

本文引用:张 弦,周 鑫,尹 华,张昊霖,文 菲,熊广华,曹德良,廖端芳,傅榕庚.水杨酰苯胺类 mglu5 拮抗剂作用模式及体外抗肿瘤活性研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(6):614-618.

## 水杨酰苯胺类 mglu5 拮抗剂作用模式及 体外抗肿瘤活性研究

张 弦<sup>1,2</sup>,周 鑫<sup>1</sup>,尹 华<sup>1</sup>,张昊霖<sup>1</sup>,文 菲<sup>1</sup>,熊广华<sup>3</sup>,曹德良<sup>2</sup>,廖端芳<sup>1\*</sup>,傅榕庚<sup>1\*</sup>

(1.湖南中医药大学药学院,湖南 长沙 410208;2.湖南中医药大学中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室  
培育基地,湖南 长沙 410208;3.国家重点学科国家中医药管理局病理生理实验室,湖南 长沙 410208)

**[摘要]** 目的 基于分子对接探讨水杨酰苯胺化合物 I-IV 与代谢型谷氨酸受体 5(metabotropic glutamate receptor 5, mglu5) 之间的相互作用并测定化合物 I-IV 的体外抗肝癌 HepG2 细胞增殖活性。方法 采用计算机软件,以 mglu5 结晶复合物 5CGD 为受体模板,将水杨酰苯胺化合物 I-IV 进行分子对接研究;利用 MTT 法测定水杨酰苯胺化合物 I-IV 对肝癌 HepG2 细胞的增殖抑制活性。结果 水杨酰苯胺化合物 I-IV 与 mglu5 的活性口袋产生疏水作用以及与活性口袋关键氨基酸残基 SER809 产生氢键结合;水杨酰苯胺化合物 I-IV 对肝癌细胞 HepG2 的抗增殖活性 IC<sub>50</sub> 值分别为 2.55 μmol/L、3.99 μmol/L、3.12 μmol/L 和 7.55 μmol/L。结论 水杨酰苯胺化合物 I-IV 与 mglu5 对接的结合信息有助于水杨酰苯胺类 mglu5 拮抗剂的结构优化和新型 mglu5 拮抗剂设计,该类化合物的抗肿瘤作用值得进一步研究。

**[关键词]** 水杨酰苯胺;代谢型谷氨酸受体 5 拮抗剂;对接;抗肿瘤

**[中图分类号]** R284.3

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.06.002

### Molecular Docking of Salicylanilides with mglu5 and Their Antitumor Activity *in Vitro*

ZHANG Xian<sup>1,2</sup>, ZHOU Xin<sup>1</sup>, YIN Hua<sup>1</sup>, ZHANG Haolin<sup>1</sup>, WEN Fei<sup>1</sup>, XIONG Guanghua<sup>3</sup>, CAO Deliang<sup>2</sup>,

LIAO Duanfang<sup>1\*</sup>, FU Ronggeng<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. State Key Laboratory of Chinese Medicine Powder and Medicine Innovation in Hunan (Incubation), Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Hunan Provincial Key Laboratory of Diagnostic and Research in Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the interaction between the salicylanilides I-IV with metabotropic glutamate receptor 5 (mglu5) based on molecular docking and their antitumor activity *in vitro*. **Methods** The molecular docking study of salicylanilides I-IV were performed by using mglu5 as a receptor template by in silica software. *In vitro* cytotoxicity of salicylanilides I-IV to human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 was measured by a MTT method. **Results** It was found that salicylanilides I-IV interacted with mglu5 binding site by hydrophobic interaction and a key hydrogen bond with amino acid residue SER809. These interactions were closely related to biological activity. Compounds I-IV showed inhibitory effect on the proliferation of HepG2 cells

**[收稿日期]** 2017-11-09

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81472465);湖南省自然科学基金项目(2015JJ6085);湖南省教育厅资助科研项目(13B080);2015 药  
学湖南省重点学科开放基金项目;2015 中医药国际合作专项基金资助项目(ZYGZ201502);湖南中医药大学本科教学质量工程项目(ZY-005)。

**[作者简介]** 张 弦,女,在读硕士研究生,主要从事药理学研究。

**[通讯作者]** \* 傅榕庚,男,博士,讲师,E-mail: furronggeng@hncmcm.edu.cn; \* 廖端芳,男,教授,博士研究生导师,E-mail: dfliao@hncmcm.edu.cn。

with the  $IC_{50}$  values of 2.55  $\mu$ M, 3.99  $\mu$ mol/L, 3.12  $\mu$ mol/L and 7.55  $\mu$ mol/L, respectively. **Conclusion** The binding information of salicylanilides with mglu5 would be useful for modifying the structure and designing novel mglu5 antagonists. The antitumor activity of compounds of this type would be further studied.

