

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2019.02.032

一种新的 MDM2-p53 信号通路抑制剂的研究

涂 潇, 李 雷, 张海波, 刘 扬, 肖智雄, 张渝君, 曹 洋

(四川大学生命科学院 生长代谢衰老中心, 成都 610065)

摘 要: 本研究以研发新型小分子 MDM2 抑制剂为目的, 建立了以分子对接为基础的虚拟筛选流程. 利用虚拟筛选流程对 SPECS 化合物库的分子进行类药性筛选、分子对接粗筛、二次筛选以及排序挑选, 并通过细胞实验验证这些分子激活 p53 并抑制肿瘤细胞生长的活性. 结果表明 M12 能够激活 p53 及其下游信号通路, 抑制肿瘤细胞周期并促进肿瘤细胞凋亡. M12 与已知 MDM2-p53 抑制剂结构完全不同, 是一种潜在的癌症治疗候选药物.

关键词: 靶向治疗; p53; MDM2; 虚拟筛选

中图分类号: Q291 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2019)02-0369-08

Identification of a novel MDM2-p53 interaction inhibitor using virtual screening and docking strategy

TU Xiao, LI Lei, ZHANG Hai-Bo, LIU Yang, XIAO Zhi-Xiong, ZHANG Yu-Jun, CAO Yang
(Center of Growth, Metabolism and Aging, Collage of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: In this study we employed a docking approach based on virtual screening to search for inhibitors that can bind to MDM2 and block MDM2-p53 interaction. Candidate compounds were obtained from SPECS library. We processed two rounds of molecular docking. Putative compounds were selected based on binding score ranking and 3D structure inspection. Furthermore, the selected small molecules were validated by cell-based experiments. Treatment of several cancer cells with M12 led to activating p53, and upregulation of p21, leading to cell cycle arrest and apoptosis. To this end, we discovered a novel small molecule named M12 that is structurally different from the known MDM2 antagonists, M12 may be a novel small compound and a potentially useful drug candidate for cancer treatment.

Keywords: Targeted therapy; p53; MDM2; Virtual screen

1 引 言

人类癌症中最常见的基因突变是 p53 基因突变, 它的缺失或失活与人类肿瘤的发生发展相关^[1, 2]. 但在一部分癌症中虽然存在着野生型 p53 基因, 但其抗癌活性受到不同因素的抑制. 以激活 p53 为出发点针对这类癌症的治疗成为当今靶向治疗的热点之一, 而筛选阻断 MDM2-p53 结合从

而激活 p53 的小分子抑制剂又是其重要策略之一^[3-8].

p53 蛋白是非常重要的肿瘤抑制因子, 在调节细胞周期、细胞凋亡、DNA 损伤修复、血管生成、细胞代谢和衰老中起着十分重要的作用^[9-12]. 在超过一半的人类肿瘤中, p53 基因发生突变或者缺失. 在剩下的人类肿瘤中, 存在野生型的 p53, 它的功能也被 MDM2 有效的抑制^[13-15]. E3 泛素连接酶

收稿日期: 2018-04-09

基金项目: 国家自然科学基金(31401130)

作者简介: 涂潇(1993-), 男, 四川南充人, 硕士研究生, 研究方向为肿瘤靶向药物筛选. E-mail: 529871426@qq.com

通讯作者: 曹洋. E-mail: cao@scu.edu.cn

MDM2 是 p53 重要的抑制因子,它能阻断 p53 的转录功能,促进 p53 从细胞核转移到细胞质,并泛素化降解 p53^[16-18],而 MDM2 又能受到 p53 转录调节. p21 基因是 p53 下游的细胞周期素依赖性激酶抑制因子, p53 激活能转录上调细胞内 p21 蛋白表达,导致细胞周期停滞. 同时,激活的 p53 能转录调节 Bax, PUMA 等导致细胞凋亡.

筛选阻断 MDM2-p53 相互作用的小分子抑制剂的关键之一是寻找具有高亲和力的的小分子化合物. 目前,科学界和医药工作界已经在这个领域开展了许多非常有价值的研究,包括高通量的实验筛选、基于结构的虚拟筛选、基于配体的虚拟筛选、基于结构的全新设计和多种方法的联合应用,都获得了一些具有高亲和力的小分子化合物,已有一些小分子化合物进入临床试验,如罗氏的 RG7338^[19]、赛诺菲的 SAR405838^[20]、安进的 AMG232^[21]和强生的 TDP665759^[22, 23]等.

阻断 p53-MDM2 相互作用的小分子抑制剂是抗肿瘤药物开发的热点,虽然已有分子进入临床试验,但是开发新型小分子抑制剂仍然具有巨大的价值. 本论文研究探索建立了一套有效的虚拟筛选方法,以 MDM2 为靶点,筛选了十多万商品化小分子,得到 20 个潜在的活性分子. 经过实验验证,我们发现分子化合物 M12 能与 MDM2 结合,阻断 MDM2-p53 的相互作用,从而激活 p53 并发挥其抗肿瘤的功能.

