

网络出版时间: 2019-12-18 17:12 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20191217.1516.018.html>

FtsZ 小分子抑制剂的筛选及抗 *S. aureus* 活性评价

姚舒生¹, 刘晨², 汪安勇¹, 王中新¹

摘要 目的 寻找靶向细丝温度敏感蛋白 Z(FtsZ) 新型结构的抗菌药物。方法 采用 Discovery Studio 2017 软件通过多重策略虚拟筛选靶向结合 FtsZ、具有潜在成药性的小分子化合物; 通过肉汤稀释法评价小分子化合物对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) 的抗菌作用; 分子动力学模拟评价小分子化合物与 FtsZ 蛋白结合稳定性。结果 虚拟筛选获得 15 个与 FtsZ 蛋白晶体结构有良好结合作用的小分子化合物; 抗菌活性评价显示筛选出的化合物对甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌(MSSA) 和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA) 均有一定的抗菌作用, 其中化合物 5010-0572 的活性最好, 对两种菌最小抑菌浓度(MIC) 值都达到 1 $\mu\text{g/ml}$; 分子动力学模拟显示抗菌活性好的化合物 5010-0572 与 FtsZ 结合稳定性远远好于抗菌活性较差的化合物 C592-0444。结论 靶向 FtsZ 的小分子化合物抗菌活性与蛋白结合稳定性密切相关; 化合物 5010-0572 具有良好的抗 *S. aureus* 活性, 具有成为抗菌药物先导化合物的潜力。

关键词 靶向; 细丝温度敏感蛋白 Z; 虚拟筛选; 金黄色葡萄球菌; 抗菌

中图分类号 R 91

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)01-0084-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.01.018

细菌耐药已经成为一个全球性的问题, 新型抗菌药物的研发需求已变得十分迫切^[1-2]。传统抗菌药物获取的主要方式是对现有抗菌药物的结构改造, 但这一策略的开展现在变得越来越困难, 故寻找新的抗菌药物作用靶点、开发作用于新型靶点的抗菌药物已成为一条越来越重要的途径^[3]。细丝温度敏感蛋白 Z(filamentous temperature-sensitive protein Z, FtsZ) 属于细菌分裂蛋白家族, 广泛分布在原核细胞中, 高度保守, 具有 GTP 酶活性, 作为细菌分

裂的起始调控蛋白, 参与细菌细胞分裂的整个过程^[4-5]。研究发现, 抑制 FtsZ 的功能能够阻止细菌细胞分裂体的形成, 进而导致细菌细胞死亡^[6-8]。

计算机辅助药物设计(computer-aided drug design, CADD) 是近年来流行的一种重要的合理药物设计方法, 其基本原理通过模拟小分子药物和大分子相互作用而设计新型药物先导化合物^[9]。CADD 技术的发展极大减少了新药研发的盲目性和偶然性, 大大缩短了新药研发的周期, 节约了大量的人力、财力, 成为新药研发重要的一环^[10]。该研究利用 CADD 技术, 选择了来自于金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) 的 FtsZ 晶体结构(PDB 号: 4DXD)^[11] 为靶点, 开展了虚拟筛选, 对筛选的化合物进行体外抗 *S. aureus* 活性评价, 并利用分子动力学模拟对部分筛选结果进行了分析, 希望能够获取 FtsZ 抑制剂, 为研发新的抗菌药物提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 主要设备与试剂 计算工作使用美国 Accelrys 公司的 Discovery Studio 2017 软件完成; 小分子库来源于美国 Chemdiv 公司, 筛选出的小分子化合物均购自于该公司; 化合物 PC190723 购自北京百诺威生物科技有限公司; 对甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌(MSSA, ATCC29213)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA, ATCC43300) 由安徽医科大学第一附属医院检验科提供; 营养肉汤购自于杭州百思生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 靶标的准备 FtsZ 蛋白晶体解析结构在 Protein Data Bank 数据库下载, PDB 编号为 4DXD。在筛选前首先进行预处理, 包括删除水分子、原配体分子 PC190723、非相关的蛋白质构象; 其次定义活性中心, 选择原配体位置为中心, 把直径 18 Å 的范围内的氨基酸残基定义为活性氨基酸残基, 保存备用。

1.2.2 软件适用性评价 评价 Discovery Studio 2017 软件中用于对接的模块, 包括 Libdock、Ligandfit、CDOCKER 和 Flexible Docking。选择定义的

