

## 基于分子对接、定量构效关系和分子动力学研究筛选小分子 SIRT1 抑制剂

刘红<sup>1,2</sup>, 曾明辉<sup>1,2</sup>, 何俊<sup>2</sup>, 欧阳亮<sup>2\*</sup>

(1. 邛崃市医疗中心医院药学部, 四川邛崃 611530; 2. 四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室, 四川成都 610041)

**摘要:** 为了寻找和发现靶向 SIRT1 的治疗 AML 的新型先导化合物, 本研究利用分子对接与 MM-GBSA 结合自由能计算进行虚拟筛选, 从 231 511 个天然小分子类药分子库中筛选出 8 个潜在的 SIRT1 抑制剂, 通过对已有的 SIRT1 抑制剂分子作为训练集和测试集进行 QSAR 建模, 对筛选出的潜在 SIRT1 抑制剂分子进行活性预测, 随后进行分子动力学模拟验证这些潜在抑制剂与 SIRT1 蛋白的结合模式与稳定性, 最后通过 OCI-AML2、OCI-AML3 和 MV4-11 三种 AML 细胞增殖实验和 SIRT1 酶活性验证了这些分子的生物活性, 发现其中 5 个分子对 3 种 AML 细胞具有不同程度的抑制作用, 其中活性最强的化合物 ZINC000001774455 对 AML 细胞 OCI-AML2 的  $IC_{50}$  达到  $2.29 \pm 0.09 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下对 SIRT1 抑制率为 65.33%, 可作为 SIRT1 抑制剂先导化合物进行结构修饰, 为开发新的 AML 治疗药物奠定了前期基础。

**关键词:** 沉默信息调节因子 1; 分子对接; 定量构效关系; 分子动力学; 抑制剂

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)02-0545-08

## Identification of small molecule sirtuin-1 inhibitors for treating acute myeloid leukemia based on molecular docking, quantitative structure-activity relationships and molecular dynamics

LIU Hong<sup>1,2</sup>, ZENG Ming-hui<sup>1,2</sup>, HE Jun<sup>2</sup>, OUYANG Liang<sup>2\*</sup>

(1. Department of Pharmacy, Qionglai Medical Center Hospital, Qionglai 611530, China;

2. State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** The purpose of this study was to discover novel inhibitors of sirtuin-1 (SIRT1) that could be used in the treatment of acute myeloid leukemia (AML). Eight potential SIRT1 inhibitors were identified from 231 511 natural drug-like molecules by virtual screening-based molecular docking and molecular mechanics-generalized Born surface area (MM-GBSA) calculation of binding free energies. Using existing SIRT1 inhibitor molecules as training and test sets, a series of quantitative structure-activity relationship models were established, and the best quantitative structure-activity relationship (QSAR) model was used to predict the  $IC_{50}$  of these 8 potential inhibitor molecules for SIRT1. Subsequently, molecular dynamics simulations were performed to verify the binding mode and stability of these complexes of potential inhibitors and SIRT1 protein. Finally, the activity of these potential SIRT1 inhibitors was verified by cell proliferation assays of OCI-AML2, OCI-AML3 and MV4-11 cells and SIRT1 enzyme activity assays, and it was found that 5 compounds could inhibit AML cell proliferation. Among them, the most active compound, ZINC000001774455, had an  $IC_{50}$  of  $2.29 \pm 0.09 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  with OCI-AML2 cells, and

收稿日期: 2020-09-08; 修回日期: 2020-10-09.

基金项目: 四川省应用基础研究项目 (2019YJ0108); 国家自然科学基金面上项目 (81673290).

\*通讯作者 E-mail: ouyangliang@scu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1461

at a concentration of  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , the inhibitory ratio of this compound on SIRT1 protein activity was 65.33%. ZINC00001774455 can be used as a lead compound for the development of new AML treatments.

**Key words:** SIRT1; molecular docking; quantitative structure-activity relationship; molecular dynamics; inhibitor

去乙酰化酶 (sirtuins) 是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 依赖的蛋白脱乙酰基酶, 从酵母到哺乳动物细胞都高度保守。由于它们在细胞中分布位置及构成的差异, 使其具有了不同酶的活性, 在生物体内发挥不同的功能。SIRT1 主要定位于细胞核, 也有少部分特殊类型的细胞定位于细胞质, 参与胰腺、肝脏、睾丸、卵巢、肌肉和脂肪组织的代谢调控。SIRT2 位于细胞质, SIRT3、SIRT4、SIRT5 位于线粒体, SIRT6 和 SIRT7 位于细胞核, 分别发挥了去乙酰化活性、去丙二酰基酶活性、去琥珀酰基酶活性、ADP-核糖基转移酶活性等。哺乳动物细胞中的 7 种去乙酰化酶 (SIRT1~SIRT7) 在衰老、糖尿病、心血管疾病和癌症方面具有重要的功能意义<sup>[1]</sup>。SIRT1 是哺乳动物沉默信息调节因子 2 (SIR2) 家族 (SIRT11-7) 中的一员, 对烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD<sup>+</sup>) 依赖的组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 有激活作用<sup>[2]</sup>, 是目前研究最广泛的去乙酰化酶, 它能使各种组蛋白和非组蛋白底物 (p53、c-MYC 和 FOXO) 脱乙酰, 从而调节各种生命过程, 比如 DNA 修复、代谢、细胞周期和生存<sup>[3-7]</sup>。早期研究认为肿瘤抑制因子 p53 是第一个非组蛋白 SIRT1 去乙酰化酶靶点: 在如 DNA 损伤等压力条件下, p53 的去乙酰化减弱其反式激活依赖的凋亡, 从而促进肺癌细胞存活<sup>[8,9]</sup>。同样, 在肺癌细胞系中, E2F1 也被发现受到 SIRT1 的负调控<sup>[10]</sup>。因此, SIRT1 被认为是一种致癌蛋白。然而, 最近的研究揭示了 SIRT1 在干细胞转化中的作用, 包括它在促进 DNA 的忠实修复和抑制癌基因转化中的作用, 显示 SIRT1 可以作为某些癌症的抑癌剂靶标<sup>[5]</sup>。

