

# 反向分子对接-药物靶点发现和确认的新途径

范胜军 李学军<sup>△</sup>

(北京大学基础医学院药理学系, 北京 100191)

**摘要** 随着药物发现与中药现代化进程的加快,越来越多的活性先导化合物和天然产物的作用机制亟待阐明,而作用靶点的确认成为新药研发的主要瓶颈。反向分子对接以其特有的高效便捷等特点,为药物靶点的发现和确认提供新的思路。本文对近年来反向分子对接技术的应用情况进行综述。

**关键词** 反向分子对接; 药物靶点; 新药发现

**中图分类号** R914

随着生命科学技术的迅猛发展,新药的合成与发现速度加快。如何迅速有效地发现先导化合物的作用靶点,阐明其作用机理,使之成为新药上市,是长期以来困扰医药工作者的一大难题。鉴于此,反向分子对接技术应运而生。本文就反向分子对接技术的发展、特点、应用现状及展望等方面进行了综述,并探讨其在药物靶点发现中的作用。

## 一、背景

21 世纪是生命科学的时代,如何行之有效地开发拥有自主知识产权的新药成为当代医药研发的热点。为了加快药物的发现进程,药物化学专家通过全新药物合成的方法制备了大量候选化合物,而天然产物也以其来源广、成分多样、毒副作用小等优点,成为药物的又一发现途径。然而新药的发现是个极具挑战的过程,常常需要耗费大量的人力和物力资源<sup>[1]</sup>。

随着结构生物学与计算化学的发展,基于计算机辅助设计的药物发现过程逐渐为人们所重视。与传统药物筛选过程相比,计算机辅助药物设计从理论出发,避免传统药物筛选过程中的盲目性并能进行直观的设计,它的出现极大地节省了资本,加快了新药开发的进程。2001 年反向分子对接(inverse docking)概念的提出<sup>[2]</sup>,无疑为药物靶点发现掀起了一场新的革命。继 INVDOCK 软件后, TarFis-Dock、PharmMapper 等免费在线服务器为人们所熟知并逐渐得到认可。其方便快捷的预测功能为药物靶点的发现提供了至关重要的作用,是药物研究与开发及中药现代化进程中不可或缺的重要工具。

## 二、基本概念

反向分子对接基于 Fisher E 的“锁-钥匙模型学说”而提出<sup>[3]</sup>(图 1)。它以小分子化合物(天然产物、先导化合物及化学合成物)为探针,在已知结构的靶点数据库内搜寻可能与之结合的生物大分子,通过空间和能量匹配相互识别形成分子复合物,进而预测药物潜在的作用靶点。根据配-受体之间的匹配程度,反向分子对接可分为药效团模型法(pharmacophore)、配体相似法(ligand similarity)和结合位点相似法(site similarity)等。

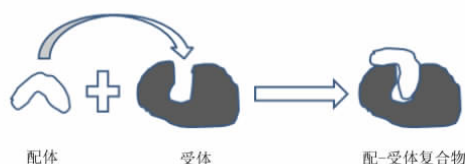


图 1 分子对接原理(锁-钥匙模型学说)  
“锁”与“钥匙”相互识别的首要条件是空间形状的相互匹配

## 三、靶点数据库

基因组测序的完成与结构生物学的发展,是许多生物大分子(DNA、RNA 和蛋白质)结构数据库得以促生的主要原因。通过对相关数据库内的生物大分子信息进行整理与分类并结合分子生物学验证,构建疾病相关靶点数据库,是反向分子对接技术得以迅速推广的关键所在。相关数据库见表 1。

<sup>△</sup> 通讯作者

表 1 国内外相关靶点数据库汇总

Target Database	Related Sources
PDTD	http://www.dddc.ac.cn/pdtd/
DrugBank	http://www.drugbank.ca/
BindingDB	http://www.bindingdb.org/bind/index.jsp
PDBbind	http://www.pdbbind.org/
KiBank	http://kibank.iis.u-tokyo.ac.jp/
RELIBASE	http://relibase.ebi.ac.uk
AffinDB	http://www.agklebe.de/affinity
TTD	http://bidd.nus.edu.sg/group/ttd/ttd.asp
PDB	http://www.rcsb.org/pdb
MMDB	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/MMDB/mmdb.shtml
TargetBank	http://59.78.96.61:8080/targetbank/tar-Home.do

