

# 乙酰胆碱酯酶 AChE 与其抑制剂 1,3,4-噻二唑类 衍生物的结合机理研究

杨雪雨,王 璇,董珂珂,朱小蕾

(南京工业大学化工学院,材料化学工程国家重点实验室,江苏 南京 210009)

[摘要] 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是老年痴呆的一种,在老年人中有较高的发病率,乙酰胆碱酯酶抑制剂(AChEI)是目前广泛应用于临床治疗这类病症的主要药物. 我们选择 3 种 1,3,4-噻二唑抑制剂,分别与 AChE 进行分子对接和分子动力学(MD)模拟研究其结合模式以及相互作用机理. 通过 MM-PBSA 方法分别计算了 3 种抑制剂与酶之间的自由结合能,计算结果与实验中测得的抑制剂的 IC<sub>50</sub> 值相一致. 抑制剂与周围残基之间的氢键作用以及能量分析合理解释了 AChE 与抑制剂之间的结合模式以及相互作用机理.

[关键词] 阿尔茨海默病,乙酰胆碱酯酶,1,3,4 噻二唑类抑制剂,分子模拟,MM-PBSA

[中图分类号] O643.1 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2017)02-0144-05

## Investigation of Binding Mechanism Between 1,3,4-Thiadiazol Inhibitors and AChE by Molecular Dynamic Simulations

Yang Xueyu, Wang Xuan, Dong Keke, Zhu Xiaolei

(State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Chemistry  
and Chemical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** Alzheimer's disease (AD), one form of dementia, is the disease of high incidence among the elderly. The acetylcholinesterase inhibitors (AChEI) are main drugs of treating AD, which are widely used in clinical application. We use molecular docking and molecular dynamics (MD) simulations to investigate the binding mode and interaction mechanism between three 1,3,4-thiadiazol inhibitors and AChE. The binding free energies are calculated based on MM-PBSA method. The ranking of binding free energies is consistent with that of the experimental IC<sub>50</sub> values. The hydrogen-bond interaction between the inhibitor and the residues as well as the energy analysis reasonably explained the binding mode and the interaction mechanism between AChE and the inhibitors.

**Key words:** Alzheimer's disease, AChE, 1,3,4-thiadiazol inhibitors, molecular simulation, MM-PBSA

近年来,阿尔茨海默病(AD)已经成为继心脏病、癌症、中风之后的老年人第四大杀手,严重危害着人类健康. 胆碱能神经传递缺陷是该病的主要病因<sup>[1]</sup>,乙酰胆碱酯酶抑制剂(AChEI)是研究最成功的一类能增强胆碱能功能的药物. AChE 是一种多分子型糖蛋白,是由 537 个氨基酸组成 14 个  $\alpha$  螺旋和 12 个  $\beta$  折叠的蛋白质,属丝氨酸水解酶,人体 AChE 主要分布于神经组织. 生理条件下,定位于突触后膜上的 AChE 的生理功能主要是催化水解乙酰胆碱(ACh)<sup>[2]</sup>,这是通过 AChE 活性中心酯解部位的催化作用实现的. 在体内,乙酰胆碱的乙酸酯能被酶迅速水解,酶在几微秒内便恢复原状和活性. 医学治疗上多采用胆碱酯酶抑制剂(AChEI)抑制 AChE 活性,延缓 ACh 水解的速度,提高突触间隙 ACh 的水平,从而发挥对 AD 的治疗作用.

目前对 AChE 抑制剂的研究主要集中在他克林、多奈哌齐、加兰他敏、石杉碱甲等已有药物及其衍生物<sup>[3-5]</sup>,以及天然产物及其衍生物,但对于新型抑制剂是如何在原子水平上与 AChE 进行相互作用的理论研究<sup>[6-7]</sup>并不多. Skrzypek<sup>[8]</sup>等人设计并合成了一类代谢更为稳定的新型 AChE 抑制剂——1,3,4 噻二唑类抑制剂,为了从原子水平上研究这类抑制剂与 AChE 的相互作用和结合模式,我们将这类抑制剂与

收稿日期:2016-03-28.

基金项目:国家自然科学基金项目(20706029、20876073、91434109).