[**Keywords**] salicylanilide; mglu5 antagonist; docking; antitumor

代谢型谷氨酸受体 5(metabotropic glutamate receptor 5, mglu5) 属于 G 蛋白偶联受体家族的成员,广泛存在于中枢神经系统,并且在多种神经退行性疾病中发挥了至关重要的作用<sup>[1]</sup>。近年来的研究发现,mglu5 不仅存在于脑组织,在许多外周器官和组织中也有表达,mglu5 表达及活性的异常还与恶性肿瘤(如肝癌)的发生发展关系密切<sup>[2]</sup>。因此,mglu5 已成为相关疾病新药研究的热门靶点。

mglu5 拮抗剂代表骨架为二芳基类为主的直线型分子<sup>[3-4]</sup>,而水杨酰苯胺 mglu5 拮抗剂 I-IV (结构

如图 1 所示)是我们课题组前期将水杨酰苯胺这一分子骨架与 4-苯胺基唑啉类 mglu5 拮抗剂(代表化合物 A)分子骨架进行骨架跃迁,设计合成得到的新型 mglu5 拮抗剂<sup>[5-6]</sup>。目前水杨酰苯胺类化合物 I-IV 与 mglu5 相互作用,以及体外抗肝癌细胞增殖活性的研究均无文献报道。由于 mglu5 的表达及活性异常与肝癌的发生发展关系密切,因此,本文通过对研究揭示水杨酰苯胺类化合物与 mglu5 结合作用模式并初步测定了水杨酰苯胺类化合物 I-IV 的体外抗肝癌增殖活性。

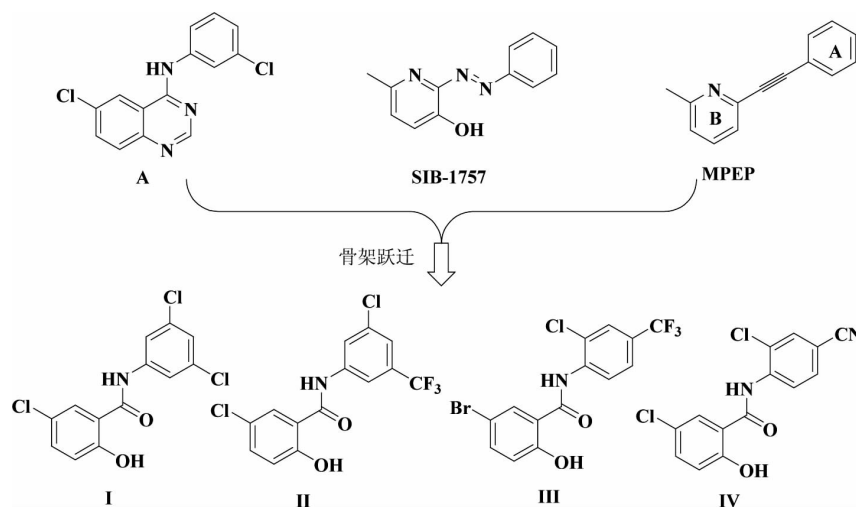


图 1 水杨酰苯胺类 mglu5 拮抗剂 I-IV 的设计与分子结构

## 1 水杨酰苯胺类化合物 I-IV 与 mglu5 结合模式研究

### 1.1 材料与方法

使用 Tripos Benchware 软件绘制化合物 I-IV、MPEP 以及化合物 A 的三维结构,并对此三维结构进行能量优化、加氢、加电荷等预处理,将优化好的分子保存为 mol2 格式文件备用。