2019-09-06 接收

基金项目: 安徽高校自然科学基金项目(编号: KJ2018A0210)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院检验科, 合肥 230022

²安徽医科大学微生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 姚舒生, 男, 硕士研究生;

汪安勇, 男, 副主任技师, 责任作者, E-mail: aywanganyong@163.com;

王中新, 男, 主任技师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: ay-wzhx87@163.com

活性中心为对接位置,分别利用4种对接模块(对接参数设置见1.2.3项虚拟筛选)将4DXD晶体复合物中的原配体PC190723对接回原来位置,用对接结果中结合能力最好构象与原配体构象之间的均方根偏差值(root-mean-square difference, RMSD)评价各模块的适用性, $\text{RMSD} \leq 1 \text{ \AA}$,表示对接软件及参数设置具有高度适用性。

1.2.3 虚拟筛选

1.2.3.1 Libdock 模块筛选 从Discovery Studio 2017 操作界面调出Libdock 模块,设置参数如下: Ligands 栏设置为 Chemdiv 公司小分子数据库, Receptor 栏设置为活性中心定义后的蛋白4DXD, Docking Preferences 选择为 High Quality, 每个小分子定义为20个构象,其余参数为默认值。筛选结束后根据 Libdock Score 打分保留每个小分子分值最高的构象,以原配体PC190723的最高分值构象为阈值,保留高于阈值的小分子,命名为Group 1。

1.2.3.2 Ligandfit 模块筛选 从工作界面调出Ligandfit 模块,设置参数如下: Ligands 栏设置为 Group 1, Receptor 栏设置为活性中心定义后的蛋白4DXD, Scoring Functions 中选择 Dock-Score, 每个小分子定义为20个构象,其余参数为默认值。筛选结束后保留每一个小分子 Dock-Score 打分最高构象,选择原配体PC190723做参照,筛选出 Dock-Score 打分高于PC190723最高打分的小分子,命名为Group 2。

1.2.3.3 CDOCKER 模块筛选 运行CDOCKER 模块,把预处理后的4DXD设置为指定受体,小分子配体选择Group 2,对接位置设置为活性位点,每个小分子定义为20个构象,其余参数为默认值。完成对接后,选择-CDOCKER_TNTERACTION_ENERGY 参数打分,保留每个小分子最高打分构象,按降序排列,筛选出打分高于PC190723的小分子,命名为Group 3。

1.2.3.4 Flexible Docking 模块筛选 首先定义活性位点中关键氨基酸残基,包括 Gly205、Val207、Leu209、Asn263、Ser204,选定之后设置为 Class 1。运行Flexible Docking 模块,对接受体设置为4DXD,对接配体设置为Group 3, Selected Residues 设置为 Class 1, Conformation Method 设置为 Best,对接次数每个小分子设置为20个构象,其余参数为默认值。对接完成后,选择-CDOCKER_TNTERACTION_ENERGY 参数打分,保留每个小分子最高打分构象,按降序排列,筛选出打分高于PC190723的小分子,命名为Group 4。

1.2.3.5 类药性筛选 打开Small molecules 工具栏,选择Filter Ligands 工具面板中的命令工具Filter by Lipinski and Veber Rule,小分子定义为Group 4,根据Veber Rule 规则和Lipinski' 类药性原则筛选出Group 4 适合成药的小分子,命名为Group 5。

1.2.4 最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC) 检测 抗菌实验方法参照美国临床实验室标准委员会的方法进行,采用肉汤稀释法检测将Group 5 中的化合物终浓度分别为256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5 $\mu\text{g/ml}$ 时的抗菌作用。具体操作步骤:取无菌96孔板,在每孔中加入100 μl 的营养肉汤培养基,第一列每孔中再补加95 μl 的营养肉汤培养基,随后分别取浓度为10.24 mg/ml 的化合物5 μl 加入到第一列各孔中,混匀,倍半稀释,最后从第10孔中吸取100 μl 液体,最后在每个孔中加入预配制的菌液5 μl ,设置空白对照和阴性对照,做好标记,在37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育24 h,观察结果,计算MIC 值。