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 细胞株 人肺癌细胞 A549、人骨肉瘤细胞 SJSA-1、人骨肉瘤细胞 U-2 OS、人结肠癌细胞 HCT116、人肺癌细胞 H1299、人宫颈癌细胞 Hela (均用 DMEM 培养基培养)和人乳腺癌细胞(用 MEM 培养基培养)均来源于本实验中心.

2.1.2 实验试剂 DMEM 培养基、MEM 培养基、胎牛血清(FBS)、胰岛素、Penicillin-Streptomycin、0.25%胰蛋白酶(Hyclone).

MTT 试剂盒(Promega), ECL 显影液、PVDF 膜(Milipore), 蛋白分子 Marker(Fermentas), APS、TEMED、Tris-HCl(pH 6.8, pH 8.8)(Bio-Rad), Propidium Iodide(PI)、RNase A(Sigma), PI(Protease inhibitors)(Calbiochem Merck KGaA), EBC250(50 m mol/L pH 8.0 Tris-HCl, 250 m mol/L NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 0.2 m

mol/L PMSF, 蛋白酶抑制剂混合物(2 μg/mL leupeptin, 2 μg/mL aprotinin, 50 m mol/L NaF), 0.5 m mol/L Na₃VO₄, 脱脂牛奶(伊利乳业), TBST(150 m mol/L NaCl、50 m mol/L Tris (pH 7.4), 0.1% Tween-20).

一抗:p53 抗体(Santa Cruz Biotechnology, cat. # sc-126), p21 抗体(Santa Cruz Biotechnology, cat. # sc-136020), GAPDH 抗体(华安, cat #. R1210-1), MDM2(Santa Cruz Biotechnology, cat. # sc-813).

二抗:goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, cat. # sc-2005), goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, cat. # sc-2004).

其余试剂均为进口或者国内产分析纯.

2.2 实验方法

2.2.1 虚拟筛选 我们采用了基于分子对接的虚拟筛选方法,通过 DOCK6.6^[24]和 Autodock Vina^[25]两种分子对接软件工具,将小分子化合物库与 MDM2 进行对接,并通过评分函数计算相应的结合自由能. 采用两步对接的方法是因为 DOCK 对接软件速度较快,而 Autodock Vina 具有更高的准确率,二者结合能在较短时间完成筛选计算,同时准确性不受损失. 计算流程如图 1 所示.

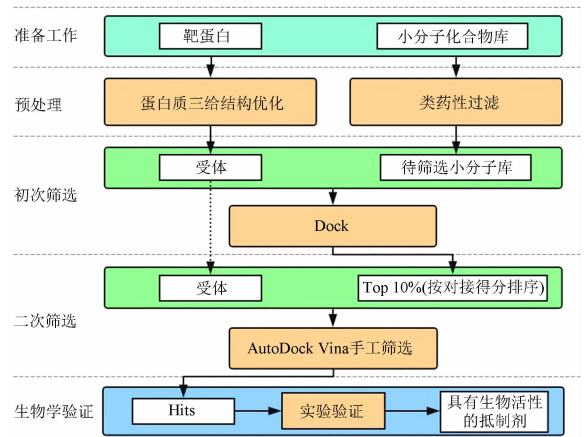


图 1 虚拟筛选模型

Fig. 1 Virtual screen model

上述流程中,靶蛋白来自蛋白质结构数据库 PDB,选择条件是 1)MDM2 与小分子共结晶的结构, 2)分辨率尽量高, 3)具有完整 p53 结合口袋. 结果选取了 MDM2 与 nutlin-3a 共结晶的结构(PDB ID: 4HG7)作为靶蛋白,然后我们用自行开发的侧链结构优化方法 MutCIS 对靶蛋白结构进

行微调,以提高分子结合口袋结构的合理性。

上述流程中,筛选小分子化合物库来自商用的 SPECS 化合物库,采用它的主要原因是:1)所有的小分子都经过了 LC/MS 和 $^1\text{H-NMR}$ 分析,有着确定的化学结构,纯度都大于 90%;2)SPECS 库中小分子结构具有多样性;3)SPECS 库中的小分子都可以购买,方便进行实验验证。我们下载了 SPECS 中的 164378 个小分子 Mol2 格式的三维结构数据,然后进行了类药性过滤,选择小分子结构中可旋转键小于 6 且相对分子量小于 900 D 的化合物作为第一步筛选的小分子化合物库,结果得到了 100479 个小分子化合物。

我们用 perl 代码编写的脚本实现了整个虚拟筛选流程的自动化运行。通过 perl 脚本对结果进行分析,包括按照评分函数的得分值对小分子进行排序、可视化检测等,最终得到筛选结果。计算过程第一步筛选采用的参数有,对接口袋的中心来自与 4HG7 共结晶的 Nutlin-3a,对接口袋半径为 8 Å,生成表面文件 dms 过程和 sph 文件过程中用到的 radius of probe 设置为 1.0 Å。评分函数选择刚性得分,对接过程参数 max_orientations 和 simplex_max_iteration 通过权衡对接准确率和时间效率设置为 750,其他参数选择默认参数。第二步筛选的时候,对接区域通过 autodocktools 软件工具进行设置,参数设置见表 1。