#### 四、对接流程

来源于靶点数据库内的生物大分子,经修饰后与特定的小分子化合物进行匹配,根据受体与配体分子的性质和形状的互补性,调整分子构象,计算对接时各个取向的受体-配体相互作用能量,进行分子动力学模拟和计算,求得复合物的全局最优化结合构象,即得到最佳的对接靶点(hit targets)。具体的反向分子对接流程如图 2 所示。

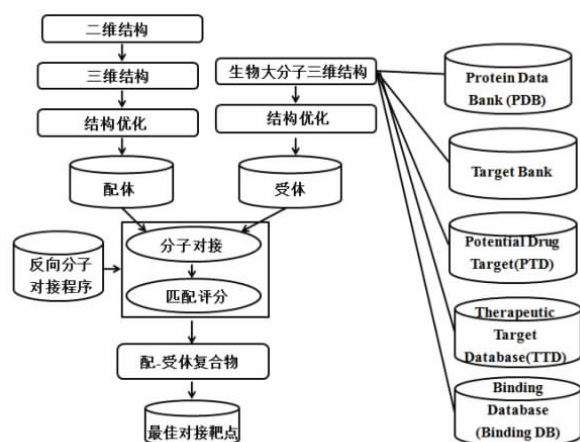


图 2 反向分子对接流程示意图

在反向分子对接过程中,具有多种构象的单一配体分子可以同时与多个受体结合,形成复合物

#### 五、相关软件

服务器或软件是反向分子对接得以顺利开展和进行的桥梁。

INVDock 是新加坡国立大学于 2001 年开发的

首款反向分子对接程序,该软件采用结合位点相似法<sup>[2]</sup>,通过与 TTD、DART 和 ADME-AP 三大药物潜在靶点数据库相连,成功对四氢他莫昔芬和维生素 E 的作用靶点、毒副作用及代谢特征进行了预测<sup>[4,5]</sup>。

INVDock 的成功值得充分肯定,然而其繁琐的操作和复杂的程序却令许多非专业人员望而却步。为了解决这一难题,中科院上海药物研究所蒋华良课题组开发了药物靶点预测的免费公共平台-TarFisDock。该服务器基于 DOCK 的分子碎片生长原理,通过搜索 PDTD 数据库,可以在数小时内预测到小分子化合物的作用靶点。随后蒋华良与沈旭等合作,采用该程序发现了一种抗幽门螺旋杆菌天然产物的作用靶点-PDF 蛋白<sup>[6]</sup>。TarFisDock 以其特有的方便快捷等优点被广泛应用于药物靶点预测中<sup>[7-9]</sup>。

PharmMapper 是继 TarFisDock 之后蒋华良课题组推出的另一款免费网络服务器。该程序采用药效团匹配法,通过对 TargetBank、DrugBank、Binding DB 和 PDTD 四大数据库进行快速检索而获得药物靶点信息。该服务器内含 7302 个药效团模型,涵盖了 110 种临床适应症。与 TarFisDock 相比 PharmMapper 具有运算速度更快、靶点信息更全面等优点。

2011 年英国丽兹大学 Jackson RM 课题组开发了 Reverse Screen 3D。该服务器基于 PDB 数据库,通过自行构建药物靶点数据库,采用 LigMatch 匹配法,寻找能与特定小分子化合物匹配的生物大分子。截止到 2011 年 06 月,该服务器内涵 9536 个生物大分子结合位点信息,其应用有待验证。

idTarget 由国立台湾大学生物信息学课题组开发的另一款内含 7864 个靶点的免费在线服务器。它采用改良的 Autodock 评分功能,首先在受体分子内部形成规则网格,采用分子或碎片作为探针,将其逐个置于每个网格点上,应用力场分析方法,计算探针原子与靶点的相互作用能,进而确定结合位点。该程序允许小分子化合物的构象发生变化,以结合自由能作为评价对接结果的依据。idTarget 已经成功应用于蛋白激酶抑制剂和他汀类药物靶点的预测<sup>[10,11]</sup>。

