

· 技术与方法 ·

梨形四膜虫细胞毒性苯酚类似物的三维定量结构毒性相关研究*

王远强, 刘跃辉, 丁元, 张娅, 林治华[△]

(重庆理工大学药学与生物工程学院 400054)

摘要:目的 使用比较分子相似性指数分析(CoMSIA)方法对梨形四膜虫细胞毒性苯酚类似物进行三维定量结构毒性相关(3D-QSTR)研究。方法 系统分析了立体场、静电场、疏水场对三维结构毒性模型的影响,并建立相应的 3D-QSTR 预测模型。结果 使用静电场与疏水场协同作用建立了具有良好可靠性和预测能力的 3D-QSTR 模型($Q^2=0.767, r^2=0.933$)。结论 模型具有良好的预测能力,对苯酚类似物的结构修饰具有指导作用。

关键词:三维定量构毒关系;比较分子相似性指数分析;苯酚类似物

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.05.019

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)05-0466-03

Three dimension quantitative structure toxicity relationship study of cytotoxic phenolic analogues against *Tetrahymena pyriformis*Wang Yuanqiang, Liu Yuehui, Ding Yuan, Zhang Ya, Lin Zhihua[△]

(College of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China)

Abstract: Objective To use the comparative molecular similarity indices analysis (CoMSIA) for constructing three dimension quantitative structure-toxicity relationship (3D-QSTR) models of phenolic analogues with cytotoxicity against *Tetrahymena pyriformis*. **Methods** The contribution of hydrophobic, electrostatic and steric property to 3D-QSTR models were analyzed comprehensively. The optimized 3D-QSTR model was constructed by CoMSIA using electrostatic and hydrophobic properties for phenolic analogues. **Results** The model had good stability ($Q^2=0.767$) and predictive ability ($r^2=0.933$). **Conclusion** The electrostatic and hydrophobic counter maps from CoMSIA could guide the structural modification of phenolic analogues directly.

Key words: three dimension quantitative structure toxicity relationship; comparative molecular similarity indices analysis; phenolic analogues

苯酚类化合物作为有机工业中一类重要的物质被广泛地用作防腐剂、防锈剂、农业化学品、生物杀伤剂、染料、杀真菌剂和杀虫剂等,其广泛存在于环境中并对环境、尤其是水环境造成严重污染^[1-4]。目前苯酚等 4 种酚类化合物被美国环境保护局列为优先控制的有机污染物,7 种苯酚类化合物被确认为中国优先控制的有机污染物;因此,苯酚类化合物的毒性研究近年来成为热点。定量构效关系(quantitative structure activity relationship, QSAR)研究在现代化学和生物化学研究领域得到了非常广泛的应用,同时在环境污染物的生物活性和生物毒性评价中发挥着重要作用^[5-7]。

定量结构毒性相关性(quantitative structure-toxicity relationships, QSTR)研究是指一组化合物的生物毒性与其结构特征之间的相互关系,是一种基于化合物结构预测其毒性,并能进一步分析毒性作用机制的研究方法。近年来, QSTR 研究在环境污染、毒性研究预测方面获得了广泛的应用。本文使用比较分子相似性指数分析(comparative molecular similarity indices analysis, CoMSIA)方法对系列具有梨形四膜虫细胞毒性的苯酚类似物进行了三维定量结构毒性相关研究(3D-QSTR),系统分析了立体场、静电场、疏水场及协同作用对模型的影响,并建立了相应的 3D-QSTR^[9-11]。

1 CoMSIA 的原理及研究方法

1.1 CoMSIA 简介 自 Cramer III 在 1988 年创建比较分子力场分析(CoMFA)方法以来, CoMFA 已经发展成为三维定量构效关系(3D-QSAR)研究中使用最广泛且最有效的工具之

一^[12],它主要用于研究分子周围的非键分子场(立体场与静电场)改变时,其相应的活性所发生的变化^[13-16]。1994 年, Klebe 等^[16]提出 CoMSIA 方法,该方法是 CoMFA 的一种扩展,两者的原理基本相同,都基于如下假设:分子的亲和力改变时,其分子性质也发生相应变化,其分子性质以分子场的形式表现。