表 1 Vina 对接过程参数设置

Parameter	Value
Center_x	-22.539
Center_y	9.084
Center_z	-12.5
Size_x	21
Size_y	35
Size_z	20
Exhaustiveness	4

2.2.2 细胞培养 细胞培养:用含有 10%FBS 和 1%Penicillin-Streptomycin 的 DMEM 培养基培养人肺癌细胞 A549、人骨肉瘤细胞 SJSA-1、人骨肉瘤细胞 U-2 OS、人结肠癌细胞 HCT116、人肺癌细胞 H1299、人宫颈癌细胞 Hela,用含有 10%FBS 和 1%Penicillin-Streptomycin 的 MEM 培养基培养人乳腺癌 MCF-7 细胞,放置于 37 °C、5%CO₂ 浓度的培养箱中培养。

2.2.3 细胞总蛋白的提取与蛋白浓度的测定 细胞总蛋白的提取:收集细胞,用 1×PBS 清洗,加入 EBC250 细胞裂解液,涡旋振荡 15 s,在冰上裂解

30 min 后,在 4 °C 离心机中以 13000 r/min 转速离心 20 min,取上清,进行蛋白定量分析。

Bradford 法测定蛋白含量:1×蛋白测定工作液与 1 μL 细胞上清混匀,在 595 nm 吸收波长处进行测量。然后根据之前做好的标准曲线仪器会把吸光值换算成浓度,用于后续实验。

2.2.4 Western Blot 等量蛋白样品进行 12%浓度的 SDS-PAGE 胶电泳分离,然后转到 PVDF 膜上。4%脱脂牛奶孵育 1 h。用一抗在 4 °C 冰箱中孵育过夜。孵育完成的 PVDF 膜用 TBST 缓冲液洗 3 次,每次 10 min。再用二抗孵育 1 h,用 TBST 缓冲液洗 10 min 后进行 ECL 显影检测。

2.2.5 流式细胞仪分析 收集细胞,用预冷 1×PBS 清洗,加入 70%的乙醇固定过夜。将处理过夜的细胞离心,1000 r/min 转速离心 2 min,倒掉乙醇。细胞用 PI(propidium iodide, 50 μg/mL)和 RNaseA(80 μg/mL)黑暗中 37 °C 染色 1 h,然后用流式细胞仪分析细胞周期。

2.2.6 MTS 测 IC₅₀ 在 96 孔板中,每孔接种 100 μL 含 3000~8000 个细胞。细胞贴壁后,更换含不同浓度梯度小分子化合物的 100 μL 相应培养基,每个浓度设置 4 个重复实验,37 °C、5%CO₂ 浓度的培养箱中培养 4 d。每孔加入 8 μL 的 MTT 试剂,反应 1.5 h,用酶标仪读取 570 nm 处的吸光值,绘制曲线。

3 结果与分析

3.1 虚拟筛选潜在的与 MDM2 蛋白结合的小分子

本研究基于分子对接的虚拟筛选(图 1),首先用 DOCK 进行筛选,根据刚性得分结果对小分子进行排序,选择与 MDM2 亲和力最高的 10%的(10 002 个)小分子用 Autodock Vina 进行第二步筛选。选择三种得分结果都在前 1000 的小分子,通过 pymol 软件检查它们与 MDM2 的结合匹配程度。最终选择了 20 个潜在的小分子用于实验验证。通过一系列实验,验证了一个名为 M12(4-(4-chlorophenyl)-2-methyl-5-oxo-7-phenyl-N-(2-pyridinyl)-1,4,5,6,7,8-hexahydro-3-quinolone-carboxamide,图 2A,2B)的分子具有抑制 MDM2-p53 的活性。已报道的 MDM2 抑制剂主要有苯二氮类、顺式咪唑啉类、羟吡啶或者环加成羟吡啶类分子,而 M12 是以喹诺酮为母核,结构与前述分子截然不同。我们把 M12 和一款经典的 MDM2 抑制剂

Nutlin-3a 的结构进行重叠(图 2B),发现虽然 M12 的分子结构不同于 Nutlin-3a,但是二者在与 MDM2 的结合模式上是类似的,它们都有深入

