

虚拟筛选和分子动力学模拟研究： 筛选弗林蛋白酶的潜在抑制剂^{*}

孙丰垒, 李晓毅[†]

(中国科学院大学材料科学与光电技术学院 材料科学与光电技术中心, 北京 100049)

(2021 年 4 月 12 日收稿; 2021 年 5 月 13 日收修改稿)

Sun F L, Li X Y. Virtual screening and molecular dynamics simulation studies to identify potential inhibitors of Furin [J]. Journal of University of Chinese Academy of Sciences, 2023, 40(2): 173-178. DOI: 10. 7523/j.ucas. 2021. 0044.

摘要 通过分子对接和分子动力学模拟的方法, 进行基于弗林蛋白 (Furin) 受体的虚拟筛选, 以寻找 Furin 的潜在抑制剂。利用 Sybyl 软件构建基于 Furin 受体的药效团模型, 在 ZINC 数据库中筛选出符合药效团模型的小分子, 将小分子与 Furin 蛋白进行分子对接, 最终筛选出 4 个符合条件的小分子。对 4 个复合物进行 100 ns 分子动力学模拟, 并对轨迹进行 RMSD 和 RMSF 分析。通过分子力学-广义 Born 表面积法 (MMGBSA) 分析 Furin 受体和小分子配体平衡后的结合能, 对比发现 ZINC7664 的结合能最低。所以小分子 ZINC7664 与 Furin 受体的结合最稳定, 具有较好的应用前景, 可用于设计有效的抑制 Furin 的药物。

关键词 弗林蛋白; 虚拟筛选; 分子对接; 分子动力学模拟

中图分类号: O642 文献标志码: A DOI: 10. 7523/j.ucas. 2021. 0044

Virtual screening and molecular dynamics simulation studies to identify potential inhibitors of Furin

SUN Fenglei, LI Xiaoyi

(Center of Materials Science and Opto-electronics Engineering, College of Materials Science and Opto-Electronic Technology, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract In this study, virtual screening based on Furin receptor was carried out by means of molecular docking and molecular dynamics simulations to find potential inhibitors of Furin. The pharmacophore model based on Furin receptor was constructed by Sybyl. Drug molecules were screened from ZINC database according to the pharmacophore model. The screened drug molecules were docked with Furin protein. Finally, four qualified drug molecules were screened. The four complexes were calculated by molecular dynamics simulations for 100 ns. RMSD and RMSF were calculated. The binding energies of Furin receptors with drug molecular ligands were analyzed by MMGBSA. It was found that the binding energy of Furin-ZINC7664 was the lowest one, which indicated that the drug molecule ZINC7664 is the most stable potential inhibitor to Furin and could be used to design the effective anti-Furin drugs.

^{*} 国家自然科学基金 (21274164) 和中央高校基本科研业务费专项资助

[†] 通信作者, E-mail: lixy@ucas.ac.cn

Keywords Furin; virtual screening; molecular docking; molecular dynamics simulation

弗林蛋白(Furin)与众多疾病的发生密切相关,比如乳腺癌、胰腺癌、炭疽病等,有效抑制其活性显得至关重要。1989 年 Fuller 等^[1]对哺乳动物的 *fur* 基因^[2]的序列进行分析,发现 *fur* 基因编码的蛋白与酵母 Kexin 有很高的同源性,并将其命名为 Furin。1990 年, Furin 被确认是一种成对的碱性氨基酸内切蛋白酶,随后大量 Furin 的同源物陆续被发现,这些同源物统称为前体蛋白转化酶,它们都能切割前体蛋白进而将其激活,其中 Furin 是第一个被研究且研究最清楚的前体蛋白转化酶^[3]。

Furin 作为前体蛋白转换酶,最开始也是从没有活性的前体蛋白(Furin 前体)中得到的。Furin 前体由前肽和 Furin 共 2 部分组成^[4],对其进行 2 次自我剪切,将前肽与 Furin 分离,生成具有生物活性的分子。第 1 次剪切是在内质网^[5-6]中迅速完成的,前肽被切割,但没有与 Furin 彻底分离,而是附着在 Furin 上,进而抑制 Furin 发挥作用。第 2 次剪切是在高尔基体中缓慢发生,此时环境的 pH 发生改变,导致前肽中对 pH 敏感的序列被切割,使其与 Furin 完全分离,Furin 没有了自身前肽的抑制而具有了生物活性,进而开始切割其他前体蛋白并将其激活来发挥作用^[7]。

