

# 分子模拟研究多奈哌齐及其衍生物对 AChE/BChE 的抑制活性和选择性

杨雪雨, 赵腾腾, 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] 乙酰胆碱酯酶(AChE)和丁酰胆碱酯酶(BChE)是具有高度同源的蛋白质,其在胆碱能神经系统中发挥着重要的作用.在本文中,我们选取了已投入临床使用的药物多奈哌齐及其吡啶衍生物对 AChE/BChE 的抑制活性和选择性进行了研究.我们采用 MM-PBSA 方法对两种抑制剂与 AChE/BChE 间的相互作用能进行了计算,结果表明范德华相互作用在总的结合能中贡献最大,且多奈哌齐的吡啶衍生物表现出比多奈哌齐更高的抑制活性以及选择性,所得计算结果与实验上抑制剂的抑制常数有较好的吻合.

[关键词] 胆碱酯酶,多奈哌齐,分子动力学模拟,MM-PBSA 方法,选择性

[中图分类号]O643.1 [文献标志码]A [文章编号]1001-4616(2017)03-0123-05

## Studies on the Bioactivity and Selectivity of Pyridonepezils to AChE/BChE by Molecular Modeling

Yang Xueyu, Zhao Tengting, 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:** Acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) are highly homologous proteins and play important roles in the cholinergic nervous system. In current work, we investigate the bioactivity and selectivity of the pyridonepezils to AChE/BChE. The binding interactions between the two inhibitors and AChE/BChE are examined based on the MM-PBSA method. The results demonstrate that the van der Waals interactions have the largest contributions to the binding free energy, and the pyridonepezil exhibits higher bioactivity and selectivity to AChE/BChE compared to donepezil. The rank of calculated binding free energies is in good agreement with experimental inhibiting constants of the two inhibitors.

**Key words:** cholinesterase, donepezil, molecular dynamics simulation, MM-PBSA method, selectivity

据估计,全世界患有老年痴呆的人数在每 20 年间几乎会翻一番<sup>[1]</sup>,且近 70% 的老年痴呆症患者会发展成为阿尔茨海默病(AD)<sup>[2]</sup>. AD 是老年人最常见的疾病之一,主要表现在认知功能障碍<sup>[3]</sup>和记忆丧失<sup>[4]</sup>.在病理学上,阿尔茨海默病是一种复杂的进行性脑神经组织退化的疾病,主要病因是基底前脑胆碱能神经递质不足,包括乙酰胆碱(ACh)和丁酰胆碱(BCh)的不足,ACh 和 BCh 分别在乙酰胆碱酯酶(AChE)和丁酰胆碱酯酶(BChE)的催化作用下发生快速分解.因此,对 AChE 和 BChE 这两种酶的活性进行抑制是治疗阿尔茨海默病的一个非常有效的方法<sup>[5]</sup>.

近年来,一些胆碱酯酶抑制剂已经在临床上应用于轻微 AD 的治疗.其中,AD 药物多奈哌齐已于 1997 年通过了美国食品药品监督管理局(FDA)的批准上市,这类药物见效快,作用时间较长,且药物副作用也比较小<sup>[6-7]</sup>,全球销售额位居 AD 药物榜首. Samadi 等人<sup>[8]</sup>在实验上对多奈哌齐及其吡啶类衍生物进行了胆碱酯酶抑制能力的研究,结果发现了一种抑制活性和选择性均高于多奈哌齐的抑制剂.而这种抑制剂与多奈哌齐对 AChE/BChE 的抑制活性和选择性的理论研究尚未见文献报道.

本文中,我们采用分子对接、分子动力学模拟(MD)以及自由结合能计算等计算方法对两种抑制剂与

收稿日期:2016-06-24.

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:分子模拟的研究工作. E-mail: xlzhu@njtech.edu.cn

AChE/BChE 酶蛋白的结合机理、抑制活性和选择性进行了研究,并将计算结果与实验中的结果进行了对比. 本文的研究为今后设计具有更高抑制效果的 AD 药物提供了一定的理论指导.