MDM2 口袋的氯苯基团,都有与左右侧面口袋结合的疏水基团(图 2C),因此它们的作用机理具有可比性。

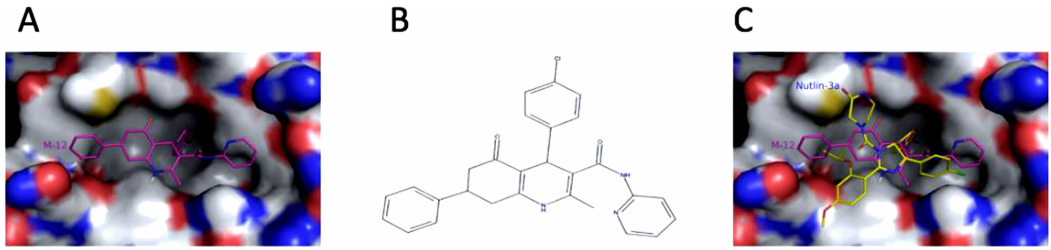


图 2 M12 分子结构与对接示意图

A. M12 和 MDM2 蛋白虚拟对接图; B. M12 小分子化合物结构; C. M12 与 nutlin-3a 和 MDM2 蛋白虚拟对接图

Fig. 2 M12 molecular structure and docking diagram

A. Virtual docking diagram(M12 molecular and MDM2 protein); B. M12 molecular compound structure; C. M12 and nutlin-3a dock with MDM2 protein

3.2 M12 能激活肿瘤细胞中的 p53 并导致 p21 和 MDM2 蛋白的上调

p53 是关键的肿瘤抑制基因,它严格地调控着细胞周期,凋亡和 DNA 损伤修复,其下游靶点包括 p21 和 MDM2。当 p53 激活时,p21 和 MDM2 表达水平显著上调。我们在多种肿瘤细胞(A549, MCF-7, 和 U-2OS)中对 M12 进行了实验。结果表明,M12 能上调 p53 蛋白表达,并促进 MDM2 和

p21 蛋白上调,这表明 M12 能激活 p53(图 3A,图 3B,图 3C),这说明 M12 确实能激活肿瘤细胞中的 p53 蛋白,然而与正对照 nutlin-3a 相比,M12 激活 p53 的能力比 nutlin-3a 低。为了验证 M12 对 p21 和 MDM2 的上调是依赖于 p53 的,我们在 HCT116 和 HCT116(p53^{-/-})细胞中进行了验证,结果表明 p21 和 MDM2 的上调依赖于 p53(图 3D)。

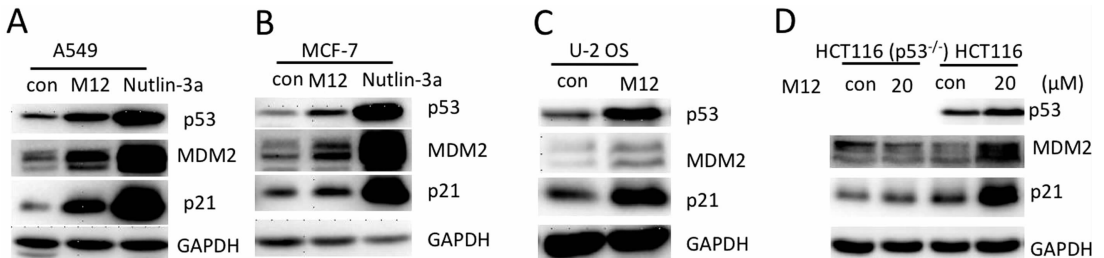


图 3 M12 能激活 p53 信号通路

A. 用 15 μ mol/L 的 M12 小分子处理 A549 细胞 24 h,nutlin-3a 作为阳性对照,DMSO 作为阴性对照。收集细胞进行 Western Blot 实验; B. 用 15 μ mol/L 的 M12 小分子处理 MCF-7 细胞 24 h,nutlin-3a 作为阳性对照,DMSO 作为阴性对照。收集细胞进行 Western Blot 实验; C. 用 15 μ mol/L 的 M12 小分子处理 U-2 OS 细胞 24 h,DMSO 作为空白对照。收集细胞进行 western blot 实验; D. 用 20 μ mol/L 的 M12 处理 HCT116 和 HCT116(p53^{-/-})细胞 24 h,DMSO 作为空白对照。收集细胞进行 Western Blot 实验

Fig. 3 M12 can activate p53 signal pathway

A. A549 cells were treated with 15 μ mol/L M12 for 24 h, nutlin-3a was used as a positive control, and the blank control (DMSO) was added, and cells were collected for Western Blotting; B. MCF-7 cells were treated with 15 μ mol/L M12 for 24 h, nutlin-3a was used as a positive control, and the blank control (DMSO) was added, and cells were collected for Western Blotting; C. U-2 OS cells were treated with 15 μ mol/L M12 for 24 h, and the blank control (DMSO) was added, and cells were collected for Western Blotting; D. HCT116 and HCT116 (p53^{-/-}) cells were treated with 20 μ mol/L M12 for 24 h, and the blank control (DMSO) was added, and cells were collected for Western Blotting

3.3 M12 能够引起肿瘤细胞周期 G1 期阻滞或促进肿瘤细胞死亡

为了研究 M12 激活 p53 通路能否抑制肿瘤细胞周期和促进细胞死亡,我们在 HCT116,A549 和

MCF-7 细胞中用 M12 处理后并做流式细胞仪分析,结果表明,M12 能够明显抑制 HCT116 和 A549 的细胞周期(图 4A 和图 4B),引起细胞周期 G1 期阻滞;而在 MCF-7 细胞中,M12 诱导细胞死

亡(图 4C).