Furin 切割的氨基酸序列有一定规律,(P1) Arg-X-X-Arg ↓ (P4) (↓ 为切割位点)是 Furin 能识别的最短序列^[8],其中 X 表示任意氨基酸,但 Furin 更容易识别 P2 位置为碱性的 Lys 或 Arg 的氨基酸序列^[9]。Furin 可以切割生长因子、基质金属蛋白酶和病毒的糖蛋白等蛋白^[10],这些前体蛋白与很多疾病相关,这也使得 Furin 在各种的疾病中被研究,并取得了一定进展。

Furin 可切割多种癌症相关的前体蛋白,已被证实的有:膜型基质金属蛋白酶 1 (membrane type-1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP)、血管内皮生长因子 C (vascular endothelial growth factor C, VEGF-C)、血小板衍生生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF)、胰岛素生长因子 1 型受体 (insulin-like growth factor 1, IGF-1R)、转化生长因子 β (transforming growth factor-β, TGFβ)、去整合素基质金属蛋白酶 (a disintegrin and metalloprotease, ADAM)^[11]等。Furin 通过切割这些前体蛋白,使其发挥生物活性,导致正常细

胞癌化^[12]。有研究证实 Furin 参与了头颈部鳞状细胞癌及和乳腺癌的癌症进程^[11],在对乳腺癌的研究中发现,Furin 通过对抑癌基因 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)产生抑制效应,降低它的活性,从而增强乳腺癌细胞的表达^[13]。也有研究表明,Furin 可促进胰腺癌细胞的上皮-间质转化 (epithelial to mesenchymal transition, EMT)^[14],抑制 Furin 的表达是治疗胰腺癌的一种有效方法。此外 Furin 还参与与卵巢癌相关的前体蛋白的表达^[15]。Furin 介导炭疽毒素进入细胞^[16],当毒素与细胞膜表面的蛋白受体结合后,Furin 被激活,将结合体切割,毒性蛋白被释放入细胞液中,使人中毒。

Furin 与众多疾病相关,寻找抑制 Furin 活性的药物十分必要。目前,人们设计了许多 Furin 的抑制剂,这些抑制剂可分为小分子抑制剂和基于蛋白的大分子抑制剂。其中最具吸引力的是小分子化合物,因为它们可以通过合成路线获得,具有持久的代谢和蛋白水解稳定性等特点。小分子抑制剂又可细分为肽类抑制剂、非肽类抑制剂和肽的类似物抑制剂^[17]。

1) 肽类抑制剂

Furin 是从 Furin 前体中得到的,Furin 前体包含前肽和 Furin 这 2 部分,前肽的存在会抑制 Furin 发挥作用。研究发现,前肽中一些特定的氨基酸序列会对 Furin 起到抑制作用,如果 P1-P2 位是双碱性氨基酸会起到很大的抑制效应^[18]。另外在多肽中引入一对二硫键,首尾相连形成环肽,通过这种方法可以形成很多新的抑制剂。例如,利用这一方法使大麦丝氨酸蛋白酶抑制剂-2 转变为十八环肽抑制剂-2,这大大提高了抑制效率^[19]。

2) 肽的类似物抑制剂

将 Furin 作用的底物的肽键(-CO-NH-)进行改造,把能被剪切的肽键换成不能被剪切的甲基酮键(-COCH₂-),即换成 Arg-X-X-Arg ↓ -(COCH₂)-X,Arg-X 的肽键替换为(-COCH₂-),改造后的肽类似物对 Furin 的抑制性很强,抑制常数为 3.4 nmol/L^[20]。