## 1 计算方法

### 1.1 初始结构构建

AChE 和 BChE 的初始晶体结构是从 PDB 数据库(AChE:代码 1EVE,分辨率为  $2.5 \text{ \AA}$ <sup>[9]</sup>;BChE:代码 1POI,分辨率为  $2.0 \text{ \AA}$ <sup>[10]</sup>)中提取的,这两个蛋白质分别只含有一条链. 在对蛋白质进行处理时,删除 PDB 文件中所有的结晶水、氢原子和配体分子. 本文中,通过 3D 图形软件构建了两种抑制剂的结构,然后使用 Gaussian09 软件在 B3LYP/6-31G\* 水平上对抑制剂进行了结构优化. 两种抑制剂的结构如图 1 所示.

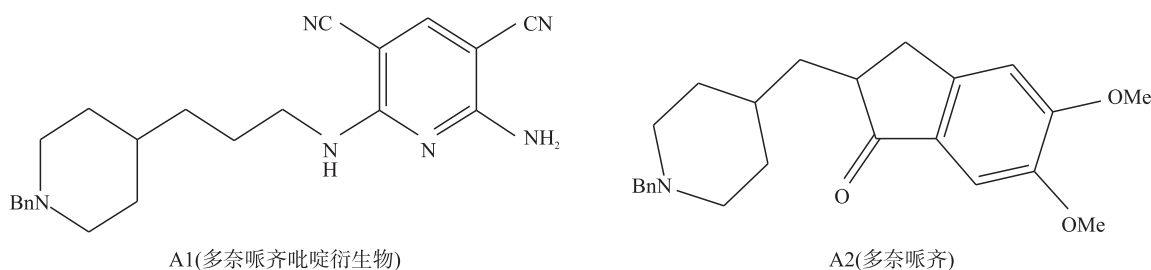


图 1 2 种抑制剂的分子结构

Fig. 1 Molecular structures of two inhibitors

### 1.2 分子对接

我们采用 Autodock4.0 程序的拉马克遗传算法<sup>[11]</sup>分别将两种抑制剂对接到 AChE 和 BChE 上. 根据前人的研究工作,我们确定了蛋白质的结合位点,通过 Autogrid 确定了格点盒子大小以使受体的活性位点能够包含在盒子里. 本文中,4 个复合物所在盒子大小设为  $70 \text{ \AA} \times 70 \text{ \AA} \times 70 \text{ \AA}$ . 我们对每个配体都进行了 200 次独立对接. 最终选取平均结合能最低和构象数量最高的结构作为最优的对接构象,也就是后面 MD 模拟所用到的构象.

### 1.3 分子动力学模拟

我们使用 AMBER10.0 软件<sup>[12]</sup>分别对每个体系进行了分子动力学模拟. 蛋白质和抑制剂分别采用 AMBERff03 力场和 AMBER GAFF 力场,并将复合物体系浸入到 1 个水分子类型为 TIP3P 的被截断的八面体溶剂水盒子中. 为了使整个系统呈电中性,我们分别在 AChE 和 BChE 系统中加入了 10 个  $\text{Na}^+$  和 5 个  $\text{Cl}^-$ . 随后,对每个体系进行优化,并将各个体系从 0 K 升温到 300 K. 最终在 NPT 系综<sup>[13]</sup>(恒温恒压)下对每个体系进行 30 ns 的 MD 模拟.

### 1.4 结合自由能计算

我们采用 AMBER10.0 的 MM-PBSA 方法<sup>[14]</sup>对抑制剂与蛋白质形成的复合物的结合自由能进行了计算,这种方法一般用于计算 MD 中的相互作用能,且每个能量项均是 MD 轨迹的平均能量. 我们从 MD 模拟的最后 5 ns 的轨迹中收集了 200 个构象进行了 MM-PBSA 的计算. 计算方法如下<sup>[15]</sup>:

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

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

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

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

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

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;气相分子力学能  $\Delta E_{\text{gas}}$  包括静电能( $\Delta E_{\text{ele}}$ )和范德华能( $\Delta E_{\text{vdW}}$ );溶剂化自由能  $\Delta G_{\text{sol}}$  包括极性溶剂化自由能( $\Delta G_{\text{polar}}$ )和非极性溶剂化自由能( $\Delta G_{\text{nonpolar}}$ ).