1.2 数据来源 本研究中 50 个具有梨形四膜虫细胞毒性的苯酚类化合物来自文献[9],化合物名称及其活性见表 1,该类化合物的公共结构见图 1。在本研究中,从 50 个苯酚类似物中随机选择 10 个化合物组成测试集,用于测试 3D-QSTR 模型的预测能力;剩余的 40 个苯酚类似物则组成的训练集建立 3D-QSTR 模型。

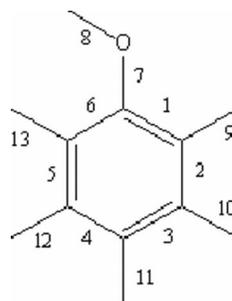


图 1 苯酚类化合物的公共结构

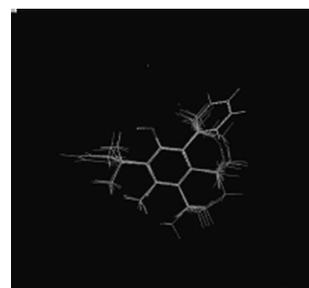


图 2 苯酚类化合物的分子叠合图

1.3 分子叠合 本研究以毒性最强的苯酚化合物(2,4-二溴-

6-苯基苯酚)作为模板,首先对该化合物进行系统搜索及分子力学优化,确定其最低能量构象,其他分子则以该分子为模板做结构修饰并进行能量优化,最后基于公共结构进行分子叠合。具体步骤为:首先选取活性最强的苯酚类化合物分子,对其进行系统构象搜索,选择最低能量构象并用 MMFF94 力场进行分子力学优化,然后以该分子为模板构建其他分子,并用 MMFF94 力场进行分子力学优化,优化的收敛条件均为能量 RMS 值小于 $0.05 \text{ KJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-1}$ 。

由于本文研究对象均为具有苯环结构的苯酚类化合物,所以认为是较刚性的分子,经过上述分子力学优化的构象即为化合物的活性构象,在分子叠合过程中,选择活性最强的苯酚化合物(2,4-二溴-6-苯基苯酚)作为叠合模板,以公共结构(原子 1-8)进行分子叠合,叠合后的分子骨架见图 2。

1.4 CoMSIA 分析 在用 CoMSIA 分析时,首先在叠合后的所有分子集合区产生边长为 0.2 \AA 的格点,并用 4 \AA 的边界确定所有叠合分子的区域。用 CoMSIA 提供的缺省探针计算分子在每个格点上的立体场、静电场、疏水场,在得到每个格点的分子场后,用偏最小二乘(partial least square, PLS)方法建立分子场参数与活性的 3D-QSTR,并用“留一法”(leave one out, LOO),交互校验(cross validation, CV)方法检验模型的统计学差异以及确定模型的主成分数,以最优的交互校验值确定的主成分数并建立非交互校验的 3D-QSAR 模型,模型质量由交互检验相关系数(Q^2)、相关系数(r^2)、预测标准差(standard error

prediction, SEP)和 F 统计值评价。本研究的计算工作在 SGI Fuel 工作站用 SYBYL6.9 完成。

2 结 果

在本研究中,分别对训练集化合物的立体场、静电场、疏水场及不同分子场的协同进行 CoMSIA 分析,各 3D-QSTR 模型的统计结果见表 2;在用 PLS 方法建立 QSAR 模型时,用最优 Q^2 确定的主成分数建立非交互校验相关模型。表 2 中的模型参数显示:使用静电场与疏水场协同作用建立的 3D-QSAR 模型具有较强的稳定性和良好的预测能力,该模型所用主成分数为 4, Q^2 为 0.767, r^2 为 0.933, SEP 为 0.179, F 检验值为 157.914。使用 CoMSIA 方法分别对 3 种分子场建立 3D-QSTR 模型,其中相关性最好、预测能力最强的是用静电场所建立的模型($Q^2=0.749, r^2=0.891$),其次是用疏水场作用建立的模型,而用立体场($Q^2=0.040, r^2=0.229$)预测能力相对较差,说明静电场对化合物亲和力的影响最明显。在用任意两种分子场所建立的模型中,用静电场与疏水场建立的 3D-QSTR 模型具有相对最优的预测能力($Q^2=0.767, r^2=0.933$);在该模型中,静电场对模型的贡献为 67%;同时使用 3 种分子场所建模型中,静电场的贡献也达到 59.1%。由此可见,静电场对模型的贡献是非常明显的,而使用立体场与疏水场的协同作用则相对较差。分析表 2 中的所有 QSTR 模型可以发现,单独使用立体场并不能建立一个理想的模型,但在有其他分子场存在的情况下立体场作用的贡献明显增强。

