



6-羟基石松碱与乙酰胆碱酯酶的相互作用

王艳丽^①, 李医明^{②*}, 何颖^①, 谭昌恒^③, 朱大元^③, 杜为红^{①*}

① 中国人民大学化学系, 北京 100872

② 上海中医药大学中药学院, 上海 201203

③ 新药研究国家重点实验室; 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203

*通讯作者, E-mail: whdu@chem.ruc.edu.cn; ymlius@163.com

收稿日期: 2010-04-14; 接受日期: 2010-05-04

摘要 目前治疗阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)的主要药物为乙酰胆碱酯酶抑制剂(AChEI). 为探讨石松碱类化合物对 AChE 的抑制作用, 以 6-羟基石松碱(6-hydroxylycopodine, HLD)为对象, 应用核磁共振、分子对接、酶活性测定、分子动力学模拟及自由能分析, 研究了 HLD 与 AChE 的相互作用. 研究发现 6-羟基石松碱对乙酰胆碱酯酶具有混合型抑制作用, 其结合作用主要来自氢键和范德华作用.

关键词

6-羟基石松碱
乙酰胆碱酯酶
相互作用

1 引言

阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)是一种严重危害人类健康的神经退行性疾病^[1]. 目前研究认为 AD 可能与 β -淀粉样蛋白(A β)沉积、 τ 蛋白聚集、脑内异常氧化压、低浓度乙酰胆碱等因素有关^[2-4], 其中最为广泛接受的是“胆碱能假说”^[5, 6], 因而提高脑内乙酰胆碱(ACh)的含量是治疗 AD 的一个重要途径. 乙酰胆碱酯酶(AChE)在调控胆碱能系统中发挥关键作用, 因此乙酰胆碱酯酶抑制剂(AChEI)被认为是治疗 AD 最具疗效的策略之一. 值得注意的是, 外周胆碱酯酶的抑制会带来较多的副作用, 如肝硬化患者血清中胆碱酯酶水平较低^[7], 患者由于年龄较大亦为 AD 的高发人群, 因而寻找高效的只作用于脑内乙酰胆碱酯酶抑制剂显得尤为重要.

石松生物碱是从石松属植物分离得到的一类具有相似结构和官能团的化合物^[8], 其中许多化合物能够抑制乙酰胆碱酯酶活性, 从千层塔(*Huperzia Serrata*)中提取出的石杉碱甲(huperzine A, HupA, 图 1(a))被证明是高效、低毒、高选择性的 AChEI^[9], 目前也已研制成临床药物用于 AD 治疗. 然而, HupA 的

化学合成未取得突破性进展, 主要来源仍为生物提取. 基于此, 对石松生物碱类化合物的研究一直备受人们关注, 以期开发出高效便捷合成的 AChEI. 石松碱(lycopodine, 图 1(b))作为第一个分离出的石松生物碱, 自发现以来就引起人们广泛的兴趣, 其合成路线已较为成熟. 本文选取石松碱衍生物—6-羟基石松碱(6-hydroxylycopodine, HLD, 图 1(c))作为对象, 结合多种实验方法, 研究了 HLD 对 AChE 的抑制作用, 给出两者结合过程的详细信息, 为开发新的 AChEI 提供了一种较为全面的实验方法和思路.

2 实验部分

2.1 实验材料

HupA、HLD 由中国科学院上海药物研究所提供, AChE 购自美国 Sigma 公司, D₂O(99.9%) 购自德国 CIL 公司, 其他试剂均为分析纯.