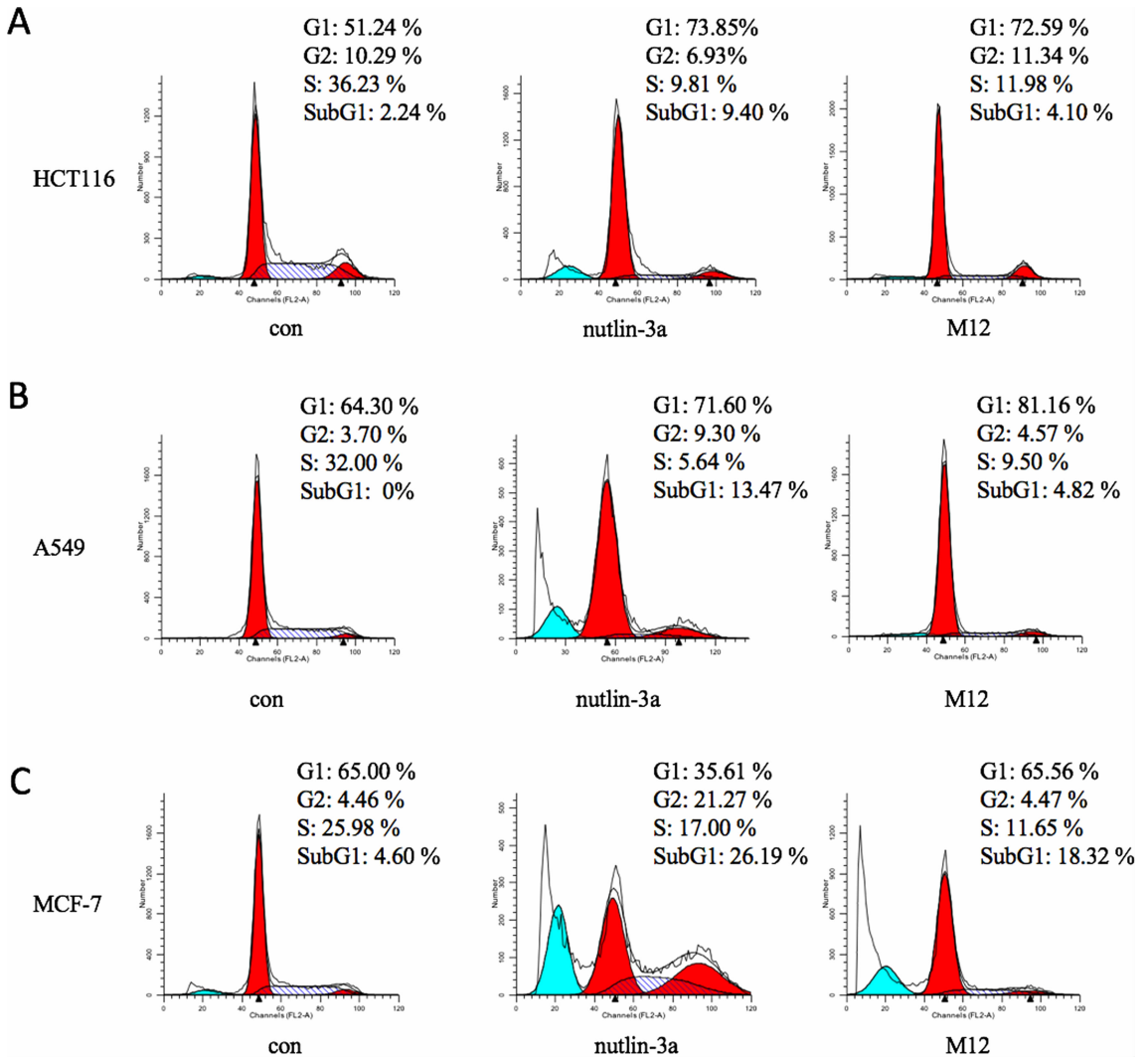


图 4 M12 诱导细胞周期 G1 期阻滞或诱导细胞死亡

A. 用 15 μ mol/L 的 M12 处理 HCT116 细胞 48 h, nutlin-3a 作为阳性对照, DMSO 作为阴性对照, 收集细胞进行 FACS 实验. B. 用 15 μ mol/L 的 M12 处理 A549 细胞 48 h, nutlin-3a 作为阳性对照, DMSO 作为阴性对照, 收集细胞进行 FACS 实验. C. 用 15 μ mol/L 的 M12 处理 MCF-7 细胞 48 h, nutlin-3a 作为阳性对照, DMSO 作为阴性对照, 收集细胞进行 FACS 实验.

Fig. 4 M12 inhibits cell cycle and induce cell apoptosis.