急性髓性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是一类由造血细胞发生遗传学改变从而发展为高度异质性的血液系统恶性肿瘤, 是成人急性白血病中最常见的一种类型, 约占成人白血病的 70%。AML 主要特征是骨髓、血液及其他造血器官中的造血祖细胞/造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSc) 恶性增殖失控和分化障碍<sup>[11]</sup>。AML 极易复发, 目前复发难治性 AML 患者的最佳单一治疗方式是挽救性治疗达到取得完全缓解后进行同种异体干细胞移植 (allo-HSCT), 移植后再复发的患者, 目前几乎不可能治愈<sup>[12]</sup>。研究表明, 白血病细胞起源于一种叫做白血病干细胞 (LSCs) 的原始造血前体细胞。LSCs 是自我更新白血病细胞的一

小部分, 在 CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> 亚群中富集, 在常规治疗后持续存在, 被认为是白血病复发的来源<sup>[13,14]</sup>。研究表明 AML 骨髓中的 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 细胞中的 SIRT1 蛋白水平较正常对照组增加<sup>[13]</sup>。大样本分析显示, AML 患者单核细胞中 SIRT1 表达与正常对照组相比, 存在持续过度表达的情况<sup>[15]</sup>。SIRT1 能够促进 PI3K/beclin1 并介导应激诱导的 ESCs 自噬。这些研究揭示了 SIRT1 在增强自噬, 最终导致细胞凋亡抵抗中的重要作用<sup>[16,17]</sup>。用药物抑制 SIRT1 可以提高 p53 乙酰化水平, 导致 p53 靶基因表达增加, 细胞生长受到抑制, 并增强对酪氨酸激酶抑制剂治疗的敏感性<sup>[18]</sup>。目前对 SIRT1 在肿瘤干细胞中的作用研究非常广泛<sup>[19]</sup>, 这些结果表明 SIRT1 在 AML 干细胞中重要作用, 并提示抑制 SIRT1 可能是精确靶向 AML 干细胞的一种潜在治疗策略。寻找和发现结构多样性的新型 SIRT1 抑制剂先导化合物是开发治疗 AML 药物的重要工作。

虽然已有不少 SIRT1 抑制剂分子报道, 从文献报道的已有的 SIRT1 抑制剂结构来看, 分子结构类型多样 (图 1)。三环类、寡肽、环肽、苯并咪唑、吡啶等多种分子结构片段都出现在 SIRT1 抑制剂中, 大部分抑制剂为人工合成分子, 天然产物结构较少。目前已报道的 SIRT1 抑制剂分子均处于较为初级的临床前研究, 还未有进入临床研究的候选药物。不断寻找和发现结构新颖和具有良好成药性的 SIRT1 抑制剂是开发 SIRT1 靶向药物的基础, 其中, 利用天然产物分子结构多样性的特点, 从中寻找和发现新型 SIRT1 抑制剂先导化合物不失为一种良好的策略。

本文利用基于分子对接技术与广义波恩表面积 (MM-GBSA) 模型计算结合自由能的手段, 开展 SIRT1 抑制剂的虚拟筛选, 从约 30 万个天然产物分子中筛选出 8 个潜在的抑制剂分子。同时利用已有的 SIRT1 抑制剂分子建立定量构效关系 (QSAR) 模型, 并利用 QSAR 模型预测了虚拟筛选获得的潜在抑制剂分子的 IC<sub>50</sub> 值, 最后, 利用分子动力学模拟手段, 验证了所获得的具有潜在活性的 SIRT1 抑制剂与靶蛋白结合物的稳定性, 为开发针对 SIRT1 的治疗急性髓性白血病的新型靶向小分子药物提供了潜在的先导化合物, 为进一步的药物开发提供了理论依据。

