

基于计算机模拟技术分析去氢枞酸作为 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制剂的潜力

李翠萍¹, 陈乃源^{2,4*}, 李昕宇³, 卢国栋^{2,4}

¹广西医科大学口腔医学院; ²广西医科大学公共卫生学院; ³广西医科大学基础医学院;

⁴广西高校高发疾病预防与控制研究重点实验室, 南宁 530021

摘要:为了研究去氢枞酸对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的抑制能力,本研究利用分子对接技术预测去氢枞酸对通路蛋白的结合能力和结合方式,用蛋白免疫印迹技术验证通路蛋白受抑制程度,用网络服务器进行类药性与药代动力学的模拟。预测结果发现,去氢枞酸对通路蛋白具有一定的结合能力,预测构像的最低结合能最高为-6.16 kcal/mol;蛋白免疫印迹结果显示,在去氢枞酸作用下,PI3K 调控亚基 p85 的表达明显下调,AKT 和 mTOR 的磷酸化被明显抑制,通路下游磷酸化蛋白的表达也被不同程度的抑制;类药性与药代动力学的模拟发现去氢枞酸通过了大部分的检验。总体上看,去氢枞酸可以作为治疗用 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制剂的候选化合物。

关键词:去氢枞酸;PI3K/AKT/mTOR;抑制剂;计算机模拟

中图分类号:O629.9

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)4-0543-12

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.4.002

Analysis of the potentiality of dehydroabietic acid as PI3K/AKT/mTOR signaling pathway inhibitor based on computational simulation

LI Cui-ping¹, CHEN Nai-yuan^{2,4*}, LI Xin-yu³, LU Guo-dong^{2,4}

¹School of Stomatology, Guangxi Medical University; ²School of Public Health, Guangxi Medical University;

³School of Preclinical Medicine, Guangxi Medical University; ⁴Guangxi Colleges and

Universities Key Laboratory of Prevention and Control of Highly Prevalent Diseases, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Abstract:To study the inhibitory ability of dehydroabietic acid (DHA) against PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, molecular docking was used to predict the binding abilities and the binding modes of DHA with the pathway proteins, western blot was performed to confirm the expressions of the pathway proteins affected by DHA, the “pkCSM-pharmacokinetics” online web-server was chosen for predictions of drug-likeness and pharmacokinetic properties of DHA. The molecular docking results showed that DHA could bind with the pathway proteins because the lowest binding energies of the predicted conformations are not higher than -6.16 kcal/mol. The western blot showed that in the presence of DHA, the expression of p85, the regulatory subunit of PI3K, was decreased obviously; the phosphorylations of AKT and mTOR were inhibited significantly; the expressions of phosphorylated downstream effectors were also inhibited in varying degrees. In the drug-likeness and pharmacokinetic predictions, DHA passes most of the tests. On the whole, DHA may be used as a therapeutic candidate against PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.

Key words:dehydroabietic acid;PI3K/AKT/mTOR;inhibitor;computational simulation

PI3K/AKT/mTOR 信号通路对细胞的增殖、分化和凋亡等过程起着重要作用,在许多肿瘤细胞中存在过度激活的现象,并被发现可促进肿瘤细胞耐

药性的产生^[1,2]。而抑制该信号通路的激活能够促进肿瘤细胞凋亡,也能恢复肿瘤细胞对药物的敏感性^[3]。因此,开发小分子 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制剂成为抗肿瘤药物的研究热点之一^[4]。去氢枞酸(DHA)是一种重要的三环二萜类天然树脂酸,也是传统中药松香的成分之一,主要由松香经歧化反应后分离获得。其性质稳定且具有与甾类分子

收稿日期:2020-09-18 接受日期:2021-02-04

基金项目:广西自然科学基金(2018GXNSFAA138023);“广西特聘专家”专项(2018)

*通信作者 Tel:86-771-5358114;E-mail:chennaiyuan@gxmu.edu.cn

类似的结构,目前已被广泛用于荧光试剂和药物中间体的合成与开发。去氢枞酸及许多它的衍生物表现出良好的抗肿瘤活性^[5-7]。近期报道显示,去氢枞酸的1*H*苯并[*d*]咪唑类衍生物对PI3K α 有抑制效果,能够下调磷酸化AKT的表达^[8]。我们的研究也发现,部分B环改性的去氢枞酸衍生物能够降低磷酸化的PI3K、AKT、mTOR表达水平,同样也能降低其下游效应器S6和4EBP1的磷酸化水平^[9]。虽然不同去氢枞酸衍生物对PI3K/AKT/mTOR信号通路蛋白表现出了一定的抑制作用,但去氢枞酸本身是否具有相应的抑制能力,目前尚不清楚,有待进一步的研究。

大多数化合物通过与蛋白分子的结合产生效应作用,其结合模式和结合能力可通过蛋白晶体解析和蛋白荧光猝灭等手段来验证,但实验周期较长,成本较高。分子对接技术是一种利用计算机进行理论计算预测化合物与受体蛋白结合情况的手段,可根据对接结合能的大小判断化合物与蛋白的结合能力,筛选出潜在的蛋白调节剂;也可通过所得的对接构像和其他的对接评分进行初步的机理研究^[10-12]。此外,了解化合物在人体的吸收、分布、代谢、排泄和毒性等类药性和药代动力学特性可以判断其是否可作为临床治疗的候选化合物。为了降低研究成本,计算机辅助程序已逐渐被用于类药性和药代动力学的初步研究^[13,14]。

因此,本研究利用分子对接技术预测去氢枞酸与该通路关键蛋白的结合能力和结合方式,并用蛋白免疫印迹法验证去氢枞酸的实际抑制情况,进一步利用网络服务器进行类药性与药代动力学的模拟,以初步了解去氢枞酸作为PI3K/AKT/mTOR信号通路抑制剂的潜力,为进一步开发去氢枞酸提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 分子对接

1.1.1 蛋白数据获取

本研究选取人癌细胞中过度激活的I类PI3K催化亚基p110的四个亚型 α 、 β 、 γ 、 δ ^[15],AKT的3种亚型AKT1、AKT2、AKT3,以及mTOR^[16]进行研究。蛋白质晶体结构主要从RCSB Protein Data Bank(PDB)数据库(<http://www.rcsb.org/>)中获取,蛋白文件ID分别为:PI3K α (4ZOP)、PI3K β (4J61)、PI3K γ (3L54)、PI3K δ (4GB9)、AKT1(3MVH)、AKT2(3D0E)和mTOR(4JT6),配体均为ATP-竞争抑制