A. HCT116 cells were treated with 15 μ mol/L M12 for 48 h, nutlin-3a was used as a positive control, and the blank control (DMSO) was added, and cells were collected for FACS; B. A549 cells were treated with 15 μ mol/L M12 for 48 h, nutlin-3a was used as a positive control, and the blank control (DMSO) was added, and cells were collected for FACS; C. MCF-7 cells were treated with 15 μ mol/L M12 for 48 h, nutlin-3a was used as a positive control, and the blank control (DMSO) was added, and cells were collected for FACS.

3.4 M12 能够抑制多种肿瘤细胞生长

我们用流式细胞仪分析了 M12 分子对肿瘤细胞周期的影响, 发现 M12 能够抑制细胞周期或者促进细胞凋亡, 提示 M12 能够抑制肿瘤细胞生长. 我们为此用不同浓度的 M12 处理肿瘤细胞 96 h, 并用 nutlin-3a 作为阳性对照, MTS 来检测细胞的生长速率(图 5)并计算了 M12 的 IC_{50} (表 2). 结果表明, M12 能够抑制肿瘤细胞生长, 其 IC_{50} 大多在 25~80 μ mol/L 之间. 平行实验测得 nutlin-3a 为

1~30 μ mol/L. 这些结果表明, M12 抑制肿瘤生长的能力与 nutlin-3a 相比还有差距, 需要进一步优化.

4 讨论

p53 是关键性的肿瘤抑制因子, 人类癌症中最常见的基因突变就是 p53, 它的突变或缺失与人类的肿瘤发生息息相关, 但在一部分癌症中虽然存在着

野生型 p53 基因,但其抗癌活性受到不同因素的抑制. 针对这类癌症的治疗以激活 p53 为出发点成为当今靶向治疗的热点之一,而 MDM2-p53 信号通路小分子抑制剂的靶向治疗又是其中的关键.

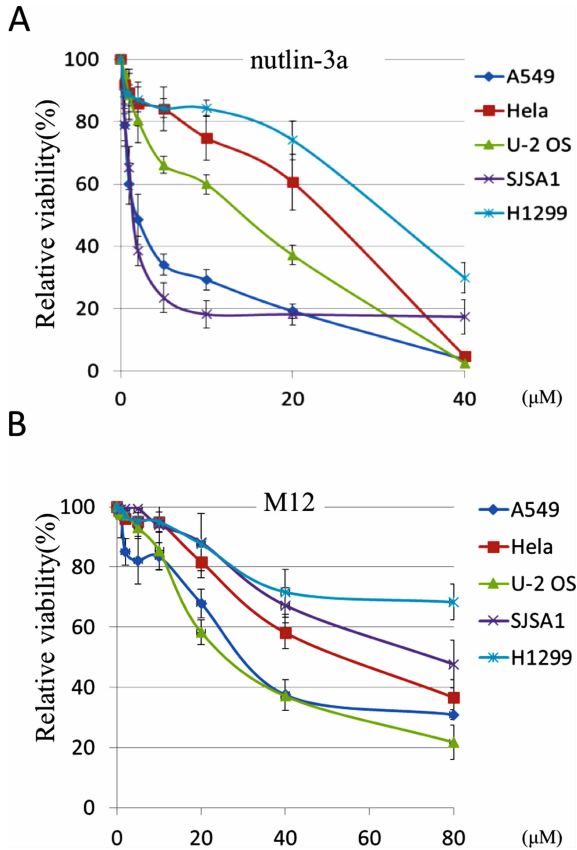


图 5 M12 抑肿瘤细胞增殖

用 0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$ 的 M12 处理 A549, HeLa, U-2 OS, SJS-1 和 H1299 细胞 96 h, 并用 0, 2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 nutlin-3a 作为阳性对照, 然后进行 MTS 实验. 5 次独立重复实验绘制生长曲线.

Fig. 5 M12 inhibits tumor cell proliferation.

A549, HeLa, U-2 OS, SJS-1 和 H1299 细胞加入 M12 浓度为 0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 处理 4 天, 同时加入 nutlin-3a 浓度为 0, 2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ 作为阳性对照, 然后进行 MTS 实验. 细胞生长曲线由 5 次独立重复实验绘制.

表 2 M12 在多种肿瘤细胞的 IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)

Cell lines	Nutlin-3a	M12
U-2 OS	15	25~30
A549	2	30
SJS-1	1~2	80
HeLa	30	60
H1299	30	>80

我们根据 MDM2 蛋白晶体结构建立了一套虚拟筛选流程, 从 SPECS 分子库中利用虚拟筛选技术得到了 M12 小分子, 在多种肿瘤细胞中实验证明 M12 小分子确实能够激活 p53 及其下游的信号

