

新型 μ 阿片受体拮抗剂的虚拟筛选及活性评价樊永正^{1,2}, 刘维国¹, 雍政^{1*}, 苏瑞斌^{1*}¹军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所/抗毒药物与毒理学国家重点实验室/神经精神药理学北京市重点实验室, 北京 100850; ²解放军联勤保障部队第991医院药械科, 湖北襄阳 441000

[中图分类号] R96

[文献标志码] A

[DOI]

10.11855/j.issn.0577-7402.2022.10.0992

[声明]

本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文]

樊永正, 刘维国, 雍政, 等. 新型 μ 阿片受体拮抗剂的虚拟筛选及活性评价[J]. 解放军医学杂志, 2022, 47(10): 992-998.

[收稿日期] 2022-01-25

[录用日期] 2022-02-18

[上线日期] 2022-03-30

[摘要] **目的** 基于计算机辅助药物设计的方法寻找具有生物活性的新型 μ 阿片受体(MOR)拮抗剂。**方法** 以MOR为靶标蛋白, 利用Schrodinger软件Glide模块对ZINC-15开源化合物数据库收录的众多化合物进行虚拟筛选, 根据分子对接分值、骨架结构、结合模式和化合物获取情况, 选择一种可能成为MOR拮抗剂的化合物; 采用抗芬太尼致小鼠急性中毒死亡模型和改善芬太尼所致大鼠呼吸抑制实验, 评价该化合物拮抗MOR的生物活性作用; 采用分子动力学模拟方法分析其与MOR之间可能的作用机制。**结果** 通过虚拟筛选获得一种肠道可吸收性和血脑屏障渗透性较强的小分子化合物A₆, 其分子对接评分与纳洛酮相当。动物实验结果显示, A₆预防给药组芬太尼致小鼠死亡的半数致死剂量(LD₅₀) [13.2(95%CI 12.0~14.5) mg/kg]是模型组[10.5(95%CI 9.6~11.5) mg/kg]的1.3倍, 且A₆预防给药组小鼠致死率明显低于模型组(P<0.05); 与模型组大鼠相比, A₆预防给药组大鼠在给予芬太尼后15、20、25 min的颈动脉血氧饱和度(SaO₂)明显升高(47.91%±3.17% vs. 62.63%±4.14%, 52.99%±3.92% vs. 69.57%±3.17%, 58.16%±2.45% vs. 77.10%±4.93%, P<0.05)。A₆与MOR复合物的分子动力学模拟显示, A₆的ASP147氨基酸残基与分子对接预测结果一致, 具有较大的结合自由能贡献。**结论** 通过虚拟筛选获得了一种结构新颖的化合物A₆, 可有效对抗芬太尼所致小鼠急性毒性死亡并改善芬太尼所致的大鼠呼吸抑制, 其作用机制可能和ASP147氨基酸残基与MOR形成氢键有关。

[关键词] μ 阿片受体; 芬太尼; 虚拟筛选; 拮抗剂Virtual screening and activity evaluation of novel μ opioid receptor antagonistsFan Yong-Zheng^{1,2}, Liu Wei-Guo¹, Yong Zheng^{1*}, Su Rui-Bin^{1*}¹Institute of Pharmacology and Toxicology/Beijing Key Laboratory of Neuropsychopharmacology/State Key Laboratory of Toxicology and Medical Countermeasures, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China²Drug and Equipment Section, the 991 Hospital of PLA Joint Logistic Support Force, Xiangyang, Hubei 441000, China

*Corresponding author. Yong Zheng, E-mail: yongzhabc@126.com; Su Rui-Bin, E-mail: ruibinsu@126.com

[Abstract] **Objective** The novel μ opiate receptor (MOR) antagonists with biological activity was searched based on computer aided drug design method. **Methods** The MOR was employed as the target protein, and the Glide module of Schrodinger software was used to virtually screen the numerous compounds included in ZINC-15 open source compound database. According to the molecular docking score, skeleton structure, binding mode and compound acquisition, one compound that may be as an antagonist was selected. The anti-fentanyl-induced acute death model of mice and the experiment of improving fentanyl-induced respiratory depression of rats were used to evaluate the biological activity of A₆ against MOR. Finally, molecular dynamics simulation method was employed to analyze the possible mechanism of MOR-A₆ interaction. **Results** The molecular docking score of compound A₆ was comparable to that of naloxone. The results of animal experiments showed that the LD₅₀ value of fentanyl-induced death of mice in A₆ prevention administration group [13.2(95%CI 12.0-14.5) mg/kg] was 1.3 times and higher than that