剂。AKT3结构的PDB文件通过Phyre2网络服务器预测得到^[17]。

1.1.2 配体文件的准备

蛋白文件中的配体分子经PyMOL Molecular Graphics System(Version 2.0 Schrödinger, LLC)提取后保留为“.pdb”格式备用。去氢枞酸(图1)和前期研究中的去氢枞酸基PI3K/AKT/mTOR信号通路抑制分子(含吡啶-3-甲基胺结构的去氢枞酸衍生物,DBDA)^[9]由ChemOffice 2019绘制成3D格式,经MM-2能量优化后保存为“.pdb”格式备用。所有“.pdb”格式文件的分子,经AutoDock 4.2.6软件(AutoDock)自动选择可扭转键后保存为PDBQT文件备用。

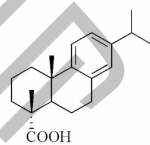


图1 去氢枞酸的结构

Fig. 1 The structure of dehydroabietic acid

1.1.3 蛋白文件的准备

利用PyMOL Molecular Graphics System删除蛋白文件中的配体、水和金属等小分子,删除相似性极高的重复蛋白链,以保留A链为主。利用AutoDock对蛋白进行“加氢”、自动计算“Gasteiger charges”、设置原子类型为“Assign AD4 type”后保存为PDBQT文件备用。

1.1.4 对接的执行

“GridBox”的“grid map”设置为 $60 \times 60 \times 60$ 以涵盖ATP位点(中心分别为:PI3K α , $x = -2.4$ 、 $y = 12.3$ 、 $z = -17.3$;PI3K β , $x = 19.0$ 、 $y = 60.0$ 、 $z = 22.0$;PI3K γ , $x = 22.0$ 、 $y = 15.0$ 、 $z = 22.0$;PI3K δ , $x = 17.0$ 、 $y = -5.0$ 、 $z = 21.0$;ATK1, $x = 19.0$ 、 $y = -3.0$ 、 $z = 28.0$;AKT2, $x = 23.0$ 、 $y = -18.0$ 、 $z = 7.0$;AKT3, $x = 3.0$ 、 $y = 15.0$ 、 $z = -42.0$;mTOR, $x = 52.0$ 、 $y = 1.0$ 、 $z = -47.0$)。对接程序使用默认参数进行,选取结合能最低的构像作为预测结果进行分析。当各蛋白原配体重新对接的构像均方根偏差(root mean square deviation, RMSD或refRMS)差小于 2 \AA 时,则认为此对接方法有较好的准确性^[18]。

1.1.5 对接结果分析

配体-蛋白相互作用的3D构像使用PyMOL制作,配体-蛋白相互作用的2D构像使用LigPlot + 2.1

制作。去氢枞酸与原配体重叠的相互作用残基用红圈指示。相互作用残基是否参与配体-蛋白的结合通过可接触表面积(accessible surface area, ASA)的损失(Δ ASA)来衡量,配体与残基的相互作用越紧密 Δ ASA越大,一般 Δ ASA大于 10\AA^2 可认为该相互作用参与了配体-蛋白的结合^[19]。各残基的ASA通过Accessible Surface Area and Accessibility Calculation for Protein(ver. 1.2)(<http://cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/ASA/>)系统进行计算。各残基的 Δ ASA = ASA_{对接前} - ASA_{对接后}。

1.2 蛋白免疫印迹测试

取对数生长期的SCC9细胞,向细胞培养皿中加入含有不同浓度药物(0、13和26 μM 的去氢枞酸)的培养基,置37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养后,用冷PBS洗,进一步用0.25%胰蛋白酶消化细胞并收集,加入200 μL 裂解液(196 μL 裂解液加2 μL PMSF和2 μL 蛋白磷酸酶抑制剂混合物)(Solarbio)裂解,置于冰上研碎至匀浆后,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置30 min,用BCA试剂盒检测(Beyotime)蛋白浓度,用SDS-PAGE凝胶电泳(Beyotime)对蛋白质进行电泳并转膜。在室温下用5%脱脂乳封闭膜1 h,并在4 $^{\circ}\text{C}$ 下与一抗孵育过夜。次日洗膜后,在室温下用相应的二抗孵育1 h,最后用化学发光试剂盒显影(Merck,德国)。使用全能成像系统显示蛋白条带(ChemiDoc MP, Bio-Rad, USA)。一抗为:PI3K p110、PI3K p85、p-AKT、

AKT、mTOR、p-mTOR、p-4EBP1、p-S6、GAPDH作为内参(Cell Signaling Technology, Boston, USA)。

1.3 类药性与药代动力学预测

利用网络服务器“pkCSM-pharmacokinetics”(http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/)对去氢枞酸的类药性(利宾斯基五法则)和药代动力学(吸收、分布、代谢、排泄和毒性)进行预测^[19]。该预测方法是将已知药代动力学特性的分子进行图形建模,转化成原子间距离参数的识别标志,再用这些识别标志和分子的特性建立药代动力学的回归与分类模型。待测分子也转换成识别标志后代入模型并进行预测。

2 结果

2.1 对接结合能

对接结果显示(表1),原配体重新对接的RMSD值均小于2 \AA ,最大值为0.48 \AA ,说明对接程序的预测结果能够很好的重复原配体在蛋白中的构像,对接方法较为可靠。DHA与通路蛋白的最低对接结合能均为负值,最大值为-6.16 kcal/mol,说明DHA可能对这些蛋白的ATP位点均有一定的结合能力。虽然最低对接结合能均高于作为抑制剂的原配体,但与对该通路有抑制作用的DBDA接近。这预示着去氢枞酸可能对该通路也可以表现出抑制能力。

表1 PDB文件信息和最低对接结合能

Table 1 The basic information of the protein and the lowest binding energy predicted by docking

蛋白名称 Name of protein	PDB ID	长度 Length	分辨率 Resolution (\AA)	RMSD 值 ^b RMSD value (\AA)	最低结合能 The lowest binding energy (kcal/mol)		
					原配体 Native ligand	去氢枞酸 DHA	DBDA
PI3K α	4ZOP	1074	2.62	0.40	-11.40	-6.72	-7.90
PI3K β	4J6I	966	2.90	0.41	-10.31	-7.72	-7.92
PI3K γ	3L54	966	2.30	0.40	-9.59	-7.54	-6.81
PI3K δ	4GB9	966	2.44	0.25	-8.91	-7.52	-7.08
AKT1	3MVH	342	2.01	0.48	-10.91	-8.04	-9.15
AKT2	3D0E	335	2.00	0.44	-11.05	-6.79	-6.72
AKT3 ^a	-	454	-	0.25	-7.94	-6.16	-8.12
mTOR	4JT6	1174	3.60	0.44	-9.78	-7.47	-8.99

注:^aAKT3为预测结构,使用AKT1的原配体进行对接;^b原配体重新对接的RMSD值。

Note:^aThe structure of AKT3 is predicted and docked with the native ligand of AKT1;^bThe RMSD value is obtained from the docking result of the protein with its native ligand.

