

核受体 FXR 与天然产物激动剂 Sarmentol H 的作用机制

张莉, 黄可轩, 顾博媛

(上海健康医学院药学院, 上海市分子影像重点实验室, 上海 201318)

摘要 近期研究发现, 从植物垂盆草分离得到的天然产物 Sarmentol H(SMH)是一种具有新颖骨架结构的法尼醇 X 受体(FXR)激动剂, 表现出良好的体内外活性. 然而, SMH 与 FXR 的具体作用机制尚不清楚. 本文综合运用分子对接、分子动力学模拟和结合自由能计算等方法, 解析了 SMH 与 FXR 之间的作用模式. 通过比较结构动力学和结合自由能, 确定了 SMH 与 FXR 的最优结合模式, 并识别出在 SMH 结合过程中起关键作用的氨基酸残基.

关键词 法尼醇 X 受体; Sarmentol H; 作用机制

中图分类号 O641

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20250182

Interaction Mechanism Between FXR and Its Natural Product Agonist Sarmentol H

ZHANG Li*, HUANG Kexuan, GU Boai

(School of Pharmacy, Shanghai Key Laboratory of Molecular Imaging,
Shanghai University of Medicine and Health Sciences, Shanghai 201318, China)

Abstract Recent studies have identified Sarmentol H(SMH), a natural product isolated from *Sedum sarmentosum* Bunge, as a novel Farnesoid X receptor (FXR) agonist with a unique scaffold structure and promising *in vitro* and *in vivo* activities. However, the precise interaction mechanism between SMH and FXR remains unclear. In this study, an integrated computational approach combining molecular docking, molecular dynamics simulations, and binding free energy calculations was employed to elucidate the binding mode between SMH and FXR in detail. By comparing structural dynamics and binding free energetics, the optimal binding mode of SMH with FXR was identified, and the key amino acid residues critical for SMH recognition and binding were pinpointed.

Keywords Farnesoid X receptor; Sarmentol H; Interaction mechanism

法尼醇 X 受体(Farnesoid X receptor, 简称 FXR)属于核受体超家族成员, 主要在肝脏、肠道、肾脏和肾上腺等组织高表达. 该受体最初因可被法尼醇衍生物激活而得名. 1999 年, 3 个研究团队分别独立证实胆汁酸是 FXR 的内源性配体^[1-3], 因此 FXR 也被称为胆汁酸受体^[4].

作为一种受配体调控的核受体, FXR 通过配体依赖性机制招募或释放共调节因子(Co-regulators), 从而调控多个下游靶基因的表达. FXR 是体内胆汁酸的关键感应器, 在被内源性胆汁酸[如鹅去氧胆酸(CDCA)]激活后, 可以调控胆汁酸的生物合成、代谢、结合和转运等多个环节, 从而维持体内胆汁

收稿日期: 2025-07-01. 网络首发日期: 2025-08-21.

联系人简介: 张莉, 女, 博士, 副教授, 主要从事材料制备、应用和理论计算方面的研究. E-mail: 2100045@sumhs.edu.cn

基金项目: 上海市分子影像重点实验室项目(批准号: 18DZ2260400)和上海健康医学院大学生创新训练计划项目(批准号: X202510262133)资助.

Supported by the Construction Project of Shanghai Key Laboratory of Molecular Imaging, China(No.18DZ2260400) and the College Student Innovation Training Program of Shanghai University of Medicine and Health Sciences, China(No.X202510262133).

酸的动态平衡^[5]。除参与胆汁酸代谢平衡外, FXR 还在葡萄糖稳态、甘油三酯代谢、新生脂肪生成以及胆固醇代谢等多种重要生理过程中发挥调控作用。此外, 研究表明 FXR 还参与炎症反应及肝纤维化的发生发展过程^[5,6]。FXR 因在多种生理过程中的关键调控作用, 已成为原发性胆汁性胆管炎、代谢相关脂肪性肝病(MASH)、2 型糖尿病以及炎症性肠病等疾病极具前景的药物开发靶点^[6,7]。

自发现胆汁酸是 FXR 内源性配体, 能在体内激活 FXR 调控多条代谢通路以来, 开发新型 FXR 激动剂受到广泛关注。迄今, 已有多种具有选择性和高活性的 FXR 激动剂被报道, 包括甾体类骨架的奥贝胆酸(也称 OCA, 6ECDCA 或 INT-747)和 EDP-305, 以及非甾类化合物 GW4064 及其衍生物(如 Cilofexor, Tropifexor 和 TERN-101)、nidufexor 和 MET409 等^[8,9]。然而临床试验结果表明, 这些候选药物在呈现积极疗效的同时, 也存在不同程度的不良反应, 例如奥贝胆酸可引起剂量依赖性的皮肤瘙痒和低密度脂蛋白水平升高等潜在安全问题^[10,11], 极大限制了其进一步开发和临床应用。鉴于 FXR 在多种代谢性疾病以及结直肠癌和炎症性肠病中的关键作用^[6,12,13], 开发具有高选择性和安全性的 FXR 小分子调节剂具有重要意义。

最近, Liu 等^[14]研究发现, 天然产物 Sarmentol H(SMH)具有激活 FXR 的活性。SMH 是从植物垂盆草(*Sedum sarmentosum Bunge*)中提取得到的一种去倍半萜类化合物。该研究通过多种分子和细胞水平实验证实, SMH 可直接作用于 FXR; 进一步的基因敲除小鼠实验证明, SMH 通过靶向 FXR 发挥抗胆汁淤积作用。由于 SMH 具有与现有 FXR 激动剂完全不同的骨架结构, 因此是开发选择性 FXR 激动剂有潜力的先导化合物。然而, SMH 与 FXR 之间的相互作用机制尚不明确, 限制了对其进一步的结构优化。本文综合运用多种计算模拟方法, 研究了 SMH 与 FXR 的相互作用, 深入分析了 SMH 在 FXR 配体口袋的结合模式和动力学行为, 并识别出对 SMH 结合起关键作用的氨基酸残基。

