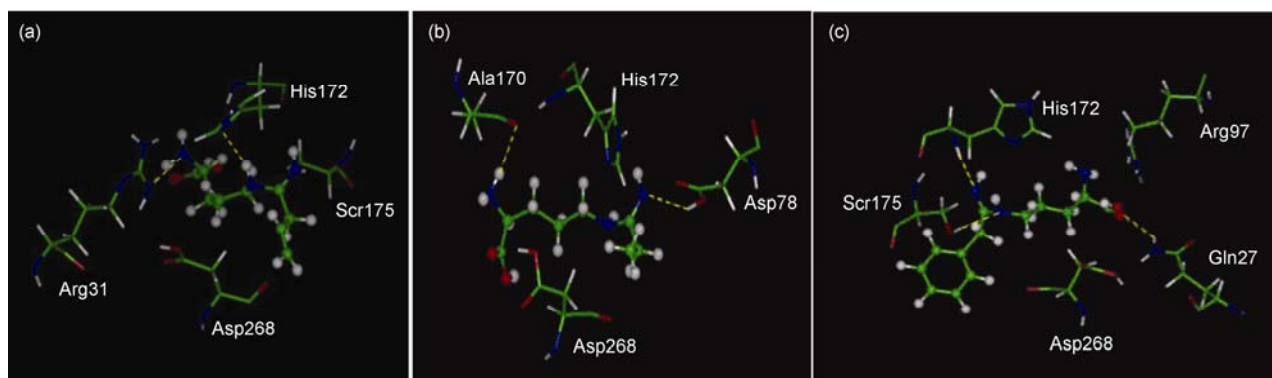


图4 复合物 L-DDAH-1(a)、M-DDAH-1(b)和 P-DDAH-1(c)结合模式及氢键示意图. 图中虚线部分显示所形成的氢键, 配体用球棍模型显示, DDAH-1 的残基用棍型显示

氮与 L-VNIO 亚氨基上的氢以及 Arg31 胍基上的氢与 L-VNIO 氨基上的氮. 由图 4(b) 可知复合物 M-DDAH-1 中 Me-L-NIO 与 DDAH-1 共形成 2 个氢键, 分别是 Ala170 羧基上的双键氧与 Me-L-NIO 氨基上的氢以及 Asp78 羧基上的氢与 Me-L-NIO 的氨基上氮. 由图 4(c) 可知复合物 P-DDAH-1 中 Ph-L-NIO 与 DDAH-1 共形成 3 个氢键, 分别是 Gln27 的氨基上的氢与 Ph-L-NIO 羧基的双键氧、His172 氨基上的氢与 Ph-L-NIO 氨基上的氮以及 Ser175 羟基上的氢与 Ph-L-NIO 亚氨基上的氮. 同时, 我们还对三种复合物的氢键做了平均统计(见表 1), 结果表明: 在抽取复合物 L-DDAH-1 的 80 个构象中, His172 形成氢键数为 20, 占 25%, Arg31 形成氢键数为 32, 占 40%, 这也说明 His172 和 Arg31 对复合物 L-DDAH-1 配体与受体形成氢键过程中起着重要的作用; 在抽取复合物 M-DDAH-1 的 80 个构象中, Asp78 形成氢键数为 53, 占 66%, Ala170 形成氢键数为 60, 占 75%, 这也说明 Asp78 和 Ala170 对复合 M-DDAH-1 配体与受体形成氢键过程中起着重要的作用; 在抽取复合物 P-DDAH-1 的 80 个构象中, Gln27 形成氢键数为 32, 占 40%, His172 形成氢键数为 30, 占 37.5%, Ser175 形成氢键数为 41, 占 51%, 这也说明 Gln27、His172 和 Ser175 对复合物 P-DDAH-1 配体与受体形成氢键过程中起着重要的作用.

在 MD 模拟平衡状态下, 考虑受体、配体和水中所有可能的氢键受体键长临界值设为 0.3 nm, 键角不限, 形成复合物氢键参数详情见表 2.

对比三种复合物, 可以发现 M-DDAH-1 中, 与配体形成氢键的残基都是酸性残基, 而 L-DDAH-1

表 1 三种复合物中形成氢键残基平均统计表(氢键数与构象数的比值, %)

L-DDAH-1		M-DDAH-1		P-DDAH-1	
残基	百分比 (%)	残基	百分比 (%)	残基	百分比 (%)
Arg31	40	Ala170	75	Ser175	51
His172	25	Asp78	66	Gln27	40
Ser175	4	Ser175	2	His172	37.5
Arg33	0.8	Asp268	5	Arg144	3
Leu171	0.6	Cys273	0.8	Ala170	2