2.2 去氢枞酸与各 PI3K 蛋白的对接结果

对 PI3K α 的分子对接结果显示(图 2),去氢枞酸在 PI3K α 的 ATP 结合位点共与 12 个残基发生非键相互作用,其中 9 个残基 Val851、Trp780、Met922、Met772、Ile932、Ile848、Ser854、Gln859 和 Arg770 对

配体-蛋白的结合起着重要作用($\Delta\text{ASA} > 10 \text{ \AA}^2$),残基 Trp780 的 ΔASA (38.99 \AA^2) 最大,可视为关键残基(表 2)。有 10 个残基与 PI3K α 原配体的相互作用残基重叠,这说明去氢枞酸和原配体对 PI3K α 的 ATP 结合位点有着较为相似的结合方式。

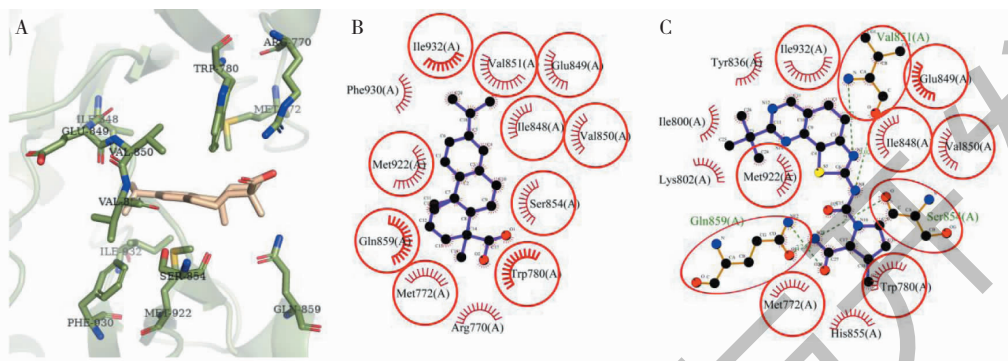


图 2 去氢枞酸与 PI3K α 对接的构像

Fig. 2 The conformation of DHA docked in PI3K α

注:A:3D 对接构像;B:2D 对接构像;C:原配体与残基的 2D 构像,下同。Note: A:3D docking conformation; B:2D docking conformation; C:2D conformation of native ligand and residues, the same below.

对 PI3K β 的分子对接结果显示(图 3),去氢枞酸在 PI3K β 的 ATP 结合位点与 13 个残基发生相互作用,其中氢键相互作用残基 2 个(Ala885 和 Lys890)、非键相互作用残基 11 个。有 9 个残基 Val882、Trp812、Ala885H、Met953、Ile963、Ile831、Lys890、Ile879 和 Asp964 对配体-蛋白的结合起着重

要作用($\Delta\text{ASA} > 10 \text{ \AA}^2$),残基 Ile963 的 ΔASA (30.642 \AA^2) 最大,可视为关键残基(表 2)。此外,有 10 个残基与 PI3K β 原配体的相互作用残基重叠,这说明去氢枞酸和原配体对 PI3K β 的 ATP 结合位点有着较为相似的结合方式。

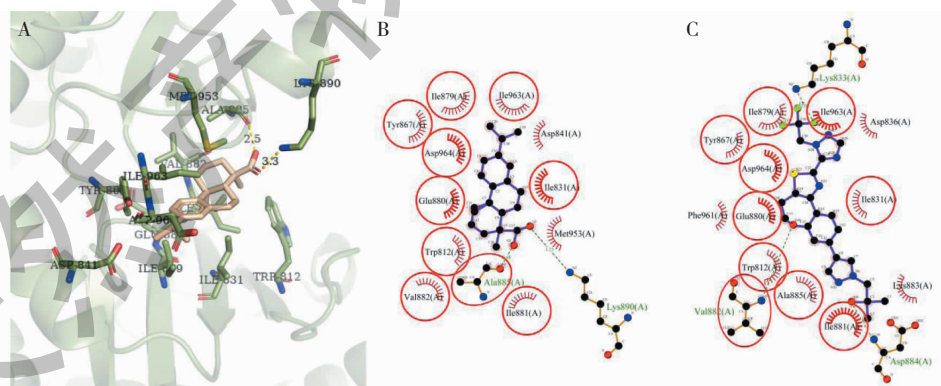
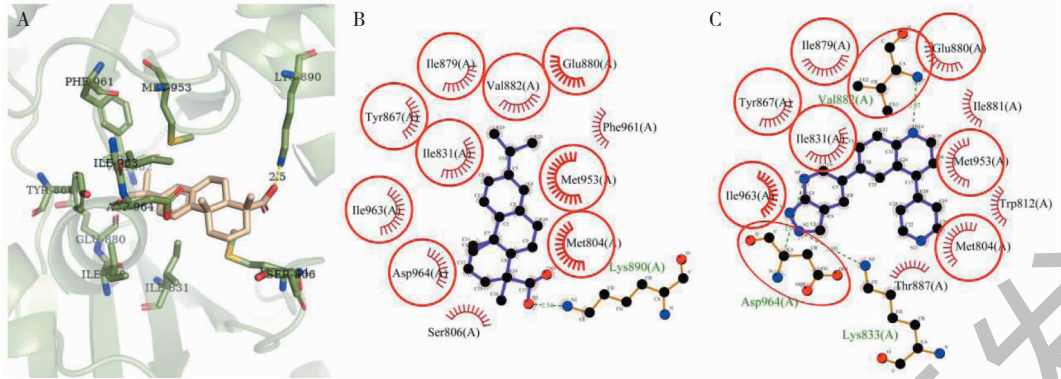