1 实验部分

1.1 仪器

Dell Precision 3660 型图形工作站, 美国 Dell 公司; Nvidia RTX 4090 型 GPU 显卡, 美国 Nvidia 公司。

1.2 实验过程

1.2.1 配体分子与受体结构准备 配体小分子 SMH 的二维结构采用分子模拟软件包 Schrödinger 2021 的 Maestro 软件(Schrödinger, LCC, New York, NY)绘制完成, 然后利用 LigPrep 模块生成三维结构并进行结构优化, 保存为 mol2 格式用于后续分子对接和力场常数生成。

受体 FXR 的结构模型取自蛋白质结构数据库(PDB, www.rcsb.org), 综合考虑配体结合口袋重点残基的侧链取向和分辨率, 最终选择 FXR 与激动剂 CDCA 衍生物的复合物晶体结构模型(PDB 编号 5q0m, 分辨率为 0.22 nm)作为受体的初始三维结构模型^[15]。利用 Protein Preparation Wizard 模块对受体结构进行预处理, 包括: 删除晶体结构中的原配体、共激活因子和结晶水, 补全残基 Arg459~His463(编号依照 5q0m 结构)缺失的坐标, 给所有原子加氢并分配键级等。

1.2.2 分子对接 利用 Maestro 软件的 Glide 模块^[16]将配体分子 SMH 对接到 FXR 的配体结合口袋。分子对接网格的中心点设置为 5q0m 中原配体的质心, 对接网格外盒和内盒尺寸分别设定为 2 和 1 nm。使用标准精度(SP)模式进行对接, 采用 GlideScore 作为打分函数对输出构象进行排序, 共输出 30 个构象, 并对对接后的构象进行能量最小化。对 30 个输出构象利用 Maestro 的“Clustering of conformers”模块进行聚类, 挑选每个类别中对接打分最低的构象作为代表性构象, 用于后续分子动力学模拟优化。

1.2.3 分子动力学模拟 由分子对接得到的 FXR-SMH 复合物, 利用分子动力学模拟方法进一步进行结合模式的优化。分子动力学模拟的体系准备由 Amber20 程序包的 tleap 模块完成^[17], 模拟步骤利用 pmemd.cuda 程序实现。

利用 Gaussian 09 程序(Gaussian Inc., Wallingford CT)在 B3LYP/6-31G*基组水平对配体小分子 SMH 进行几何优化和静电势计算^[18]。配体小分子中的各原子电荷通过限制性静电势(Restrained electrostatic

potential, RESP)方法拟合得到^[19]. 配体分子的力场参数采用gaff2力场^[20], 由antechamber程序生成^[21].

FXR-SMH复合物体系离子化残基的质子化状态由Maestro的PROPKA模块计算得到^[22]. 根据计算结果和残基所处微环境, His298, His433和His451设置为在 ϵ 氮上质子化, 其余组氨酸设置为在 δ 氮上质子化. 另外, 根据计算结果, Glu338设置为中性. 将FXR-SMH复合物体系置于一个边界厚度为1 nm的截断八面体水溶剂盒子中, 水分子采用TIP3P溶剂模型^[23], 然后添加钠离子中和体系电荷. 受体蛋白质采用AMBER ff14SB全原子力场^[24].

分子动力学模拟的详细步骤类似于先前的研究工作^[25-27]. 复合物体系首先经过4轮逐渐减小力常数约束的方式, 对整个体系进行能量最小化. 在每轮的能量优化中, 先采用最速下降法优化1000步, 再使用共轭梯度法优化2000步. 能量最小化后, 对复合物体系逐步升温. 先在NVT系综下, 在100 ps内将复合物体系从0 K升温至300 K, 然后在300 K下对体系平衡800 ps. 最后, 在NPT系综和1个标准压强下, 对每个体系进行500 ns(50 ns/次 \times 10次, 参数ig设为-1)的无约束动力学模拟. 分子动力学模拟过程中, 采用Langevin热浴法进行控温^[28], 碰撞频率设为1 ps⁻¹, 采用Berendsen压力耦合算法控制压力^[29]. 采用SHAKE算法限制所有涉及氢原子的化学键^[30], 采用PME(Partial-mesh Ewald)方法处理长程静电相互作用^[31], 非键相互作用的距离截断阈值设为1 nm, 时间步长设置为2 fs. 每隔2 ps保存一次坐标和能量信息. 分子动力学模拟的轨迹采用cpptraj程序进行分析^[32].

1.2.4 结合自由能计算 FXR与SMH之间的结合自由能和结合自由能分解均使用MM-GBSA方法进行计算^[33,34]. 结合自由能根据下式进行计算:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{solv}} - T\Delta S \quad (1)$$

式中: ΔG_{bind} (kJ/mol)为FXR与SMH之间的结合自由能; ΔG_{MM} (kJ/mol)为分子力学作用能; $T\Delta S$ (kJ/mol)代表熵的贡献. ΔG_{MM} (kJ/mol)可进一步表达为

$$\Delta G_{\text{MM}} = \Delta G_{\text{int}} + \Delta G_{\text{elec}} + \Delta G_{\text{vdw}} \quad (2)$$

式中: ΔG_{int} (kJ/mol)为内能项; ΔG_{elec} (kJ/mol)为静电能项; ΔG_{vdw} (kJ/mol)为范德华能项.

$$\Delta G_{\text{solv}} = \Delta G_{\text{pol}} + \Delta G_{\text{nonpol}} = \Delta G_{\text{pol}} + \gamma(\text{SASA}) + b \quad (3)$$

式中: ΔG_{sol} (kJ/mol)是溶剂化能, 包括极性溶剂化自由能 ΔG_{pol} (kJ/mol)和非极性溶剂化自由能 ΔG_{nonpol} (kJ/mol), 其中极性贡献项使用广义波恩模型(Generalized Born, GB)计算而得, 非极性贡献项根据溶剂可及表面[Solvent Accessible Surface Area, SASA(nm²)]估算得到; γ (kJ \cdot mol⁻¹ \cdot nm²)表示表面张力, b 则是常数.