通讯联系人:朱小蕾,博士,教授,研究方向:分子模拟. E-mail:xlzhu@njtech.edu.cn

AChE 的活性区域进行对接,并通过 MD 模拟以及结合自由能计算来对抑制剂与酶之间的结合机制进行理论研究,进一步理解抑制剂是如何与 AChE 进行结合的。

本文采用分子对接和分子动力学模拟方法研究了 3 种 1,3,4-噻二唑抑制剂与 AChE 酶的结合模式,并采用 MM-PBSA 方法计算了抑制剂与 AChE 的自由结合能,获得了这 3 种药物对酶的不同的活性以及具体的作用模式,从而为进一步设计出新型的效果更好的 AD 药物提供了理论指导。

## 1 计算方法

### 1.1 初始结构构建

AChE 的 X 射线晶体结构是从 PDB 数据库(PDB 代码:1EVE,分辨率为 2.5 Å)<sup>[9]</sup>中提取的,并去除该晶体结构中的配体、结晶水分子和氢原子。3 种 AChE 抑制剂结构均用分子图形软件 Chemdraw 构建,然后使用 Gaussian09 软件对抑制剂结构进行优化,优化后的结构作为分子对接所需配体的初始结构。3 种抑制剂的结构如图 1 所示。

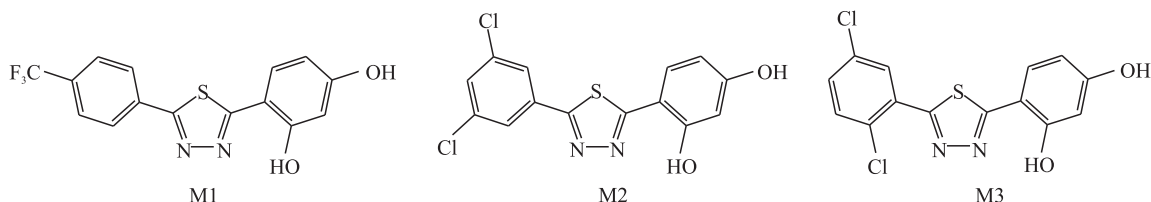


图 1 3 种 1,3,4-噻二唑类抑制剂的分子结构

Fig. 1 Molecular structures of three 1,3,4-thiadiazol inhibitors

### 1.2 分子对接

基于拉马克遗传算法,我们用 Autodock4.0 程序包<sup>[10]</sup>分别对 AChE 与 3 种抑制剂进行分子对接。在对接过程中,将极性氢原子添加到 AChE 中,受体的格点盒子大小设置为 70 Å×70 Å×70 Å。每组对接实验进行 200 次独立计算,然后从对接构象的最大簇(均方根偏差 RMSD 设定为 2.0 Å)选出能量最低的构象,最终得到的复合物模型即可用于之后的 MD 模拟过程。

### 1.3 分子动力学模拟

我们采用 AMBER 10.0 软件分别对 3 个复合物模型进行 MD 模拟,受体和配体的力场分别为 AMBER-FF03 和 GAFF 力场。将 3 个复合物体系分别浸入到 1 个溶剂为 TIP3P 水分子模型<sup>[11]</sup>的盒子中。我们在溶剂盒子中加入了 10 个 Na<sup>+</sup>使得体系电荷处于电中性。在 MD 模拟之前,对每个体系分别进行了能量优化和体系升温过程,最后在 NPT 系统<sup>[12]</sup>(恒温恒压)下对每个体系进行 20 ns 的 MD 模拟。在 MD 模拟过程中,长程静电相互作用采用 PME 方法进行处理,采用 SHAKE 算法对原子键长进行约束。

### 1.4 结合自由能计算

为了更加清楚地了解 AChE 与药物之间的结合机制,我们使用 AMBER10 中的 MM-PBSA 方法<sup>[13-14]</sup>分别对 MD 最后 10 ns 的 200 个构象进行了结合自由能以及自由能分解的计算,结合自由能  $\Delta G_{\text{bind}}$  的计算公式如下:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G(\text{complex}) - [\Delta G(\text{protein}) + \Delta G(\text{ligand})], \quad (1)$$