面对着纷杂的反向分子对接程序,适宜的选择对于实验的顺利开展与进行显得至关重要。郑荣等采用 Autodock 和 TarFisDock 预测了四种茶多酚(EGCG、EGC、ECG 和 EC)抗肿瘤作用的相关靶点,

结果发现两种程序预测结果具有显著的差异<sup>[12]</sup>。付伟课题组以八种小分子化合物为药物探针,对比 GOLD、FlexX、DOCK、TarSearch-X 和 TarSearch-M 的反向靶点预测能力。结果显示 TarSearch-X 的预测结果最为精准,GOLD 次之,而且 TarSearch-X 和 GOLD 亦可用于药物毒副作用的预测<sup>[13]</sup>。对接原理的不同可能是造成上述差异的主要原因。

在生物信息学与计算机科学技术高速发展的今天,将会涌现出更多快而精准的反向分子对接软件,其功能将备受瞩目,有待验证。相关程序见表 2。

表 2 反向分子对接程序汇总

Program	Related Sources
INVDock	<a href="http://bidd.nus.edu.sg/group/software/invdock.htm">http://bidd.nus.edu.sg/group/software/invdock.htm</a>
TarFisDock	<a href="http://www.ddde.ac.cn/tarfisdock/">http://www.ddde.ac.cn/tarfisdock/</a>
PharmMapper	<a href="http://59.78.96.61/pharmmapper/">http://59.78.96.61/pharmmapper/</a>
Reverse Screen 3D	<a href="http://www.modelling.leeds.ac.uk/ReverseScreen3D/">http://www.modelling.leeds.ac.uk/ReverseScreen3D/</a>
AutoDock	<a href="http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock">http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock</a>
GOLD	<a href="http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold">http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold</a>
FlexX	<a href="http://www.tripos.com/">http://www.tripos.com/</a>
DOCK	<a href="http://dock.compbio.ucsf.edu/">http://dock.compbio.ucsf.edu/</a>
eHits	<a href="http://www.simbiosys.ca/ehits/index.html">http://www.simbiosys.ca/ehits/index.html</a>
FRED	<a href="http://www.eyesopen.com">http://www.eyesopen.com</a>
Surflex	<a href="http://www.biopharmics.com">http://www.biopharmics.com</a>
PSI-DOCK	<a href="http://mdl.ipc.pku.edu.cn/">http://mdl.ipc.pku.edu.cn/</a>
MDock	<a href="http://zoulab.dalton.missouri.edu/software.htm">http://zoulab.dalton.missouri.edu/software.htm</a>
Plants	<a href="http://www.tcd.uni-konstanz.de/research/plants.php">http://www.tcd.uni-konstanz.de/research/plants.php</a>
idTarget	<a href="http://idtarget.rcas.sinica.edu.tw/">http://idtarget.rcas.sinica.edu.tw/</a>
ChemMapper	<a href="http://59.78.96.61:8080/chemmapper/">http://59.78.96.61:8080/chemmapper/</a>

## 六、应用

反向分子对接技术的出现彻底改变了药物的研发思路,加快了药物开发的进程,为先导化合物的优化和生物学验证提供了理论指导。

董子刚课题组采用 TarFisDock 搜索姜辣素治疗肿瘤的靶点,结果发现白三烯 A<sub>4</sub> 水解酶与姜辣素具有较高的亲和力,提示其可能是姜辣素发挥抗肿瘤作用的关键靶点,该预测已得到分子生物学实验的验证<sup>[7]</sup>。