图 3 去氢枞酸与 PI3K β 对接的构像

Fig. 3 The conformation of DHA docked in PI3K β

对 PI3K γ 的分子对接预测显示(图 4),去氢枞酸在 PI3K γ 的 ATP 结合位点共与 12 个残基发生相互作用,其中与氢键相互作用残基 1 个(Lys890)、非键相互作用残基 11 个。有 8 个残基 Met804、Asp964、Met953、Ile963、Ile831、Ser806、Ile879 和

Lys890 对配体-蛋白的结合起着重要作用($\Delta\text{ASA} > 10 \text{ \AA}^2$),残基 Met804 的 ΔASA (49.215 \AA^2) 最大,可视为关键残基(表 2)。有 9 个残基与 PI3K γ 原配体的相互作用残基重叠,这说明去氢枞酸和原配体对 PI3K γ 的 ATP 结合位点有着较为相似的结合方式。

图4 去氢枞酸与 PI3K γ 对接的构像Fig. 4 The conformation of DHA docked in PI3K γ

对 PI3K δ 的分子对接结果显示(图5),去氢枞酸在 PI3K δ 的 ATP 结合位点与 13 个残基发生相互作用,其中氢键相互作用残基 1 个(Lys890)、非键相互作用残基 12 个。有 7 个残基 Met953、Lys890、Ile963、Met804、Ile879、Ile831 和 Ser806 对配体-蛋白

的结合起着重要作用($\Delta\text{ASA} > 10 \text{ \AA}^2$),残基 Lys890 的 ΔASA (43.805 \AA^2)最大,可视为关键残基(表2)。有 11 个残基与 PI3K δ 原配体的相互作用残基重叠,这说明去氢枞酸和原配体对 PI3K δ 的 ATP 结合位点有着较为相似的结合方式。

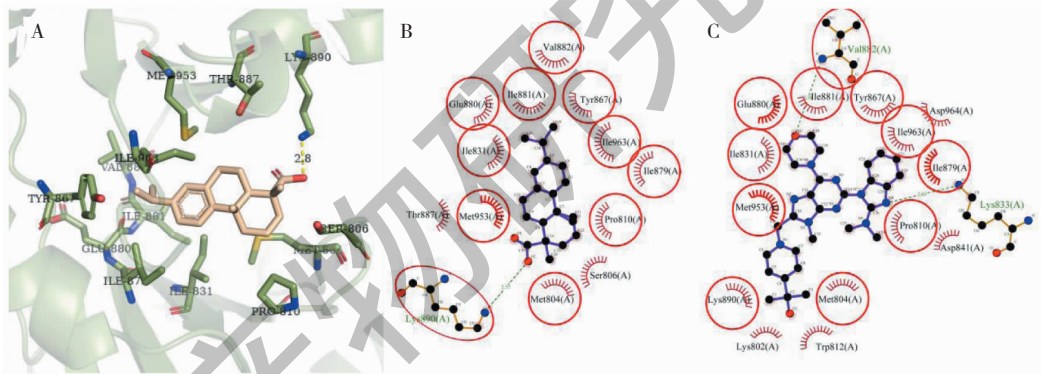
图5 去氢枞酸与 PI3K δ 对接的构像Fig. 5 The conformation of DHA docked in PI3K δ

表2 去氢枞酸与 PI3K 相互作用残基信息

Table 2 The residues of PI3K interacted with DHA

PI3K α		PI3K β		PI3K γ		PI3K δ	
残基 Residue	$\Delta\text{ASA}(\text{\AA}^2)$	残基 Residue	$\Delta\text{ASA}(\text{\AA}^2)$	残基 Residue	$\Delta\text{ASA}(\text{\AA}^2)$	残基 Residue	$\Delta\text{ASA}(\text{\AA}^2)$
Val851 ^o	13.179	Val882 ^o	11.989	Met804 ^o	49.215	Met953 ^o	30.3
Trp780 ^o	38.990	Trp812 ^o	25.198	Asp964 ^o	30.49	Lys890 ^{o,H}	43.805
Met922 ^o	31.397	Ile881 ^o	9.079	Val882 ^o	6.862	Ile963 ^o	36.317
Met772 ^o	23.606	Ala885 ^H	16.584	Met953 ^o	31.527	Met804 ^o	27.782
Ile932 ^o	24.287	Met953	29.622	Ile963 ^o	29.167	Ile879 ^o	22.812
Ile848 ^o	10.441	Ile963 ^o	30.642	Ile831 ^o	28.486	Thr887	9.261
Ser854 ^o	11.710	Ile831 ^o	28.259	Ser806	23.345	Ile831 ^o	25.308
Gln859 ^o	35.631	Tyr867 ^o	6.075	Lys890 ^H	43.733	Val882 ^o	7.375

续表 2 (Continued Tab. 2)

PI3K α		PI3K β		PI3K γ		PI3K δ	
残基 Residue	Δ ASA (\AA^2)	残基 Residue	Δ ASA (\AA^2)	残基 Residue	Δ ASA (\AA^2)	残基 Residue	Δ ASA (\AA^2)
Val850 ^o	6.923	Lys890 ^H	20.269	Ile879 ^o	14.073	Glu880 ^o	3.617
Glu849 ^o	2.694	Ile879 ^o	27.919	Glu880 ^o	4.002	Tyr867 ^o	2.642
Arg770	33.126	Glu880 ^o	3.849	Tyr867 ^o	3.94	Ser806	37.458
Phe930	0.518	Asp964 ^o	16.708	Phe961	1.97	Pro810 ^o	6.118
		Asp841	1.73			Ile881 ^o	5.674

注:^o 与原配体相互作用重叠的残基;^H 氢键相互作用残基。

Note:^oThe residues overlapping with the interacting residues of native ligand;^HThe residues interacted with DHA through hydrogen bond.