通路. M12 小分子能够引起 HCT116 和 A549 细胞周期阻滞在 G1 期, 但是在 MCF-7 细胞中 p53 却诱导大量细胞死亡. M12 通过 p53 诱导的这两种不同的生物学现象可能与细胞内 MDM2 的拷贝数或表达量有关. 有文献报道, 在细胞中 MDM2 能通过与肿瘤抑制因子 Rb 蛋白结合并抑制其功能来调节细胞周期和增殖^[26], MDM2 和 Rb 在调控细胞周期抑制还是凋亡过程中扮演着重要的角色. 在大多数 p53⁺ Rb⁺ 的肿瘤细胞中, 阻断 MDM2-p53 信号通路激活 p53 时, 会诱导 hypo-pRb 蛋白上调, 细胞表现为周期停滞. 而在少数 MDM2 高拷贝或 MDM2 过表达的肿瘤细胞中, 当激活 p53 时会下调 hypo-pRb 蛋白, 从而细胞发生凋亡, 当敲低 MDM2 或重新过表达具有活性的 Rb 突变蛋白 (Rb Δ p34) 时, 能够很好的抑制 p53 诱导的细胞凋亡^[27]. 所以不同肿瘤细胞对 M12 的反应有所不同, 无论是周期抑制还是细胞死亡, 这些结果都证实 M12 阻断了 MDM2-p53 信号通路从而激活 p53, 抑制肿瘤细胞生长.

虽然和 nutlin-3a 等知名药企开发的抑制剂分子相比, M12 的活性还有一定差距, 但是 M12 有完全不同的分子结构, 能够阻断 MDM2-p53 信号通路, 抑制肿瘤细胞的生长, 具备进一步分子修饰改进的潜力. M12 分子的母核是喹诺酮, 母核的三个方向连接了苯和氯苯 (图 6A), 可与 MDM2-p53 结合口袋中三个小口袋分别相互作用, 而 Nutlin-3a 分子的母核是顺式咪唑啉, 其在四个方向上连接了氯苯和其他芳香环等 (图 6B), 其中三个方向的作用与 M12 类似, 另外一个方向与口袋边缘的疏水残基相互作用. 由于 M12 的母核比 nutlin-3a 大, 受到 MDM2-p53 结合口袋大小的限制, 其侧面连接的基团不如 nutlin-3a 结构复杂, 因此它跟 MDM2-p53 结合口袋的空间互补不佳, 导致活性弱于 nutlin-3a. 若能对 M12 的连接苯环作进一步修饰, 填充 M12 与 MDM2 相互作用界面的空隙, 将有助于提高分子的活性.

M12 分子以喹诺酮为母核有一定的优势, 很多喹诺酮类分子是抗菌药物, 如吡哌酸、诺氟沙星、氧氟沙星、氟罗沙星、司帕沙星等, 具有抗菌谱广、组织浓度高、口服吸收好、不良反应相对较少等特点, 这暗示着新分子可能具有较好的药代特性, 具有开发潜力. 我们将进一步对 M12 进行优化, 以提高活性, 为肿瘤靶向药物开发提供有价值的参考.

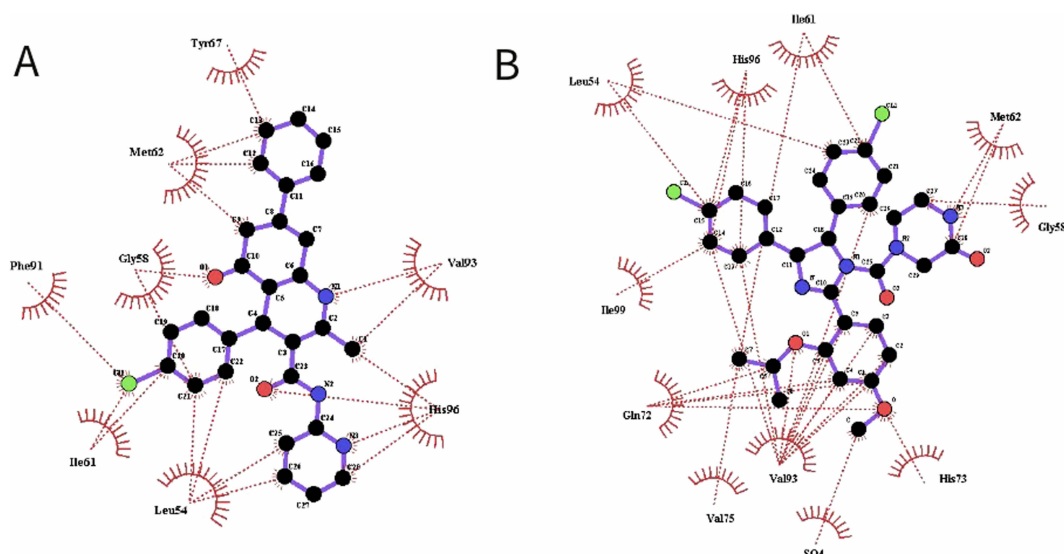


图 6 M12 和 Nutlin-3a 的结构对比

其中黑色圆点表示碳原子, 蓝色圆点表示氮原子, 红色圆点表示氧原子, 绿色圆点表示氯原子. 分子外侧的红色半圆曲线代表 MDM2 上的相互作用残基, 红色虚线表示原子的接触情况.