[作者简介] 樊永正, 硕士研究生, 主要从事神经药理学方面的研究

[通信作者] 雍政, E-mail: yongzhabc@126.com; 苏瑞斌, E-mail: ruibinsu@126.com

in model group [10.5 (95% CI 9.6-11.5) mg/kg], and the mortality of mice in experimental group was significantly lower than that in model group ($P < 0.05$); Compared with model group, the carotid oxygen saturation (SaO_2) of rats in A_6 prevention administration group increased significantly at 15, 20 and 25 min after fentanyl injection ($47.91\% \pm 3.17\%$ vs. $62.63\% \pm 4.14\%$, $52.99\% \pm 3.92\%$ vs. $69.57\% \pm 3.17\%$, and $58.16\% \pm 2.45\%$ vs. $77.10\% \pm 4.93\%$, $P < 0.05$). Molecular dynamics simulation of A_6 and MOR showed that ASP147 amino acid residue of A_6 is consistent with the predicted results of molecular docking, and has a large contribution on binding free energy. **Conclusions** A novel compound A_6 has obtained by virtual screening which could effectively antagonise fentanyl-induced acute toxic death in mice and improve fentanyl-induced respiratory depression in rats. The mechanism may be related to the hydrogen bond formation of ASP147 amino acid residue with MOR.

[Key words] μ opioid receptor; fentanyl; virtual filtering; antagonists

μ 阿片受体(μ opiate receptor, MOR)为G蛋白偶联受体家族(G protein-coupled receptors, GPCRs)的成员之一,是中重度疼痛治疗的重要药理学靶点。MOR是一种完整的跨膜蛋白,广泛分布于中枢和周围神经系统,是多种阿片类药物(如芬太尼、吗啡等)的分子作用靶点,在临床上被广泛用于术后镇痛、麻醉诱导及维持^[1],且在药物滥用、酒精依赖和胃肠运动功能障碍的治疗中也具有重要作用^[2-5]。阿片类药物在发挥效应时可能因为药物过量引起呼吸抑制而致死^[6-8],目前用于解救阿片类药物过量的首选药物是其药理性拮抗剂如纳洛酮或纳美芬等,但存在给药方式单一、剂量不可控和需长时间密切观察等缺点^[9-11]。因此,研究和开发新型的阿片类拮抗剂,对于完善阿片系统药理学研究,促进神经系统及其他疾病的防治均具有重要意义。计算机辅助药物设计(computer aided drug design, CADD)是新药研发的有力工具^[12-15],本研究利用CADD技术,为新型MOR拮抗剂的设计与研发提供数据支持和研究思路,以期获得可有效拮抗阿片类药物所致呼吸抑制的活性化合物,为临床解救阿片类药物过量或中毒提供新的选择。

1 材料与方法

1.1 主要软件、试剂和仪器 ZINC-15化合物数据库(<http://www.zinc15.docking.org/>); Discovery Studio软件(DS, 版本号: 4.0); 薛定谔软件(版本号: 4.1.2); 蛋白质数据库(Protein Data Bank, PDB); GraphPad Prism 5.0软件; Gromacs软件(版本: 2016)。化合物 A_6 购自美国MedChemExpress公司,溶于6%的DMSO双蒸水中;盐酸芬太尼购自中国湖北人福医药集团股份有限公司,溶于生理盐水中;以上药物均现配现用。MouseOx小动物脉搏血氧仪为美国斯塔尔生命科学公司(SLS-MP-00016, Starr Life Sciences, Oakmont, PA, USA)产品。

1.2 药代动力学性质预测 通过DS-2019软件的药物代动力学性质预测板块预测ZINC-15 in-vitro数据库(<http://zinc.docking.org/substances/subsets/>)收录的306 347种化合物的ADMET(absorption, distribution,

metabolism, excretion and toxicity)性质^[16],根据ADMET预测结果选择渗透性和可吸收性非常高的小分子化合物用于下一步的分子对接。

1.3 分子对接 从PDB下载MOR与吗啡拮抗剂 β -氟乐曲胺(β -FNA)晶体结构复合物(PDBID: 4DKL)。采用Schrodinger 2018-1软件的Glide模块进行分子对接;利用蛋白质准备向导(protein preparation wizard)模块补全受体缺失的原子和氨基酸残基并进行能量最小化;以原有吗啡拮抗剂配体 β -FNA为中心并设置为对接口袋,依托LigPrep计算候选化合物的三维结构,并依次通过HTVS、SP和XP筛选。分子对接完成后,为了评价其结果的准确性和可靠性,将纳洛酮(已知的MOR特异性拮抗剂)与MOR进行分子对接,并以其对接分值(docking score)为参照,筛选对接分值接近或高于纳洛酮的化合物,并一一分析蛋白与配体之间的相互作用及结合模式。