1.2.5 分子动力学模拟 将对接后的4DXD 蛋白-配体复合物首先进行溶剂化处理,处理后加CHARMM 力场进行能量优化;其次在NVT 系统下进行模拟升温,温度参数设置为0~300 K,升温时间设置为0.25 ns,压力设置为1 atm,到达预定参数值后进行0.25 ns 的平衡模拟,最后对体系进行5 ns 的模拟,每0.002 ns 保存一次轨迹文件。使用Discovery Studio 2017 的Simulation 模块完成。

2 结果

2.1 对接软件适用性评价 使用4种对接模块Libdock、Ligandfit、CDOCKER 和 Flexible Docking 对原配体和FtsZ 蛋白晶体对接,见图1。结果显示4种对接模块对接后配体PC190723与对接前FtsZ 蛋白晶体复合物中的同一配体PC190723相比,RMSD 值均小于1 $\text{\AA}$,说明这4种对接程序及参数设置均适用于分子对接的研究,对接结果是可信的。

2.2 虚拟筛选结果 对ChemDiv 公司小分子库中39 005个小分子化合物经多步筛选,使用PC190723作为对照。结果显示使用Libdock 和 LigandFit 模块快速筛选后得到5 632个小分子化合物;使用CDOCKER 对筛选得到的5 632个小分子化合物各个构象在受体活性位点进行优化,精确对接后得到473个小分子化合物;使用Flexible Docking 模块针对关键氨基酸残基进行全柔性对接后剩余72个小分子化合物;最后通过类药性评价,获得15个具

表1 Discovery Studio 2017 软件4个模块筛选结果分值及体外抗 *S. aureus* 活性(MIC)评价

小分子编号	Libdock	LigandFit	CDOCKER	Flexible Docking	MSSA ATCC29213 ^e MIC 值($\mu\text{g/ml}$)	MRSA ATCC43300 ^e MIC 值($\mu\text{g/ml}$)
5449-0045	162.1	72.724	57.977 5	60.7517	2	4
8007-3764	158.2	78.212	53.394 8	58.499 9	8	32
7706-0425	170.9	75.398	57.253 0	59.132 5	4	8
C592-0444	182.0	92.448	66.951 9	67.339 0	64	128
V012-4515	150.5	77.148	54.839 0	66.787 3	4	8
4581-2246	153.7	97.761	54.910 7	63.758 7	16	16
C198-0473	164.2	105.781	57.752 1	60.699 8	16	8
C548-2773	157.9	86.383	53.973 5	59.250 3	64	64
5010-0572	170.4	106.182	59.482 6	61.176 8	1	1
C614-6337	179.8	62.864	59.442 7	60.313 7	32	8
5012-0010	168.0	61.622	58.779 9	57.187 2	16	16
6145-0510	185.6	68.615	50.356 2	58.173 2	64	32
3627-0038	155.0	83.445	54.737 5	58.499 9	32	32
8018-3534F	156.2	73.174	52.803 7	60.313 7	64	32
5591-1071	174.3	89.182	57.440 9	60.751 7	4	4
PC190723	152.4	88.678	56.344 9	56.517 6	1	1

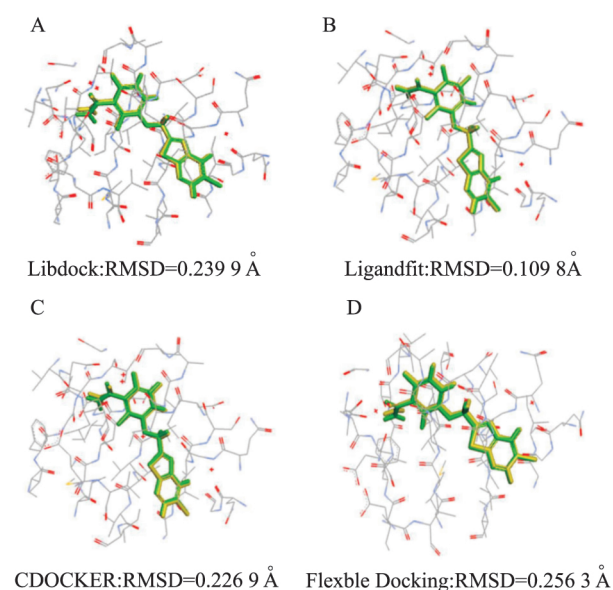


图1 对接软件一致性评价

A: Libdock 模块对接; B: Ligandfit 模块对接; C: CDOCKER 模块对接; D: Flexible Docking 模块对接; 黄色结构为 PC190723 在 4DXD 晶体复合物构象, 绿色为 PC190723 对接后的构象