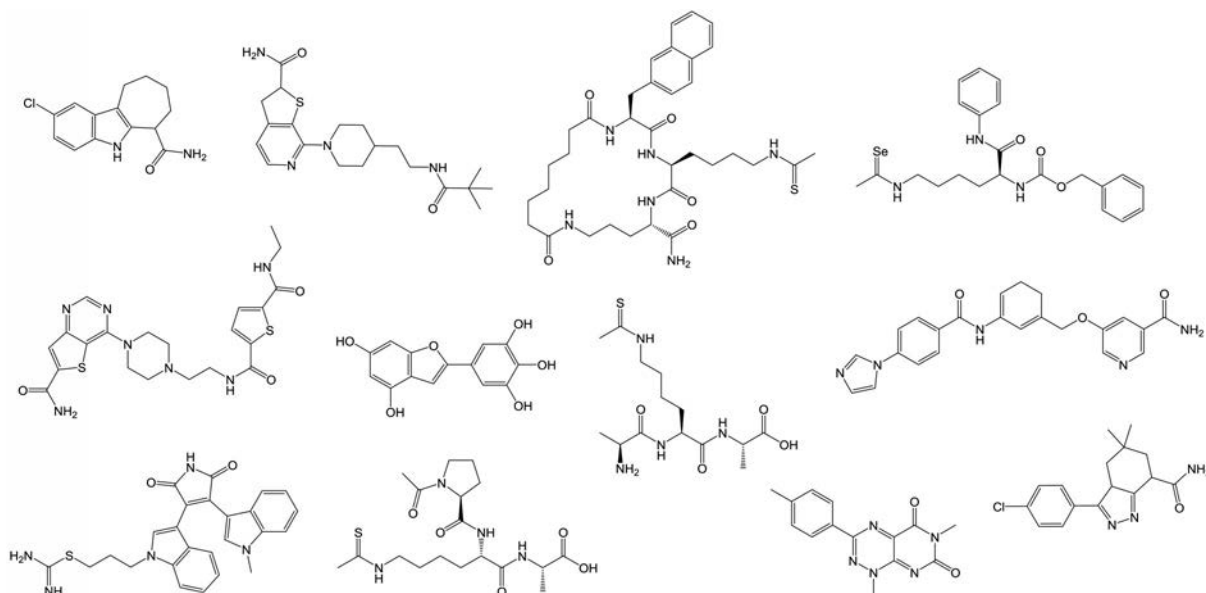


Figure 1 Molecular structures of some SIRT1 inhibitors

## 结果与讨论

### 1 分子对接与方法学验证结果

通过将 SIRT1 复合物中的抑制剂分子 **415** 按照分子对接流程, 再次对 SIRT1 蛋白活性位点, 并与晶体结构叠合比较, 计算 RMSD, 结果表明, 其重原子 RMSD = 0.11, 对接分子与晶体结构几乎完全重合 (图 2), 证明了对接方法的可靠性。

### 2 基于分子对接和 MM-GBSA 的虚拟筛选结果

通过访问网站、数据库, 收集整理了天然产物及衍生物分子 298 029 个, 经过“里宾斯基五规则”过滤, 得到 231 511 个天然类药分子。这些分子经过分子对接和 MM-GBSA 计算结合自由能, 共获得 8 个分子结合自由能超过阳性分子 **415** ( $\Delta G = -74.62 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), 即潜在活性分子 (表 1 和图 3)。其与 SIRT1 蛋白的典型结合模式见图 4。

### 3 QSAR 模型的建立、验证与预测结果

以文献中收集到的 122 个 SIRT1 抑制剂分子随机分成 108 个分子的训练集和 24 个分子的测试集。利用

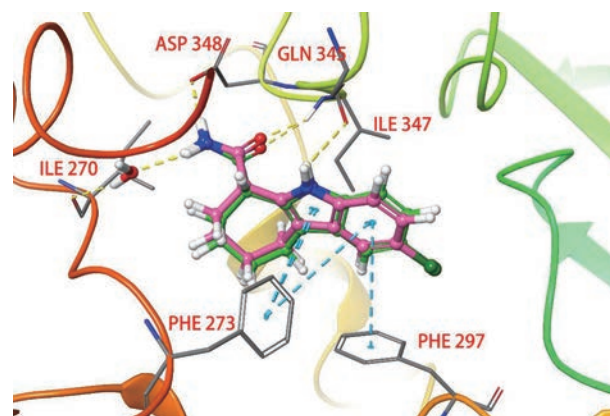
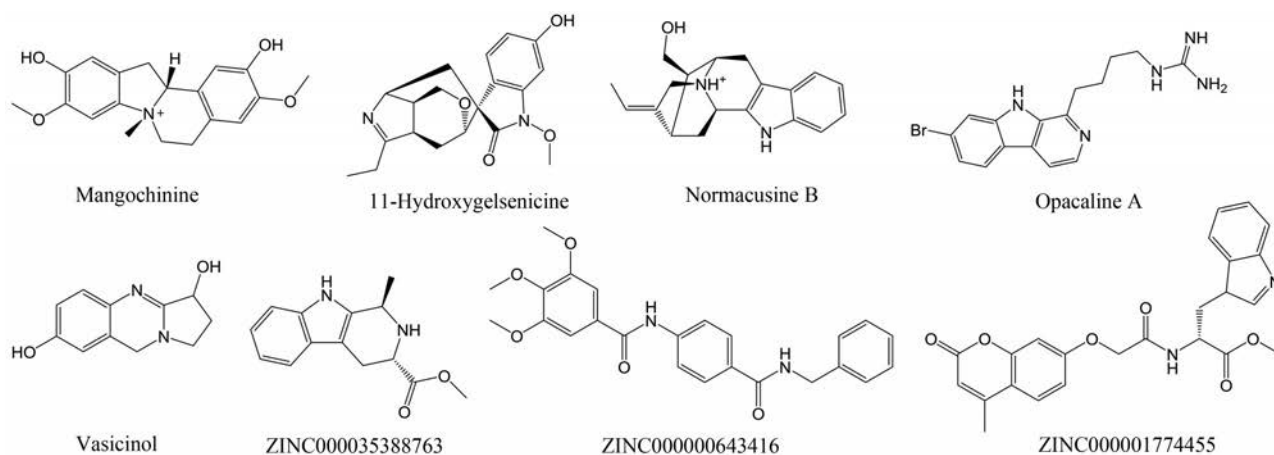


Figure 2 The contrast between the docked conformation of SIRT1 inhibitor molecule **415** and the crystal conformation, pink is the crystal conformation, green is the docked conformation, RMSD=0.11