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta E_{\text{gs}} + \Delta G_{\text{sol}} - T\Delta S, \quad (2)$$

$$\Delta E_{\text{gas}} = \Delta E_{\text{ele}} + \Delta E_{\text{vdW}}, \quad (3)$$

$$\Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{polar}} + \Delta G_{\text{nonpolar}}, \quad (4)$$

$$\Delta G_{\text{nonpolar}} = \gamma(\text{SASA}) + \beta, \quad (5)$$

其中  $\Delta G(\text{complex})$ ,  $\Delta G(\text{protein})$ , 和  $\Delta G(\text{ligand})$  分别代表复合物、蛋白质和配体的自由能;  $T$  表示温度;  $\Delta S$  表示熵变; 气相分子力学能  $\Delta E_{\text{gas}}$  可分解为静电能 ( $\Delta E_{\text{ele}}$ ) 和范德华能 ( $\Delta E_{\text{vdW}}$ ); 溶剂化自由能  $\Delta G_{\text{sol}}$  可分为极性溶剂化自由能 ( $\Delta G_{\text{polar}}$ ) 和非极性溶剂化自由能 ( $\Delta G_{\text{nonpolar}}$ ); 通过溶剂可及性表面积 (SASA) 以及溶剂参数  $\gamma$  和  $\beta$  的数值可以计算出  $\Delta G_{\text{nonpolar}}$ , 其中  $\gamma$  和  $\beta$  分别为 0.005 42 kcal/(mol Å) 和 0.92 kcal/mol; 溶质和溶剂的介电常数分别设为 1 和 80。

2 结果与讨论

在本文中,将 3 种 1,3,4-噻二唑类抑制剂对接到 AChE 中,所有抑制剂都位于由残基 Asp72、Trp84、Tyr121、Trp279、Phe330 和 Tyr334 形成的疏水口袋中,尽管这 3 种抑制剂的几何结构有所不同,但是它们的结合模式大致相同,另外抑制剂 M1 和 M2 与 AChE 形成了氢键,而 M3 并没有形成氢键,这也许与抑制剂在 AChE 中的活性高低有关.

2.1 体系的稳定性

我们分析了 20 ns 的 MD 模拟过程中的结合态 AChE 上的骨架 C $\alpha$  原子的均方根偏差(RMSD),以此来衡量模拟体系的是否稳定. 结果表明这 3 个体系的 RMSD 值在 10ns 之后均趋于稳定,即这 3 种复合物在 MD 模拟过程中的后 10ns 达到平衡状态,我们对稳定后的体系进行了能量分析从而进一步研究抑制剂与 AChE 的结合机制.

2.2 抑制剂与 AChE 的氢键及疏水作用

为了研究抑制剂与周围残基之间的相互作用,我们对抑制剂与 AChE 间形成的氢键及其在 MD 过程中的稳定性进行了分析,结果如表 1 所示,M1 与 AChE 之间形成了 6 个氢键,其中残基 Glu199 和 Gly117 与药物间形成的氢键占有率分别达到了 93.47%和 90.15%;M2 与 AChE 的残基 Ser286 和 Trp279 间形成了两个氢键,占有率分别达到了 44.08%和 30.32%;而 M3 与 AChE 之间并没有形成氢键作用. 另外,我们对这些氢键的稳定性也进行了分析,抑制剂 M1、M2 与 AChE 间形成的氢键在 20 ns 的 MD 模拟过程中都保持相当稳定,这些稳定的氢键也导致了抑制剂 M1 和 M2 与 AChE 之间的较强的静电作用.

表 1 3 种复合物在模拟过程中形成的氢键

Table 1 Hydrogen bonds formed in the three complexes during MD simulations					
体系	供电子对	受电子对	占有率/%	距离/Å	角度/(°)
AChE/M1	:199@ OE2	:M1@ H9-;M1@ O19	93.47	2.764(0.21)	20.62(13.37)
	:M1@ O19	:117@ H-;:117@ N	90.15	3.109(0.17)	37.68(10.55)
	:199@ OE1	:M1@ H9-;M1@ O19	49.26	3.037(0.30)	34.55(15.98)
	:122@ O	:M1@ H8-;M1@ O18	31.52	2.994(0.22)	35.69(13.81)
	:M1@ N9	:122@ HG-;:122@ OG	16.36	3.047(0.17)	44.67(11.57)
	:M1@ O19	:130@ HH-;:130@ OH	11.23	3.099(0.19)	45.67(10.66)
AChE/M2	:M2@ O19	:286@ H-;:286@ N	44.08	3.187(0.18)	34.85(14.26)
	:M2@ O18	:279@ HE1-;:279@ NE1	30.32	3.166(0.18)	39.87(12.55)
AChE/M3	无氢键形成				

另外,我们采用 LIGPLOT 软件分析了抑制剂与 AChE 的疏水相互作用,如图 2 所示,3 种抑制剂与 AChE 的残基均形成了多个稳定的疏水作用,这些疏水作用在一定程度上影响了抑制剂的抑制效果,另外,图中每个复合物中形成的氢键也与之之前对氢键的分析相一致.