表 2 三种复合物氢键参数表

体系	H 供体	H 受体	距离 (nm)	角度 (°)
L-DDAH-1	L-VNIO:H3	His172:ND1	0.23	157.37
	Arg31:HH11	L-VNIO:N11	0.24	161.82
M-DDAH-1	Me-L-NIO:H11	Ala170:O	0.24	162.20
	Asp78:H12	Me-L-NIO:N12	0.25	137.65
	Gln27:HE22	Ph-L-NIO:O9	0.23	158.38
P-DDAH-1	His172:HN	Ph-L-NIO:N12	0.18	137.41
	Ser175:HG	Ph-L-NIO:N3	0.21	137.01

和 P-DDAH-1 中, 与配体形成氢键的残基几乎都是碱性残基. P-DDAH-1 相对 L-DDAH-1 和 M-DDAH-1 而言, 形成的氢键数最多, 键长相对短, 从氢键对稳定性的贡献来看, P-DDAH-1 中的 Ph-L-NIO 与 DDAH-1 相互作用应该最强. 为了确定活性口袋中的重要氨基酸残基, 分别计算了 3 种配体和活性口袋中每个氨基酸残基的相互作用能. 表 3 给出了总相互作用能低于-4.00 kJ/mol 的氨基酸残基(详细列出了这些残基的范德华相互作用能、静电作用能和总的相互作用能)、

表 3 三种复合物中关键残基与配体的 Evdw、Eele 和 Etotal 数据表(kJ/mol)、Ludi 打分和 IC50 值(μm/L)

L-DDAH-1				M-DDAH-1				P-DDAH-1			
残基	E_{vdw}	E_{ele}	E_{Total}	残基	E_{vdw}	E_{ele}	E_{Total}	残基	E_{vdw}	E_{ele}	E_{Total}
Asp268	-18.26	-6.41	-24.67	Asp268	-21.28	-2.76	-24.04	Asp268	-22.10	1.69	-20.41
His172	-18.45	-4.13	-22.58	His172	-14.89	-0.13	-15.02	His172	-15.96	-3.20	-19.16
Ser175	-8.26	-4.61	-12.87	Ser175	-6.71	-3.07	-9.78	Ser175	-19.56	-10.03	-29.59
Phe75	-10.49	-0.72	-11.12	Phe75	-10.98	0.67	-10.31	Phe75	-11.17	-2.33	-13.50
Asp78	-10.68	0.28	-10.04	Asp78	-7.07	-2.01	-9.08	Asp78	-10.06	0.18	-9.88
Arg31	-7.36	-6.72	-14.08	Leu171	-7.18	-0.51	-8.69	Arg144	-5.69	-1.23	-6.92
Leu171	-8.25	0.96	-7.92	Ala170	-2.11	-7.56	-9.67	Arg97	-8.21	-1.14	-9.35
Cys273	-6.03	1.65	-4.38	Asp72	-5.74	-0.21	-5.95	Gln27	-6.23	-0.56	-6.79
E_{total}		-188.34				-155.43				-259.71	
Ludi 值		241				159				280	
IC ₅₀		13 ± 3				300 ± 104				-	

Ludi 值和实验测得的 IC_{50} 值.

从表 3 可以看到复合物 L-DDAH-1 中 Asp268 (−24.67 kJ/mol) 和 His172 (−22.58 kJ/mol), 复合物 M-DDAH-1 中 Asp268 (−21.28 kJ/mol), 复合物 P-DDAH-1 中 Ser175 (−29.56 kJ/mol)、Asp268 (−20.41 kJ/mol) 和 His172 (19.16 kJ/mol) 在配体与受体相互作用中起主要作用, 并且都是由范德华相互作用能起主导作用. 通过分析可以发现 Asp268 与三种配体的相互作用都很强, 可以推测 Asp268 在 DDAH-1 与配体结合的过程中起着关键的作用, 这与 Frey 等的实验结果一致. 通过比较三种复合物总相互作用能的大小, 发现 P-DDAH-1 的总相互作用能 (−259.71 kJ/mol) 最大. 此外, 还利用 Ludi 程序来评判所得复合物结构的合理性. 同样, Ph-L-NIO 与 DDAH-1 的 Ludi 打分 280 比另两种复合物都高, 进一步证明了 Ph-L-NIO 对 DDAH-1 的抑制效果最好. 通过比较 L-DDAH-1 和 M-DDAH-1 的总相互作用能和 Ludi 打分, 得到 L-VNIO 要比 Me-L-NIO 对 DDAH-1 的抑制效果强, 这个结果与 Kotthaus 等人通过实验测 IC_{50} 值表现出的抑制强度结果一致. 通过表 3, 还可以发

现 Phe75、Asp78、His172、Ser175 和 Asp268 这五个氨基酸残基在三种抑制剂形成的复合物中起到非常重要的作用, 而且形成氢键的氨基酸残基与小分子也有很强的相互作用能.