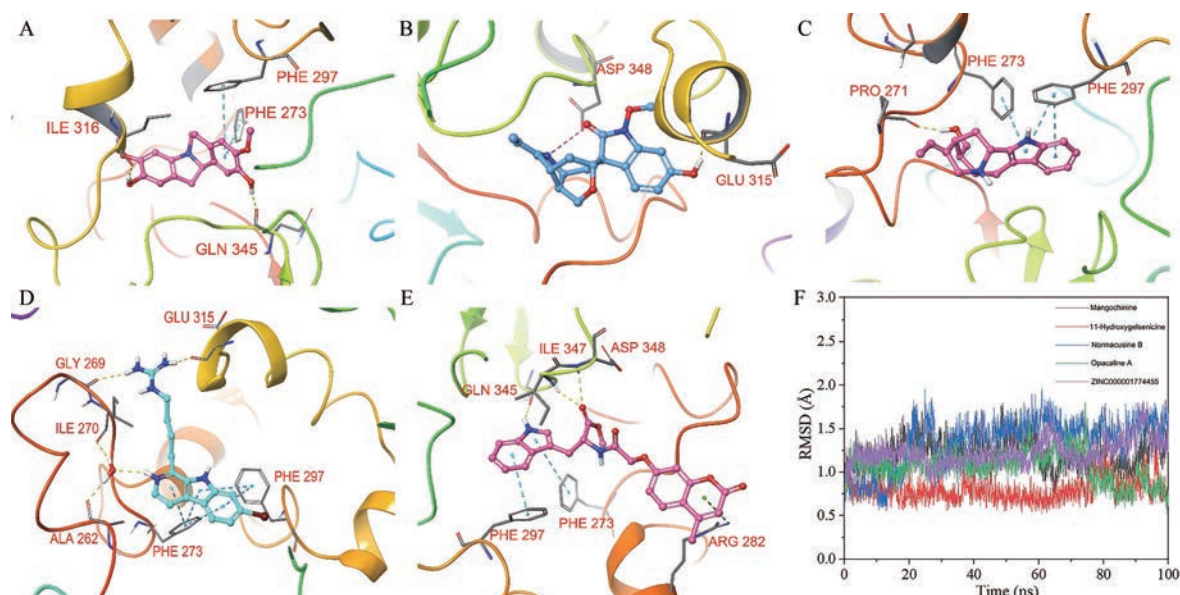
108 个分子建立的 QSAR 模型, TOP10 的 10 个模型, 均是核偏最小二乘法 (KPLS) 回归的模型, 以其中得分在 0.8 以上的有 5 个模型,  $R^2$  在 0.797 6~0.883 4 之间,  $Q^2$  在 0.794 2~0.815 1 之间 (表 2)。其中以 2D 分子指纹的 KPLS 回归算法的模型 kpls\_molprint2D\_17 表现

Table 1 Binding free energy of 8 potential inhibitors and the predicted activity by QSAR

Compound	Simplified molecular input line entry system (SMILES)	$\Delta G$ /kJ·mol <sup>-1</sup>	Predict IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup> by QSAR
Mangochinine	<chem>COC1=C(O)C=C2C([N@+](CCC3=C4C=C(O)C(OC)=C3)(C)[C@14([H])C2)=C1</chem>	-87.43	0.59
11-Hydroxygelsenicine	<chem>O=C(N(OC)C1=C2C=CC(O)=C1)[C@]32C[C@H](N=C4CC)[C@@H]5[C@H]4C[C@H]3OC5</chem>	-81.91	0.81
ZINC000001774455	<chem>COC([C@H](NC(COC1=CC2=C(C(C)=CC(O2)=O)C=C1)=O)CC3C=NC4=CC=CC=C34)=O</chem>	-80.6	2.74
Opacaline A	<chem>N=C(N)NCCCC1=NC=CC2=C1NC3=CC(Br)=CC=C32</chem>	-76.93	9.15
Vasicinol	<chem>OC1=CC=C2C(CN(CCC3O)C3=N2)=C1</chem>	-76.74	4.48
Normacusine B	<chem>C/C=C1[C@H]([C@@H]2C3)[C@H](C[C@H]1)[C@H]2CO)C4=C3C5=CC=CC=C5N4</chem>	-76.64	12.82
ZINC000000643416	<chem>COC1=C(OC)C(OC)=CC(C(NC2=CC=C(C(NCC3=CC=CC=C3)=O)C=C2)=O)=C1</chem>	-75.94	46.02
ZINC000035388763	<chem>COC([C@H]1CC2=C([C@H](N1)C)NC3=C2C=CC=C3)=O</chem>	-75.78	21.73



**Figure 3** Molecular structure of potential active compounds obtained through virtual screening



**Figure 4** Typical binding mode of potential inhibitors with SIRT1 protein by molecular docking and their RMSD in molecular dynamics simulation. A: Mangochinine; B: 11-Hydroxygelsenicine; C: Normacusine B; D: Opacaline A; E: ZINC000001774455; F: The RMSD changes of 5 potential inhibitor molecules in molecular dynamics simulation

最佳(图5),因此,最终选择该模型作为后续的QSAR预测模型。对24个测试集分子的预测结果显示,所有测试集分子的预测 $pIC_{50}$ 与实验值偏差均较小,表明预测结果较为准确(表3)。利用上述QSAR模型预测分子对接虚拟筛选所获得hits分子的 $IC_{50}$ 值如表1所示。

#### 4 分子动力学模拟结果

虚拟筛选获得的Hits分子中的top5分子的对接复合物的100 ns分子动力学模拟结果显示,在整个动力学模拟过程中,化合物分子重原子的RMSD均在1 Å内波动(图4F),说明潜在抑制剂分子与SIRT1形成稳定的分子间作用,且这些潜在活性分子与SIRT1蛋白复合物构象稳定,处于较低的能量状态,进一步证明了对接结果的可靠性。