2.2 核磁实验

所有 NMR 实验均在 Bruker Avance 400MHz 核

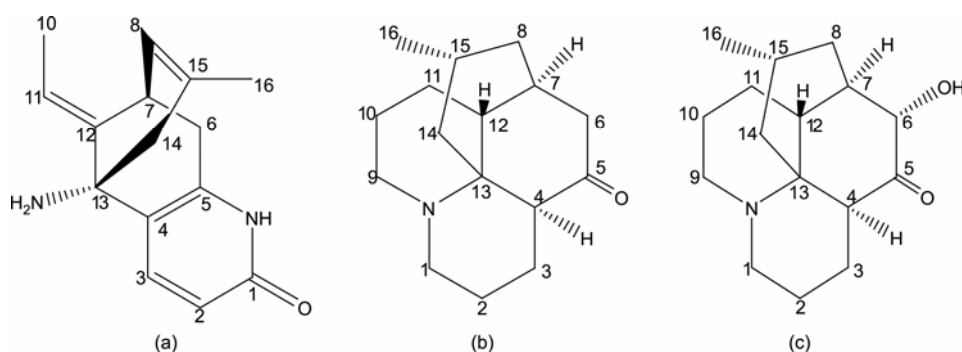


图1 化合物结构

磁共振仪上进行. 用于核磁实验的溶液配制在 pH 7.0 的 50 mmol L⁻¹ 重水磷酸盐缓冲液中, 采样温度为 298 K. ¹H NMR 实验中 HLD 浓度为 1 mmol L⁻¹, 取出一份作为空白对照, 另一份加入 AChE, 小分子与酶浓度比为 200:1, 测定溶液中小分子的非选择性自旋-晶格弛豫速率 R^{ns} 与选择性自旋-晶格弛豫速率 R^{sc} [10-12]. R^{ns} 与 R^{sc} 测定实验参数均采用 $(180^\circ - \tau - 90^\circ - t)_n$ 反转恢复脉冲, τ 值取 1×10^{-5} , 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1, 1.2, 1.5, 2, 3, 5.0 s, 脉冲恢复时间 5 s. 180° 选择性脉冲采用 Gauss180 i.1000 软脉冲, 脉冲时间 20 ms, 脉冲功率为 50 dB, 激发宽度大约 45 Hz.

二维 ¹H-¹H TR-NOESY[13] 实验混合时间 t_m 设为 200 ms, 采用预饱和方法压制水峰. 为观测到 TR-NOE 信号, 溶液中 HLD 最终浓度为 1.5 mmol L⁻¹, 蛋白最终浓度为 0.05 mmol L⁻¹, 两者比例达到 30:1. 分别测定 HLD 小分子在自由态及加入酶后混合体系的谱图, 两实验参数相同.

2.3 Ellman 比色法测定酶活性

按照 Ellman 方法[14], 以碘化硫代乙酰胆碱 (ATCh) 为底物, 在 412 nm 处比色, 以酶促反应的初速度来确定酶活性.

在 pH 7.2 的 0.067 mmol L⁻¹ 磷酸盐缓冲液条件下, 20 μ L 5.0 mmol L⁻¹ 的 AChE 与 30 μ L HLD 在 298 K 水浴中反应 25 min, 然后依次加入 25 μ L ATCh, 175 μ L 0.3 mmol L⁻¹ 5,5-二硫双硝基苯甲酸 (DTNB), 最终溶液体积为 250 μ L. 混合后恒温振荡, 使用 MK-III 酶标仪测定体系在 412 nm 处的 OD 值, 分别在反应时间为 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 min 时测定. 每组实验数据重复记录三次, 取平均值. 以 HupA 为

参照, 进行上述同样实验.

2.4 Surflex Dock 分子对接

分子对接实验通过 SYBYL 程序包中 Surflex-Dock 模块实现[15]. HLD 的三维结构使用 SYBYL 7.3 绘制, 并应用 Minimize 程序对小分子进行能量优化, 能量收敛为 0.42 kJ mol⁻¹ nm⁻¹, 得到 HLD 的最低能量构象.