3) 非肽类抑制剂

非肽类抑制剂有对细胞的穿透力强、专一性高和不易被降解等优点,目前大多数是对于此类

抑制剂的研究。抑制活性最好的非肽类抑制剂是琥珀酰(andrographolide, SEA)^[21],另外一些含有吡啶和喹啉环的化合物也对 Furin 有很高的抑制性^[22]。

鉴于以上研究,我们基于 Furin 受体进行虚拟筛选,通过分子对接,分子动力学模拟,最终筛选出最具潜能的 Furin 小分子抑制剂。

1 材料和方法

1.1 模型搭建

本文所使用的 Furin 蛋白(PDB ID 5JXH)的 X 射线晶体结构来源于蛋白质数据库 RCSB PDB,分辨率为 2.0 Å(1 Å=0.1 nm)。该蛋白质包含 473 个残基,活性中心已经确定,由 12 个残基组成活性口袋,分别是 ASP153、HIS194、ALA252、SER253、TRP254、GLY255、PRO256、GLU257、ASP258、ASN295、THR367 和 SER368^[23]。

1.2 分子动力学模拟

用 Amber18 的 antechamber 工具创建配体小分子的力场参数。通过加入 Na⁺和 Cl⁻使模拟体系电荷为 0。然后将每个体系浸入厚度为 1.2 nm 的 TIP3P 水分子周期边界盒子中。采用 PME 方法处理静电相互作用。每个体系经历 3 步优化过程。首先采用最陡下降法,然后采用共轭梯度法,最后经历 7 步升温过程,将体系温度从 0 K 升到 310 K^[24]。每个体系模拟 100 ns,用 RMSD 评估和检查体系的动力学稳定性。对于共价结合的氢原子,采用 Shake 算法。使用 Berendsen 算法保持温度恒定。使用 Amber18 中的 CPPTRAJ 模块对轨迹进行分析。

1.3 结合自由能计算

有 2 种方法可以估计对接复合物的结合自由能:分子力学-广义 Born 表面积法(MMGBSA)和分子力学泊松-Boltzmann 表面积法(MMPBSA)。2 种方法在计算体系的非成键的相互作用能的贡献都是采用的分子力学的方法。在溶液效应中,非极性部分对整个体系的自由能的影响都是通过计算分子表面积而得到^[25]。不同的是,在计算溶液效应中,计算极性部分对整个体系的自由能的贡献时,MMPBSA 是通过解 Poisson-Boltzmann(PB)方程的方法得到,MMGBSA 通过广义 Born 模型得到。2 种方法得到的自由能都是相对的,所以我们采用 MMGBSA 方法,分析分子运动轨迹,得到受体、

配体和复合物的各项能量和总能量,并通过以下方程估计系统的净能量:

$$\Delta G_{\text{Binding}} = \Delta G_{\text{Complex}} - \Delta G_{\text{Receptor}} - \Delta G_{\text{Ligand}}$$

上述每一项都包含几种键合能与非键合能的计算,如范德华相互作用能、静电相互作用能、极性对溶剂化能的贡献等。

2 结果与讨论

2.1 构建药效团模型

基于 Furin 受体的关键残基以及残基和抑制剂分子间的相互作用构建药效团。我们构建的 Furin 药效团模型,是基于 2 个关键残基 GLY255、GLU257 和氢键相互作用构建的 3 个药效团。其中,以 GLY255 为氢键供体和氢键受体构建了 2 个药效团,以 GLU257 为氢键受体构建了 1 个药效团。

2.2 基于药效团模型的虚拟筛选

利用 SYBYL 进行第 1 次筛选,筛选的分子库为 ZINC 数据库,筛选的小分子数目为 9 800 个,第 1 次筛选的原则基于类药五原则(Lipinski rules)和 pan assay interference compounds (PAINS)。第 1 次筛选后,剩余小分子数目 9 000 个。基于 Furin 药效团模型进行第 2 次筛选,利用 SYBYL 中的部分匹配功能,筛选满足药效团的小分子。经过筛选,最后选中 22 个小分子。

2.3 分子对接

利用 SYBYL 将选中的 22 个小分子与 Furin 受体进行对接,根据能量匹配和位置匹配,进行打分排序,选取打分值高于 6 分的小分子展示,如图 1 所示。筛选出打分排名靠前的 4 个小分子,从图 1 可以看出,分别为 ZINC7588、ZINC3496、ZINC7664 和 ZINC8366,4 个小分子和受体 Furin