本研究使用修正的广义波恩模型(GB^{OBC1}, igrb=2)计算极性溶剂化能^[35], 表面张力 γ 和 b 分别取值为3.0 kJ \cdot mol⁻¹ \cdot nm²和0; 溶剂化可及表面积SASA则使用LCPO方法计算得到^[36]. 从分子动力学模拟平衡的后100 ns轨迹中提取500个瞬时结构用于结合自由能计算和结合自由能分解. 熵的贡献使用简正模分析方法计算^[37], 由于熵的计算相当耗费资源, 从后100 ns轨迹中提取50个瞬时结构计算熵变.

1.2.5 配体与受体相互作用分析 使用PLIP(Protein-ligand interaction profiler)程序对分子动力学模拟过程中FXR与SMH之间的相互作用进行了进一步分析^[38]. PLIP是一个检测生物大分子和配体小分子之间相互作用的程序, 可以分析包括氢键、疏水接触、 π 堆积、阳离子- π 、盐桥、水桥和卤键等在内的7种非键相互作用. 研究中使用动力学平衡后100 ns轨迹中提取的500个瞬时结构进行FXR与SMH之间相互作用分析.

2 结果与讨论

2.1 SMH-FXR复合物初始模型构建

由于目前还没有SMH[结构见图1(A)]与FXR之间的复合物结构模型, 因此首先利用分子对接方法预测了SMH与FXR之间的结合模式. 在对接SMH之前, 先对FXR复合物晶体结构5q0m里原始的小分子配体9L1进行了自对接实验^[15], 以验证对接程序和参数是否适合FXR体系. 自对接结果显示, 原始配体9L1的对接模式能很好地重现复合物晶体结构中的结合模式, 对接打分最高的构象与实验构象

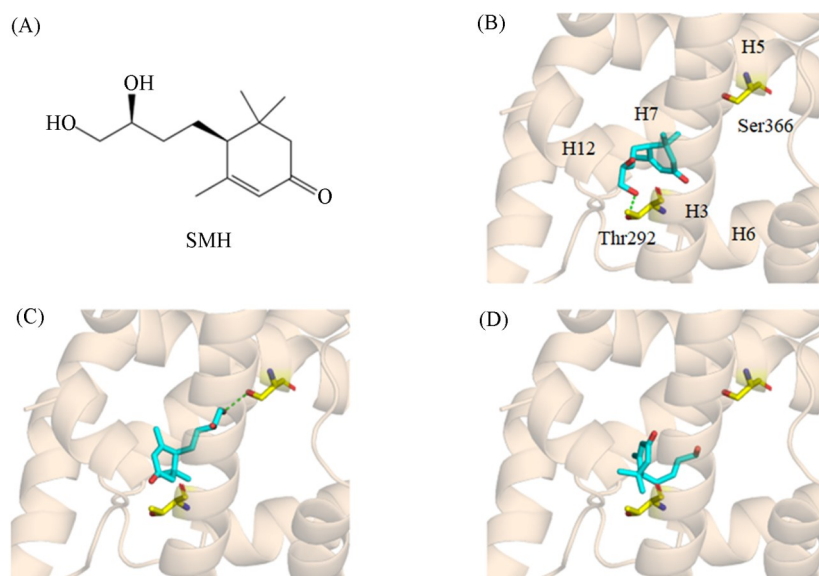


Fig. 1 Binding modes of SMH in the ligand-binding pocket of FXR obtained by docking

(A) 2D structure of SMH; (B) BM1; (C) BM2; (D) BM3. The hydrogen bonds are represented by the green dashed lines.

的均方根偏差(Root-mean-square deviation, RMSD)值仅为0.062 nm(见本文支持信息图S1),说明选用的参数设置适合FXR体系的对接实验.

将SMH与FXR对接后的构象聚类后,可以分为3种不同的结合模式,将其分别命名为Binding mode 1(BM1), Binding mode 2(BM2)和Binding mode 3(BM3).在BM1中,SMH的1-羟基朝向螺旋3(H3),与H3上的Thr292残基侧链的羟基形成氢键作用;一端的六元环则朝向H5和H7形成的空间区域,其中4-羰基朝向H6[图1(B)].在BM2中,SMH的结合取向相比于BM1中的模式发生了180°的翻转.SMH六元环上的4-羰基朝向H3,1-羟基则朝向H5,与H5上的Ser336形成氢键作用[图1(C)].在BM3中,SMH主要依靠疏水作用结合于配体结合口袋,整个分子呈1个U型,六元环位于H3和H12形成的空间,2位的2个甲基朝向H3,1-羟基和2-羟基则朝向H5和H6形成的空间区域[图1(D)].

2.2 分子动力学模拟

为考虑蛋白质柔性对配体结合模式的影响^[39,40],对分子对接得到的SMH与FXR的3个结合模式进一步进行了分子动力学模拟,主要有3个目的:(1)优化分子对接得到的结合模式;(2)考察SMH和FXR在分子动力学模拟过程中的结构稳定性;(3)收集稳定的分子动力学轨迹以计算两者之间的结合自由能.

2.2.1 整体结构变化分析 先对3个复合物体系在分子动力学模拟过程中整体结构的稳定性进行了分析.图2示出了分子动力学模拟过程中蛋白质骨架原子和配体小分子的RMSD值(相比于对接模式)的变化.可以看出,蛋白质骨架原子的RMSD值在300 ns后基本达到稳定,3个体系的RMSD值分别收敛于约0.14, 0.16和0.19 nm,表明蛋白质结构在分子动力学模拟过程中整体上为发生显著变化.