以 AChE 与 HupA 的复合物晶体结构 (PDB: 1GPK) 为初始模型[16], 保留结晶水, 对照 AChE-乙酰葡萄糖胺 (NAG) 复合物晶体结构 (PDB: 1EA5) 补齐缺失残基, 并加入氢原子及其他遗漏原子, 能量优化后构型作为对接起始结构. 对接通过 Surflex-Dock 中 Ligand 模式进行, 分别以 HupA 和 HLD 为 Ligand, 考虑配体环柔性, 对接前后均进行能量优化, 其余使用缺省参数. 结果分析通过 MolMol 软件进行, 给出最可能的氢键.

2.5 结合自由能分析

应用分子对接产生的 AChE-HLD 复合物结构, 通过 Amber 9 软件进行分子动力学模拟. 蛋白质采用 Amber 9 中的 ff03 力场, HLD 采用 gaff 力场. 加入抗衡离子 (Na⁺ 或 Cl⁻) 使体系中性化; 加 TIP3P 模型的 15 Å 立方体水环境. 复合物在分子动力学模拟之前需通过优化平衡[17], 之后在 310 K 温度下进行 10 ns 的分子动力学模拟, 步长 2 fs, 每隔 10 ps 进行一次取样, 使用 SHAKE 方法限制氢键伸缩, 利用 PME 方法来计算体系的长程静电相互作用. 同样, 对 HupA 与 AChE 的复合物进行相同处理.

结合自由能计算通过 Amber 9 中 MM_PBSA 模

块实现^[18], 计算式为:

$$\begin{aligned}\Delta G_{\text{binding}} &= G_{\text{complex}} - G_{\text{protein}} - G_{\text{ligand}} \\ &= \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{PB}} + \Delta G_{\text{NP}} - T\Delta S\end{aligned}\quad (1)$$

ΔE_{MM} 为体系内能的变化, 可以通过分子力学计算得到; ΔG_{PB} 指溶剂化能中极性部分的贡献, 在此通过计算 Poisson-Boltzmann 模型方程得到的; ΔG_{NP} 是溶剂化能中非极性部分的贡献, 这部分主要通过计算溶剂可极化表面完成. 上式中最后一项为构象熵的改变, 由于复合物较庞大, 计算成本过高, 且其准确度较差, 故在此不考虑熵的贡献. 自由能计算参数均取缺省值. 从分子动力学模拟中取 8 至 10 ns 的轨迹, 一共取样 200 个分析结合自由能.

3 结果

3.1 质子弛豫速率测定

溶液中小分子的非选择性自旋-晶格弛豫速率 R^{ns} 与选择性自旋-晶格弛豫速率 R^{sc} 的差异反映小分子与蛋白的结合状态^[10]. ^1H NMR 实验中, 我们观测了与乙酰胆碱酯酶结合的 HLD 及自由态的 HLD 中 H1a、H1e、H6、H7、H9a、H9e 和 H16 质子的弛豫速率, 这些质子分辨率较好, 而其他质子由于化学位移相互重叠或为多重峰型, 无法选择合适的软脉冲照射进行观测. 表 1 可见被测质子的化学位移, 其归属参照并与文献^[19]吻合; 可以看到, 加入蛋白前后质子化学位移未发生明显变化, 而几乎所有质子选择性和非选择性自旋-晶格弛豫速率都有变化. R^{ns} 变化不大, 而 R^{sc} 却普遍增强, 使得 $R^{\text{ns}}/R^{\text{sc}}$ 的比值在加入蛋白后减小. 这是因为当小分子与大分子结合后, 质子间的交叉弛豫速率 σ^{ij} 往往为负值, 抵消了部分由偶极作用带来的弛豫速率增强. 选择弛豫速率 R^{sc}

的普遍增强说明 HLD 与 AChE 发生了结合.