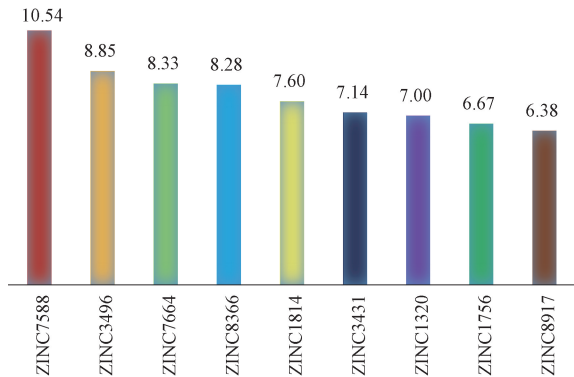


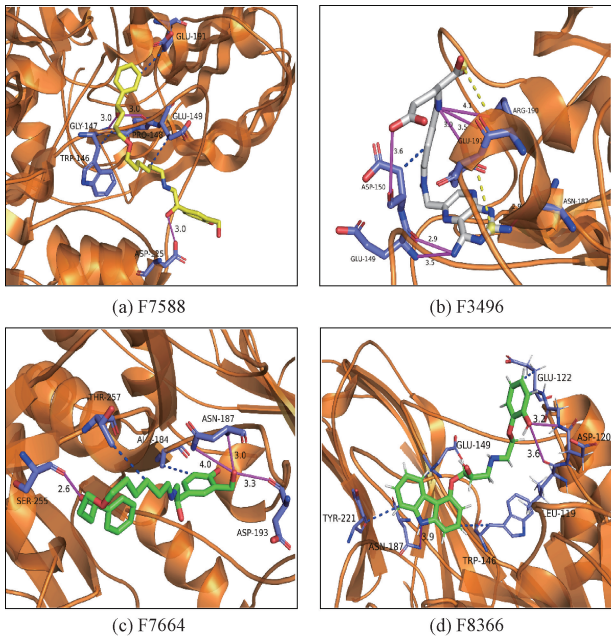
图 1 小分子与 Furin 的对接得分

Fig. 1 Docking score of small molecule and Furin

对接后的复合物结构分别为 F7588、F3496、F7664 和 F8366。

为了更清楚地认识 ZINC7588、ZINC3496、ZINC7664、ZINC8366 与 Furin 之间的相互作用,对 4 个小分子与 Furin 的结合模式进行分析,如图 2 所示。图中显示了小分子与 Furin 之间的非键相互作用和关键残基,不同颜色的线分别表示氢键、疏水相互作用和盐桥。

从图 2(a)可以看出 ZINC7588 与 Furin 的 6 个残基发生了相互作用,其中 Asp125、Gly147 和 Pro148 与 Furin 形成氢键,键长均为 3.0 Å; Trp146、Glu149 和 Glu191 与 Furin 之间有疏水相互作用。从图 2(b)可以看出 ZINC3496 与 Furin 的 5 个残基发生相互作用,形成 7 个氢键,其中 Glu149 和 Arg190 分别与 Furin 形成 2 个氢键,键长分别为 3.5、2.9、4.1、3.5 Å; Asp150、Asn187 和 Glu191 分别与 Furin 形成 1 个氢键,键长分别为 3.6、2.9 和 3.0 Å; Asp150 与 Furin 之间有疏水相互作用; Arg190 和 Glu191 与 Furin 形成盐桥。从图 2(c)可以看出 ZINC7664 与 Furin 的 5 个残基发生相互作用,其中 Asn187 与 Furin 形成 2 个氢键,键长分别为 3.0 和 4.0 Å; Asp193 和 Ser255 分别与 Furin 形成 1 个氢键,键长分别为 3.3 和 3.6 Å; Ala184 和 Thr257 与 Furin 之间有疏水相互作用。从图 2(d)可以看出 ZINC8366 与 Furin 的