### 1.2 受体准备

所选取的 mglu5 的三维结构文件来源于 RSCB 蛋白质数据库(PDB code:5CGD)。这一蛋白晶体由 A、B 两条完全对称的亚单元组成,其中还包含了配体 HTL14242。在分子对接前,使用 Tripos Benchware

软件对 mglu5 蛋白进行加氢、加电荷、去配体、去水分子等预处理,并保存为 mol2 文件格式备用。

### 1.3 分子对接方法和原理

Gold 是一款由英国剑桥大学晶体数据中心开发的一款分子对接程序,采用遗传算法(GA)进行蛋白-配体柔性对接,从而计算大分子与小分子结合模式,具有精度高、可靠性高以及操作界面友好等特点。

对接定义活性口袋设定以 HTL14242 半径 5Å 以内的氨基酸残基组成的活性口袋,即由 ILE625、ILE651、SER654、PRO655、SER658、TYR659、ASN747、THR781、ILE784、TRP785、PHE788、VAL806、SER805、SER809、ALA810 氨基酸残基构成。

Gold 程序借用遗传算法将化合物 I-IV、MPEP、

化合物 A 与 mglu5 对接,充分搜索构象空间,以找到分子相互作用的最优模式。Gold 程序提供了多种相互作用打分,用拟合度(GoldScore Fitness)函数表示。根据拟合度函数值的大小判断分子对接的好坏,函数值越大则分子间相互作用越强,形成的复合物能量越低,越稳定。在 Gold 对接过程中不允许提前结束对接,对接过程中配体构象可翻转。如无特别说明,所有参数均采用 Gold 3.0 默认值。

## 2 化合物 I-IV 体外抗肝癌 HepG2 细胞增殖活性

取对数生长期状态良好的为 HepG2 肝癌细胞(来源于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心)加入 0.25%胰酶蛋白消化,使贴壁细胞脱落,制成细胞悬液,密度为  $5 \times 10^4$  个/mL。分别以 100  $\mu$ L/孔,每孔  $5 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔培养板

中。置 37  $^{\circ}$ C,5%  $\text{CO}_2$  孵箱内培养 24 h。吸弃上清,然后分别加入 200  $\mu$ L 不同浓度(0.1  $\mu$ mol/L 至 25  $\mu$ mol/L)的目标化合物,每组设 8 个复孔。培养 72 h 后,再加入 5 mg/mL 的 MTT 20  $\mu$ L/孔,继续培养 4 h 后吸弃上清,加入 DMSO 150  $\mu$ L/孔,微振荡器上振荡 10 min,将试剂对照调零,用自动酶标仪在 550 nm 波长处测出细胞对照组和各药物组的吸收度,取各组均值,并计算细胞抑制率。计算化合物对细胞的抑制率(IR)。IR=[1-(实验孔 OD 值-空白孔 OD 值)/(对照孔 OD 值-空白孔 OD 值)] $\times$ 100%,计算 IC<sub>50</sub> 值,使用软件 Grapipad Prism 5.0 拟合计算得到。

## 3 结果与讨论

化合物 I-IV 与 mglu5 活性口袋对接结果如表 1 所示,函数值越大则分子间相互作用越强,形成的复合物能量越低,相对越稳定。

表 1 化合物 I-IV 与 mglu5 活性口袋对接函数值

GoldScore Fitness	化合物 I	化合物 II	化合物 III	化合物 IV	MPEP	化合物 A
函数值	56.60	55.88	53.09	51.72	60.99	22.34

注:实测值来源于参考文献<sup>[6]</sup>。

### 3.1 MPEP 与 mglu5 结合模式分析

将 MPEP 对接到 mglu5 活性口袋中,如图 2 所示:MPEP 在 mglu5 活性口袋中分别与关键的氨基酸残基 SER809 形成一个氢键,氢键键长为  $1.879 \times 10^{-10}$  m。

MPEP 结构中的 A 环进入 mglu5 活性口袋中由 TRP785、PHE788、ILE651、VAL806、SER805 等形成的疏水腔,TRP785 的苯环结构能够与 MPEP 产生  $\pi$ - $\pi$  堆积作用,对 MPEP 构象的稳定起到一定作用;MPEP 结构中 B 环作用于另一疏水腔。在横跨活性口袋方向,ILE625、PHE788 的位阻限制了化合物的长度。