1.4 实验动物 雄性昆明小鼠83只,体重18~22 g,雄性SD大鼠10只,体重180~220 g,均为SPF级,购自北京华阜康生物科技股份有限公司[实验动物生产许可证号: SCXK(京)2019-0008]。在标准实验室条件下,将动物饲养于覆盖有洁净垫料的笼子中,小鼠8~10只/笼,大鼠3~5只/笼,室温控制在 25 ± 1 °C, 12 h/12 h光/暗循环,湿度40%~60%;动物自由摄取食物和水。实验前动物至少适应性饲养3 d。所有操作均按照军事医学研究院实验动物管理与使用委员会的要求进行(批准文号: AMMS-06-2019-003)。

1.5 小鼠急性毒性实验 83只雄性昆明小鼠随机分为8组:第1~4组为模型组(芬太尼组),每组10只;第5~8组为 A_6 预防给药(A_6 +芬太尼)组,其中第6组13只,其他各组均为10只。模型组小鼠尾静脉注射6% DMSO双蒸水溶液(0.1 ml/10 g),5 min后分别经尾静脉注射8.0、10.0、12.5、15.6 mg/kg芬太尼。 A_6 预防给药组小鼠经尾静脉注射10 mg/kg A_6 ,5 min后分别经尾静脉注射10.0、12.5、15.6、19.5 mg/kg芬太尼。给药体积均为0.1 ml/10 g。在给药24 h内,观察小鼠主要中毒症状,死亡时间,

濒死前的反应、外观、行为、对刺激的反应、分泌物、排泄物等指标,记录小鼠存活情况,采用Bliss法^[17-18]计算各组小鼠的致死率和芬太尼的半数致死剂量(LD₅₀)值。致死率(%)=(死亡数/样本总数)×100%。

1.6 大鼠脉搏血氧实验 SD大鼠10只,随机分为模型组和A₆预防给药组,每组5只。模型组静脉注射15% DMSO、10% 聚山梨酯-80的双蒸水溶液,5 min后静脉给予50 μg/kg芬太尼;A₆预防给药组静脉给予5 mg/kg A₆+15% DMSO、10%聚山梨酯-80的双蒸水溶液,5 min后静脉给予50 μg/kg芬太尼。给药体积均为0.1 ml/100 g。两组分别在给予芬太尼后0、5、15、20、25和30 min共6个时间点采用MouseOx小动物脉搏血氧仪检测大鼠颈动脉血氧饱和度(O₂ Saturation, SaO₂)。该仪器采用无创、实时的方法检测大鼠颈动脉SaO₂值。操作方法如下:将红外脉搏血氧仪传感器MouseOx Plus颈动脉夹放置于大鼠颈部两侧,将大鼠轻置于透明有机玻璃容器中,传感器将数据转换并在计算机界面上显示SaO₂、心率、呼吸频率和其他随时间变化的测量值。测量前大鼠戴上颈动脉夹自由活动至少30 min以适应环境,随后开始测量并记录15 s有效SaO₂数值。大鼠在清醒状态下采用清醒模式测定SaO₂,注射芬太尼后采用麻醉模式测定SaO₂。

1.7 分子动力学模拟(molecular dynamics simulation, MD) 使用GROMACS 5.1.4软件模拟A₆和MOR的动态变化,模拟时间为80 ns,采用AMBER ff99SB力场,使用AMBER程序的GAFF力场准备配体拓扑文件。利用TIP3P水分子填充周期性盒子,并向体系中添加氯离子以保持电中性。系统通过最速下降法快速调整到能量较低的构象。以5000步或F_{max}<10为条件进行能量最小化,随后进行100 ps的NVT和1 ns的NPT预平衡,时间步长为2 fs。在预平衡过程中分别采用Nose-Hoover和Berendsen进行温度和压力耦合。最后在NPT系统中通过Nose-Hoover温度和Parrinello-Rahman压力耦合进行成品MD模拟。通过体系的稳定性分析并结合自由能大小预测,考察A₆可能作用的关键氨基酸残基。

1.8 统计学处理 采用GraphPad Prism 5.0软件进行统计学处理。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用非配对t检验,多组间比较采用双因素方差分析和Bonferroni post-hoc检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ADMET性质预测 通过DS-2019软件ADMET性质预测功能对ZINC-15 in-vitro数据库中的化合物

进行筛选,得到97 151种肠道可吸收性较好、血脑屏障透过性较高的小分子化合物(图1,标记为黄色点状的化合物)。预测评估筛选获得的多种化合物,其肠道可吸收性和血脑屏障渗透性结果见图1。