粉实线表示氢键,蓝虚线表示疏水相互作用,黄虚线表示盐桥
图 2 F7588、F3496、F7664、F8366 的结合模式图
Fig. 2 Binding mode of F7588, F3496, F7664, and F8366

7 个残基发生相互作用,其中 Leu119、Asp120 和 Asn187 与 Furin 形成氢键,键长分别为 3.6、3.2 和 3.9 Å。Glu122、Trp146、Glu149 和 Tyr221 与 Furin 之间有疏水相互作用。

2.4 均方根偏差

对接后的 4 个复合物结构 F7588、F3496、F7664、F8366 为初始构象,利用 Amber 18 软件进行 100 ns 分子动力学模拟,得到 4 组轨迹,并对 4 组轨迹进行数据整理和分析。首先,对轨迹分析计算得到均方根偏差(RMSD)值随时间变化的图像,如图 3 所示。

图 3 表明,4 组轨迹均达到平衡,其中 F7588、F7664 和 F8366 的平均 RMSD 值稳定在 2.0 Å 左右,F3496 的平均 RMSD 值稳定在 2.25 Å 左右,均可在接受范围内,表明 4 个小分子配体都可以紧密地结合在 Furin 受体的活性口袋中。

2.5 均方根扰动

均方根扰动(RMSF)可以表示分子中各个原子的自由程度。对 4 组轨迹进行 RMSF 分析表明,Furin 关键残基的 RMSF 值没有大幅度的波动,如图 4 所示。

对活性口袋中的关键残基的 RMSF 值进行分析,从图 4 可以看出,小分子与 Furin 作用的关键残基的 RMSF 值处于一个相对较低的水平,平均值大约为 0.8 Å,表明由于 Furin 受体与小分子配体结合而使关键残基失去了灵活性,结合很稳定。

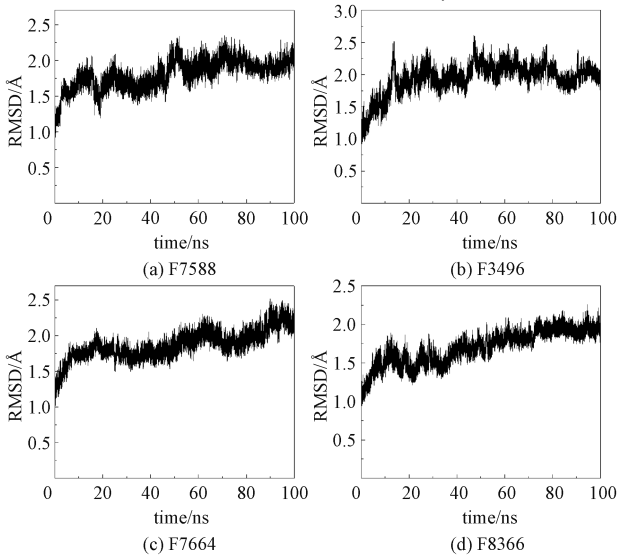


图 3 100 ns 分子动力学中 F7588、F3496、F7664 和 F8366 的 RMSD

Fig. 3 RMSD profile of F7588, F3496, F7664, and F8366 during 100 ns MD simulation

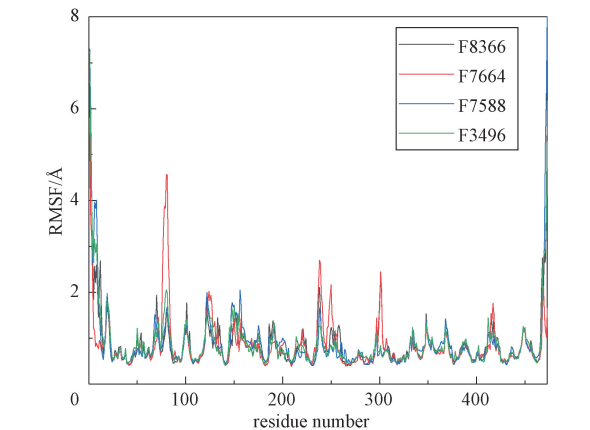


图 4 100 ns 分子动力学中 F7588、F3496、F7664 和 F8366 的 RMSF 图

Fig. 4 RMSF profile of F7588, F3496, F7664, and F8366 during 100 ns MD simulation