2.3 去氢枞酸与各 AKT 蛋白的对接结果

对 AKT1 的分子对接结果显示(图 6),去氢枞酸在 AKT1 的 ATP 结合位点与 15 个残基发生相互作用,其中氢键相互作用残基 2 个(Thr211 和 Ala230)、非键相互作用残基 13 个。有 10 个残基 Glu234、Asp292、Val164、Leu156、Arg4 (B)、Met281、Met227、Gly157、Ala177 和 Thr291 对配体-蛋白的结

合起着重要作用(Δ ASA $> 10\text{\AA}^2$),残基 Val164 的 Δ ASA (40.176\AA^2) 最大,可视为关键残基(表 3)。有 12 个残基与 AKT1 原配体的相互作用残基重叠,这说明去氢枞酸和原配体对 AKT1 的 ATP 结合位点有着较为相似的结合方式。

对 AKT2 的分子对接结果显示(图 7),去氢枞酸在 AKT2 的 ATP 结合位点与 13 个残基发生非键

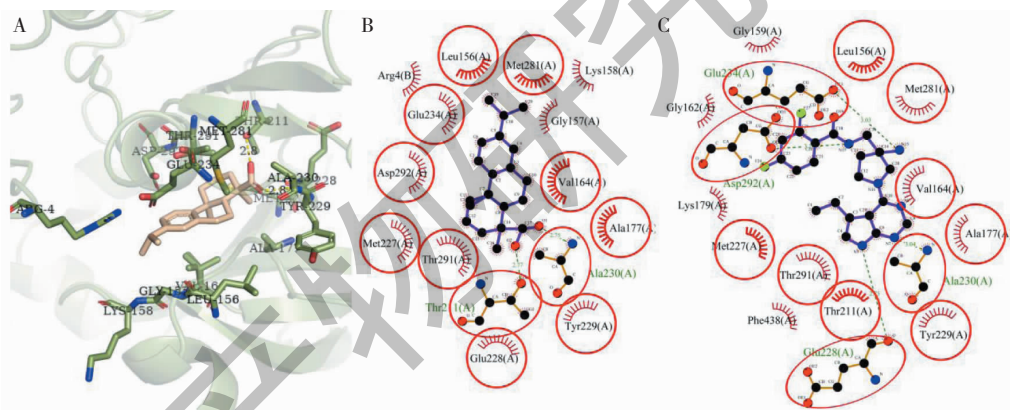


图 6 去氢枞酸与 AKT1 对接的构像

Fig. 6 The conformation of DHA docked in AKT1

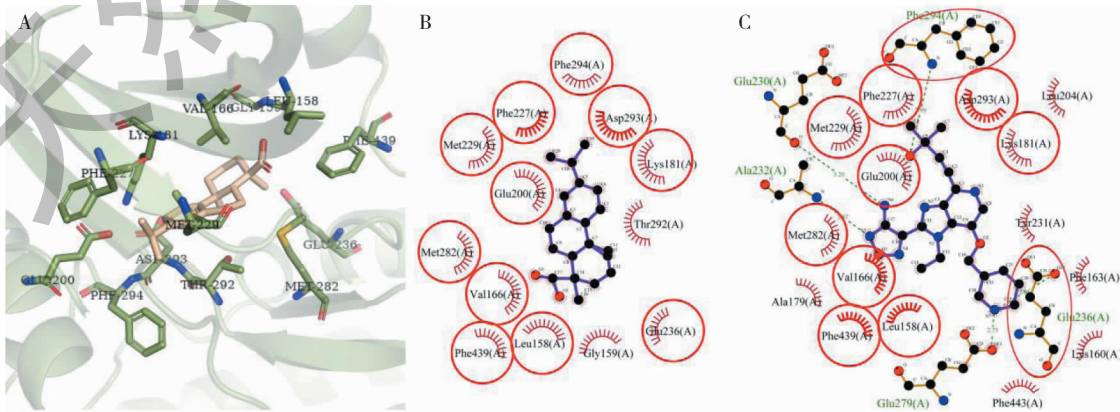


图 7 去氢枞酸与 AKT2 对接的构像

Fig. 7 The conformation of DHA docked in AKT2

相互作用,其中 8 个残基 Lys181、Asp293、Val166、Glu236、Met229、Gly159、Thr292 和 Met282 对配体-蛋白的结合起着重要作用($\Delta\text{ASA} > 10\text{\AA}^2$),残基 Val166 的 ΔASA (30.756\AA^2)最大,可视为关键残基(表 3)。有 11 个残基与 AKT2 原配体的相互作用残基重叠,这说明去氢枞酸和原配体对 AKT2 的 ATP 结合位点有着较为相似的结合方式。

对 AKT3 的分子对接结果显示(图 8),去氢枞

酸在 AKT3 的 ATP 结合位点与 14 个残基发生非键相互作用,其中 9 个残基 Leu154、Val228、Val162、Met278、Gly155、Met225、Asp289、Lys177 和 Gly157 对配体-蛋白的结合起着重要作用($\Delta\text{ASA} > 10\text{\AA}^2$),残基 Met278 的 ΔASA (41.586\AA^2)最大,可视为关键残基(表 3)。近半数的残基与 AKT1 原配体的相互作用残基重叠,说明去氢枞酸与 AKT1 配体在一定程度上对 AKT3 的 ATP 结合位点有着相似的结合方式。