有成药潜力的小分子化合物。见图 2、3 和表 1。

2.3 化合物抗菌活性评价 结果如表 1 所示, 所筛选出的化合物对 MSSA 和 MRSA 均表现出一定的抗菌活性, MIC 值范围分别为 1 ~ 64 $\mu\text{g/ml}$ 和 1 ~ 128 $\mu\text{g/ml}$ 。其中, 化合物 5010-0572 表现出最强的活性, MIC 值均为 1 $\mu\text{g/ml}$, 与 FtsZ 抑制剂 PC190723 相当; 化合物 5591-1071 和 5449-0045 也表现出良好的抗 MSSA 和 MRSA 的作用, MIC 值分别为 1 ~ 4 $\mu\text{g/ml}$ 之间。C592-0444 抗 MSSA 和 MRSA 增殖的

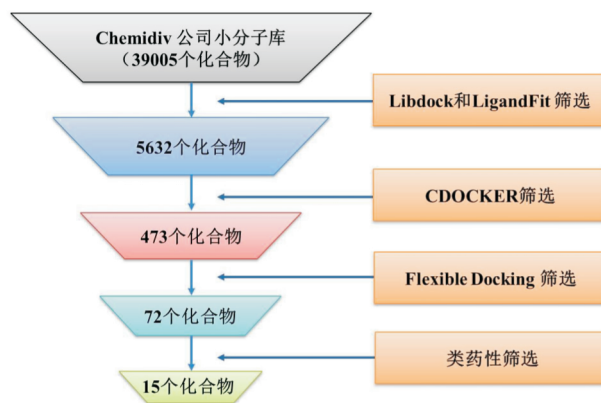


图2 虚拟筛选流程及结果

作用最差, MIC 值分别为 64 $\mu\text{g/ml}$ 和 128 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.4 配体-受体复合物体系稳定性评价 基于抗菌活性评价结果, 采用分子动力学模拟评估了化合物 5010-0572、5591-1071、5449-0045、C592-0444 和 PC190723 在与 FtsZ 蛋白对接形成的配体-受体复合物体系稳定性。结果如图 4 所示, 晶体复合物中的原配体 PC190723 在 2.5 ns 的时候与受体的结合便得到平衡。筛选出的 4 个化合物中, 化合物 5010-0572 的 RMSD 变化幅度和 PC190723 相比最为接近, 化合物 5591-1071、5449-0045 RMSD 依次变大, 化合物 C592-0444 直到 3.5 ns 后才达到平衡, 且波动幅度很大, 意味着其形成的复合物体系的稳定性差。