与蛋白质骨架原子相比,配体分子SMH的RMSD值在分子动力学模拟过程中变化较明显,表明配体分子在动力学模拟过程中经过了较大的结合模式调整.与BM2和BM3体系相比,BM1体系中配体RMSD的波动幅度最小,提示在体系平衡后BM1中小分子的结合模式相对更加稳定.

除了分析体系的RMSD值,还计算了3个体系的均方根波动(Root-mean-square fluctuation, RMSF)以检查蛋白质残基在分子动力学模拟过程的运动.如图2所示,除了阴影矩形框标注的区域,3个体系的RMSF值整体变化趋势类似.阴影框区域分别对应于H1-H2连接环(H1-H2 loop)、H8-H9连接环和H11-H12连接环区域.BM1体系在这些区域的RMSF值均低于另外两个体系,说明BM1体系相对柔性较小更稳定.另外,发现His426-Gln432区域呈现一较高的峰值,这一区域对应于H9-H10环区且暴露于溶剂中,因此具有较大的RMSF值并不为奇.这些连接环区的残基距离SMH较远,未与其产生直接相互作用,因此其较大的波动对SMH的结合并无显著影响.

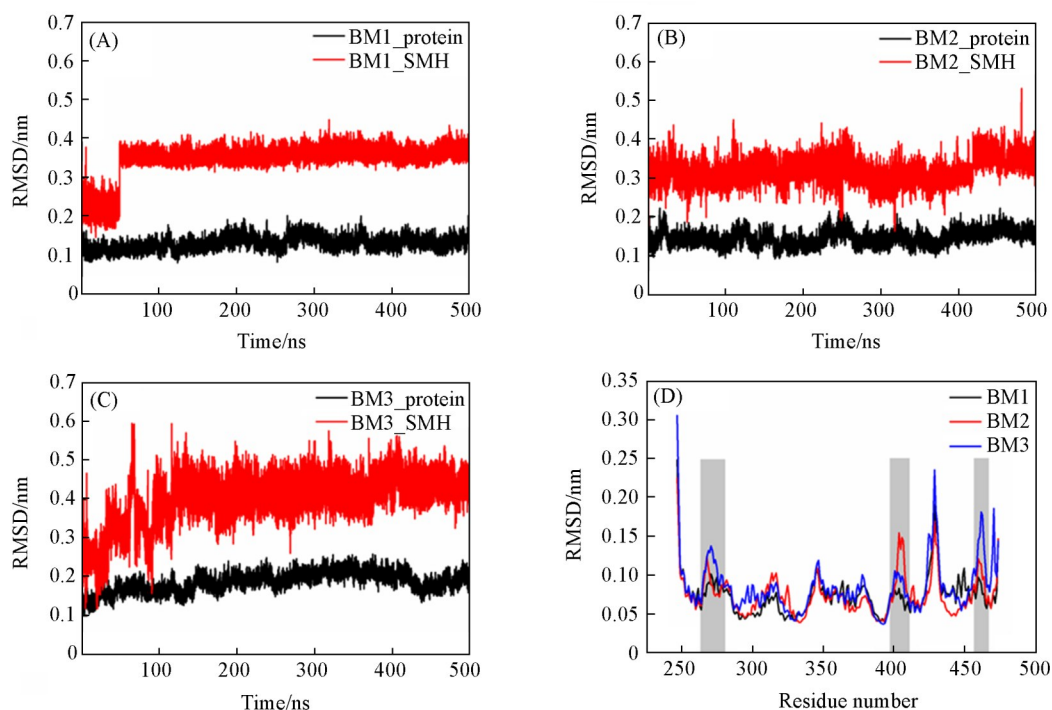


Fig. 2 RMSD variations with respect to simulation time

(A)—(C) BM1—BM3 systems, respectively; (D) RMSF profiles of three systems.

2.2.2 受体局部构象分析 为比较3个体系在分子动力学模拟前后的结构差异,分析了受体局部特别是配体结合口袋残基的构象变化.先计算了分子动力学模拟平衡阶段后100 ns的平均结构,然后将保存的每个瞬时结构(Snapshot)与平均结构叠合,取叠合后RMSD值最小的瞬时结构作为代表性结构进行对比分析.

在BM1中,将动力学模拟后的代表结构与初始结构叠合后发现,配体结合口袋的大部分残基仅发生小的位置偏移.相比而言,Phe333,Phe447和Tyr365的构象变化较为明显.Phe333的侧链苯环向结合口袋外侧发生了一定程度的平移,而Phe447的侧链苯环发生较大的摆动,伸向结合口袋.Tyr365的侧链发生了约 90° 的转动,使其苯甲基朝向配体结合位置[图3(A)].

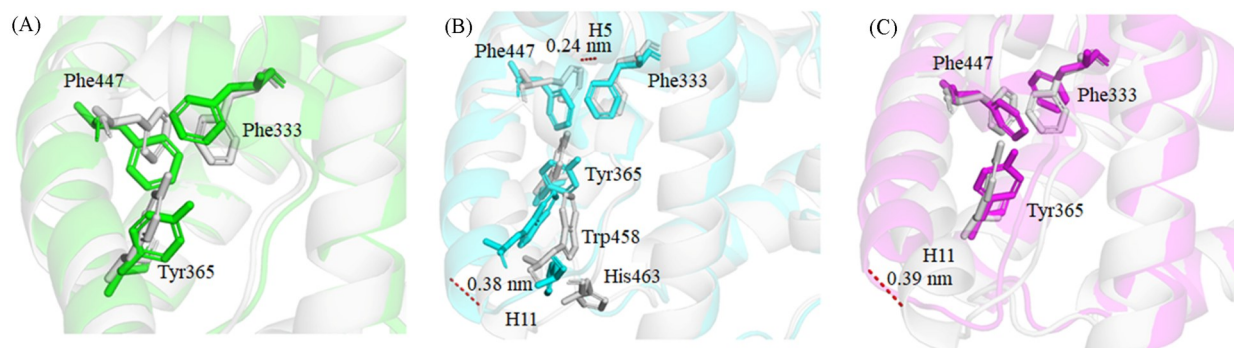


Fig. 3 Structural changes of the local regions of FXR after MD refinement

(A) BM1; (B) BM2; (C) BM3. The initial structures are presented in grey and the MD snapshots are shown in different colors.