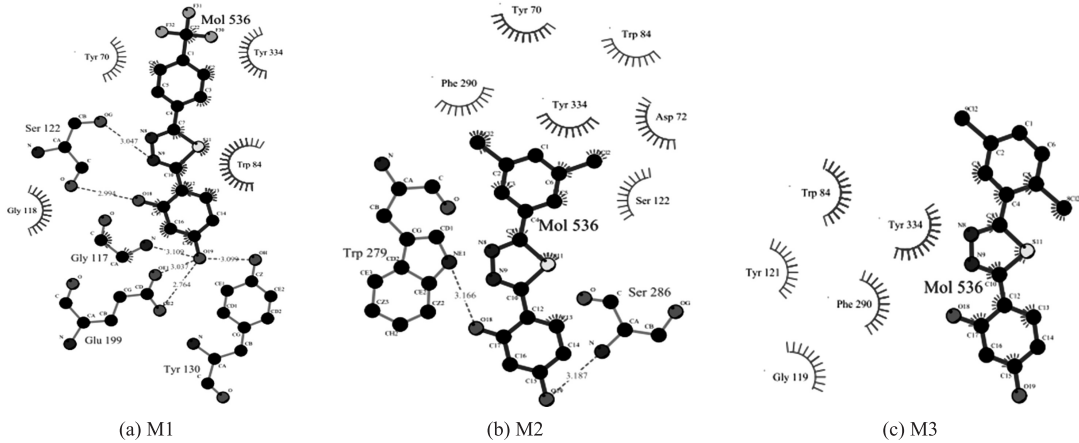


图 2 结合位点的氢键和疏水作用的二维图. 虚线代表氢键,穗状残基代表疏水作用

Fig. 2 2D representation of hydrogen bond and hydrophobic interactions. Dashed lines represent hydrogen bonds, and spiked residues form hydrophobic interactions

2.3 体系地结合自由能及能量分解

为了更加深入地分析抑制剂与 AChE 的结合机制,本文采用 MM-PBSA 方法对复合物的结合自由能进行了计算,结果如表 2 所示,不同成分对结合自由能的贡献也显示在该表中. 从表中可以看出 M1-M3 对于 AChE 的结合自由能分别为-26.79 kcal/mol、-24.16 kcal/mol、-22.79 kcal/mol,表明 AChE 与 M1 的结合能力最强,药物活性排序 M1>M2>M3,而且计算结果与实验上得到的抑制常数 IC50 值排列一致.

表 2 通过 MM-PBSA 方法计算得到的 3 种复合物的结合自由能(kcal/mol)

复合物/能量项	$\Delta E_{ele}$	$\Delta E_{vdW}$	$\Delta E_{gas}$	$\Delta G_{pol}$	$\Delta G_{nonpolar}$	$\Delta G_{sol}$	$\Delta G_{bind}$	IC50 <sup>a</sup> /( $\mu$ mol/L)
AChE/M1	-26.90	-39.00	-65.89	44.40	-5.30	39.10	-26.79	0.09
AChE/M2	-8.87	-35.63	-44.49	25.72	-5.39	20.33	-24.16	45.26
AChE/M3	-4.47	-34.15	-38.62	20.80	-4.96	15.83	-22.79	112.01

通过比较表 2 中的 4 个单独的能量项( $\Delta E_{ele}$ 、 $\Delta E_{vdW}$ 、 $\Delta G_{pol}$ 、 $\Delta G_{nonpolar}$ )的贡献,我们发现范德华作用( $\Delta E_{vdW}$ )对结合起主导作用,非极性项( $\Delta G_{nonpolar}$ )也有较小的贡献利于抑制剂与 AChE 的结合. 另外,气相静电能( $\Delta E_{ele}$ )对结合有利,而极性去溶剂化自由能( $\Delta G_{pol}$ )对结合不利,总体来说,净静电贡献( $\Delta E_{ele}$  +  $\Delta G_{pol}$ )反而不利于两者的结合.