反向分子对接技术与蛋白质组学及生物信息学

相结合,阐明天然产物的多靶点特性已成为当今中药现代化研究的新方法。果德安课题组结合双向凝胶电泳,借助 TarFisDock 首次阐明了灵芝酸 D 通过直接与 14-3-3 蛋白结合而发挥抗肿瘤作用<sup>[9]</sup>。随后该组采用类似的方法,阐明了丹酚酸 B 发挥心血管保护作用的机理与直接和表皮生长因子受体 (EGFR) 结合有关<sup>[8]</sup>。鲁碧楠等(2010 年)亦采用反向分子对接技术发现了小檗碱引起细胞凋亡的机理与 P53 蛋白有关。

除了药物靶点预测功能外,反向分子对接在评价药物毒副作用机制的研究中亦发挥着巨大的作用。药物的不良反应是新药筛选的难题,也是导致药品撤市的主要原因,因此快速精准的毒性预测有利于降低药物研发的资本,加快新药开发进程。纪志梁等于 2006 年采用 INVDock 算法对 11 种已上市的抗艾滋病药物的毒副作用进行了预测,其结果与 FDA 药物不良反应数据库的报道惊人地相似。曹志伟课题组(2011 年)也采用类似的方法成功地预测了三聚氰胺的毒性。

反向分子对接技术在环境科学中也得到了广泛的应用和认可。Olivero Verbel 等通过 TarFisDock 发现二噁英引起人体病理性改变的原因与其直接与金属基质蛋白、环氧角鲨烯环化酶和髓过氧化物酶等结合有关<sup>[14]</sup>。

## 七、结语与展望

反向分子对接技术的出现,彻底地改变了新药研发的思路,为后续生物学验证的顺利进行指明了方向,同时在某种程度上极大地弥补实验能力的不足。该方法将成功地应用于药物作用靶点预测、老药新用、毒副作用预测及新药研发中。

对于拥有五千年悠久历史的传统中草药而言,进军国际市场一直是中医药学者孜孜不倦的追求。反向分子对接的出现和发展无疑为中药现代化的实现提供新的手段。然而面对着天然产物单一成分多靶点、组方复杂多变的特性,反向分子对接技术仍然显示出了很大的不足。仅凭经验用药的时代已经一去不复返,如何更为科学有效地阐明其作用机制、加快中药发展的脚步显得至关重要。

目前来看,反向分子对接技术依旧处于初级阶段,其应用与推广仍然受到诸多因素如靶点信息不完备、操作程序繁琐等的制约。如何利用已知药物靶点的结构信息,开发出更为高效简便的多分子柔性对接程序,从中药组方角度出发,立足于整个疾病

网络,才能真正地做到走出。相信在不久的将来,中药现代化和国际化的目标不再遥远,最终得以达到全人类的资源和文化共享。

## 参 考 文 献

- Mcpherson K, Bunker JP. Costs, risks and benefits of surgery: a milestone in the development of health services research. *J R Soc Med* 2007, 100: 387 ~ 390.
- Chen YZ, Zhi DG. Ligand-protein inverse docking and its potential use in the computer search of protein targets of a small molecule. *Proteins* 2001, 43: 217 ~ 226.
- Jorgensen WL. Rusting of the lock and key model for protein-ligand binding. *Science* 1991, 254: 954 ~ 955.
- Chen YZ, Ung CY. Computer automated prediction of potential therapeutic and toxicity protein targets of bioactive compounds from Chinese medicinal plants. *Am J Chin Med*, 2002, 30: 139 ~ 154.
- Chen YZ, Ung CY. Prediction of potential toxicity and side effect protein targets of a small molecule by a ligand-protein inverse docking approach. *J Mol Graph Model* 2001, 20: 199 ~ 218.
- Cai J, Han C, Hu T, et al. Peptide deformylase is a potential target for anti-Helicobacter pylori drugs: reverse docking, enzymatic assay, and X-ray crystallography validation. *Protein Sci* 2006, 15: 2071 ~ 2081.
- Jeong CH, Bode AM, Pugliese A, et al. [6]-Gingerol suppresses colon cancer growth by targeting leukotriene A4 hydrolase. *Cancer Res* 2009, 69: 5584 ~ 5591.
- Feng LX, Jing CJ, Tang KL, et al. Clarifying the signal network of salvianolic acid B using proteomic assay and bioinformatic analysis. *Proteomics* 2011, 11: 1473 ~ 1485.
- Yue QX, Cao ZW, Guan SH, et al. Proteomics characterization of the cytotoxicity mechanism of ganoderic acid D and computer-automated estimation of the possible drug target network. *Mol Cell Proteomics* 2008, 7: 949 ~ 961.
- Zahler S, Tietze S, Totzke F, et al. Inverse in silico screening for identification of kinase inhibitor targets. *Chem Biol* 2007, 14: 1207 ~ 1214.
- Lin YC, Lin JH, Chou CW, et al. Statins increase p21 through inhibition of histone deacetylase activity and release of promoter-associated HDAC1/2. *Cancer Res* 2008, 68: 2375 ~ 2383.
- Zheng R, Chen TS, Lu T. A comparative reverse docking strategy to identify potential antineoplastic targets of tea functional components and binding mode. *Int J Mol Sci*, 2011, 12: 5200 ~ 5212.
- Hui-Fang L, Qing S, Jian Z, et al. Evaluation of various inverse docking schemes in multiple targets identification. *J Mol Graph Model* 2010, 29: 326 ~ 330.
- Olivero-Verbel J, Cabarcas-Montalvo M, Ortega-Zuniga C. Theoretical targets for TCDD: a bioinformatics approach. *Chemosphere* 2010, 80: 1160 ~ 1166.