2.6 MMGBSA 结合自由能计算

通过计算复合物的结合自由能, 评估 Furin 受体和小分子对接后的复合物的结合稳定性。对 4 个复合物的分子动力学模拟进行 MMGBSA 计算, 得到 4 个复合物的各项能量平均值, 如表 1 所示。

表 1 列出了在 MMGBSA 中体系的结合自由能, 结合自由能越低, 表明结合稳定性越强。可以看出, 在各项能量贡献中, 复合物之间的相互作用主要是范德华相互作用能和静电相互作用能贡献, 其中 F7664 的范德华相互作用能最低, 为 -47.47 kcal/mol, F3496 的静电相互作用能最低, 为 -98.60 kcal/mol。极性溶剂化能不利于受体-抑制剂的结合, F3496 的极性溶剂化能最高, 为 112.29 kcal/mol。MMGBSA 预测的复合物的净结合能由低到高分别是 F7664、F3496、F8366 和 F7588。所以综合对比, 小分子 ZINC7664 更容易与 Furin 受体结合, 并且结合更稳定。

表 1 F7588、F3496、F7664 和 F8366 的结合自由能

Table 1 Binding free energies of F7588, F3496, F7664, and F8366

	energy/(kcal/mol)			
	F7588	F3496	F7664	F8366
VDWAALS	-37.80	-33.34	-47.47	-23.20
EEL	-13.27	-98.60	-32.58	-10.15
EGB	45.44	112.29	47.34	23.23
ESURF	-5.62	-4.44	-6.56	-3.00
DELTA G _{gas}	-51.07	-131.94	-80.05	-33.34
DELTA G _{sol}	39.82	107.85	40.77	20.24
DELTA TOTAL	-11.26	-24.09	-39.28	-13.11

3 结论

本文通过虚拟筛选、分子对接和分子动力学模拟的方法, 进行基于 Furin 受体的虚拟筛选, 以寻找 Furin 的潜在抑制剂。利用 Sybyl 基于 Furin 受体药效团模型进行虚拟筛选和分子对接, 从 ZINC 数据库中筛选出 4 个小分子 ZINC7588、ZINC3496、ZINC7664 和 ZINC8366, 对 4 组复合物进行分子动力学模拟表明, 它们在 65 ns 达到平衡, 保持了结构的稳定性, RMSD 值稳定在 2.0 Å 左右。在 RMSF 中可以看到, 关键残基的 RMSF 保持较低水平, 在 0.8 Å 左右, 也可以说明小分子与 Furin 受体结合稳定。对 4 组复合物进行 MMGBSA 分析对比, 发现 ZINC7664 的结合自由能最低, 为 -39.28 kcal/mol。综上所述, 小分子 ZINC7664 与 Furin 受体的结合最稳定, 具有较好的应用前景, 可用于设计有效的抑制 Furin 发挥作用的药物, 为治疗与 Furin 相关的疾病提供可能。

本文的计算结果是中国科学院计算机网络信息中心超级计算中心“元”上计算得到。

参考文献

[1] Fuller R S, Brake A J, Thorner J. Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease[J]. Science, 1989, 246(4929):482-486.

[2] Roebroek A J M, Schalken J A, Bussemakers M J G, et al. Characterization of human c-Fes/fps reveals a new transcription unit (fur) in the immediately upstream region of the proto-oncogene[J]. Molecular Biology Reports, 1986, 11 (2) :117-125.

[3] Nakayama K. Furin; a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins[J]. The Biochemical Journal, 1997, 327 (Pt 3) :625-635.

[4] Osadchuk T V, Shybyryn O V, Kibirev V K. Chemical structure and properties of low-molecular furin inhibitors[J]. Ukrainian Biochemical Journal, 2016, 88(6) :5-25.

[5] Gawlik K, Shiryayev S A, Zhu W, et al. Autocatalytic activation of the furin zymogen requires removal of the emerging enzyme's N-terminus from the active site[J]. PLoS One, 2009, 4(4) :e5031.