表 1 苯酚类化合物对四膜虫细胞毒性的观察值与计算值

序号	化合物	观察值	计算值	误差	序号	化合物	观察值	计算值	误差
1	苯酚	-0.431	-0.427	0.004	26	2,5-二氯苯酚	1.128	0.793	0.335
2	2,6-二氟苯酚	0.396	0.431	0.035	27	2,3-二氯苯酚	1.271	1.19	0.081
3	2-氟苯酚	0.248	0.146	0.102	28	4-氯-2-甲基苯酚	0.700	0.662	0.038
4	4-氟苯酚	0.017	-0.118	0.135	29	4-氯-3-甲基苯酚	0.795	0.655	0.140
5*	3-氟苯酚	0.473	0.574	0.101	30*	2,4-二氯苯酚	1.036	0.861	0.175
6	4-甲基苯酚	-0.192	0.043	0.235	31	3-叔丁基苯酚	0.730	0.672	0.058
7	3-甲基苯酚	-0.062	0.081	0.08	32	4-叔丁基苯酚	0.913	0.964	0.051
8	2-氯苯酚	0.277	0.424	0.147	33	3,5-二氯苯酚	1.562	1.642	0.08
9	2-溴苯酚	0.504	0.535	0.031	34	2-苯基苯酚	1.094	1.088	0.006
10*	4-氯苯酚	0.545	0.665	0.12	35*	2,4-二溴苯酚	1.403	1.647	0.244
11	3-乙基苯酚	0.229	0.241	0.012	36	2,3,6-三甲基苯酚	0.418	0.896	0.47
12	2-乙基苯酚	0.176	0.135	0.041	37	3,4,5-三甲基苯酚	0.930	0.765	0.165
13	4-溴苯酚	0.681	0.728	0.047	38	2,4,6-三甲基苯酚	1.695	1.057	0.638
14	2,3-二甲基苯酚	0.122	0.052	0.07	39	4-氯-3,5-二甲基苯酚	1.203	1.357	0.154
15*	2,4-二甲基苯酚	0.128	0.145	0.017	40*	4-溴-2,6-二氯苯酚	1.779	1.765	0.014
16	2,5-二甲基苯酚	0.009	0.158	0.149	41	2,4,5-三氯苯酚	2.100	2.111	0.011
17	3,4-二甲基苯酚	0.122	0.188	0.066	42	4-溴-6-氯-2-甲基苯酚	1.277	1.401	0.124
18	3,5-二甲基苯酚	0.113	0.268	0.155	43	4-溴-2,6-二甲基苯酚	1.278	1.154	0.124
19	3-氯-4-氟苯酚	0.842	1.072	0.23	44	2,4,6-三溴苯酚	2.050	2.081	0.031
20*	2-氯-5-甲基苯酚	0.64	0.573	0.067	45*	2-叔丁基-4-甲基苯酚	1.297	1.345	0.048
21	4-碘苯酚	0.854	0.821	0.033	46	4-氯-2-异丙基-5-甲基苯酚	1.862	1.964	0.102
22	3-碘苯酚	1.118	0.905	0.213	47	6-叔丁基-2,4-二甲基苯酚	1.245	1.343	0.098
23	2-异丙基苯酚	0.803	0.631	0.172	48	2,6-二苯基苯酚	2.113	1.97	0.143
24	3-异丙基苯酚	0.609	0.643	0.034	49	2,4-二溴-6-苯基苯酚	2.207	2.285	0.078
25*	4-异丙基苯酚	0.473	0.408	0.065	50*	2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚	1.788	0.685	1.103