## 2 结果与讨论

在进行 MD 模拟之前,我们对游离的 AChE 和 BChE 的晶体结构进行了对比,两个蛋白质的整体结构

非常相似,其主链原子在整体上也是非常叠合的. 因此,我们认为所选抑制剂在 AChE 和 BChE 中的结合模式也是很相似的,这一猜想也在后面的研究中得到了验证.

## 2.1 AChE/BChE 序列比对

我们采用 Culstal Omega 程序<sup>[16]</sup>对 AChE 和 BChE 的残基序列进行了比对,这两种蛋白质的序列同源性高达 55%,结果如图 2 所示,下方有星号标记的残基表示两种蛋白质在结构上的一致性,下方的缺口表示不同的残基,灰色阴影部分表示已报道的文献中组成蛋白质活性口袋的残基. 由图 2 可知,AChE 与抑制剂的结合口袋主要由残基 Asp72, Trp84, Gly118, Gly119, Tyr121, Glu199, Trp279, Leu282, Ser286, Ile287, Phe288, Arg289, Phe290, Phe330, Phe331, Tyr334, Trp432 和 His440 构成, BChE 与抑制剂的结合口袋主要由残基 Asp70, Trp82, Gly116, Gly117, Gln119, Glu197, Ser198, Ala199, Val280, Thr284, Pro285, Leu286, Ser287, Asn289, Ala328, Phe329, Tyr332, Trp430, His438, and Tyr440 构成. 我们通过图 2 中两种蛋白质的序列比对可知, AChE 结合口袋的主要残基与 BChE 的主要残基有较好的吻合,且这些残基在抑制剂与蛋白质的结合中起着相似的作用.

```

AChE 2  DHSSELLVNTKSGKVMGTRVPLVSSHISAFGLIPFAEPPVGNMRFRRPEPKPWSGVWNAS  AChE
BChE 4  ----IIITKNGKVRGMQLTVFGGTVTAFLGIPYAQPPLGRLRFKKPQSLTKWSDIWNAT  BChE
      :: **.*.* * : : * : . : :*****:*:*:* : : : : . : ** :***:
AChE 62  TYPNCCQYVDEQFPGFSGSEMWNPNREMSDECLYLNIVWSPRPKSTTVMVWYGGGFY  AChE
BChE 60  KYANSCCNIDQSFPGFHGSEMWNPNLSEDECLYLNWIPAPKPKNATVLIWIYGGGFQ  BChE
      . * * * * : * : .*** **.*.*.* : :*****:*:*:* : : : : : : : : :
AChE 122  SGSTLDVYNGKYLAYTEEVVLVSLSYRVGAFGLALHGSQEAPGNVGLLDQRMALQVWH  AChE
BChE 120  TGTSSLHVDGKFLARVERVIVVMNYRVGALGFLALPGNPEAPGNMGLFDQQLALQWVQ  BChE
      : * : * : * : * : * : * : * : . * : * : * : * : * : * : * : * :
AChE 182  DNIQFFGGDPKVTITFGESAGGASVGMHILSPGSRDLFRRAILQSGSPNCPWASVSVAEG  AChE
BChE 180  KNIAAFGGNPKSVTLFGESA GAASVSLHLLSPGSHSLFTRAILQSGSFNAPWAVTSLYEA  BChE
      . ** **.*:*:*:*:*:*.*.*. : :*****: . ** ***** * . * . * :
AChE 242  RRRAVELGRNLNCLNLSDEELIHLCKREKKPQELIDVEWNLVLPDFSIFRFSFVPVIDGEFF  AChE
BChE 240  RNRTLNLAKLTGCSRENETEIIKCLRKNKDPQEILLNEAFVVPYGTPLSVNFGPTVDGDFL  BChE
      * . : : * : . * : . : * : * : * : * : * : * : * : * : . : * : * : * :
AChE 302  PTSLESMLNSGNFKKTQILGVNKDEGSFFLLYGAPGFSKDESKISREDFMSGVKLSVP  AChE
BChE 300  TDMPDILLELGQFKKTQILGVNKDEGTAFLVYGAPGFSKDNNSIITRKEFQGLKIFFP  BChE
      : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
AChE 362  HANDLGLDAVTLQYTDWMDNNGIKNRDGLDDIVGDHNVICPLMHFVNKYTKFGNGTYLY  AChE