3.2 分子运动相关时间 τ_{ij}

除单选择性弛豫速率 R_i^{sc} 外, 通过双选择性照射, 可以测得 $R_i^{ij[11, 12]}$, 由此可以得知质子间的交叉弛豫速率 σ^{ij} , 而分子运动相关时间 τ_{ij} 则可通过测定 σ^{ij} 计算而得到:

$$\sigma^{ij} = \frac{1}{10} \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r_{ij}^6} \left[\frac{6\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_{ij}^2} - \tau_{ij} \right] \quad (2)$$

式中 $\hbar$ 为约化 Planck 常数 ($\hbar/2\pi$, $1.0545887 \times 10^{-27}$ erg S rad⁻¹); γ 是质子的磁旋比值 ($26,753$ rad S⁻¹ G⁻¹); ω 为质子的 Larmor 进动频率, 随磁场强度而改变; r_{ij} 是质子 H_i 、 H_j 的核间距离. 测定小分子配体在自由态和结合态时的 σ^{ij} , 并计算得到两种状态下的 τ_{ij} . τ_{ij} 依赖于分子的大小、对称性和溶液的黏度等因素而不同, 体现了小分子在溶液中的运动状态.

HLD 中 H1a/H1e 为同碳上相耦合的质子对, 由于两者化学位移相差较大, 可以选择合适的 180° 脉冲照射并进行观测. 实验测得 $\sigma_{\text{free}}^{ij}$ 和 σ_{obs}^{ij} 分别为 0.42 s^{-1} , 0.37 s^{-1} , 它们分别为未加酶时和加酶后观察到的交叉弛豫速率; 再计算得到纯酶结合状态下的交叉弛豫速率 $\sigma_{\text{bound}}^{ij}$ ^[11], 本文中为 -0.96 s^{-1} . 得到 $\sigma_{\text{free}}^{ij}$ 和 $\sigma_{\text{bound}}^{ij}$ 后, 通过 eq. (2) 即可求出结合前后的分子相关时间. 交叉弛豫速率 σ^{ij} 从未结合状态下一个较小的正值转变为结合状态下的一个较大的负值, 说明 HLD 与 AChE 结合后其分子运动相关速率减慢, 使得 $\omega \tau$ 从小于 1 转化为大于 1. 而所观测质子对的 τ_{ij} 也从未加酶时的 34.6 ps 变化到结合酶后的 3.21 ns . 时间尺度的变化表明 HLD 与乙酰胆碱酯酶发生了结合.

表 1 加入乙酰胆碱酯酶 ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) 前后 HLD (1 mmol L^{-1}) 的 ^1H NMR 弛豫速率参数 (400 MHz, 溶剂: D_2O pH 7.4, $T = 298 \text{ K}$)

Protons number	Ligand				Ligand+AChE			
	δ (ppm)	R^{ns} (s ⁻¹)	R^{sc} (s ⁻¹)	$R^{\text{ns}}/R^{\text{sc}}$	δ (ppm)	R^{ns} (s ⁻¹)	R^{sc} (s ⁻¹)	$R^{\text{ns}}/R^{\text{sc}}$
6H	3.87	0.75	0.56	1.34	3.87	0.74	0.60	1.23
9a	3.71	2.51	2.73	0.92	3.71	2.32	2.91	0.80
1a	3.60	2.49	2.12	1.17	3.60	2.05	2.02	1.01
9e	3.09	2.51	2.19	1.15	3.09	2.15	2.25	0.96
1e	2.92	2.44	1.71	1.43	2.92	2.32	1.99	1.17
7H	2.66	2.59	2.57	1.01	2.66	2.46	2.59	0.95
16H	0.82	2.14	2.05	1.04	0.82	2.07	2.12	0.98

3.3 转移NOE (TR-NOE, transferred nuclear overhauser enhancement)

TR-NOE 实验同弛豫速率实验均适用于化学交换较快的体系^[20], 通过观察由大分子转移到小分子上的NOE所产生的小分子NOE性质的改变, 判定与酶作用的小分子的结合部位. 如图2所示, 在高场区我们选择检测两个NOE信号, 分别归属为H14a/H14e、H7/H8e的交叉信号峰, 在自由态时它们均与对角峰信号反相, 表明在小分子溶液中小分子转动速率较快. 加入酶后, 这些交叉峰变成与对角峰同相, 这是由于HLD与AChE结合后, 分子转动速率会与酶一起变慢, 而小分子大多以结合态存在, 故测得的NOE信号也会变为与对角峰同相. 实验表明, 小分子的H14, H7等位点与酶的作用较强.