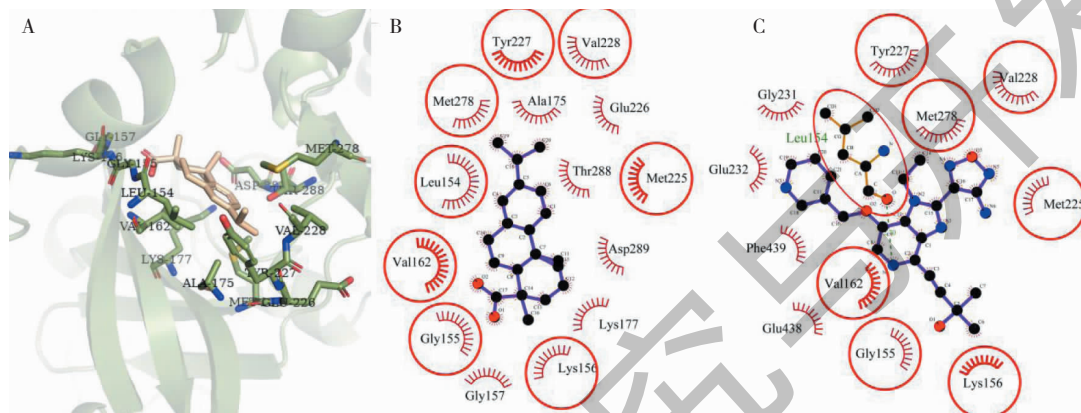


图 8 去氢枞酸与 AKT3 对接的构像

Fig. 8 The conformation of DHA docked in AKT3

表 3 去氢枞酸与 AKT 相互作用残基信息

Table 3 The residues of AKT interacted with DHA

AKT1		AKT3		AKT2	
残基 Residue	$\Delta\text{ASA} (\text{\AA}^2)$	残基 Residue	$\Delta\text{ASA} (\text{\AA}^2)$	残基 Residue	$\Delta\text{ASA} (\text{\AA}^2)$
Glu234 ^o	20.471	Lys181 ^o	10.327	Leu154 ^o	23.186
Asp292 ^o	31.265	Asp293 ^o	23.897	Val228 ^o	10.942
Val164 ^o	40.176	Val166 ^o	30.756	Val162 ^o	34.615
Leu156 ^o	13.148	Glu236 ^o	19.923	Tyr227 ^o	5.502
Arg4(B)	21.836	Glu200 ^o	3.156	Met278 ^o	41.586
Met281 ^o	25.657	Met229 ^o	25.360	Gly155 ^o	17.023
Met227 ^o	19.148	Leu158 ^o	7.043	Ala175 ^o	5.675
Lys158	5.977	Gly159	14.300	Met225 ^o	11.236
Gly157	15.435	Phe227 ^o	1.141	Lys156 ^o	6.653
Ala177 ^o	11.122	Thr292	17.344	Thr288	4.731
Tyr229 ^o	0.83	Phe439 ^o	7.673	Glu226	1.001
Thr291 ^o	19.097	Phe294 ^o	2.282	Asp289	25.904
Thr211 ^H	3.947	Met282 ^o	25.464	Lys177	12.876
Glu228 ^o	5.991			Gly157	14.836
Ala230 ^H	5.897				

注:^o 与原配体相互作用重叠的残基;^H 氢键相互作用残基。

Note:^oThe residues are overlapping with the interacting residues of native ligand;^HThe residues interacted with DHA through hydrogen bond.

2.4 去氢枞酸与 mTOR 蛋白的对接结果

对 mTOR 的分子对接结果显示(图 9),去氢枞酸在 mTOR 的 ATP 结合位点与 13 个残基发生相互作用,其中氢键相互作用残基 1 个(Val2240)、非键相互作用残基 12 个。有 9 个残基 Trp2239、Ile2356、Ile2237、Met2345、Leu2185、Cys2243、Thr2245、

Ala2248 和 Asp2244 对配体-蛋白的结合起着重要作用($\Delta\text{ASA} > 10 \text{ \AA}^2$),残基 Trp2239 的 ΔASA (50.969 \AA^2) 最大,可视为关键残基(表 4)。近半数的残基与 mTOR 原配体的相互作用残基重叠,这说明去氢枞酸与原配体可能在一定程度上对 mTOR 的 ATP 结合位点有着相似的结合方式。

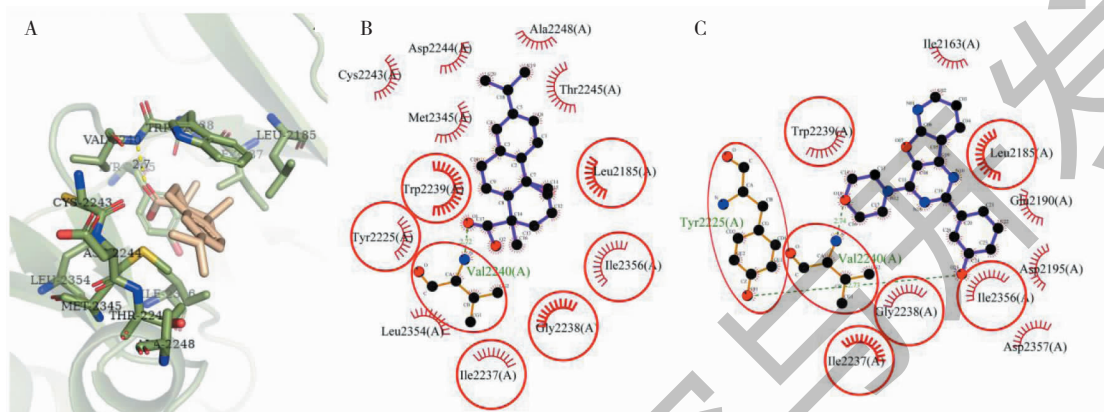


图 9 去氢枞酸与 mTOR 对接的构像

Fig. 9 The conformation of DHA docked in mTOR

表 4 去氢枞酸与 mTOR 相互作用残基信息

Table 4 The residues of mTOR interacted with DHA

mTOR			
残基 Residue	$\Delta\text{ASA} (\text{ \AA}^2)$	残基 Residue	$\Delta\text{ASA} (\text{ \AA}^2)$
Val2240 ^{0, H}	7.073	Leu2185 ^o	24.854
Trp2239 ^o	50.969	Cys2243	14.949
Ile2356 ^o	33.253	Thr2245	21.848
Gly2238 ^o	3.001	Leu2354	1.362
Ile2237 ^o	12.824	Ala2248	12.938
Tyr2225 ^o	2.097	Asp2244	12.555
Met2345	32.651		

注: ^o 与原配体相互作用重叠的残基; ^H 氢键相互作用残基。

Note: ^oThe residues are overlapping with the interacting residues of native ligand; ^HThe residues interacted with DHA through hydrogen bond.