Fig. 6 Molecular comparison between M12 and nutlin-3a

The black, blue, red and green circle dots indicate C, N, O, Cl atoms. The half circles illustrate the interactions between the compound and residues of MDM2.

参考文献:

- [1] Duffy M J, Synnott N C, McGoWan P M, *et al.* p53 as a target for the treatment of cancer [J]. *Cancer Treat Rev*, 2014, 40: 1153.
- [2] 谢一, 王阳, 肖智雄. 具有激活 RB 蛋白生物活性小肽的研究 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2016, 53: 883.
- [3] Zhao Y J, Aguilar A, Bernard D, *et al.* Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction (MDM2 Inhibitors) in clinical trials for cancer treatment [J]. *J Med Chem*, 2015, 58: 1038.
- [4] Nag S, Zhang X, Srivenugopal, *et al.* Targeting MDM2-p53 interaction for cancer therapy: are we there yet? [J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21: 553.
- [5] Zhang B, Golding B T, Hardcastle I R. Small-molecule MDM2-p53 inhibitors: recent advances [J]. *Future Med Chem*, 2015, 7: 631.
- [6] Shangary S, Wang S. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function; a novel approach for cancer therapy [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2009, 49: 223.
- [7] Van M T, Rihani A, Van G, *et al.* Pharmacologic activation of wild-type p53 by nutlin therapy in childhood cancer [J]. *Cancer Lett*, 2014, 344: 157.
- [8] Liu L, Bernard D, Wang S. Case study: discovery of inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1278: 567.
- [9] Tazawa H, Kagawa S, Fujiwara T. Advances in adenovirus-mediated p53 cancer gene therapy [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2013, 13: 1569.
- [10] Lukin D J, Carvajal L A, Liu W J, *et al.* p53 Promotes cell survival due to the reversibility of its cell-cycle checkpoints [J]. *Mol Cancer Res*, 2015, 13: 16.
- [11] Speidel D. The role of DNA damage responses in p53 biology [J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89: 501.
- [12] Rufini A, Tucci P, Celardo I, *et al.* Senescence and aging: the critical roles of p53 [J]. *Oncogene*, 2013, 32: 5129.
- [13] Liu J, Zhang C, Hu W, *et al.* Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism [J]. *Cancer Lett*, 2015, 56: 197.
- [14] Wade M, Li Y C, Wahl G M. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13: 83.
- [15] Pei D, Zhang Y, Zheng J. Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and Mdmx [J]. *Oncotarget*, 2012, 3: 228.
- [16] Mendoza M, Mandani G, and Momand J. The MDM2 gene family [J]. *Biomol Concepts*, 2014, 5: 9.
- [17] Meng X, Franklin D A, Dong J H, *et al.* MDM2-p53 pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Canc*

- er Res, 2014, 74: 7161.
- [18] Barone G, Tweddle D, Shohet J, *et al.* MDM2-p53 interaction in paediatric solid tumours; preclinical rationale, biomarkers and resistance [J]. *Curr Drug Targets*, 2014, 15: 114.
- [19] Ding Q, Zhang Z M, Liu J J, *et al.* Discovery of RG7388, a potent and selective p53-MDM2 inhibitor in clinical development [J]. *J Med Chem*, 2013, 56: 5979.
- [20] Wang S, Wei S, Zhao Y J, *et al.* SAR405838: an optimized inhibitor of MDM2-p53 interaction that induces complete and durable tumor regression [J]. *Cancer Res*, 2014, 74: 5855.
- [21] Sun D, Li Z H, Rew Y, *et al.* Discovery of AMG 232, a potent, selective, and orally bioavailable MDM2-p53 inhibitor in clinical development [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 1454.
- [22] Shangary S, Wang S. Targeting the MDM2-p53 interaction for cancer therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 5318.
- [23] Koblisch H K, Zhao S, Franks C F, *et al.* Benzodiazepinedione inhibitors of the Hdm2: p53 complex suppress human tumor cell proliferation *in vitro* and sensitize tumors to doxorubicin *in vivo* [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5: 160.
- [24] Lang P T, Brozell S R, Mukherjee S, *et al.* DOCK 6: combining techniques to model RNA-small molecule complexes [J]. *RNA*, 2009, 15: 1219.
- [25] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31: 455.
- [26] Xiao Z X, Chen J, Levine A J, *et al.* Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoproteinMDM2 [J]. *Nature*, 1995, 375: 694.
- [27] Du W, Wu J F, Walsh E M, *et al.* Nutlin-3 affects expression and function of retinoblastoma protein [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 26315.

引用本文格式:

中文: 涂潇, 李雷, 张海波, 等. 一种新的 MDM2-p53 信号通路抑制剂的发现研究 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2019, 56: 369.

英文: Tu X, Li L, Zhang H B, *et al.* Identification of a novel MDM2-p53 interaction inhibitor using virtual screening and docking strategy [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2019, 56: 369.