**Table 2** QSAR model of SIRT1 inhibitors

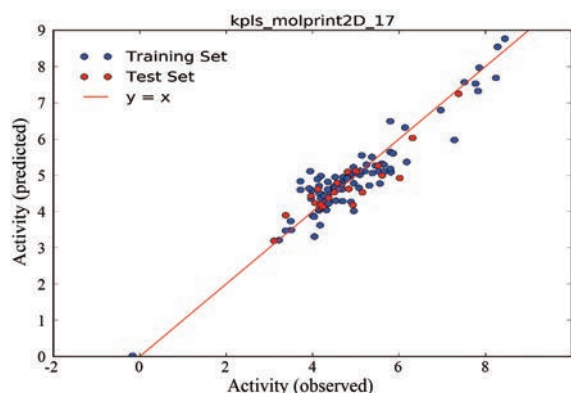
Model code	Score	S.D.	$R^2$	RMSE	$Q^2$
kpls_molprint2D_17	0.883 4	0.441 6	0.883 4	0.416 8	0.815 1
kpls_linear_17	0.861 9	0.450 6	0.879 5	0.441 1	0.792 9
kpls_dendritic_17	0.837 5	0.480 2	0.863 2	0.475 1	0.759 7
kpls_radial_17	0.814 1	0.573 1	0.805 1	0.423	0.809 6
kpls_molprint2D_20	0.800 6	0.566 3	0.797 6	0.528 7	0.794 2
kpls_molprint2D_3	0.791 7	0.562 8	0.802 4	0.552 2	0.763 8
kpls_molprint2D_43	0.787 8	0.577 5	0.784 6	0.546 5	0.796 1
kpls_molprint2D_13	0.786 6	0.586 8	0.780 3	0.527 3	0.803
kpls_molprint2D_15	0.769 3	0.567 5	0.799 9	0.570 5	0.742 8
kpls_molprint2D_14	0.768 6	0.588 5	0.782 6	0.581	0.746 1

#### 5 AML细胞抑制活性测试结果

MTT实验结果显示,8个hits化合物对MV4-11、OCI-AML2和OCI-AML3三种AML白血病细胞具有不同程度的抑制作用(表4),其 $IC_{50}$ 为2.29~83.21  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,

**Table 3** The prediction results of test set of SIRT1 inhibitors by the best QSAR model

Compound	SMILES	pIC <sub>50</sub> /mol·L <sup>-1</sup>	Predict pIC <sub>50</sub> /mol·L <sup>-1</sup>	SD
Compound291	NC(=O)c1cnc(Nc2cccc3cccc23)c1	4.388	4.277	-0.111
Compound82	NC(=O)c1cnc(OCc2cccc(NC(=O)c3ccc4cc[nH]c43)c2)c1	5.652	5.428	-0.224
Compound193	CC(=O)NCC1CCN(CC1)c2nnc3cc(sc23)C(=O)N	4.796	4.916	0.12
Compound232	NC(=O)c1ccnc1	4.602	4.621	0.019
Compound248	NC(=O)c1cnc(OCc2cccc(NC(=O)c3cccc3F)c2)c1	4.52	4.947	0.427
Compound36	CS(=O)(=O)NCCN1CCN(CC1)c2nnc3cc(sc23)C(=O)N	6.42	5.973	-0.447
Compound312	NC(=O)c1cnc(OCc2cccc(NC(=O)C=C)c3cccn3)c2)c1	4.314	4.046	-0.268
Compound4	CCNC(=O)c1cccc(c1)C(=O)NCCC2CCN(CC2)c3nnc4cc(sc34)C(=O)N	8.276	8.545	0.269
Compound101	NC(=O)c1cnc(OCc2cccc(NC(=O)C=C)c3cccn3)c2)c1	5.46	4.886	-0.574
Compound13	NC(=O)c1cc2nnc(N3CCN(CCN4CCCC4)CC3)c2s1	7.276	5.973	-1.303
Compound46	CC(=O)Nc1ccc(cc1)C(=O)Nc2cccc(COc3cnc(c3)C(=O)N)c2	6.173	5.371	-0.802
Compound5	NC(=O)c1cc2nnc(N3CCC(CCN(C(=O)c4cccs4)CC3)c2s1	8.237	7.688	-0.549
Compound178	NC(=O)c1cnc(OCc2cccc3cccc3c2)c1	4.87	4.71	-0.16
Compound210	NC(=O)c1cnc(OCc2cccc(NC(=O)c3cccn3)c2)c1	4.693	4.289	-0.404
Compound77	NC(=O)c1ccc(cc1)C(=O)Nc2cccc(COc3cnc(c3)C(=O)N)c2	5.726	5.063	-0.663
Compound33	NC(=O)c1cnc(OCc2cccc(NC(=O)c3ccc(cc3)n4cnc4)c2)c1	6.435	5.011	-1.424
Compound2	CCNC(=O)c1ccc(s1)C(=O)NCCC2CCN(CC2)c3nnc4cc(sc34)C(=O)N	8.444	8.766	0.322
Compound185	NC(=O)c1cc2nnc(N3CCCC3)c2s1	4.824	5.487	0.663
Compound187	CC(C)(C)c1ccc(cc1)C(=O)Nc2cccc(COc3cnc(c3)C(=O)N)c2	4.815	4.945	0.13
Compound242	OC(=O)c1ccc2NC(=S)Nc2c1	4.533	4.298	-0.235
Compound66	CNC(=O)c1ccc(cc1)C(=O)Nc2cccc(COc3cnc(c3)C(=O)N)c2	5.857	5.605	-0.252
Compound177	NC(=O)c1cnc(OCc2cccc(NC(=O)c3ccc(cc3)c4nccs4)c2)c1	4.873	4.957	0.084
Compound142	Cc1ccc(cc1)C(=O)Nc2cccc(COc3cnc(c3)C(=O)N)c2	5.069	4.657	-0.412
Compound88	NC(=O)c1cnc(OCc2cccc(NC(=O)c3ccc(cc3)c4cccn4)c2)c1	5.593	5.327	-0.266

**Figure 5** QSAR model curve of SIRT1 inhibitors**Table 4** The inhibitory effect of hits compounds on the proliferation of AML cells