[6] Thomas G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(10) :753-766.

[7] Salvas A, Benjannet S, Reudelhuber T L, et al. Evidence for proprotein convertase activity in the endoplasmic reticulum/

- early Golgi[J]. FEBS Letters, 2005, 579(25):5621-5625.
- [8] 张友义, 刘伟娜, 赵慧娜, 等. Furin 的生物学功能[J]. 生命的化学, 2019, 39(2):353-359.
- [9] Henrich S, Cameron A, Bourenkov G P, et al. The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity[J]. Nature Structural Biology, 2003, 10(7):520-526.
- [10] Rockwell N C, Thorner J W. The kindest cuts of all: crystal structures of Kex2 and furin reveal secrets of precursor processing[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2004, 29(2):80-87.
- [11] Jaaks P, Bernasconi M. The proprotein convertase furin in tumour progression [J]. International Journal of Cancer, 2017, 141(4):654-663.
- [12] 王涛, 赵晶, 杨安钢. 弗林蛋白酶:一种广泛参与前体蛋白切割的内切蛋白酶[J]. 医学分子生物学杂志, 2006, 3(3):202-205.
- [13] Li Y F, Chu J H, Li J, et al. Cancer/testis antigen-Plac1 promotes invasion and metastasis of breast cancer through Furin/NICD/PTEN signaling pathway [J]. Molecular Oncology, 2018, 12(8):1233-1248.
- [14] Zhang Y, Zhou M, Wei H, et al. Furin promotes epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells via Hippo-YAP pathway[J]. International Journal of Oncology, 2017, 50(4):1352-1362.
- [15] Longuespée R, Couture F, Levesque C, et al. Implications of proprotein convertases in ovarian cancer cell proliferation and tumor progression: insights for PACE4 as a therapeutic target [J]. Translational Oncology, 2014, 7(3):410-419.
- [16] Sergeeva O A, van der Goot F G. Anthrax toxin requires ZDHHC₅ - mediated palmitoylation of its surface-processing host enzymes[J]. PNAS, 2019, 116(4):1279-1288.
- [17] 韩锦铂. 前体蛋白加工酶 furin 的天然抑制剂及相互作用蛋白研究[D]. 上海:中国科学院研究生院(上海生命科学研究院), 2007.
- [18] Basak A, Lazure C. Synthetic peptides derived from the prosegments of proprotein convertase 1/3 and furin are potent inhibitors of both enzymes [J]. The Biochemical Journal, 2003, 373(Pt 1):231-239.
- [19] Villemure M, Fournier A, Gauthier D, et al. Barley serine proteinase inhibitor 2-derived cyclic peptides as potent and selective inhibitors of convertases PC₁/3 and furin [J]. Biochemistry, 2003, 42(32):9659-9668.
- [20] Jean F, Boudreault A, Basak A, et al. Fluorescent peptidyl substrates as an aid in studying the substrate specificity of human prohormone convertase PC₁ and human furin and designing a potent irreversible inhibitor [J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(33):19225-19231.
- [21] Basak A, Cooper S, Roberge A G, et al. Inhibition of proprotein convertases-1, -7 and furin by diterpenes of *Andropogon paniculata* and their succinoyl esters [J]. The Biochemical Journal, 1999, 338 (Pt 1):107-113.
- [22] Podsiadlo P, Komiyama T, Fuller R S, et al. Furin inhibition by compounds of copper and zinc [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(35):36219-36227.
- [23] Dahms S O, Arciniega M, Steinmetzer T, et al. Structure of the unliganded form of the proprotein convertase furin suggests activation by a substrate-induced mechanism[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(40):11196-11201.
- [24] 方磊, 计明娟. PTP1B 选择性抑制剂的分子动力学模拟及结合自由能计算 [J]. 中国科学院研究生院学报, 2009, 26(1):58-64.
- [25] 侯廷军, 朱丽荔, 陈丽蓉, 等. EGFR 和 4-苯胺噻唑啉类抑制剂之间相互作用模式的研究 [J]. 化学学报, 2002, 60(6):1023-1028.