The dashed lines represent the relative displacement of the protein backbone atoms.

在BM2中,对分子动力学模拟前后的结构发现,螺旋H11的碳端和H5的中部比初始结构发生了较大的位置偏移,位移分别达到约0.38和0.24 nm,这也导致H11和H5上的多个残基发生位置移动,如H11上的His463和Trp458向外扩张,H5上的Phe333则相对于初始结构向上移动[图3(B)].此外,残基Phe447和Tyr365发生了与BM1模式中类似的构象变化.

在BM式中,分子动力学模拟后螺旋H11的碳端比初始结构同样向外移动了约0.39 nm,这一变化与BM2的结果几乎一致,不同的是连接H11和H12的环区构象在2个结合模式中有所差异.同样,Tyr365侧链转动了约90°,Phe447侧链苯环伸向结合口袋.与BM1和BM2不同的是,BM3中Phe333的侧链苯环发生了远离结合口袋的转动,而非上下平移[图3(C)].

2.2.3 配体SMH的结合模式 经过500 ns的分子动力学优化后,除了受体的局部构象发生改变,配体SMH的结合模式也发生了不同程度的变化.为了表征配体SMH在3个体系中的结合模式差异,分析了配体SMH与受体之间的作用信息.

在BM1体系中,配体SMH在分子动力学模拟后其1-羟基仍然朝向H3,并保持与Thr292的侧链羟基的氢键作用;另一端的六元环的结合构象则发生了较大变化,其4-羰基指向H5和H7形成的空间,与H7上的Tyr373形成了新的氢键作用[图4(A)].监测了形成这2个氢键的重原子之间的距离在分子动力学模拟过程中的变化,如[图4(B)]所示.SMH的1-羟基的氧原子与残基Thr292侧链的羟基氧原子之间的距离以及4-羰基的氧原子与Tyr373侧链的羟基氧原子之间的距离,在大多数模拟时间内均维持在0.35 nm以下.计算的2个氢键在分子动力学模拟轨迹中的占有率分别为83.63%和82.79%.除了直接氢键作用,SMH还与Tyr365,Leu291,Met332,Ile356,His451和Trp458等残基形成疏水或范德华作用.

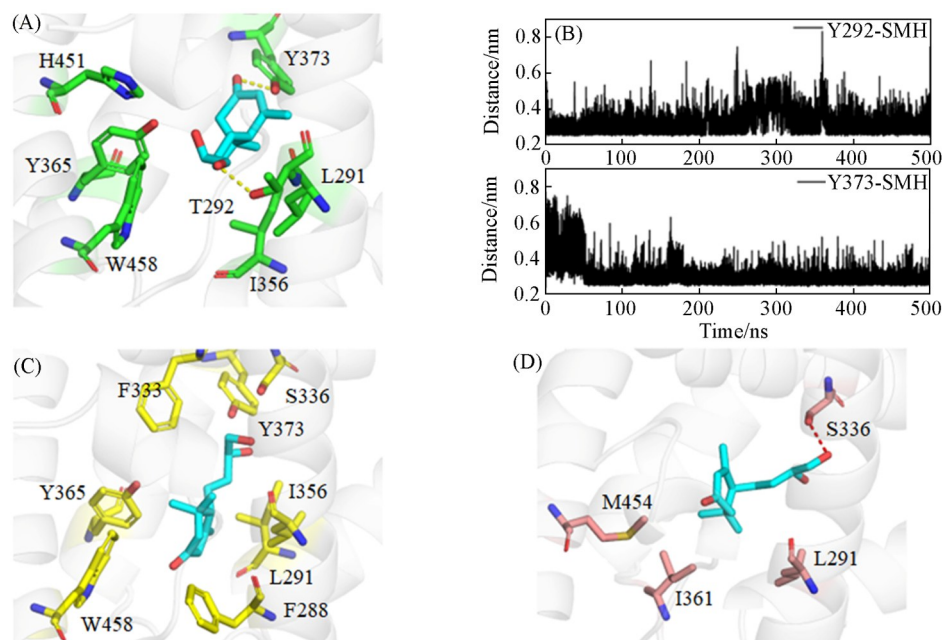


Fig. 4 Binding modes of SMH in the three systems

(A) BM1; (B) distances between SMH and Thr292 as well as between SMH and Tyr373 in the BM1 system; (C) BM2; (D) BM3.

The hydrogen bonds are represented by the dashed lines.

在BM2体系中,与起始的对接模式相比,分子动力学模拟后SMH整体向H6偏移.SMH六元环的4-羰基伸向Trp458和Phe288之间,与这2个残基形成范德华作用.SMH的1-羟基和3-羟基与H5上的残基Ser336和H7上的Tyr373间歇性发生氢键作用,其占有率分别为26.40%和20.25%.同样,SMH还与Leu291,Tyr365,Ile356和Phe333等残基形成疏水或范德华作用[图4(C)].