## 2012 年诺贝尔生理学或医学奖介绍

2012 年 10 月 8 日,卡罗林斯卡医学院(Karolinska Institute)的诺贝尔生理学或医学奖评委会将本年度诺贝尔生理学或医学奖联合授予来自京都大学的山中伸弥(Shinya Yamanaka)和英国发育生物学家约翰·戈登(John B. Gurdon),以表彰他们在细胞重编程领域的杰出成就。

随着近年来干细胞在基础、临床等领域的广泛应用与发展,如何获取干细胞逐渐成为极具前景的研究热点。由于胚胎干细胞的来源困难和伦理争议,研究者们开始思考成熟细胞逆转回干细胞状态并进行重新分化的可能性。1962 年,英国科学家约翰·戈登将美洲爪蟾的小肠上皮细胞核注入去核的卵细胞中进行培养,发现一部分卵可以增殖分化形成蝌蚪,甚至进一步发育为成熟爪蟾。这一具有划时代意义的实验证明成熟细胞核具有全能性,并引起了科学界的一场技术革命,为其后蓬勃发展的克隆技术奠定了理论根基。在此基础上,能否将完整成熟的细胞重编程为多功能干细胞成为了最大的难题。40 多年后,日本科学家山中伸弥经过多年的努力终于给出了一个肯定的答复。山中伸弥在其早期工作中,发现一些特异性表达于胚胎干细胞的基因是维持干细胞体外培养的必需因子,于是大胆推测,如果在成熟细胞内表达这些维持因子,也许可以实现对细胞的重编程。基于这种假设,山中伸弥与他的学生将已知的 24 种维持因子全部通过病毒感染给小鼠成纤维细胞,并凭借他们早期建立的 Flx15 干细胞筛选系统,成功筛选出诱导成功的多功能干细胞。这对于实现细胞全能性无疑是一个突破性进展。接下来,山中伸弥对这 24 种维持因子做出进一步筛选,最终鉴定出四个明星因子: Oct3/4、Sox2、c-Myc 和 Klf4,认为只需这四个因子在成纤维细胞中过表达,就可以达到重编程的目的。这一重大发现于 2006 年发表在《Cell》杂志上。次年,山中伸弥又成功培养了人类诱导多功能干细胞,正式拉开了干细胞研究领域的崭新帷幕。

诱导多功能干细胞的发现彻底改变了人们以往对细胞命运不可逆转的观念,并为干细胞研究摆脱了长久以来的伦理困扰,对临床自体器官移植、药物模拟测试和观察疾病演化过程等方面也具有重要意义。

(www.nobelprize.org) (李婧)