为了进一步了解每个残基对结合自由能的贡献,本文同样采用 MM-PBSA 方法进行了基于残基的自由能分解. 3 种复合物的能量光谱如图 4 所示,这个结果有助于我们找到每个复合物中提供贡献较大的氨基酸残基. 如图 3 所示,对 M1 与 AChE 结合贡献较大的残基主要有 W84、Y116、G117、G118 和 Y121;对 M2 与 AChE 结合贡献较大的残基主要有 Y70、D72、W279、S286、F290 和 Y334;对 M3 与 AChE 结合贡献较大的残基主要有 W84、Y121、F330、F331 和 Y334. 从残基的能量上来看,M1 与残基 W84 的结合能最低,达到了-3.38 kJ/mol;M2、M3 与残基 W334 间的结合能最低,分别为 3.02 kJ/mol 和 2.62 kJ/mol. 这一最低的结合能也在一定程度上影响了抑制剂与 AChE 结合的强弱.

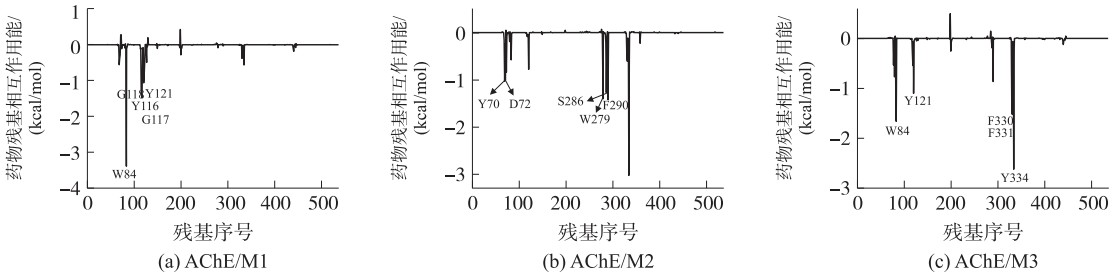


图 3 AChE/抑制剂复合物中抑制剂-残基之间的相互作用谱图

Fig. 3 Interaction spectra of inhibitor-residue pair in the protein-inhibitor complexes

前面我们已经通过表 2 得知范德华作用对复合物的结合起主导作用,抑制剂 M1、M2、M3 与 AChE 间的范德华作用能分别为-39.00 kcal/mol、-35.63 kcal/mol 和-34.15 kcal/mol,这也就主导性的决定了 3 种药物的生物活性为 M1>M2>M3. 随后,我们对范德华作用能进行了残基自由能分解,结果如图 4 所示,同样,3 种抑制剂与 AChE 的范德华作用最大的残基为 W84 和 W334,这也同图 3 的结果相对应. 综合分子对接结果以及图 3 和图 4,所选抑制剂与 AChE 相结合的关键残基为 Asp72、Trp84、Tyr121、Trp279、Phe330 和 Tyr334,这几个残基也就是 AChE 中的活性位点,对药物与 AChE 的结合起重要作用.

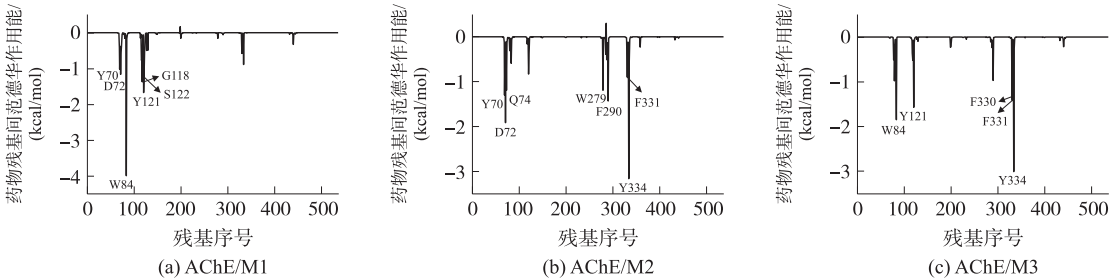


图 4 AChE/抑制剂复合物中抑制剂-残基的范德华作用谱图

Fig. 4 Van der Waals interaction energy spectra of inhibitor-residue pair in AChE/inhibitor complexes