### 3.2 化合物 A 与 mglu5 结合模式分析

如图 3 所示,将化合物 A 对接到 mglu5 活性口袋中,其在 mglu5 活性口袋中与一个关键的氨基酸残基 SER809 形成一个氢键,长度为  $1.792 \times 10^{-10}$  m。

化合物 A 结构中的 A 环进入 mglu5 活性口袋中由 TRP785、PHE788、ILE651、VAL806、SER805 等形成的疏水腔,A 环上的胺基作为氢键供体与关键的氨基酸残基 SER809 形成氢键。化合物 A 结构中的喹啉环刚性较强,分子趋于平面构象。

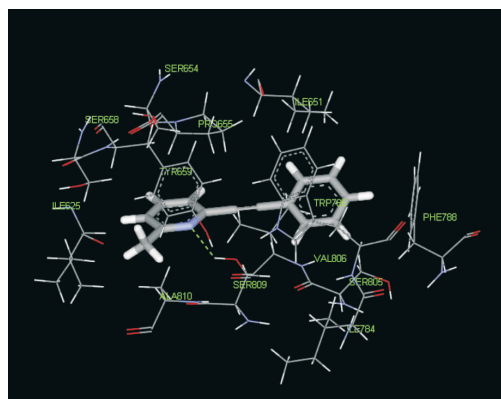


图 2 MPEP 的作用模式

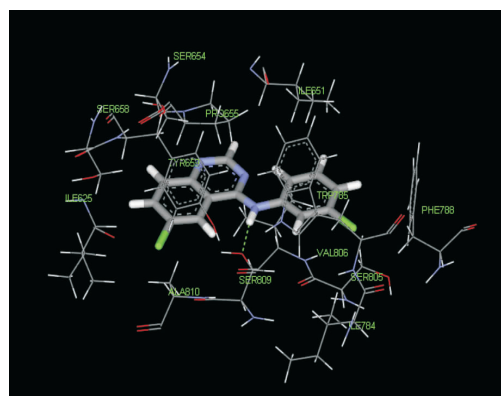
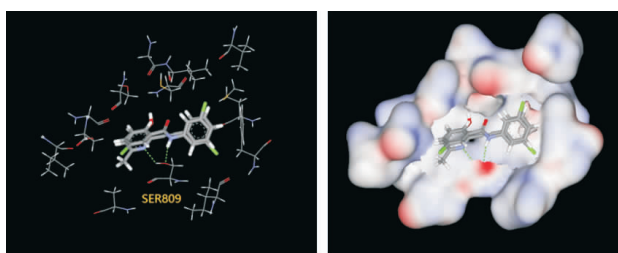


图 3 化合物 A 的作用模式

### 3.3 化合物 I 与 MPEP 在 mglu5 活性口袋结合模式比较

鉴于化合物 MPEP 是代表性的 mglu5 拮抗剂工具药,如图 4 所示,首先将化合物 I 与 MPEP 对接到 mglu5 活性口袋中,二者的苯环重叠性较好,均作用于 mglu5 的疏水口袋;化合物 I 的酰胺结构和 MPEP 的碳碳三键结构的长度相近,两者都能与关键的 SER809 形成氢键。不同之处在于化合物 I 和 MPEP 在与 SER809 形成氢键时分别提供氢键受体和氢键供体。结合体外活性结果,推测二者氢键产生的方式不同。