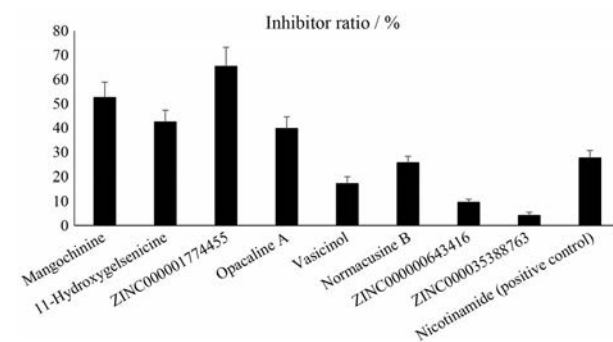
Compound	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>		
	OCI-AML2	OCI-AML3	MV4-11
Mangochinine	12.52 ± 1.36	8.7 ± 0.93	15.43 ± 2.18
11-Hydroxygelsenicine	3.82 ± 0.41	7.56 ± 0.52	9.63 ± 0.87
ZINC000001774455	2.29 ± 0.09	2.86 ± 0.11	4.56 ± 0.22
Opacaline A	6.21 ± 0.59	9.58 ± 0.92	13.92 ± 1.42
Vasicinol	23.54 ± 2.47	28.56 ± 3.02	17.98 ± 1.52
Normacusine B	30.36 ± 6.35	42.12 ± 7.02	43.56 ± 5.04
ZINC00000643416	58.23 ± 6.21	83.21 ± 8.87	66.13 ± 7.11
ZINC000035388763	76.89 ± 5.07	56.84 ± 3.92	43.93 ± 3.46

其中 ZINC000004836915 化合物对 OCI-AML2 的活性最好, IC<sub>50</sub> 达到了 2.29 ± 0.09 μmol·L<sup>-1</sup>。

## 6 酶活性测定

SIRT1 活性比色法定量检测结果显示, 1 μmol·L<sup>-1</sup>

浓度时, 不同化合物作用下 SIRT1 的活性受到不同程度的抑制作用 (图 6), 其中化合物 ZINC000001774455 抑制作用最强, 其酶抑制率达到了 65.33%, mangochinine、11-hydroxygelsenicine 和 opacaline A 3 个化合物也有较好抑制作用, 其抑制率分别为 52.45%、42.40% 和 39.65%。优于天然阳性对照药物 nicotinamide。而 ZINC00000643416 和 ZINC000035388763 两个化合物对 SIRT1 的抑制较为微弱, 抑制率仅为 9.56% 和 4.12%。

**Figure 6** The inhibitory effects of 8 potential inhibitors on SIRT1 enzyme activity at a concentration of 1 μmol·L<sup>-1</sup>

## 讨论

急性髓性白血病 (AML) 是一种容易复发和难治性白血病, 尚缺乏有效的治疗药物, 最近的研究表明, 抑制 SIRT1 能够抑制 AML 的干细胞, 从而抑制 AML 的复发, 是一种有前景的治疗策略。目前 SIRT1 抑制剂

尚未有上市药物,寻找结构新颖多样的SIRT1抑制剂先导化合物对开发靶向SIRT1的AML治疗药物具有重要的价值。

计算机辅助药物设计技术是快速经济发现药物先导化合物的重要手段,通过虚拟筛选,实现从数十万乃至数十亿的化合物中快速筛选可能药物先导化合物,避免传统药物筛选“盲筛”的盲目性导致的人力物力资源的浪费。本文利用分子对接,MM-GBSA法计算结合自由能,定量构效关系(QSAR)预测等手段,从231 511个小分子药分子库中筛选出8个潜在的SIRT1抑制剂分子,并经过分子动力学模拟验证了这些分子与蛋白的结合模式与结合稳定性,细胞活性测试结果表明这些化合物具有不同程度的抑制白血病细胞增殖的作用,酶活性测定结果显示,其中mangochinine、11-hydroxygelsenicine、ZINC000001774455、opacaline A、normacusine B等5个化合物是SIRT1的抑制剂,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,对SIRT1酶活性抑制率在28.30%~65.33%之间,其中活性最强的化合物ZINC000001774455在1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下对SIRT1酶活性抑制率达到了65.33%,对急性髓性白血病(AML)细胞株OCI-AML2、OCI-AML3、MV4-11的 $\text{IC}_{50}$ 值分别为 $2.29 \pm 0.09 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2.86 \pm 0.11 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $4.56 \pm 0.22 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。ZINC000001774455是一个由吡啶环和苯并咪唑环中间通过包含取代酰胺结构的连接链连接的结构,其与SIRT1蛋白的结合模式与共结晶报道的抑制剂分子有所不同,其分子除吡啶环部分与疏水区的PHE 273、PHE 297氨基酸形成 $\pi$ - $\pi$ 作用外,位于口袋另一端的苯并咪唑环与ARG 282也形成了 $\pi$ - $\pi$ 作用,分子中部亲水部分的酯羰基氧原子与ILE 347和ASP 348形成了双重氢键作用,吡啶环上的亚胺在离子化状态下质子H与GLN 345残基形成氢键作用,加强了抑制剂分子与SIRT1的相互作用。目前尚未见文献对该化合物抑制SIRT1活性的报道。因此,可作为新型SIRT1抑制剂开发的先导化合物。

利用分子对接进行虚拟筛选,对候选分子打分排序是虚拟筛选的难点,基于广义波恩表面积(MM-GBSA)模型计算小分子与蛋白的结合自由能代替分子对接的打分函数具有更好的活性分子识别效果,使分子对接尽可能体现药物分子与靶蛋白结合的能量变化。定量构效关系QSAR模型,虽然有泛化性差的缺点,但对于分布于训练集分子附近化学空间的潜在药物分子,还是具有较好的识别作用,在药物研发中利用构效关系预测活性也具有一定的参考价值。分子动力学可以模拟药物分子与蛋白复合物在生理环境下的分子构象变化和分子运动情况,从而了解药物分子与靶