BChE 360  GVSEFGKESILFHYTDWVQRPEN--YREALGDVVDYFNICPALEFTKKFSEWGNNAFFY  BChE
      . . : * : : : * : * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
AChE 422  FFNHRASNLVPEWMGVIIHGYEIEFVFGPLPLVKELNYTAEELSRIMHYWATFAKTGN  AChE
BChE 420  YFEHRSSKLPPEWMGMVHGYEIEFVFGPLPLER-RDYTKAEIILSRISIVKRWANFAKYGN  BChE
      : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
AChE 482  PNEPHSQESKWPLFTTKEQKFIDLNTEPMKVHQRRLRVQMCVFWNQFLPKLLNAT  AChE
BChE 480  PQETQNQSTSWPVFKSTEQKYLTLNTESTRIMTKLRAQQRFWTSFFPKV----  BChE
      * : * : . * : . * : * : . * : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

图 2 AChE 和 BChE 的序列比对

Fig. 2 Sequence alignment of AChE and BChE

## 2.2 体系的稳定性

为了确保这 4 个复合物的动力学稳定性以及后面分析的合理性,我们对所有体系相对于它们初始结构的 C $\alpha$  原子的均方根偏差(RMSDs)进行了计算,结果如图 3 所示. 所有体系的 RMSDs 值在 10 ns 后均达到了稳定的状态,它们的 RMSDs 值最终均稳定在  $2.0 \pm 0.2$  Å 附近上下波动,表明所有体系均处于平衡,动力学分析也是合理的. 基于轨迹的 RMSDs 值,我们选取模拟的最后 5 ns 的轨迹进行后面的能量分析.

## 2.3 药物的抑制活性及选择性

我们利用 AMBER10.0 中的 MM-PBSA 方法对 4 个

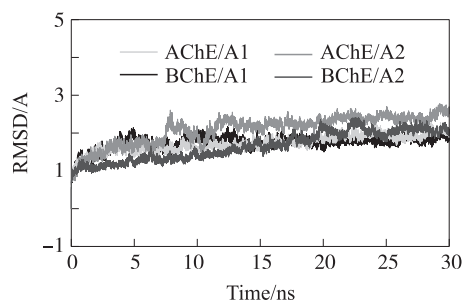


图 3 4 种复合物骨架原子的 RMSD 值随时间的变化

Fig. 3 RMSDs values of the backbone atoms as a function of time for the four complexes

复合物的自由结合能进行了计算,抑制剂与 AChE 和 BChE 的各项相互作用能的计算结果如表 1 所示. AChE/A1 和 AChE/A2 的自由结合能分别为-45.28 kcal/mol 和-36.28 kcal/mol,表明在 AChE 中,抑制剂 A1 的抑制活性要比 A2 高,这与实验中的抑制常数( IC50 )是一致的. 对于 BChE/A1 和 BChE/A2,它们的自由结合能分别为-28.35 kcal/mol 和-30.83 kcal/mol,两者差值较小,与实验中的 IC50 值也是一致的.

表 1 通过 MM-PBSA 方法计算得到的 4 种复合物的结合自由能(kcal/mol)

| 复合物/能量  | $\Delta E_{ele}$ | $\Delta E_{vdW}$ | $\Delta E_{gas}$ | $\Delta G_{polar}$ | $\Delta G_{nonpolar}$ | $\Delta G_{sol}$ | $\Delta G_{bind}$ | IC50( $\mu\text{mol/L}$ ) |
|---------|------------------|------------------|------------------|--------------------|-----------------------|------------------|-------------------|---------------------------|
| AChE/A1 | -27.96           | -63.19           | -91.15           | 53.02              | -7.16                 | 45.86            | -45.28            | 0.0094                    |
| BChE/A1 | -10.83           | -48.38           | -59.21           | 37.49              | -6.63                 | 30.86            | -28.35            | 6.6                       |