2.5 蛋白免疫印迹结果

蛋白免疫印迹结果显示(图 10),在去氢枞酸的作用下,SCC9 的 PI3K 催化亚基 p110 的表达略有下调,调控亚基 p85 的表达明显下调;PI3K 下游蛋白 AKT 和 mTOR 的磷酸化明显被抑制,但其总蛋白的表达基本不受影响;通路下游的效应蛋白 4EBP1 的磷酸化略受抑制,S6 的磷酸化明显减少。这说明 PI3K/AKT/mTOR 信号通路受到去氢枞酸的抑制。

2.6 类药性与药代动力学预测结果

类药性预测结果经“五倍率法则(Lipinski rule

of five)”比较(表 5):去氢枞酸的分子量、油水分配系数(LogP)、可旋转键(rotatable bonds)、氢键受体(acceptors)、氢键供体(donors)和总极化表面积(surface area)均在可接受值域内。

药代动力学预测结果显示(表 6):去氢枞酸有较好的脂溶性和口服作用,容易通过肠道吸收,且不作为 P-糖蛋白的底物;较易分布于血液,易穿透血脑屏障、穿透中枢神经;对机体的代谢能力没有影响;可以被正常排泄;不致突变,毒性较小。总的来说去氢枞酸通过了大多数的预测,成为安全药物的

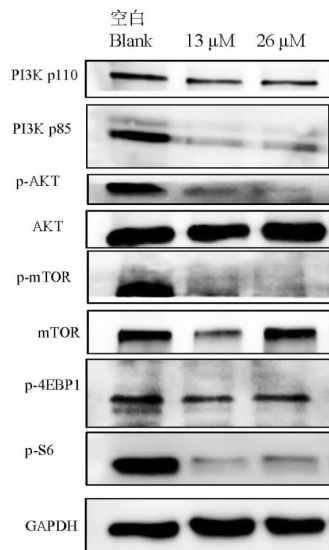


图 10 去氢枞酸对蛋白表达的影响

Fig. 10 The protein expressions affected by DHA

可能性较大,可考虑作为治疗使用的候选化合物^[19]。

3 讨论

PI3K/AKT/mTOR 信号通路对细胞的增殖、分化和凋亡等过程起着重要作用,也是癌症治疗的靶点之一。PI3K 主要由催化亚基 p110 和调控亚基 p85 构成,经磷酸化激活后,可将其底物 3,4-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP₂)转化成 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇(PIP₃)。PIP₃ 能够与 AKT 结合后通过磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1(PDK1)促使 AKT 磷酸化。经磷酸化激活的 AKT 能够直接或间接的使 mTOR 磷酸化,从而进一步促进下游效应蛋白 4EBP1 和 S6 的磷酸化以调控细胞内生化活动^[20,21]。

本研究基于近年来去氢枞酸抗癌衍生物不断被开发,部分衍生物被报道对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的部分关键蛋白有抑制作用^[8,9,22]。为了研究

表 5 去氢枞酸类药性预测数据

Table 5 Drug-likeness prediction of DHA

预测项目 Property	结果 Score	可接受值域 Desired value
分子量 Molecular Weight	300.442 g/mol	<500
Log P	4.9049	<5
旋转键 Rotatable bonds	2	<10
氢键受体 Acceptors	1	<10
氢键供体 Donors	1	<5
表面积 Surface area	133.485	<140

表 6 去氢枞酸药代动力学预测数据

Table 6 Pharmacokinetic properties prediction of DHA

性质 Property	预测项目 Model name	单位 Unit	可接受值域 Desired value	DHA
吸收 Absorption	水溶性	log mol/L	-	-3.469
	Caco-2 细胞系渗透性	log Papp in 10 ⁻⁶ cm/s	>0.90	1.694
	肠道吸收性	% Absorbed	> >30	100
	皮肤渗透性	log Kp	> -2.5	-2.688
	糖蛋白底物	Yes/No	No	No
	P-糖蛋白 I 抑制剂	Yes/No	-	No
	P-糖蛋白 II 抑制剂	Yes/No	-	No
分布 Distribution	稳态分布体积	log L/kg	0.71 < VD _{ss} < 2.81	-0.661
	血浆未结合分数	Fu		0
	血脑屏障渗透性	log BB	<0.3	0.037

续表 6 (Continued Tab. 6)

性质 Property	预测项目 Model name	单位 Unit	可接受值域 Desired value	DHA
	中枢神经系统穿透性	log PS	> -2	-1.455
代谢能力 Metabolism	CYP2D6 底物	Yes/No	No	No
	CYP3A4 底物	Yes/No	No	Yes
	CYP1A2 抑制剂	Yes/No	-	No
	CYP2C19 抑制剂	Yes/No	-	No
	CYP2C9 抑制剂	Yes/No	-	No
	CYP2D6 抑制剂	Yes/No	-	No
	CYP3A4 抑制剂	Yes/No	-	No
排泄 Excretion	总清除率	log mL · min ⁻¹ · kg ⁻¹	-	0.836
	肾 OCT2 底物	Yes/No	No	No
毒性 Toxicity	致突变性	Yes/No	No	No
	最大推荐耐受剂量	log mg · kg ⁻¹ · day ⁻¹	> 0.477	0.117
	hERG I 抑制剂	Yes/No	No	No
	hERG II 抑制剂	Yes/No	No	No
	大鼠口服急性毒性	mol/kg	-	2.481
	大鼠口服慢性毒性	log mg/kg_bw/day	-	2.495
	肝毒性	Yes/No	No	Yes
	皮肤过敏性	Yes/No	No	No
	梨形虫 (<i>Tetrahymena pyriformis</i>) 毒性	log µg/L	< -0.5	0.285
米诺鱼毒性	log mmol/L	> -0.3	-1.576	

作为原料的去氢枞酸对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响,为去氢枞酸抗癌衍生物的开发提供依据。利用分子对接技术预测了去氢枞酸对通路关键蛋白 PI3K, AKT 和 mTOR 的 ATP 结合位点的结合能力和结合方式,利用蛋白免疫印迹法检验去氢枞酸对通路的抑制效果,通过初步的类药性和药代动力学模拟预测去氢枞酸成为口服药物的潜力。

分子对接结果表明,去氢枞酸对各关键蛋白的 ATP 结合位点均有一定的结合能力,与 AKT3 的结合最弱,最低结合能为 -6.16 kcal/mol,与 AKT1 结合最强,最低结合能为 -8.04 kcal/mol。去氢枞酸对通路蛋白的结合能力弱于作为高效抑制剂的原配体,与我们已合成得到的去氢枞酸基 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制分子 DBDA 相近。在 ATP 结合位点中,去氢枞酸与蛋白的相互作用残基多为含疏水性残基。除了 PI3K δ 的 Lys890,其他对配体-蛋白结合起最重要作用的关键残基也均为疏水性残基。说明去氢枞酸可能通过与 ATP 结合位点的腺嘌呤区结合从而产生抑制作用^[23]。各蛋白与去氢枞酸的相