蛋白结合的结合模式和稳定性。可作为在没有共结晶数据的情况下的药物分子与靶蛋白作用的评估。综合利用分子对接、定量构效关系QSAR、药效团、分子动力学模拟,以及机器学习、深度学习等人工智能方法将是未来药物研发的趋势,这些手段的发展将极大的提高新药研发的效率和成功率。

## 实验部分

### 1 天然产物库的收集和预处理

从Chemdiv、Chembridge、Enamine、Specs、ZINC等小分子化合物库收集天然产物分子,利用Discovery studio软件包,进行小分子预处理,包括加氢,去盐、调节电荷,修正不良价态原子,生成互变异构体和立体异构体,加载CHARMm分子力场,能量最小化得到3D构象。随后剔除不满足里宾斯基五规则的成药性差的分子,即:化合物的分子质量小于500道尔顿;化合物结构中的氢键给体(包括羟基、氨基等)的数量不超过5个;化合物中氢键受体的数量不超过10个;化合物的脂水分配系数的对数值(logP)在-2到5之间化合物中可旋转键的数量不超过10个。

### 2 训练集与测试集分子的准备

从文献中收集有SIRT1抑制活性且有 $\text{IC}_{50}$ 值,相对分子质量 $< 500$ 化合物分子122个,进行小分子预处理,包括加氢,去盐、调节电荷,修正不良价态原子,生成互变异构体和立体异构体,加载CHARMm分子力场,能量最小化得到3D构象,然后按照80%作为训练集,20%作为测试集的原则,随机分成两组。

### 3 受体蛋白的准备与预处理

PDB蛋白晶体数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载SIRT1蛋白的抑制剂共结晶结构(PDB ID: 4I5I),然后利用Discover studio软件包的Prepare Protein模块对晶体结构进行预处理,包括加氢,补全缺失氨基酸支链和缺失的loop,去除金属离子,水分子及其他结晶剂分子,生成二硫键,生成 $\text{pH } 7.0 \pm 2.0$ 的氨基酸电荷价态,对重原子在RMSD 0.3 Å范围内利用CHARMm分子力场优化构象。

### 4 分子对接

在经过预处理的SIRT1蛋白的抑制剂共结晶结构(PDB ID: 4I5I)的配体质心处定义一个直径20 Å的球体,作为进行分子对接的位点,同时删除原来的小分子配体,采用受体蛋白基本刚性、配体柔性的分子对接策略进行分子对接,每个分子保留10个最佳对接点,聚类半径0.1 Å;每个分子的初始随机构象数为10,随机启动构象的高温MD的步骤数为1 000,高温MD中随机启动构象的目标温度为1 000 K。随机构象包含电

荷相互作用, 并利用模拟退火进行构象优化, 其参数为: 加热步数 2 000 步, 目标温度 700 K, 退火步数 2 000 步, 退火温度 300 K。对接过程使用 CHARMM 力场, 采用 Momany-Rone 法处理配体原子部分电荷。

### 5 分子对接的方法验证

将上述经过预处理的 SIRT1 蛋白与抑制剂共结晶中的抑制剂分子, 使用 Chemdraw 软件构建结构, 保存为 SDF 格式, 再利用 Discovery studio 软件对该分子进行加氢、去盐、调节电荷, 修正不良价态原子, 生成互变异构体和立体异构体, 加载 CHARMM 分子力场, 能量最小化得到 3D 构象的预处理。上述生成的配体分子按照分子对接的方法重新对接到受体蛋白中, 并与原晶体结构中的对应配体进行叠合, 计算重原子的 RMSD, 以考察分子对接方法的准确性。

### 6 MM-GBSA 计算结合自由能

利用分子对接生成的不同构象的配体-蛋白复合物, 基于分子力学的广义波恩表面积 (MM-GBSA) 模型计算小分子与蛋白的结合自由能。

### 7 基于分子对接的虚拟筛选

将经过预处理的约 30 万天然产物分子及原共晶中的配体分子依次进行与 SIRT1 蛋白的分子对接, 随后进行 MM-GBSA 计算结合自由能, 以结合自由能 ( $\Delta G$ ) 超过原配体的化合物为潜在活性分子, 并按照结合自由能大小进行升序排列。

### 8 QSAR 模型的建立, 验证与预测

将上述收集的 SIRT1 抑制剂分子构建的训练集和测试集分子利用 Schrodinger 软件包的 AutoQSAR 模块, 进行定量构效关系建模, 变量采用由系统生成的二进制的各种分子指纹以及各种分子描述符, 因变量采用  $\text{pIC}_{50}$  值, 采用训练集 5 倍交叉验证, 尝试核偏最小二乘法 (KPLS)、多元线性回归 (MLR) 等算法, 寻找最优的 QSAR 模型, 并保留最优的 10 个 QSAR 模型。将最优化的 QSAR 模型用于分子对接虚拟筛选所得的潜在 SIRT1 抑制剂分子的  $\text{IC}_{50}$  预测。

### 9 分子动力学模拟

将 Top5 的潜在抑制剂分子的对接复合物分别进行 100 ns 的分子动力学模拟, 考察抑制剂分子与 SIRT1 蛋白结合的稳定性。模拟过程通过 Desmond 软件实施, 流程如下: 第一步, 在配体-蛋白复合物周围建立边长为 10 Å 的 TIP3P 周期性显性水模型的立方体水盒子, 并添加 Cl<sup>-</sup> 作为抗衡离子, 平衡体系电荷, 并添加 0.15 mol·L<sup>-1</sup> 浓度的 NaCl, 模拟生理环境, 加载分子力场 OPLS3, 建立模拟体系。第二步, 体系能量最小化, 采用 0.1 kcal·mol<sup>-1</sup>·Å<sup>2</sup> 的力常数固定配体-蛋白复合物, 截值法处理短程静电作用, 截值半径 9 Å, 利用最