注:测试集中化合物用*标注。

表 2 苯酚化合物的 CoMSIA 模型参数

序号	力场	交互检验			非交互检验		贡献(%)		
		nc	Q ²	SEP	r ²	F	S	E	H
1	S	1	0.040	0.590	0.229	14.295	1.000	—	—
2	E	3	0.749	0.227	0.891	125.506	—	1.000	—
3	H	3	0.393	0.296	0.815	67.343	—	—	1.000
4	S+E	3	0.719	0.218	0.898	136.893	0.193	0.807	—
5	S+H	5	0.612	0.237	0.886	68.376	0.353	—	0.647
6	E+H	4	0.767	0.179	0.933	157.914	—	0.67	0.330
7	S+E+H	3	0.739	0.183	0.929	200.857	0.140	0.591	0.269

注:训练集为 40 个化合物;—表示无数据。

3 讨 论

对于训练集中,细胞毒性计算值与观测值的绝对误差小于 0.335,说明所建立模型具有良好的估计能力,即静电场和疏水场与细胞毒性的相关性非常好;在测试集的 10 个化合物中,有 1 个化合物的预测值出现了异常情况,即与观测值的偏差比较大,但另外 9 个化合物的预测值与观测值吻合得比较好,其绝对误差最大为 0.244。对于化合物 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚,其预测值与观测值的绝对误差达到了 1.103,这可能是由于化合物中含有 2 个空间位阻较大的叔丁基所引起的,也可能是实验观测值本身存在一定误差所致或实验中的偶然误差引起。

CoMSIA 的一个优点就是可以分析各种分子场对毒性的影响,并可以通过 3D 相关性等值面图进行观察;该等值面图有助于确定影响毒性的分子场重要区域,也可以标记对活性具有重要贡献的分子场特征。苯酚类化合物的静电场、疏水场等值面图如图 3、4 所示。结合静电场的等值面图中(图 3)与具体的化合物进行分析可知:在 6 位(红色区域)有相对较大的基团时,使用负电性较强的取代基可以增加化合物的毒性,在 2、3、5 位(蓝色区域)附近的区域则应该使用正电性较强的取代基。疏水场相关性等值面图(图 4)显示:在分子的 2~5 位取代位置上都不适合有立体位阻较大的基团。

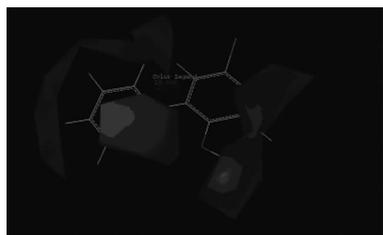


图 3 CoMSIA 分析静电场等值面图

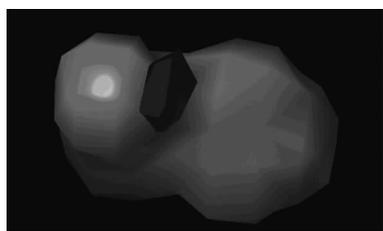


图 4 CoMSIA 分析疏水场等值面图

Cramer 等^[13]采用量子化学方法对该系列苯酚类化合物进行 QSTR,作者分别使用 AM1、PM3、PM5 与 DFT 方法计算了苯酚的分子质量(Mw)、最高能量轨道(εHOMO)、最低能量

轨道(εLOMO)、硬度(η)、柔软性(S)、化学势(μ)、亲电指(ω)数及总能量(TE),建立了良好的定量结构毒性相关模型(表 3)。尽管本文使用 CoMSIA 方法所建立的模型与文献研究结果相比没有优势,但是 CoMSIA 从三维空间结构讨论苯酚类似物的静电性质、空间结构与疏水性质对其细胞毒性的影响,并可通过分子等势面图为苯酚类似物的设计与改造提供直接依据。