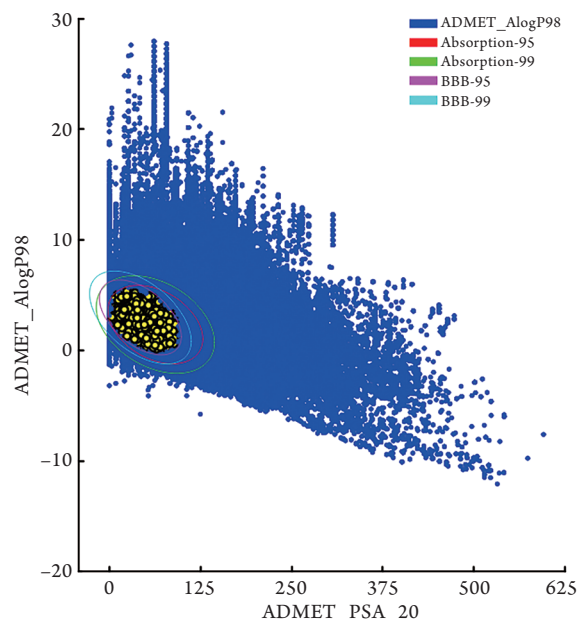


图1 ZINC-15 in-vitro数据库中众多小分子化合物的ADMET性质预测结果

Fig.1 Predicted results of ADMET property of micromolecule compounds

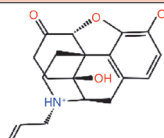
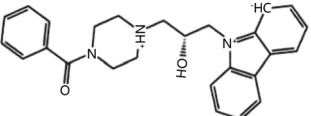
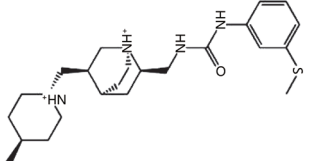
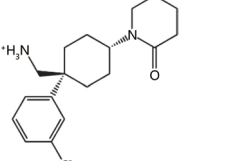
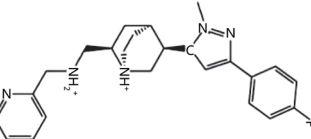
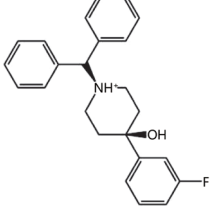
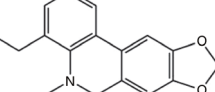
ADMET. 药物的吸收、分配、代谢、排泄和毒性;绿色椭圆中99%的小分子化合物的人体肠道吸收为中等,红色椭圆中95%的小分子化合物的人体肠道吸收为良好;蓝色椭圆中99%的小分子化合物的血脑屏障透过性高,品红色椭圆中95%的小分子化合物的血脑屏障透过性非常高

2.2 分子对接 分子对接后,根据评分高低、化合物的骨架结构、作用力,采用聚类分析、目视决策等原则从中选出较优的6种化合物作为代表。除了各种疏水性相互作用(本研究未重点关注)外,分子对接筛选结果见表1,各化合物与MOR的结合模式见图2。

2.3 小鼠急性毒性实验 根据虚拟筛选对接评分情况,通过目视分子结构、相互作用及化合物可获取性等综合考虑,选用化合物A₆进行生物活性评价,考察其对抗芬太尼致小鼠急性毒性死亡情况。模型组第2、3组小鼠24 h内的急性毒性致死率分别为40%和90%,A₆预防给药的第5、6组小鼠24 h致死率分别为0和46%,A₆预防给药小鼠致死率明显低于同剂量芬太尼模型组,差异有统计学意义(P<0.05)(表2)。模型组或A₆预防给药组小鼠尾静脉注射致死剂量的芬太尼后,小鼠濒死反应多为惊厥、运动失调、腹式呼吸、跳跃、口周毛潮湿、背毛杂乱等中枢神经、自主神经、感觉运动、呼吸循

表1 通过分子对接筛选的6种化合物与纳洛酮的结构信息

Tab.1 Structural information of naloxone and 6 compounds screened by molecular docking

化合物	结构式	对接评分	氢键/芳香氢键	盐桥	$\pi-\pi$	π -阳离子	卤素键
纳洛酮		-7.90	ASP147	ASP147	-	-	-
A ₁		-8.33	ASP147、CYS217	ASP147	HID297、TYR326	-	-
A ₂		-8.32	ASP147	ASP147	-	HID297	-
A ₃		-8.46	ASP147	ASP147	TYR326	-	ASN150
A ₄		-7.47	ASP147、HID297	ASP147	-	-	-
A ₅		-7.42	ASP147、ILE322	ASP147	TYR326、HID297	TYR148	-
A ₆		-7.48	ASP147、ILE322	-	TYR326	-	-

- 不存在相互作用力

表2 A₆预防给药对芬太尼致小鼠急性中毒死亡的影响Tab.2 Preventive effect of A₆ on fentanyl-induced acute toxic death in mice

组别	芬太尼剂量 (mg/kg, iv)	剂量对数(Log)	小鼠数(例)	死亡数(例)	致死率(%)
模型组					
1	8.0	0.9	10	0	0
2	10.0	1.0	10	4	40
3	12.5	1.1	10	9	90
4	15.6	1.2	10	10	100
A ₆ 预防给药组					
5	10.0	1.0	10	0	0 ⁽¹⁾
6	12.5	1.1	13	6	46 ⁽²⁾
7	15.6	1.2	10	8	80
8	19.5	1.3	10	10	100