在BM3体系中,在分子动力学模拟后,配体SMH的结合构象由初始的U型变为L型,整体向H5偏移.1-羟基和3-羟基所在的脂肪链变成舒展的L型后,3-羟基与H5上的Ser336形成氢键作用.1-羟基则伸向H5和H6形成空间区域.六元环上的2个甲基与Ile361,Leu291和Met454等残基形成疏水作用[图4(D)].

2.3 结合自由能计算

为了定量比较SMH与FXR 3种不同结合模式下的结合差异,采用MM-GBSA方法计算了SMH与FXR之间的结合自由能.表1列出了各体系的总结合自由能值及其各构成项的贡献值.

Table 1 Binding free energies calculated by the MM-GBSA method

System	$\Delta G_{\text{vdw}}/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta G_{\text{ele}}/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta G_{\text{pol}}/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta G_{\text{nonpol}}/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$T\Delta S/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta G_{\text{binding}}^{\text{cal}}/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$
BM1	-153.87±9.24*	-88.83±8.78	120.55±5.76	-22.70±0.71	-84.14±17.39	-60.71
BM2	-144.04±10.41	-39.67±26.42	78.50±17.10	-21.95±0.63	-84.98±15.68	-42.18
BM3	-136.94±8.48	-36.32±17.68	80.76±10.45	-20.36±0.75	-77.04±17.05	-35.82
T292A	-156.62±9.36	-73.07±10.03	113.11±6.85	-22.44±0.59	-88.32±17.89	-50.70
Y365A	-149.39±8.78	-53.42±15.26	101.37±8.69	-21.82±0.63	-85.56±3.23	-37.70

* The uncertainties are the standard deviations calculated with 500 snapshots (50 snapshots for entropic calculations).

在BM1体系中, 计算得到的SMH与FXR之间的结合自由能为-60.71 kJ/mol, 明显低于BM2和BM3体系的自由能值(分别为-42.18和-35.82 kJ/mol). 这表明配体SMH与FXR结合时更倾向于以BM1中的结合模式与FXR结合. 从表1也可以看出, 范德华作用能对SMH与FXR之间结合贡献最大, 这主要归因于FXR的配体结合口袋主要由疏水性残基所构成. 同时发现, 引起3种不同结合模式自由能差异的主要因素并非是贡献最大的范德华作用能项, 而是静电作用能项, 表明静电作用(主要是氢键作用)决定了不同结合模式的结合亲和力差异.

2.4 对配体结合有重要贡献的关键残基

为了表征对SMH结合有重要贡献的关键残基, 对结合自由能进行了分解计算. 从前面的分子动力学模拟过程的结构变化和自由能计算结果可以看出, 相比于BM2和BM3体系, BM1体系中SMH与FXR的结合更稳定, 因此可以认为结合模式BM1是SMH与FXR的优势结合模式, 下文的分析均基于BM1体系进行.

图5(A)列出了对SMH的结合自由能贡献值低于-2.0 kJ/mol的残基. 根据计算结果, Phe288, Leu291, Thr292, Met294, Ala295, Met332, Phe333, Ser336, Ile356, Ile361, Tyr365, Met369, Tyr373和Trp458等是对结合自由能有主要贡献的残基. 如2.2.3节所述, 其中大部分残基主要与配体SMH形成了疏水和范德华作用, 而Thr292和Tyr373在大部分分子动力学模拟时间内与SMH形成了氢键作用.

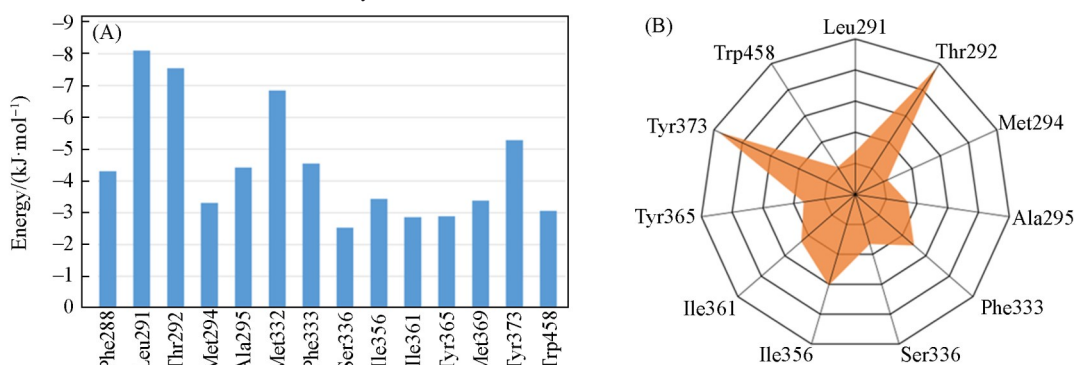


Fig. 5 Key residues identified by free energy decomposition(A) and interaction frequencies of key residues with SMH by PLIP analysis(B)

The frequencies are calculated with 500 snapshots.

除了通过自由能分解方法表征对结合自由能有重要贡献的重点残基外, 还利用PLIP程序分析了配体SMH与FXR结合口袋残基在分子动力学模拟过程中的相互作用信息. PLIP程序基于配体和受体复合物PDB文件, 可以同时分析配体和受体之间7种不同的非键相互作用. 根据分子动力学模拟的轨迹结构, 统计计算了与配体SMH发生非键作用的残基的百分率. 如图5(B)所示, Leu291, Thr292, Met294, Ala295, Phe333, Ser336, Ile356, Ile361, Tyr365, Tyr373和Trp458等是与配体SMH发生非键相互作用的重点残基, 其中Thr292, Tyr373和Ser336在动力学模拟过程中与配体形成氢键作用, 其余残基主要形成疏水作用. 这与自由能分解结果相一致.

2.5 残基突变对配体结合的影响

为进一步验证表征的关键残基对配体SMH结合的重要性, 构建了T292A和Y365A两个突变体, 并对其进行了500 ns的分子动力学模拟, 以考察残基突变对受体结构以及配体SMH结合的影响.