| AChE/A2 | -18.41           | -52.08           | -70.48           | 41.14              | -6.94                 | 34.20            | -36.28            | 0.01                      |
| BChE/A2 | -2.56            | -46.64           | -49.20           | 25.11              | -6.74                 | 18.37            | -30.83            | 2.5                       |

为了研究药物的选择性机理,我们通过比较 AChE/A1 和 BChE/A1 以及 AChE/A2 和 BChE/A2 的自由结合能的值,发现两种抑制剂在 AChE 中均表现出较高的活性,说明这两种抑制剂能够选择性抑制 AChE,在胆碱酯酶中具有选择性. 在实验研究中,抑制剂 A1 和 A2 的选择指数分别为 703 和 250<sup>[8]</sup>. 因此,抑制剂 A1 对于 AChE/BChE 具有更高的选择性.

此外,通过比较表 1 中的 4 个单独的能量项(  $\Delta E_{ele}$ 、 $\Delta E_{vdW}$ 、 $\Delta G_{polar}$ 、 $\Delta G_{nonpolar}$  )的贡献,不难发现范德华作用(  $\Delta E_{vdW}$  )对结合起主导作用. 抑制剂 A1 与 AChE 和 BChE 的范德华作用能分别为-63.19 kcal/mol 和-48.38 kcal/mol, A2 与 AChE 和 BChE 的范德华作用能分别为-52.08 kcal/mol 和-46.64 kcal/mol,这也就主导性地决定两种抑制剂均能够选择性抑制 AChE.

MM-PBSA 方法不仅能够计算复合物的结合能,还能对每一个残基与抑制剂之间的的结合能进行计算. AChE 和 BChE 复合物的每个残基与抑制剂间的结合能计算结果如图 4 所示,图中标记残基为对自由结合能的贡献值大于 1 kcal/mol 的残基. 从图 4 可以看出,对 AChE/A1 结合贡献比较大的残基数量要比 AChE/A2 的多,即 A1 对于 AChE 表现出更高的抑制活性. 另外, A1 和 A2 在 AChE 复合物中的结合能贡献值普遍比在 BChE 复合物中的贡献要大,表明 A1 和 A2 与 AChE 的结合更强,进一步揭示了两种抑制剂所具有的选择性.

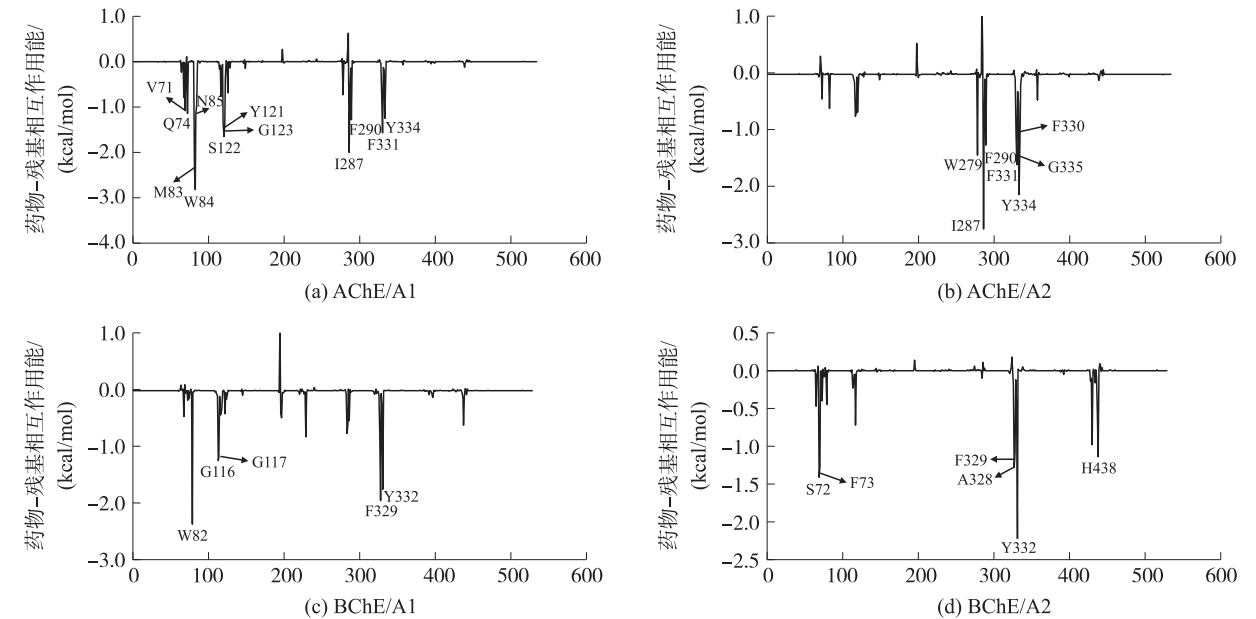


图 4 复合物中抑制剂-残基之间的相互作用谱图

Fig. 4 Interaction spectra of inhibitor-residue pair in the protein-inhibitor complexes

3 结论

本文通过分子动力学模拟揭示了两种抑制剂与胆碱酯酶 AChE/BChE 间的结合机理. 两个体系的结

合自由能计算以及能量分解的结果表明,抑制剂 A1 在 AChE 中表现出较 A2 更高的抑制活性,而 A2 在 BChE 中表现出比 A1 稍高的活性,结合能的计算结果与抑制剂的实验抑制活性吻合较好。此外,结合能计算结果表明,范德华作用能决定了两种抑制剂均能够选择性抑制 AChE。同样,两个 AChE 复合物的药物-残基间的相互作用要比相对应的 BChE 复合物的更强,这进一步说明了抑制剂能够选择性抑制 AChE。本文的工作为今后设计具有更高的抑制活性和选择性的阿尔茨海默病药物提供了重要的理论依据和指导。

### [参考文献]

- [1] FERRI C P, PRINCE M, BRAYNE C, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study[J]. *Lancet*, 2005, 366(9503): 2112–2117.
- [2] REITZ C, MAYEUX R. Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers[J]. *Biochem pharmacol*, 2014, 88(4): 640–651.
- [3] MUSSELE S V, BASTARD N L, VERMEIREN Y, et al. Behavioral symptoms in mild cognitive impairment as compared with Alzheimer's disease and healthy older adults[J]. *Int J Geriatr Psych*, 2013, 28(3): 265–275.