A₆预防给药组各组预防给药A₆(10 mg/kg, iv); 与第2组比较, (1) $P<0.05$; 与第3组比较, (2) $P<0.05$

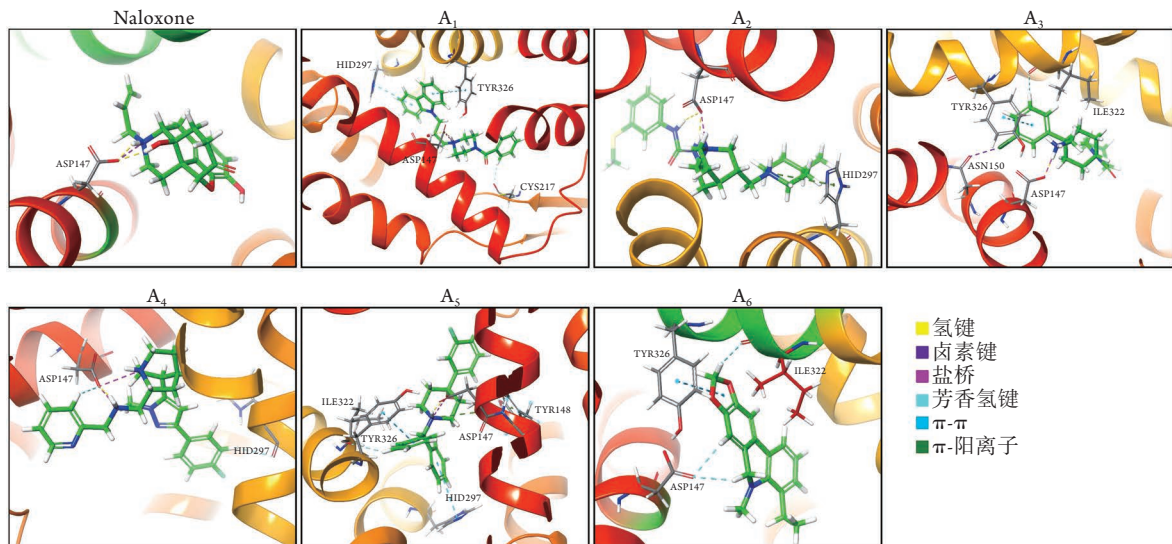


图2 通过分子对接筛选的6种化合物及纳洛酮与MOR的结合模式预测

Fig.2 Predicted binding modes of naloxone and 6 compounds screened by molecular docking with MOR
Naloxone. 纳洛酮; MOR. μ 阿片受体

环系统中毒体征或症状。根据Bliss法计算, 模型组小鼠芬太尼的 $LD_{50}=10.5(95\text{CI } 9.6\sim 11.5)$ mg/kg, $LD_5=8.5$ mg/kg, $LD_{95}=12.9$ mg/kg; A_6 预防给药组小鼠芬太尼的 $LD_{50}=13.2(95\text{CI } 12.0\sim 14.5)$ mg/kg, $LD_5=10.2$ mg/kg, $LD_{95}=17.0$ mg/kg。 A_6 预防给药组芬太尼 LD_{50} 值是模型组的1.3倍。

2.4 A_6 预防给药对芬太尼所致大鼠颈动脉 SaO_2 降低的改善作用 模型组大鼠注射芬太尼后, 颈动脉 SaO_2 明显降低, 差异有统计学意义($P<0.01$); A_6 预防给药组大鼠在芬太尼给药前5 min给予 A_6 (5 mg/kg)预处理, 与模型组相比, 在15、20、25 min三个时间点, 其颈动脉 SaO_2 明显升高($47.91\% \pm 3.17\%$ vs. $62.63\% \pm 4.14\%$, $52.99\% \pm 3.92\%$ vs. $69.57\% \pm 3.17\%$, $58.16\% \pm 2.45\%$ vs. $77.10\% \pm 4.93\%$, $P<0.05$)(图3)。

2.5 A_6 与MOR复合物的分子动力学模拟 采用分子动力学模拟分析化合物 A_6 与MOR的动态结合模式特征。通过分子动力学模拟的轨迹分析获得各体系

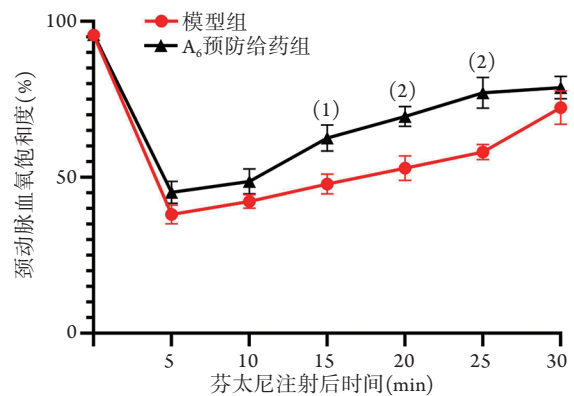


图3 A_6 预防给药对芬太尼所致大鼠颈动脉 SaO_2 降低的改善作用

Fig.3 Preventive effect of A_6 on improving the low level of carotid SaO_2 induced by fentanyl in rats
与模型组比较, (1) $P<0.05$, (2) $P<0.01$