对于T292A突变体,当苏氨酸被突变成丙氨酸后,使得原来位于H3螺旋上的Thr292侧链羟基与Phe288主链氧原子之间的氢键被破坏,导致Phe288侧链的苯环发生一定程度的位置偏移.这种位置移动进一步引起临近的位于H11-H12环区和H11上的残基发生位置移动,从而导致H11螺旋整体向外侧偏移约0.2 nm[图6(A)].Thr292被突变成丙氨酸后,原本在Thr292侧链羟基与配体SMH之间的氢键同时消失,这也导致配体的结合模式有了轻微的改变.尽管SMH的结合模式变化不显著,但消失的氢键以及周围残基的位置改变使得配体SMH与受体之间的结合自由能降低约10.01 kJ/mol(表1).

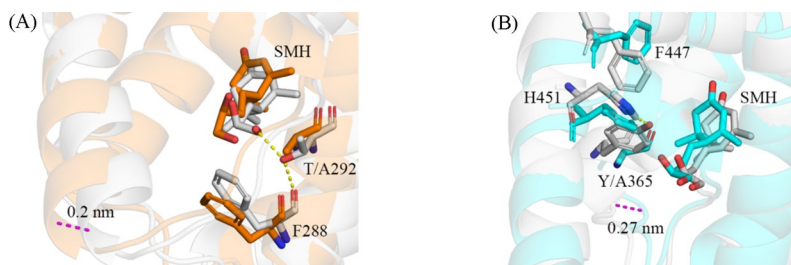


Fig. 6 Superposition of T292A and Y365A mutants with the wild type

(A) T292A mutant; (B) Y365A mutant. The wild type system is presented in grey, the T292A mutant is colored in orange, and the Y365A mutant is colored in cyan. The important residues are labeled. The hydrogen bonds are represented by the yellow dashed lines and the distances are represented the pink dashed lines.

对于Y365A体系,将酪氨酸突变成丙氨酸后,原本在Tyr365侧链羟基和His451之间形成的直接氢键消失,导致Tyr365所在的H7螺旋碳端向下移动了约0.27 nm[图6(B)].同时,Tyr365附近的His451,Phe333和Phe447等残基侧链发生了一定程度的转动.配体SMH的结合姿势未发生显著变化,但六元环发生了小的位置偏移.这两者的累积效应使得SMH与Y365A突变体之间的结合自由能下降了约23.01 kJ/mol(表1).

先前的定点突变实验结果已经证明SMH对T292A和Y365A突变体的激活活性显著降低,这与对照组之间未观察到相对荧光素酶活性存在显著差异^[14].上述模拟结果和定点突变实验结果一致.SMH与FXR的作用模式与现有高活性FXR激动剂(如OCA和GW4064等)存在显著差异.OCA和GW4064占据了FXR狭长结合口袋的整个空间,其一端的羧基可与螺旋H5上的Arg335形成盐桥作用;而SMH仅占据结合口袋的部分区域,并与螺旋H3上的Thr292形成直接氢键.这种独特的结合模式可能使其呈现出有别于现有FXR激动剂的生物学效应.

3 结 论

综合运用分子对接、分子动力学模拟和结合自由能计算等研究了SMH与FXR之间的作用机制.分子对接结果显示,SMH能以3种不同的模式结合在FXR的配体口袋,随后对这3种潜在的结合模式分别进行了500 ns的分子动力学模拟优化,并利用MM-GBSA方法计算了配体SMH与FXR在3种模式下的结合自由能.通过比较3个复合物体系的结构动力学和结合自由能,发现BM1体系中的受体结构变化更小且配体结合能更低,表明BM1相较于另外两种结合模式更稳定,是配体SMH的优势结合模式.通过自由能分解和PLIP的非键相互作用分析,表征了对SMH结合至关重要的关键残基,包括Thr292,Tyr373,Tyr365,Met294,Ala295,Ile356和Phe333等.进一步构建了T292A和Y365A两个突变体体系验证了所表征残基的重要性,模拟结果与先前的定点突变实验相一致.期望研究结果能为靶向FXR的SMH衍生物设计提供指导,从而促进FXR相关代谢性和肝脏疾病药物的开发.

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/20250182>.

感谢华东理工大学药学院分子模拟与设计实验室提供Schrödinger 2021软件的使用支持.

参 考 文 献

[1] Makishima M., Okamoto A. Y., Repa J. J., Tu H., Learned R. M., Luk A., Hull M. V., Lustig K. D., Mangelsdorf D. J., Shan B.,