3 讨论

FtsZ 作为细菌分裂起始蛋白广泛存在于多种细

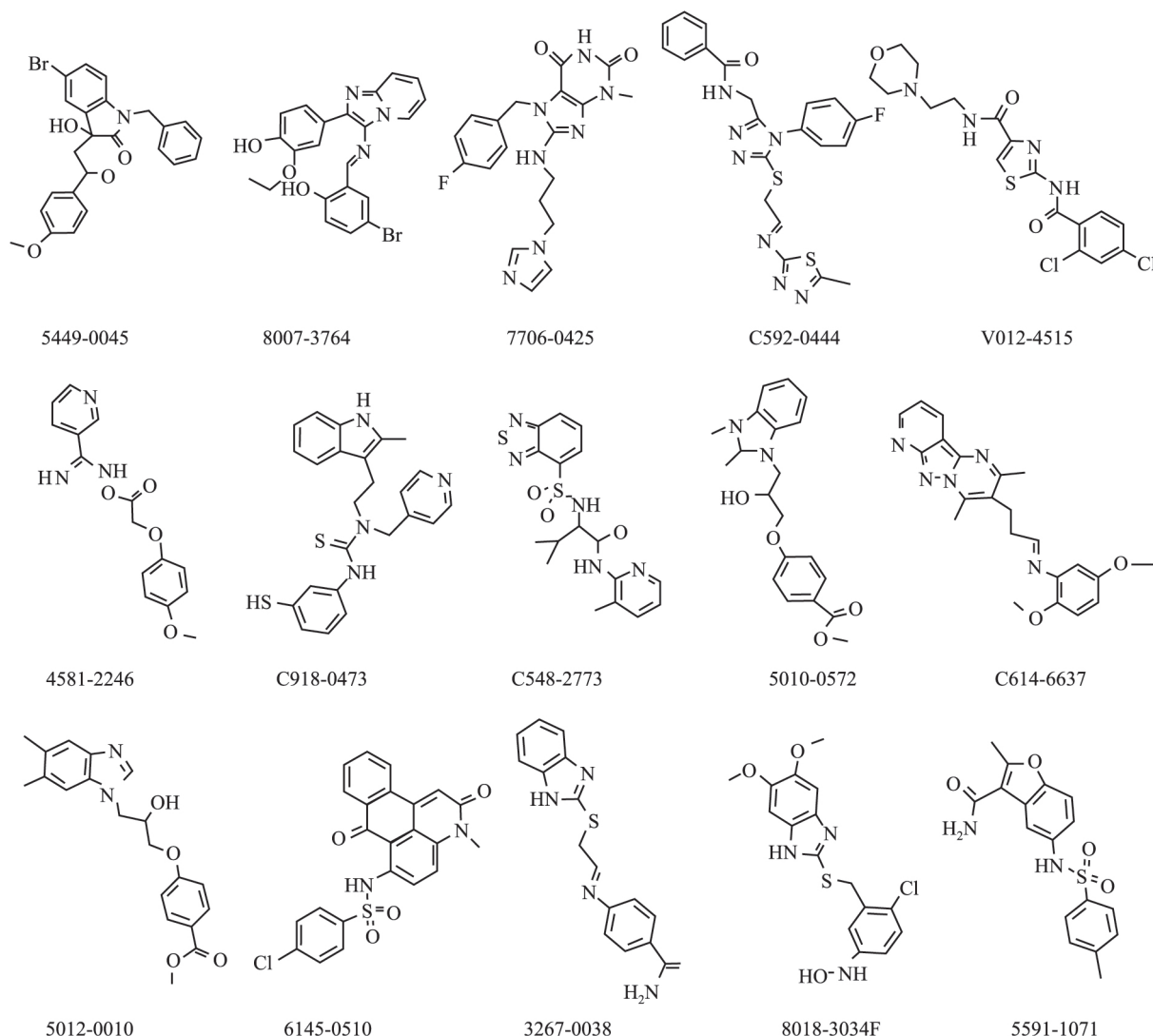


图3 虚拟筛选获得的小分子配体的结构

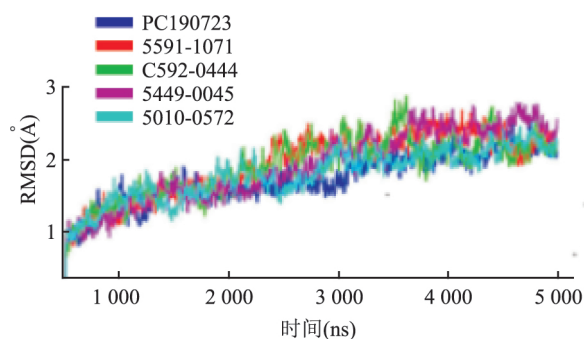


图4 配体-受体复合物体系蛋白主链碳原子的 RMSD

菌中,其通过招募多种细菌分裂蛋白参与细菌分裂的过程,同时能够催化 GTP 生成 GDP,为细菌分裂提供能量,已广泛被认定是一个具有研发前景的抗菌作用靶点^[4-5],尤其对于抗耐药菌药物的研发^[12]。FtsZ 具有高度的保守性和特异性,具备小分

子药物靶向识别的条件。

在本研究中,利用计算机辅助药物设计 Discovery Studio 2017 软件技术开展了基于 *S. aureus* FtsZ 蛋白为靶标的药物筛选。在筛选过程中,首先开展了对接程序适用性的评价。对接结果的准确性关系到筛选结果的可信度,这也是评价 CADD 软件优劣的重要标准。结果显示,4 种对接模块 Libdock、Ligandfit、CDOCKER 和 Flexible Docking 使用原配体对接后,均能够很好重现原配体与受体的相互作用模式,RMSD 值在 1 Å 以下,说明软件的对接结果是十分可信的。随后使用 4 种对接模块设计了由粗犷到精细渐进式的筛选方案。其中 Libdock 根据热区匹配的原理将小分子构象刚性对活性位点口袋中,Ligandfit 则是基于配体和受体的形状匹配,采用 Monte Carlo method 来检索分子的柔性空间构象,两种方法适用于快速的虚拟筛选;CDOCKER 基于