互作用残基跟原配体的有着大量的重叠,这表明去氢枞酸可能是以和原配体相近的方式与 ATP 展开竞争以抑制蛋白作用。此外,没有氢键存在的构像,如去氢枞酸与 PI3K α 、AKT2 和 AKT3,它们的结合能均高于其他存在氢键的构像,这表明氢键对去氢枞酸与蛋白的稳定结合发挥着重要作用。在去氢枞酸结合的构像中,氢键全部在羧基位置产生。但是,异丙基和苯环附近存在多个在原配体中为氢键相互作用的重叠残基。这一特征提示,在设计新的去氢枞酸基 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制剂时,可加强羧基位置的亲水能力,并在异丙基和苯环位置引入亲水基团,可能可以提高新化合物与蛋白的结合能力。

蛋白免疫印迹实验显示,SCC9 细胞经去氢枞酸处理后,PI3K 调控亚基 p85 的表达明显降低。p85 含量的减少可能使 PI3K 的生成受阻,并成为减少 PI3K 下游蛋白 AKT 磷酸化表达的因素之一。AKT 和 mTOR 的总蛋白在不同浓度的去氢枞酸作用下与空白组相比没有明显的变化,但其磷酸化蛋白表

达均明显减少,说明 AKT 和 mTOR 的磷酸化进程受到抑制。处于 mTOR 下游的 4EBP1 的磷酸化表达下降较少,可能是因为 4EBP1 还可经 MEK/Erk 信号通路激活的原因^[24]。而受 mTOR 调控的另一效应蛋白 S6K1 下游的 S6 磷酸化表达明显减少,可能是因为 mTOR 的磷酸化受阻,导致 S6K1 激活减少,从而减少了 S6 的磷酸化反应。总的来说在 SCC9 细胞内,PI3K/AKT/mTOR 信号通路的表达受到了去氢枞酸的抑制,这与分子对接中预测的结果一致。

类药性和药代动力学预测中,去氢枞酸的五倍率法则(Lipinski rule of five)分析显示,其分子量、LogP、旋转键、氢键受体、氢键供体的值均在该经验性规则要求的范围内^[25]。药代动力学预测对去氢枞酸在体内的吸收、分布、代谢、排泄和毒性等性能进行模拟,去氢枞酸通过了大部分的测试,说明它可能可以较好的在体内发挥药物作用^[19]。

总之,本研究通过分子对接预测、蛋白免疫印迹实验、类药性检验和药代动力学预测,发现去氢枞酸本身可能成为一种候选的治疗药剂,用于抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,以达到缓解肿瘤细胞耐药和抗肿瘤的目的。也可以进一步对去氢枞酸的结构进行修饰,以开发出更有效的去氢枞酸基 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制剂。

参考文献

- 1 Chen S, Rehman SK, Zhang W, et al. Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1806: 220-229.
- 2 Zhang XP, Yang HJ. Research progress on long non-coding RNAs and drug resistance of breast cancer[J]. *Clin Breast Cancer*, 2020, 20: 275-282.
- 3 Vassiliki papadimitrakopoulo MD. Development of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors and their application in personalized therapy for non-small-cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7: 1315-1326.
- 4 Alzahrani AS. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: at the bench and bedside[J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 59: 125-132.
- 5 Luo D, Ni Q, Ji A, et al. Dehydroabiatic acid derivative qc4 induces gastric cancer cell death via oncosis and apoptosis[J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 2581061.
- 6 Chen H, Qiao C, Miao TT, et al. Synthesis and biological evaluation of novel *N*-(piperazin-1-yl) alkyl-1*H*-dibenzo [*a*, *c*] carbazole derivatives of dehydroabiatic acid as potential MEK inhibitors[J]. *J Enzym Inhib Med Ch*, 2019, 34: 1544-

- 1561.
- 7 Li FY, Huang L, Li Q, et al. Synthesis and antiproliferative evaluation of novel hybrids of dehydroabiatic acid bearing 1, 2, 3-triazole moiety[J]. *Molecules*, 2019, 24: 4191-4201.
- 8 Yang YQ, Chen H, Liu QS, et al. Synthesis and anticancer evaluation of novel 1*H*-benzo [*d*] imidazole derivatives of dehydroabiatic acid as PI3K α inhibitors[J]. *Bioorg Chem*, 2020, 100: 103845.
- 9 Chen NY, Xie YL, Lu GD, et al. Synthesis and antitumor evaluation of (aryl) methyl-amine derivatives of dehydroabiatic acid-based B ring-fused-thiazole as potential PI3K/AKT/mTOR signaling pathway inhibitors[J]. *Mol Divers*, 2020, DOI: 10. 1007/s11030-020-10081-7.
- 10 Man D, Bai MH, Mu QE, et al. Mechanism of Resina Liquidambaris intervention in rheumatoid arthritis based on molecular docking[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2020, 32: 920-927.
- 11 Zhu XQ, Liu ZQ, Wang BL. Mechanism of quercetin against cervical cancer based on biomolecular network and molecular docking[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2020, 32: 23-31.
- 12 Su Z, Tian W, Li J, et al. Biological evaluation and molecular docking of rhein as a multi-targeted radiotherapy sensitization agent of nasopharyngeal carcinoma[J]. *J Mol Struct*, 2017, 1147: 462-468.
- 13 Chen H, Zhou X, Gao Y, et al. Fragment-based drug design: Strategic advances and lessons learned[J]. *Comprehensive Medicinal Chemistry III*, 2017: 212-232.
- 14 Pires DEV, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures[J]. *J Med Chem*, 2015, 58: 4066-4072.
- 15 Elmenier FM, Lasheen SD, Abouzid KAM. Phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) inhibitors as new weapon to combat cancer[J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 183: 111718.
- 16 Dey N, De P, Leyland-Jones B. PI3K-AKT-mTOR inhibitors in breast cancers: from tumor cell signaling to clinical trials[J]. *Pharmacol Therapeut*, 2017, 175: 91-106.
- 17 Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis[J]. *Nat Protoc*, 2015, 10: 845-858.
- 18 Godoy MJG, Camacho EL, Nieto JG, et al. Molecular docking optimization in the context of multi-drug resistant and sensitive EGFR mutants[J]. *Molecules*, 2016, 21: 1575.
- 19 Rehan M, Bajouh OS. Virtual screening of naphthoquinone analogs for potent inhibitors against the cancer-signaling PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120: 1328-1339.