- [4] SPERLING R A, DICKERSON B C, PIHLAJAMAKI M, et al. Functional alterations in memory networks in early Alzheimer's disease[J]. *Neuromol Med*, 2010, 12(1): 27–43.
- [5] LAZZARO V D, OLIVIERO A, PILATO F, et al. Neurophysiological predictors of long term response to AChE inhibitors in AD patients[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2005, 76(8): 1064–1069.
- [6] MOLINUEVO J L, BERTHIER M L, RAMI L. Donepezil provides greater benefits in mild compared to moderate Alzheimer's disease: implications for early diagnosis and treatment[J]. *Arch gerontol geriatr*, 2011, 52(1): 18–22.
- [7] TSUNO N. Donepezil in the treatment of patients with Alzheimer's disease[J]. *Expert Rev Neurother*, 2009, 9(5): 591–598.
- [8] SAMADI A, ESTRADA M, PEREZ C, et al. Pyridonepezils, new dual AChE inhibitors as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease: synthesis, biological assessment, and molecular modeling[J]. *Eur J Med Chem*, 2012, 57: 296–301.
- [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] NICOLET Y, LOCKRIDGE O, MASSON P, et al. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(42): 41141–41147.
- [11] 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]. *J Comput Chem*, 1998, 19(14): 1639–1662.
- [12] CASE D A, CHEATHAM T A, SIMMERLING C L, et al. AMBER10[M]. San Francisco: University of California, 2008.
- [13] ANDERSEN H C. Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature[J]. *J Chem Phys*, 1980, 72(4): 2384–2393.
- [14] 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]. *J Chosun Natural Sci*, 2012, 5(4): 216–219.
- [15] SAIZ U L, CABRERA M A, FROEYEN M. Exploring the conformational changes of the ATP binding site of gyrase B from *Escherichia coli* complexed with different established inhibitors by using molecular dynamics simulation: protein-ligand interactions in the light of the alanine scanning and free energy decomposition methods[J]. *J Mol Graph Model*, 2011, 29(5): 726–739.
- [16] PAIS F S, RUY P D C, OLIVEIRA G, et al. Assessing the efficiency of multiple sequence alignment programs[J]. *Algorithm Mol Biol*, 2014, 9(4): 1–8.

[责任编辑:顾晓天]