陡下降法能量最小化, 步长 2 fs, 直至达到梯度阈值 25 kcal·mol<sup>-1</sup>·Å, 随后切换 LBFGS 法, 继续能量最小化直至收敛。第三步, 体系升温, 利用 2.0 kcal·mol<sup>-1</sup>·Å<sup>2</sup> 的力常数固定复合物, 将体系从 0 K 缓慢升温至 300 K。第四步, 平衡体系, 依次用 2.0 kcal·mol<sup>-1</sup>·Å<sup>2</sup>、1.0 kcal·mol<sup>-1</sup>·Å<sup>2</sup>、0.5 kcal·mol<sup>-1</sup>·Å<sup>2</sup>、0.2 kcal·mol<sup>-1</sup>·Å<sup>2</sup>、0.1 kcal·mol<sup>-1</sup>·Å<sup>2</sup> 的力常数限制复合物, 放开小分子配体, 依次做 1 ns 的分子动力学模拟。第五步, 全体系不限制进行 100 ns 的分子动力学模拟。

### 10 肿瘤细胞抑制活性测试

三种急性髓性白血病细胞 MV4-11、OCI-AML2 和 OCI-AML3 细胞用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 Iscove's 改良的 Dulbecco (IMDM) 培养液培养。所有媒介含有 100 U·mL<sup>-1</sup> 青霉素和 100 μg·dL<sup>-1</sup> 链霉素。将细胞在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的潮湿环境中孵育。对数生长期细胞将接种到 96 孔培养板中, 密度为 (每孔 10 000~15 000 个细胞。24 h 后, 用 0.02、0.2、2、20、100、200 μmol·L<sup>-1</sup> 浓度的化合物处理细胞 72 h, 终体积为 200 μL。终点时, 向每个孔和细胞中加入 20 μL 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴化物 (5 mg·mL<sup>-1</sup>) 再孵育 1~3 h。经过 20% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 的过夜处理后, 用酶标仪 (Molecular Devices, Sunnyvale) 测定 570 nm 的吸光度值, 未经药物处理的样品做对照, 计算  $\text{IC}_{50}$  值。

### 11 酶活性测试

将待测化合物与阳性对照药物 Nicotinamide 精密称定后分别先用 DMSO, 随后用缓冲液稀释至 DMSO 含量 1% 的贮备液, 在 96 孔板上依次加入 10 μL 的 SIRT1 蛋白缓冲液, 按照 SIRT1 活性比色法定量检测试剂盒的说明操作, 依次加入缓冲液、底物缓冲液、补充液稀释, 使最终化合物浓度为 1 μmol·L<sup>-1</sup>, 按照试剂盒的方法测定待测化合物作用下 SIRT1 的酶活性, 并计算化合物对 SIRT1 酶活抑制率。

致谢: 感谢四川大学华西药学院提供 Schrodinger 软件及技术支持。

作者贡献: 该论文是在所有作者共同参与贡献下完成, 该论文的最后版本通过了所有作者认可。

利益冲突: 本文所有作者申明, 不存在利益冲突关系。

### References

- [1] Chalkiadaki A, Guarente L. The multifaceted functions of sirtuins in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15: 608-624.
- [2] Voelter-Mahlknecht S, Mahlkecht U. Cloning, chromosomal-characterization and mapping of the NAD-dependent histone deacetylases gene sirtuin 1 [J]. Int J Mol Med, 2006, 17: 59-67.

- [3] Brooks CL, Gu W. How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer? [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9: 123-128.
- [4] Herranz D, Serrano M. SIRT1: recent lessons from mouse models [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10: 819-823.
- [5] Chalkiadaki A, Guarente L. The multifaceted functions of sirtuins in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15: 608-624.
- [6] Chen YR, Lai YL, Lin SD, et al. SIRT1 interacts with metabolic transcriptional factors in the pancreas of insulin-resistant and calorie-restricted rats [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40: 3373-3380.
- [7] Chang HC, Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism [J]. *Trends Endocrin Met*, 2014, 25: 138-145.
- [8] Luo JY, Nikolaev AY, Imai SI, et al. Negative control of p53 by Sir2 $\alpha$  promotes cell survival under stress [J]. *Cell*, 2001, 107: 137-148.
- [9] Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, et al. hSIR2 (SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase [J]. *Cell*, 2001, 107: 149-159.
- [10] Wang CG, Chen LH, Hou XH, et al. Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8: 1025-1031.
- [11] Medinger M, Passweg JR. Acute myeloid leukaemia genomics [J]. *Br J Haematol*, 2017, 179: 530-542.
- [12] O'Donnell MR, Tallman MS, Abboud CN, et al. Acute myeloid leukemia, version 3. 2017, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2017, 15: 926-957.
- [13] Li L, Osdal T, Ho Y, et al. SIRT1 activation by a c-MYC oncogenic network promotes the maintenance and drug resistance of human FLT3-ITD acute myeloid leukemia stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15: 431-446.
- [14] Ng SW, Mitchell A, Kennedy JA, et al. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia [J]. *Nature*, 2016, 540: 433-437.
- [15] Bradbury CA, Khanim FL, Hayden R, et al. Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors [J]. *Leukemia*, 2005, 19: 1751-1759.
- [16] Ou X, Lee MR, Huang XX, et al. SIRT1 positively regulates autophagy and mitochondria function in embryonic stem cells under oxidative stress [J]. *Stem Cells*, 2014, 32: 1183-1194.
- [17] Tian WL, Guo R, Wang F, et al. The IRF9-SIRT1-P53 axis is involved in the growth of human acute myeloid leukemia [J]. *Exp Cell Res*, 2018, 365: 185-193.
- [18] Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13: 225-238.
- [19] Qiang MJ, Hu Y, Zhu H, et al. Sirtuins in malignant progression of tumor [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 1259-1270.