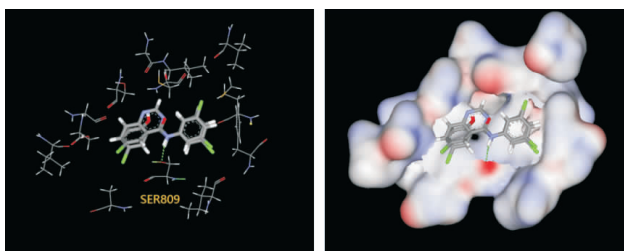


注:左为作用模式,右为添加表面示意图。

图 4 化合物 I 和 MPEP 在 mglu5 活性口袋中的状态

### 3.4 化合物 I 与化合物 A 在 mglu5 活性口袋结合模式比较

如图 5 所示,将化合物 I 与化合物 A 对接到 mglu5 活性口袋中,化合物 I 的两个苯环与化合物 A 中的两个苯环在口袋中叠合较好,均作用于关键的疏水口袋,且两化合物都能通过胺基与 SER809 形成氢键。从对接结果看,化合物 A 的水杨酰苯胺结构中的羟基与羰基通过分子内氢键形成的“假”六元环构型能够很好的模拟化合物 A 中的喹啉结构。区别在于:喹啉环相对于水杨酰苯胺结构刚性较强,而所设计的水杨酰苯胺化合物没有类似刚性结构的约束。上述对接结果也验证了设计思想的可行性,即将 4-苯胺基喹啉结构通过骨架跃迁水杨酰苯胺结构,可以具有类似的作用模式。

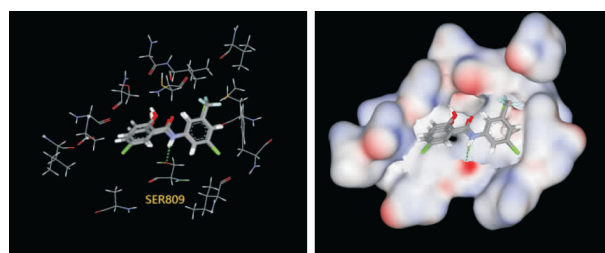


注:左为作用模式,右为添加表面示意图。

图 5 化合物 I 和化合物 A 在 mglu5 活性口袋中的状态

### 3.5 化合物 I 和化合物 II 在 mglu5 活性口袋结合模式比较

如图 6 所示,将化合物 I 与化合物 II 对接到 mglu5 活性口袋中。两者的芳环均作用于 mglu5 的疏水腔中,差异在于:与化合物 I 相比,由于化合物 II 的苯胺 3' 碳位置上的氯原子被体积较大的三氟甲基取代,使得化合物 II 与疏水腔存在一定的空间位阻,从某种程度上影响了化合物与 mglu5 产生氢键的强度,对接打分值与实测值正相关,即对 mglu5 拮抗活性化合物 I 强于化合物 II (如表 1 所示)。



注:左为作用模式,右为添加表面示意图。

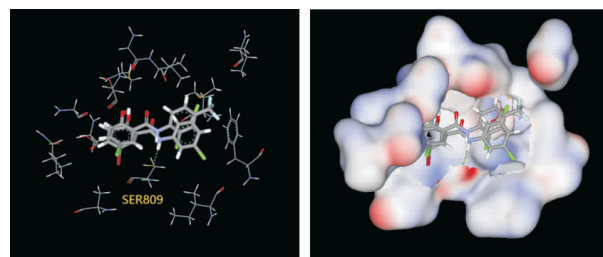
图 6 化合物 I 和化合物 II 在 mglu5 活性口袋中的状态

### 3.6 化合物 III 和化合物 I 在 mglu5 活性口袋结合模式比较

如图 7 所示,将化合物 I 与化合物 III 对接到 mglu5 活性口袋中。由于化合物 I 与化合物 III 在取代基上有较大的差异(化合物 III 苯环上 5 位为溴原子,苯胺的取代基为 2'-氯-4'-三氟甲基),使得化合物 III 的作用模式与化合物 I 有较大的差异:化合物 III 有体积较大的三氟甲基且在苯胺的 4' 位,使得整个化合物的长度增加,由于 PHE788 的大位阻的存在,使化合物 III 结合构象产生了较大的偏移,结果使得其不能与 mglu5 活性口袋中的关键氨基酸残基 SER809 产生氢键。