- Science*, **1999**, 284(5418), 1362—1365
- [2] Parks D. J., Blanchard S. G., Bledsoe R. K., Chandra G., Consler T. G., Kliever S. A., Stimmel J. B., Willson T. M., Zavacki A. M., Moore D. D., Lehmann J. M., *Science*, **1999**, 284(5418), 1365—1368
- [3] Wang H. B., Chen J., Hollister K., Sowers L. C., Forman B. M., *Mol. Cell*, **1999**, 3(5), 543—553
- [4] Fiorucci S., Distrutti E., Carino A., Zampella A., Biagioli M., *Prog. Lipid Res.*, **2021**, 82, 101094
- [5] Fiorucci S., Biagioli M., Baldoni M., Ricci P., Sepe V., Zampella A., Distrutti E., *Expert Opin. Drug Discov.*, **2021**, 16(10), 1193—1208
- [6] Panzitt K., Zollner G., Marschall H., Wagner M., *Mol. Cell. Endocrinol.*, **2022**, 552, 111678
- [7] Adorini L., Trauner M., *J. Hepatol.*, **2023**, 79(5), 1317—1331
- [8] Fang Y. Y., Hegazy L., Finck B. N., Elgendy B., *J. Med. Chem.*, **2021**, 64(24), 17545—17571
- [9] Xu Y. P., *J. Med. Chem.*, **2016**, 59(14), 6553—6579
- [10] Mullard A., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2020**, 19(8), 501—501
- [11] Wang K., Zhang Y. C., Wang G. J., Hao H. P., Wang H., *Med. Res. Rev.*, **2024**, 44(2), 568—586
- [12] Li Y., Xu T. T., Zhao Y., Zhang H., Liu Z. S., Wang H., Huang C. Y., Shu Z. H., Gao L. X., Xie R. R., Jiao T. Y., Zhang D., Zhang D., Liang X. W., Zang Y., Sun Y. L., Liu H., Li J., Zhou Y., *J. Med. Chem.*, **2024**, 67(7), 5642—5661
- [13] Yin Y. M., Wang M. G., Gu W. J., Chen L. L., *Biochem. Pharmacol.*, **2021**, 186, 114430
- [14] Liu Z. X., Chen L., Chen M. Y., Linghu L., Liao Z. H., Chen M., Wang G. W., *Phytomedicine*, **2024**, 130, 155759
- [15] Gaieb Z., Liu S., Gathiaka S., Chiu M., Yang H. W., Shao C. H., Feher V. A., Walters W. P., Kuhn B., Rudolph M. G., Burley S. K., Gilson M. K., Amaro R. E., *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **2018**, 32(1), 1—20
- [16] Friesner R. A., Banks J. L., Murphy R. B., Halgren T. A., Klicic J. J., Mainz D. T., Repasky M. P., Knoll E. H., Shelley M., Perry J. K., Shaw D. E., Francis P., Shenkin P. S., *J. Med. Chem.*, **2004**, 47(7), 1739—1749
- [17] Case D. A., Cheatham T. E. III, Darden T., Gohlke H., Luo R., Merz K. M. Jr., Onufriev A., Simmerling C., Wang B., Woods R. J., *J. Comput. Chem.*, **2005**, 26(16), 1668—1688
- [18] Lee C., Yang W., Parr, R. G., *Phys. Rev. B*, **1988**, 37(2), 785—789
- [19] Wang J. M., Cieplak P., Kollman P. A., *J. Comput. Chem.*, **2000**, 21(12), 1049—1074
- [20] Wang J. M., Wolf R. M., Caldwell J. W., Kollman P. A., Case D. A., *J. Comput. Chem.*, **2004**, 25(9), 1157—1174
- [21] Salomon-Ferrer R., Case D. A., Walker R. C., *WIREs Comput. Mol. Sci.*, **2013**, 3(2), 198—210
- [22] Olsson M. H. M., Sondergaard C. R., Rostkowski M., Jensen J. H., *J. Chem. Theory Comput.*, **2011**, 7(2), 525—537
- [23] Jorgensen W. L., Chandrasekhar J., Madura J. D., Impey R., Klein M. L., *J. Chem. Phys.*, **1983**, 79(2), 926—935
- [24] Maier J. A., Martinez C., Kasavajhala K., Wickstrom L., Hauser K. E., Simmerling C., *J. Chem. Theory Comput.*, **2015**, 11(8), 3696—3713
- [25] Zhang L., Chen Y. Q., Li W. H., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2025**, 41(1), 146—154
- [26] Chen Y., Li J. H., Wu Z. R., Liu G. X., Li H. L., Tang Y., Li W. H., *J. Chem. Inf. Model.*, **2020**, 60(3), 1540—1550
- [27] Li W. H., Fu J., Cheng F. X., Zheng M. Y., Zhang J., Liu G. X., Tang Y., *J. Chem. Inf. Model.*, **2012**, 52(11), 3043—3052
- [28] Izaguirre J. A., Catarella D. P., Wozniak J. M., Skeel R. D., *J. Chem. Phys.*, **2001**, 114(5), 2090—2098
- [29] Berendsen H. J. C., Postma J. P. M., van Gunsteren W. F., DiNola A., Haak J. R., *J. Chem. Phys.*, **1984**, 81(8), 3684—3690
- [30] Elber R., Ruymgaart A. P., Hess B., *Eur. Phys. J. Spec. Top.*, **2011**, 200(1), 211—223
- [31] Essmann U., Perera L., Berkowitz M. L., Darden T., Lee H., Pedersen L. G., *J. Chem. Phys.*, **1995**, 103(19), 8577—8593
- [32] Roe D. R., Cheatham T. E., *J. Chem. Theory Comput.*, **2013**, 9(7), 3084—3095
- [33] Genheden S., Ryde U., *Expert Opin. Drug Discov.*, **2015**, 10(5), 449—461
- [34] Wang E. C., Sun H. Y., Wang J. M., Wang Z., Liu H., Zhang J. Z. H., Hou T. J., *Chem. Rev.*, **2019**, 119(16), 9478—9508
- [35] Onufriev A., Bashford D., Case D. A., *J. Phys. Chem. B*, **2000**, 104(15), 3712—3720
- [36] Weiser J., Shenkin P. S., Still W. C., *J. Comput. Chem.*, **1999**, 20(2), 217—230
- [37] Brooks B. R., Janezic D., Karplus M., *J. Comput. Chem.*, **1995**, 16(12), 1522—1542
- [38] Adasme M. F., Linnemann K. L., Bolz S. N., Kaiser F., Salentin S., Haupt V. J., Schroeder M., *Nucleic Acids Res.*, **2021**, 49(W1), W530—W534
- [39] Zhang J. J., Lv L. N., Zhu H. R., Zhang Y., Xu X. D., Long L. X., Fu W., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2024**, 40(6), 1201—1211
- [40] Xue X. L., Wang X., Ye C. H., Gao M. N., Li P., Yu K. Q., Chen G. H., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2024**, 40(6), 1298—1310

(Ed.: L, V, K)