表 3 苯酚化合物的定量构毒关系模型对比

序号	建模方法	建模方案	R ² CV	R ²	SE	文献
1	Quantum	AM1	0.787	0.884	0.241	[13]
2	Quantum	PM3	0.709	0.853	0.270	[13]
3	Quantum	PM5	0.710	0.857	0.267	[13]
4	Quantum	DFT	0.880	0.911	0.210	[13]
5	CoMSIA	E+H	0.767	0.933	0.179	

综上所述,使用静电场与疏水场建立的 3D-QSTR 模型,具有良好的稳定性与预测能力。分子场等值面图可直观反映出细胞毒性有重要影响的重要部位,并可由此推测在 6 位上有较大的负电性基团及 2~5 位上有带正电荷的取代基对增强细胞毒性有利。将本研究中的 3D-QSTR 模型与 2D-QSTR 研究相结合,对苯酚类化合物进行结构修饰以改善其细胞毒性具有重要意义。

参考文献:

- [1] Olexandr I. Structure toxicity relationships of nitroaromatic compounds[J]. Mol Divers, 2006, 10(3): 233-245.
- [2] 梁兆亮,梅虎,周原,等. 计算机辅助药物设计中的多维定量构效关系模型化方法[J]. 化学进展, 2006, 18(1): 120-127.
- [3] Kunal R, Gopinath G. QSTR with extended topochemical atom (ETA) indices. VI. Acute toxicity of benzene derivatives to tadpoles (*Rana japonica*)[J]. J Mol Model, 2006, 12(5): 306-316.
- [4] Donatas Z. Progress in toxin formatics: the challenge of predicting acute toxicity[J]. Current Topics Med Chem, 2003, 3(11): 1301-1314.
- [5] 钟国华,胡美英. QSAR 及其在农药设计中的应用和进展[J]. 农药学报, 2001, 3(1): 1-11.
- [6] Zaliani A, Gancia E. MS2WH IM scores(下转第 471 页)

可去除 APTT 此项检验。

去除 APTT 检验项后的评判函数为：

$$P(1) = PT \times 2.794 + TT \times 2.578 + FIB \times 2.465 - 45.869$$

$$P(3) = PT \times 3.088 + TT \times 2.519 + FIB \times 1.977 - 45.898$$

将评价指标 APTT 从评判体系中去除后对于低凝类型的评判准确率结果见表 8。

表 8 两种方法对低凝类型的评判准确率比较

方法	准确率(%)
未改进法	48.57
改进法	74.29

此结果与罗万春等^[14]的判别结果出入较大,而且在之前投影寻踪法所给出的指标权重中,APTT 明显大于 FIB,然而再去除指标权重较大的 APTT 后,评判准确率有了明显的提高。其原因可能是:APTT 是内源性凝血系统的一个较为敏感的筛选试验。当血液表现为低凝时,其会表现为延长,例如内源系统因子先天性缺乏的血友病等。本文中检测的样本,其低凝时 APTT 均表现为延长,但可能由于实验过程中的误差等因素,使其波动性较大,从而加大了实验产生的不确定性^[15]。其具体原因仍待进一步探究。

随着数学中判别分析方法的不断发展,其判别的准确性不断提高。但须引起注意的是,在应用数学方法进行评价时,不能单一的只相信纯数学评价结果,而应结合其相应的实际临床意义,以此作为评判分析的根本出发点,才能收到满意的结果。

参考文献:

[1] 林英辉. 血凝指标的自动检测方法及其临床应用[J]. 医学文选, 2002, 10(5): 725-727.
 [2] 王润琴, 李美英, 杨海青. 25 °C 室温下不同保存时间对凝血功能的影响[J]. 山西职工医学院学报, 2011, 21(1): 13-