### 3.7 化合物 IV 和化合物 I 在 mglu5 活性口袋结合模式比较

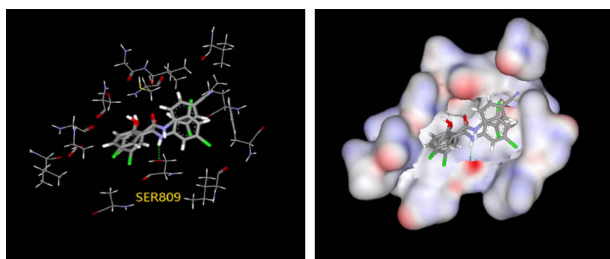
如图 8 所示,将化合物 I 与化合物 IV 对接



注:左为作用模式,右为添加表面示意图。

图 7 化合物 I 和化合物 III 在 mglu5 活性口袋中的状态

到 mglu5 活性口袋中。由于化合物 IV 结构中苯胺上 4' 位为较长的氰基, 而活性口袋长度有限, 使得化合物 IV 在口袋中的结合构象同样产生了较大的倾斜, 不仅降低了其在疏水腔中产生的疏水作用, 而且使得其不能靠近关键的氨基酸残基 SER809 产生氢键。因此, 在活性上化合物 IV 对 mglu5 的拮抗活性远低于化合物 I。



注: 左为作用模式, 右为添加表面示意图。

图 8 化合物 I 和化合物 IV 在 mglu5 活性口袋中的状态

### 3.8 化合物 I-IV 对肝癌 HepG2 细胞增殖的影响

目标化合物 I-IV 对肝癌细胞 HepG2 具不同程度的抗增殖活性,  $IC_{50}$  值分别为 2.55  $\mu\text{mol/L}$ 、3.99  $\mu\text{mol/L}$ 、3.12  $\mu\text{mol/L}$  和 7.55  $\mu\text{mol/L}$ 。目标化合物体外抗 HepG2 增殖实验结果与 mglu5 拮抗活性具有一定的正相关性, 即化合物 I 活性在 4 个目标化合物中抗增殖活性最强, 化合物 IV 抗增殖活性最差。见表 2。

表 2 化合物 I-IV 对肝癌 HepG2 细胞的增殖作用及

化合物	mglu5 的拮抗活性 ( $IC_{50}$ , $\mu\text{mol/L}$ )	
	HepG2	mglu5*
化合物 I	2.55	0.079
化合物 II	3.99	0.23
化合物 III	3.12	0.19
化合物 IV	7.55	11.5

注: \* 数据源于课题组前期工作<sup>[6]</sup>。

## 4 结论

本课题组前期设计合成的水杨酰苯胺化合物 I-IV, 通过与 mglu5 的活性口袋产生疏水作用以及与活性口袋关键氨基酸残基 SER809 产生氢键作用, 从而拮抗 mglu5, 并对 HepG2 细胞增殖产生抑制, 符合文献<sup>[2]</sup>报道的 mglu5 的表达与 HepG2 细胞增殖正相关这一规律。对接研究发现: 水杨酰苯胺取代基的种类、个数以及取代位置对 mglu5 拮抗活性有较大影响, 此结合模式提供的信息将为针对 mglu5 这一靶点设计抗肿瘤新化合物提供新方向。

### 参考文献:

- [1] WIJETUNGE L S, TILL S M, GILLINGWATER T H, et al. mGluR5 regulates glutamate-dependent development of the mouse somatosensory cortex[J]. *J Neurosci*, 2008, 28(49):13028-13037.
- [2] WU Y L, WANG N N, GU L, et al. The suppressive effect of metabotropic glutamate receptor 5 (mGlu5) inhibition on hepatocarcinogenesis[J]. *Biochimie*, 2012, 94(11):2366-2375.
- [3] VARNEY M A, COSFORD N D, JACHEC C, et al. SIB-1757 and SIB-1893: selective, noncompetitive antagonists of metabotropic glutamate receptor type 5[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, 290(1):170-181.
- [4] COSFORD N D, TEHRANI L, ROPPE J, et al. 3-[(2-Methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl]-pyridine: a potent and highly selective metabotropic glutamate subtype 5 receptor antagonist with anxiolytic activity[J]. *J Med Chem*, 2003, 46(2):204-206.
- [5] FELTS A S, SALEH S A, LE U, et al. Discovery and SAR of 6-substituted-4-anilinoquinazolines as non-competitive antagonists of mGlu5[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19(23): 6623-6626.
- [6] 傅榕康, 杨辰枝子, 严建业, 等. 水杨酰苯胺类 mglu5 拮抗剂的设计、合成及活性研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2017, 37(5):489-492.

(本文编辑 苏 维)