的均方根偏差(RMSD)值和均方根涨落(RMSF)值及各氨基酸残基的结合自由能(图4)。 A_6 体系的RMSD值在5~6 ns时迅速增加到0.9 nm, 然后逐渐回落,

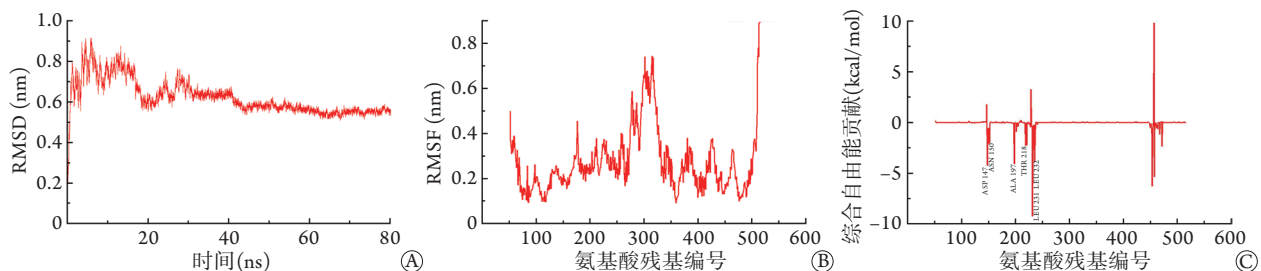


图4 分子动力学模拟化合物 A_6 与MOR的动态结合模式

Fig.4 The dynamic binding mode of compound A_6 to MOR simulated by molecular dynamics

RMSD. 均方根偏差; RMSF. 均方根涨落; A. 骨架原子RMSD值随时间的变化; B. 各氨基酸残基的RMSF值; C. 各氨基酸残基的结合自由能

在40 ns后基本稳定在0.6 nm左右,提示该体系达到平衡,且RMSF值基本都小于0.6 nm。提示该体系在模拟时间内均达到平衡,即80 ns的模拟时间使体系达到平衡,可以基于后40 ns的轨迹计算结合自由能。MOR各残基对结合自由能的贡献见图4C。关键残基的结合自由能贡献分析显示,A₆的ASP147氨基酸残基与分子对接预测结果一致,具有较大的结合自由能贡献。此外,A₆可能还与ALA197、THR218、LEU231和LEU232等氨基酸残基存在额外的相互作用,特别是LEU231氨基酸残基与MOR结合的自由能贡献较大。

3 讨 论

MOR作为一个突出的药物靶标,长期受到广泛关注,因为其可在介导各种神经生理学和行为反应方面发挥关键作用,包括疼痛、奖赏和成瘾行为以及胃肠疾病等^[2-3]。阿片类药物引起的呼吸抑制是一种严重的并发症,虽然在麻醉应用过程中可通过呼吸监测及时发现并进行纠正,然而在治疗急慢性疼痛的过程中,并非所有呼吸抑制病例都能被及时发现。现有的MOR拮抗剂纳洛酮存在给药方式单一、戒断症状严重等缺点,因此,业界一直关注MOR新型拮抗配体的设计和发现,因为这些配体可能具有开发新的、更安全的治疗方案的潜力^[19-21]。

CADD是提高新药研发效率、缩短药物研发周期的有力工具,包含虚拟筛选、同源建模、定量构效关系构建和动力学模拟等多种技术手段。而虚拟筛选是指导先导化合物发现与优化的核心技术之一,其通过模型的建立以及对计算结果的分析,预测受体靶标与配体分子之间的相互作用,从而在数量众多的化合物中找出具有潜力的先导化合物,而且CADD能显著降低药物的开发成本(可达50%)^[22-24]。目前已有多种药物通过该项技术开发成功并上市,如抗流感药物奥司他韦和扎那米韦、抗HIV感染药茚地那韦以及慢性粒细胞白血病治疗药伊马替尼等^[25-28]。通过分子对接、虚拟筛选等CADD手段,使规模化、科学化、快速化分析配体—受体和结构—功能关系成为可能,从而有助于推进阿片类相关治疗药物的研发^[29]。

在本研究中,我们基于MOR晶体结构展开了药物设计工作,由于4DKL中的配体β-FNA与LYS233残基及蛋白形成了共价键,而共价键对接不在我们本次研究范围,因此不适于作为本研究的阳性对照参考。实际分子对接和虚拟筛选中我们采用阳性对照物纳洛酮与MOR蛋白进行分子对接打分并作为参考,以评价对接方法的准确性,同时为了避免诱导契合现象降低分子对接结果的准确性,