4 结论

本工作用分子对接和分子动力学方法研究了 DDAH-1 与其抑制剂 L-VNIO 和 Me-L-NIO 的相互作用和结合模式, 还根据计算结果设计了抑制效果更强的 Ph-L-NIO. 结果表明: L-VNIO 比 Me-L-NIO 与 DDAH-1 结合能力强, 得到了与实验中测得 DDAH-1 抑制剂的 IC_{50} 值半抑制浓度大小一致的结果. Phe75、Asp78、His172、Ser175 和 Asp268 这五个氨基酸残基在三种抑制剂形成的复合物中起到非常重要的作用, Asp268 在与配体结合的过程中起着关键的作用, 对接时起主要推动力的都是氢键和范德华相互作用, 并且从计算结果推断在这三个抑制剂中我们设计得到的 Ph-L-NIO 对 DDAH-1 的抑制效果最好. 希望这些能为 DDAH-1 的新型抑制剂设计提供理论支持.

致谢 本工作得到黑龙江省自然科学基金项目 (B200605) 和黑龙江省博士后基金资助项目资助, 特此一并致谢.

参考文献

- Colasanti M, Suzuki H. The dual personality of NO. *Trends Pharmacolog Sci*, 2000, 21: 249—252
- Tsao PS, Cooke JP. Endothelial alterations in hypercholesterolemia: more than simply vasodilator dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1998, 32(Suppl 3): S48—S53
- Vallance P, Leiper J. Blocking NO synthesis: How, where and why? *Nature Reviews Drug Discovey*, 2002, 1: 939—950
- Leiper J, Vallance P. Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*, 1999, 43: 542—548
- Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atherosclerosis*, 2003, 4(suppl.): 33—40
- Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine: The uber marker? *Circulation*, 2004, 109: 1813—1818
- Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: Dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Vasc Biol*, 2004, 24: 1023—1030
- Frey D, Braun O, Briand C, Vařák M, Grütter M. Structure of the mammalian NOS regulator dimethylarginine dimethylaminohydrolase: A basis for the design of specific inhibitors. *Elsev Res*, 2006, 14: 901—911
- Kotthaus J, Schade D. Structure-activity relationship of novel and known inhibitors of human dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1: Alkenyl-amidines as new leads. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 10205—10209
- 郑清川, 楚慧郢, 牛瑞娟, 孙家锤. 人类乙酰胆碱酯酶(Ach)与抑制剂小分子的对接研究. *中国科学 B 辑: 化学*, 2009, 38: 15—160
- 孙苗, 曹苏明. 非对称二甲基精氨酸二甲胺水解酶-2 的理论研究. *分子科学学报*, 2009, 25: 116—120
- Insight, Version 98.0 [CP], San Diego: M S I, 1998
- Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Montgomery JA Jr, Vreven T, Kudin KN, Burant JC, Millam JM, Iyengar SS, Tomasi J, Barone V, Mennucci B, Cossi M, Scalmani G, Rega N, Petersson GA, Nakatsuji H, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Klene M, Li X, Knox JE, Hratchian HP, Cross JB, Adamo C,

Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Ayala PY, Morokuma K, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Zakrzewski VG, Dapprich S, Daniels AD, Strain MC, Farkas O, Malick DK, Rabuck AD, Raghavachari K, Foresman JB, Ortiz JV, Cui Q, Baboul AG, Clifford S, Cioslowski J, Stefanov BB, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Ko-maromi I, Martin RL, Fox DJ, Keith T, Al-Laham MA, Peng CY, Nanayakkara A, Challacombe M, Gill P MW, Johnson B, Chen W, Wong MW, Gonzalez C, Pople JA. Gaussian 03[CP], Pittsburgh PA: Gaussian Inc, 2003

14 陈凯先, 蒋华良. 计算机辅助药物设计-原理、方法及应用. 上海: 上海科学技术出版社, 2000. 325—326

Theoretical studies on dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1

SUN Xin¹, SUN Miao¹, ZHANG Hui¹, ZHANG GuiLing¹ & LIU JingYao²

1 College of Chemistry and Environmental Engineering, Harbin University of Science and Technology, Harbin 150080, China

2 State Key Laboratory of Theoretical and Computational Chemistry; Institute of Theoretical Chemistry, Jilin University, Changchun 130023, China

Abstract: The interaction and combination mode of N^{ω} , N^{ω} -dimethyl-L-arginine dimethylaminohydrolase-1 (DDAH-1) and its inhibitors N^5 -(1-iminobut-3-enyl)-L-ornithine(L-VNIO) and N^5 -(1-iminopropyl)-L-ornithine(Me-L-NIO) were studied by using the methods of molecular docking and molecular dynamics, and N^5 -(1-iminobut-3-phenyl)-L-ornithine(Ph-L-NIO) inhibitor is designed according to the experimental results. The result shows that the combination of L-VNIO with DDAH-1 is stronger than Me-L-NIO, which reflects the experimental inhibitory activity expressed in terms of the half maximal inhibitory concentration (the IC_{50} value). Phe75、Asp78、His172、Ser175 and Asp268 play very important role in the compound formed by the three kinds of inhibitors and form the results that N^5 -(1-iminobut-3-phenyl)-L-ornithine(Ph-L-NIO) could most effectively inhibit DDAH-1.

Keywords: molecular docking, molecular dynamics, DDAH-1, inhibitor