CHARMm 力场,采用模拟退火的方法将各个构象在受体活性位点进行优化,从而找到全局能量最低构象,CDOCKER 对接结果更加准确,但速度较慢,耗时约是 Libdock 的 5 倍; Flexible Docking 模拟生理条件受体和配体的状态,以柔性的方式进行对接,精准的研究受体-配体相互作用过程,适用于进一步更精确的筛选^[14]。对小分子库中 39 005 个小分子经上述 4 个模块依次筛选后得到了 72 个化合物,进一步通过类药性评价最终获得 15 个化合物。抗菌活性评价显示,这些化合物对 MSSA 和 MRSA 均有一定的抗菌作用,其中化合物 5010-0572 的活性最强 (MIC = 1 μ g/ml),与已报道 FtsZ 抑制剂 PC190723 相当^[11]。

分子动力学模拟能够模拟受体-配体相互作用随着时间的变化,判断受体-配体结合的稳定性,准确性高,可以用来解释复合物相互作用机理。对经虚拟筛选和抗菌活性筛选后的部分化合物研究发现,抗菌能力强的化合物 5010-0572 与 FtsZ 结合过程与蛋白晶体中的原配体 PC190723 最为接近,而抗菌活性最差的化合物 C592-0444 的结合过程与原配体相比,偏差最大,这一结果有力的印证了化合物抗菌活性评价的结果,也是对虚拟筛选结果的有力补充。

综上,本研究利用 CADD 技术,通过多重筛选策略筛选得到了 15 个靶向 FtsZ 蛋白的抗菌小分子化合物,化合物 5010-0572 表现出最强的抗菌活性,具有成为抗菌药物先导化合物的条件。

参考文献

- [1] Hiltunen T, Virta M, Laine A L. Antibiotic resistance in the wild: an eco-evolutionary perspective [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2017,372(1712): 20160039.
- [2] Coskun S. Investigation of the relationship between virulence fac-

- tors and antibiotic resistance of Enterococci isolates [J]. Cell Mol Biol(Noisy-le-grand), 2019,65(2): 14-7.
- [3] Campanini-Salinas J, Andrades-Lagos J, Mella-Raipan J, et al. Novel classes of antibacterial drugs in clinical development, a hope in a post-antibiotic era [J]. Curr Top Med Chem, 2018,18(14): 1188-202.
- [4] Haeusser D P, Margolin W. Splitsville: structural and functional insights into the dynamic bacterial Z ring [J]. Nat Rev Microbiol, 2016,14(5): 305-19.
- [5] Ortiz C, Natale P, Cueto L, et al. The keepers of the ring: regulators of FtsZ assembly [J]. FEMS Microbiol Rev, 2016,40(1): 57-67.
- [6] Lin Y, Zhu N, Han Y, et al. Identification of anti-tuberculosis agents that target the cell-division protein FtsZ [J]. J Antibiot (Tokyo), 2014,67(9): 671-6.
- [7] Haranahalli K, Tong S, Ojima I. Recent advances in the discovery and development of antibacterial agents targeting the cell-division protein FtsZ [J]. Bioorg Med Chem, 2016,24(24): 6354-69.
- [8] 马思提,魏国栋,刘慧,等.以 FtsZ 蛋白为靶点的抗菌天然产物的研究进展 [J]. 药学研究, 2015,34(10): 604-7.
- [9] Nero T L, Parker M W, Morton C J. Protein structure and computational drug discovery [J]. Biochem Soc Trans, 2018,46(5): 1367-79.
- [10] 刘轲,陈曦,蔡如意,等.计算机辅助药物设计的研究进展 [J/CD]. 转化医学电子杂志, 2018,5(9): 31-3.
- [11] Tan C M, Therien A G, Lu J, et al. Restoring methicillin-resistant Staphylococcus aureus susceptibility to β -lactam antibiotics [J]. Sci Transl Med, 2012,4(126): 126-35.
- [12] Foster T J. Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. Current status and future prospects [J]. FEMS Microbiol Rev, 2017,41(3): 430-49.
- [13] Mateos-Gil P, Tarazona P, Vélez M. Bacterial cell division: modeling FtsZ assembly and force generation from single filament experimental data [J]. FEMS Microbiol Rev, 2019,43(1): 73-87.
- [14] Uba A I, Yelekci K. Pharmacophore-based virtual screening for identification of potential selective inhibitors of human histone deacetylase 6 [J]. Comput Biol Chem, 2018,77: 318-30.