我们根据目视决策,挑选并考察化合物A₆拮抗芬太尼致小鼠急性毒性死亡和改善大鼠动脉血氧的作用,结果显示,A₆这个结构新颖、可拮抗MOR的小分子化合物与阳性对照药纳洛酮虚拟筛选对接打分值接近,可显著拮抗芬太尼致小鼠急性毒性死亡和致大鼠呼吸抑制的作用。因此,动物活性实验进一步提示这种新的化合物可能具有一定的MOR拮抗活性。随后在分子动力学模拟过程中,依次采用RMSD值、RMSF值、结合自由能分解等对蛋白复合物的动态结合情况进行评价分析,考察其可能的作用结合模式。对A₆关键残基的结合自由能贡献大小分析显示,A₆的ASP147氨基酸残基与分子对接预测结果一致,具有较大的结合自由能贡献;此外,A₆的ALA197、THR218、LEU231和LEU232等氨基酸残基可能还与MOR存在额外的相互作用,其中LEU231氨基酸残基与MOR结合的自由能贡献较大,推测可能是与该氨基酸残基形成了氢键或盐桥等较强的相互作用。因此,可能需要更多的结构信息,尤其是其他阿片类配体与MOR复合物的结构信息,以进一步阐明不同结构的多种配体与MOR结合的分子机制。

化合物A₆的结构与药物化学数据库(ChEMBL)中已知的MOR激动剂或拮抗剂结构不同, PubChem也未见其是MOR有关配体的报道。相对纳洛酮等传统拮抗剂而言,A₆结构较为简单,便于进行相关的结构修饰和改造,这为进一步的化学结构优化和开发新的MOR神经药理学工具提供了可能;另外,对于识别与MOR相互作用的新结构化合物,进而发展治疗中枢神经系统和其他系统疾病的新方法,以及完善MOR系统的药理学研究也有一定的指导意义。

由于目前的分子虚拟筛选对接和动力学模拟理论还有待完善,加之各种对接程序,包括开源软件和商业软件数量众多且性能不一,因此虚拟筛选的成功率和预测的精准性往往参差不齐。本研究中,我们通过小鼠和大鼠动物实验初步验证了A₆可能具有一定的MOR拮抗活性,也采用分子动力学模拟分析了A₆与MOR的拮抗结合模式,但其靶向MOR的拮抗特性可能还需从细胞水平上进一步补充完善并验证。因此,下一步我们拟将虚拟筛选得到的化合物A₆通过MOR的HTRF-cAMP功能性验证或放射性配基结合实验对其拮抗特性进行再次确证,进一步完善A₆在细胞水平上拮抗MOR活性的评价内容^[30-31]。在此基础上通过构建MOR定点氨基酸突变体来预测A₆与其关键氨基酸残基的结合位点及结合模式,为后续有针对性地进行精准筛选与改构靶标明确、结合作用强、安全性高的新型MOR拮抗剂

提供理论基础。

综上所述,本研究利用CADD手段设计获得了新型MOR拮抗剂A₆, A₆是有一定前途的新型先导化合物;“虚拟筛选模式研究—动物水平活性验证—动力学模拟作用分析—优化改造先导化合物”这一模式,对于开发新型MOR拮抗剂可能具有一定的指导和借鉴意义。