14.
 [3] 薛宇红. 避免标本采集不当给血常规检验结果造成的影响[J]. 中国实用医药, 2011, 6(17): 224-225.
 [4] 苏伟雄. 浅析凝血实验检测的影响因素[J]. 中国卫生产业, 2011, 8(6): 40-41.
 [5] 赵龙莲, 张录达, 李军会等. 小波包熵和 Fisher 判别在近红外光谱法鉴别中药大黄真伪中的应用[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 4(4): 817-820.
 [6] 唐勤, 李星, 张弘扬, 等. 核 Fisher 判别分析在助学贷款违约判别中的应用[J]. 工程地球物理学报, 2011, 8(3): 374-376.
 [7] 程正东, 章毓晋, 樊祥. 常用 Fisher 判别函数的判别矩阵研究[J]. 自动化学报, 2011(10): 1361-1370.
 [8] 田艳, 孙建孟, 王鑫. 利用逐步法和 Fisher 判别法识别储层岩性[J]. 勘探地球物理进展, 2011, 33(2): 126-129.
 [9] 金菊良, 魏一鸣, 丁晶. 水质综合评价的投影寻踪模型[J]. 环境科学学报, 2001, 7(21): 431-434.
 [10] 李为相, 张广明, 李帮义. 基于投影寻踪模型的区间数群决策权重确定[J]. 工业工程, 2011, 14(2): 16-20.
 [11] 徐杉, 周四清, 温生贵. 孤立性肺结节 CT 形态学征象的 Fisher 判别[J]. 放射学实践, 2011(2): 180-182.
 [12] 金菊良, 杨晓华, 丁晶. 基于实数编码的加速遗传算法[J]. 四川大学学报: 工程科学版, 2000, 7(4): 20-24.
 [13] 陈淑贞. 静脉采血影响凝血 4 项结果的探讨[J]. 中国当代医药, 2009, 11(16): 59-60.
 [14] 罗万春, 刘宿, 易东. 兔血液凝血功能诊断的逐步判别与分析[J]. 第三军医大学学报, 2008, 9(30): 1638-1640.
 [15] 吴慧玲. 凝血 4 项检验的临床意义[J]. 菏泽医学专科学校学报, 2008, 3(20): 47-48.

(收稿日期: 2011-03-18 修回日期: 2011-08-22)

(上接第 468 页)

for amino acids: a new 3D-descriptor for peptide QSAR and QSPR studies[J]. J Chem Inf Comput Sci, 1999, 39(3): 525-533.
 [7] 李志良. 定量构效关系与研究进展[J]. 化学通报, 1995, (9): 5-10.
 [8] Beermann K, Buschmann HJ, Schollmeyer E. A calorimetric method for the rapid evaluation of toxic substances using *Tetrahymena pyriformis* [J]. *Thermochimica Acta*, 1999, 337: 65-69.
 [9] Telvekar VN, Patel DJ, Jadhav NC, et al. Three-dimensional QSAR and pharmacophore mapping of biphenyl benzoic acid derivatives as selective human β 3-adrenergic receptor agonists[J]. *Med Chem Res*, 2010, 19(9): 1174-1190.
 [10] Pasha FA, Srivastava HK, Singh PP. Comparative QSAR study of phenol derivatives with the help of density functional theory[J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13(24): 6823-6829.

[11] 刘仲杰, 刘叔倩. 三维定量构效关系最新研究进展[J]. 河北科技大学学报, 1999, 20(1): 17-21.
 [12] 丁俊杰, 丁晓琴, 赵立峰, 等. 新型三维氨基酸结构描述子的研究及其在多肽中的应用[J]. 药学学报, 2005, 40(4): 340-346.
 [13] Cramer RD, Patterson DE, Bunce JD. Comparative molecular field analysis (CoMFA) 1: Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins[J]. *J Am Chem Soc*, 1988, 110(18): 5959-5967.
 [14] Gaurav A, Yadav MR, Giridhar R, et al. 3D-QSAR studies of 4-quinolone derivatives as high-affinity ligands at the benzodiazepine site of brain GABAA receptors[J]. *Med Chem Res*, 2011, 20(2): 192-199.
 [15] Klebe G, Abraham U, Mietzner T. Molecular similarity indices in a comparative analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological activity[J]. *J Med Chem*, 1994, 37(24): 4130-4146.

(收稿日期: 2011-03-09 修回日期: 2011-07-22)