Screening of FtsZ inhibitors and evaluation of their antibacterial effect against *S. aureus*

Yao Shusheng¹, Liu Chen², Wang Anyong¹, et al

(¹Dept of Clinical Laboratory, The Frist Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate novel antimicrobial agents targeting FtsZ. **Methods** Identification of potential molecules targeting FtsZ by structural-based virtual screening using Discovery Studio 2017 software in a variety of ways. Determination of antibacterial effect against *S. aureus* of small molecule by broth dilution method. Molecular dynamics simulation was used to evaluate the binding stability of small molecule to FtsZ protein. **Results** Fifty

(下转第 94 页)

- [3] Jy W, Ricci M, Shariatmadar S, et al. Microparticles in stored red blood cells as potential mediators of transfusion complications [J]. *Transfusion*, 2011, 51(4): 886–93.
- [4] Rubin O, Delobel J, Prudent M, et al. Red blood cell-derived microparticles isolated from blood units initiate and propagate thrombin generation [J]. *Transfusion*, 2013, 53(8): 1744–54.
- [5] Seghatchian J, Amiral J. Unresolved clinical aspects and safety hazards of blood derived–EV/MV in stored blood components: From personal memory lanes to newer perspectives on the roles of EV/MV in various biological phenomena [J]. *Transfus Apher Sci*, 2016, 55(1): 10–22.

Relationship between procoagulant properties of red blood cell – derived microparticles and acute lung injury in mice

Zhu Yueyue^{1,2}, Bian Maohong¹, Xie Rufeng³

(¹Dept of Blood Transfusion, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Blood Transfusion, Lu'an Civil Hospital, Lu'an 237000; ³Shanghai Institute of Blood Transfusion, Shanghai Blood Center, Shanghai 200051)

Abstract Objective To investigate the procoagulant properties of red blood cell microparticles (RMPs) and the relationship between this property and acute lung injury in mice. **Methods** RMPs were isolated, purified and counted, and then the contents of the activated partial prothrombin time (APTT), prothrombin time (PT) and thrombin generation test were detected in the plasma of red cell supernatant under the circumstances before and after the removal of the microparticles and different concentrations of RMPs. In animal experiments, the levels of thrombin-antithrombin complex, plasminogen and plasminogen activator inhibitor-1 in mouse alveolar lavage fluid were measured by ELISA. Histological observation of right lung tissue in the experimental group injected with 3×10^7 RMPs and the control group was conducted. **Results** The number of RMPs increased gradually with the prolongation of storage time. As the concentration of RMPs added increased, the APTT value of the degranulated plasma decreased slightly, while the PT value did not change significantly. When erythrocyte supernatant and RMPs with a certain range of concentrations were added to the plasma, the lag time and tt-peak could be shortened to some extent, while the peak and ETP were increased significantly with a concentration dependent manner. Compared with the control group, the TATc of BALF was significantly increased in the experimental group injected with 3×10^7 RMPs, and the alveolar tissue inflammation was intensified and the coagulation promoting mechanism was enhanced. **Conclusion** As the storage time increases, the number of RMPs increases significantly. RMPs can promote thrombin generation and thereby promote systemic coagulation, which may be related to the transfusion-related acute lung injury (TRALI).

Key words RMPs; coagulation; APTT; Thrombin generation; TRALI

(上接第 88 页)

molecules with potential drug ability and excellent binding ability were obtained by virtual screening. All compounds exhibit certain antimicrobial effects on MSSA and MRSA. Among them, compound 5010-0572 showed best activity against MSSA and MRSA, with MIC value of 1 $\mu\text{g/ml}$. Molecular dynamics simulation illustrated that compound 5010-0572 with best antimicrobial effects bound to FtsZ better than compound C592-0444 with lowest antimicrobial effects. **Conclusion** The antimicrobial effects of small molecules targeting FtsZ is closely related to the binding stability with protein. Compound 5010-0572, which has notable antimicrobial activity, may become a leading compound for the development of new antimicrobial agent.

Key words targeting; FtsZ; virtual screening; *S. aureus*; antimicrobial