【参考文献】

- [1] Zhang XY, Zhang Y, Sun YJ, *et al.* Application of bilateral transverse thoracic muscle plane block(modified approach) combined with general anesthesia in off-pump coronary artery bypass grafting[J]. *Med J Chin PLA*, 2020, 45(8): 840-844. [张霄燕, 张瑜, 孙莹杰, 等. 胸横肌平面阻滞(改良入路)复合全麻在非体外循环冠状动脉旁路移植术中的应用[J]. *解放军医学杂志*, 2020, 45(8): 840-844.]
- [2] Pasternak GW. Opiate pharmacology and relief of pain[J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(16): 1655-1661.
- [3] Spetea M, Asim MF, Wolber G, *et al.* The μ opioid receptor and ligands acting at the μ opioid receptor, as therapeutics and potential therapeutics[J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19(42): 7415-7434.
- [4] Fürst S, Hosztafi S. The chemical and pharmacological importance of morphine analogues[J]. *Acta Physiol Hung*, 2008, 95(1): 3-44.
- [5] Ohgi Y. Alcohol dependence and opioid receptor - pharmacological profile of nalmefene[J]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 2020, 155(3): 145-148.
- [6] Kolodny A, Courtwright DT, Hwang CS, *et al.* The prescription opioid and heroin crisis: a public health approach to an epidemic of addiction[J]. *Annu Rev Public Health*, 2015, 36: 559-574.
- [7] Volkow ND, McLellan AT. Opioid abuse in chronic pain -- misconceptions and mitigation strategies[J]. *N Engl J Med*, 2016, 374(13): 1253-1263.
- [8] Kharasch ED, Brunt LM. Perioperative opioids and public health[J]. *Anesthesiology*, 2016, 124(4): 960-965.
- [9] van Dorp E, Yassen A, Dahan A. Naloxone treatment in opioid addiction: the risks and benefits[J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2007, 6(2): 125-132.
- [10] Dahan A, Aarts L, Smith TW. Incidence, reversal, and prevention of opioid-induced respiratory depression[J]. *Anesthesiology*, 2010, 112(1): 226-238.
- [11] Dadpour B, Gholoobi A, Tajoddini S, *et al.* Acute myocardial infarction following naltrexone consumption: A case report[J]. *Emerg (Tehran)*, 2017, 5(1): e45.
- [12] Vyas R, Karthikeyan M, Nainaru G, *et al.* Pharmacophore and docking based virtual screening of validated *Mycobacterium tuberculosis* targets[J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2015, 18(7): 624-637.
- [13] Fischer A, Smieško M, Sellner M, *et al.* Decision making in structure-based drug discovery: Visual inspection of docking results[J]. *J Med Chem*, 2021, 64(5): 2489-2500.
- [14] Wang Z, Sun H, Yao X, *et al.* Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein-ligand complexes: the prediction accuracy of sampling power and scoring power[J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2016, 18(18): 12964-12975.
- [15] Scotti L, Scotti MT. Recent advancement in computer-aided drug design[J]. *Curr Pharm Des*, 2020, 26(15): 1635-1636.
- [16] Vora J, Patel S, Sinha S, *et al.* Molecular docking, QSAR and ADMET based mining of natural compounds against prime targets of HIV[J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2019, 37(1): 131-146.
- [17] Yang D, Huang WY, Li YQ, *et al.* Acute and subchronic toxicity studies of rhein in immature and d-galactose-induced aged mice and its potential hepatotoxicity mechanisms[J]. *Drug Chem Toxicol*, 2022, 45(3): 1119-1130.
- [18] DePass LR. Alternative approaches in median lethality (LD50) and acute toxicity testing[J]. *Toxicol Lett*, 1989, 49(2-3): 159-170.
- [19] Shi JP, Li SX, Ma ZL, *et al.* Acute and sub-chronic toxicity of tetrandrine in intravenously exposed female BALB/c mice[J]. *Chin J Integr Med*, 2016, 22(12): 925-931.
- [20] Bliss CI. The toxicity of poisons applied jointly[J]. *Ann Appl Biol*, 2008, 26(3): 585-615.
- [21] Seidel T, Schuetz DA, Garon A, *et al.* The pharmacophore concept and its applications in computer-aided drug design[J]. *Prog Chem Org Nat Prod*, 2019, 110: 99-141.
- [22] de Araújo RSA, da Silva-Junior EF, de Aquino TM, *et al.* Computer-aided drug design applied to secondary metabolites as anticancer agents[J]. *Curr Top Med Chem*, 2020, 20(19): 1677-1703.
- [23] Baig MH, Ahmad K, Roy S, *et al.* Computer aided drug design: success and limitations[J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(5): 572-581.
- [24] Yu W, MacKerell AD Jr. Computer-aided drug design methods[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1520: 85-106.
- [25] Del Poeta G, Postorino M, Pupo L, *et al.* Venetoclax: Bcl-2 inhibition for the treatment of chronic lymphocytic leukemia[J]. *Drugs Today (Barc)*, 2016, 52(4): 249-260.
- [26] Patel H, Kukol A. Integrating molecular modelling methods to advance influenza A virus drug discovery[J]. *Drug Discov Today*, 2021, 26(2): 503-510.
- [27] Mallipeddi PL, Kumar G, White SW, *et al.* Recent advances in computer-aided drug design as applied to anti-influenza drug discovery[J]. *Curr Top Med Chem*, 2014, 14(16): 1875-1889.
- [28] Selvaraj C, Singh P, Singh SK. Molecular modeling studies and comparative analysis on structurally similar HTLV and HIV protease using HIV-PR inhibitors[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2014, 34(5): 361-371.
- [29] Beuming T, Lenselink B, Pala D, *et al.* Docking and virtual screening strategies for GPCR drug discovery[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1335: 251-276.
- [30] Nørskov-Lauritsen L, Thomsen AR, Bräuner-Osborne H. G protein-coupled receptor signaling analysis using homogenous time-resolved Förster resonance energy transfer (HTRF®) technology[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(2): 2554-2572.
- [31] Flanagan CA. GPCR-radioligand binding assays[J]. *Methods Cell Biol*, 2016, 132: 191-215.

(责任编辑: 蒋铭敏)