### 3 结论

本文通过分子对接、分子动力学模拟、氢键和疏水作用分析、结合自由能计算和能量分解探究了3种1,3,4-噻二唑类抑制剂与AChE之间的作用模式以及结合机理. 结果表明复合物中稳定的氢键可以使抑制剂与AChE之间产生较强的静电作用. 结合能的计算结果与抑制剂的实验生物活性吻合较好,证实了抑制剂的生物活性顺序为M1>M2>M3. 另外,形成复合物的主要驱动力是范德华相互作用. 通过能量分解找出了对抑制剂与AChE结合贡献较大的残基,这些关键残基(Asp72、Trp84、Tyr121、Trp279、Phe330和Tyr334)组成了AChE的活性口袋区域,可以通过这些关键残基与抑制剂间的能量来区分抑制剂的生物活性高低. 本文的工作对新型抗AD的抑制剂类药物的研发有一定的理论指导意义.

### [参考文献]

- [1] THAL D R, VON ARNIM C, GRIFFIN W S T, et al. Pathology of clinical and preclinical Alzheimer's disease[J]. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 2013, 263(2): 137–145.
- [2] TALESA V N. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease[J]. *Mechanisms of ageing and development*, 2001, 122: 1 961–1 969.
- [3] XIE S S, WANG X B, JIANG N, et al. Multi-target tacrine-coumarin hybrids: cholinesterase and monoamine oxidase B inhibition properties against Alzheimer's disease[J]. *European journal of medicinal chemistry*, 2015, 95: 153–165.
- [4] LIU H R, LIU X J, FAN H Q, et al. Design, synthesis and pharmacological evaluation of chalcone derivatives as acetylcholinesterase inhibitors[J]. *Bioorganic and medicinal chemistry*, 2014, 22(21): 6 124–6 133.
- [5] EL-MALAH A, GEDAWY E M, KASSAB A E, et al. Novel tacrine analogs as potential cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease[J]. *Archiv der pharmazie*, 2014, 347(2): 96–103.
- [6] ZHU X L, YU N X, HAO G F, et al. Structural basis of femtomolar inhibitors for acetylcholinesterase subtype selectivity: insights from computational simulations[J]. *Journal of molecular graphics and modelling*, 2013, 41: 55–60.
- [7] ARAUJO J Q, DE BRITO M A, HOELZ L V, et al. Receptor-dependent(RD)3D-QSAR approach of a series of benzylpiperidine inhibitors of human acetylcholinesterase (HuAChE)[J]. *European journal of medicinal chemistry*, 2011, 46(1): 39–51.
- [8] SKRZYPEK A, MATYSIAK J, NIEWIADOMY A, et al. Synthesis and biological evaluation of 1,3,4-thiadiazole analogues as novel AChE and BuChE inhibitors[J]. *European journal of medicinal chemistry*, 2013, 62: 311–319.
- [9] KRYGER G, SILMAN I, SUSSMAN J L. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs[J]. *Structure with folding and design*, 1999, 7(3): 297–307.
- [10] MORRIS G M, GOODSELL D S, HALLIDAY R S, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function[J]. *Journal of computational chemistry*, 1998, 19(14): 1 639–1 662.
- [11] JORGENSEN W L, CHANDRASEKHAR J, MADURA J D. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water[J]. *The journal of chemical physics*, 1983, 79(2): 926–935.
- [12] ANDERSEN H C. Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature[J]. *The journal of chemical physics*, 1980, 72(4): 2 384–2 393.
- [13] KOTHANDAN G, CHO S J. Prediction of binding free energy calculation using molecular mechanics/Poisson-Boltzmann surface area(MM-PBSA) method in drug discovery: a short review[J]. *Journal of the chosun natural science*, 2012, 5(4): 216–219.
- [14] KUMARI R, KUMAR R, LYNN A, et al. g\_mmpbsa—a GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations[J]. *Journal of chemical information and modeling*, 2014, 54(7): 1 951–1 962.

[责任编辑:顾晓天]