3.4 酶活性实验测定

选取HupA作为抑制AChE活性的参照物, 测定所得 IC_{50} 与文献值吻合^[16], 并测得HLD抑制AChE的 IC_{50} 约为 0.35 mmol L^{-1} (图3). 选择HLD在 IC_{50} 附近的浓度, 测定含有HLD的酶促反应的表现米氏常数 K_{app} 和最大反应速率 V_{max} . 实验发现, K_{app} 随抑制剂浓度的增加而增加, 而 V_{max} 随抑制剂浓度的增加而减小, 因此, 我们可以推断, HLD为AChE的混合型抑制剂, 并测得其 K_i 值为 $190 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. 结果表明, HLD对AChE有较好的抑制作用, 且抑制机理与HupA类似.

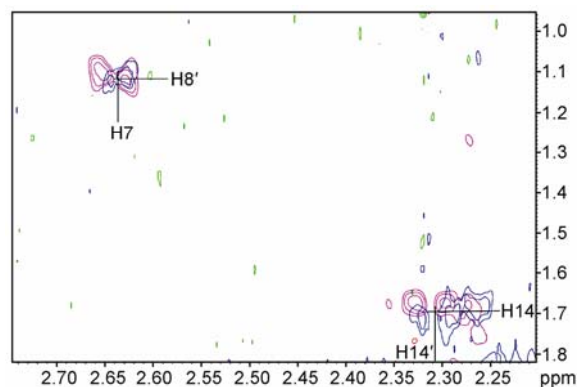


图2 加入AChE前后HLD的TR-NOE谱图. 粉色为小分子NOE谱图中的负信号峰, 蓝色为加入蛋白后NOE谱图中的正信号峰. 溶液条件: D_2O , pH 7.0, 50 mmol L^{-1} 磷酸盐缓冲溶液, 298 K

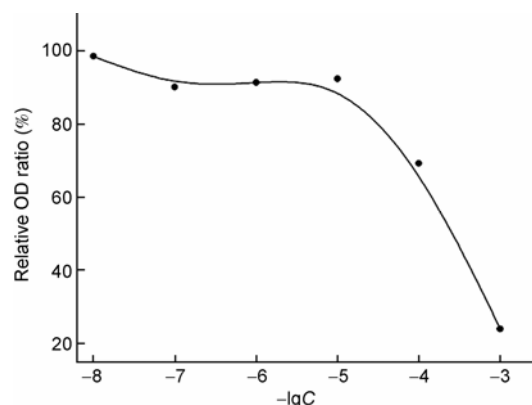


图3 HLD的 IC_{50} 测定. 横坐标为抑制剂浓度的负对数, 纵坐标为加入不同浓度抑制剂与不加抑制剂的OD值之比(用%表示), 结果为三次实验平均值

3.5 分子对接

酶活性实验表明HLD与HupA抑制机理类似, 因此我们选取AChE与HupA的复合物作为起始结构, 通过Surflex-Dock对HLD与AChE进行对接分析, 预测配体与受体之间的结合性. 实验数据给出HLD 4.3的分值, 这与酶活性实验数据较吻合, 说明计算结果合理可信.

图4给出HLD与AChE结合位点处的构象, 显示范围为与HLD 5 Å距离内的氨基酸残基. 由图可见, 结合位点中关键的残基有Trp84, Asn85, Gly117, Gly118, Gly119, Tyr121, Ser122, Gly123, Tyr130, Ser200, Glu199, Phe330, Phe331和His440. 分析显示, Ser122侧链的羟基氢与HLD6位羟基氧形成氢键. 同

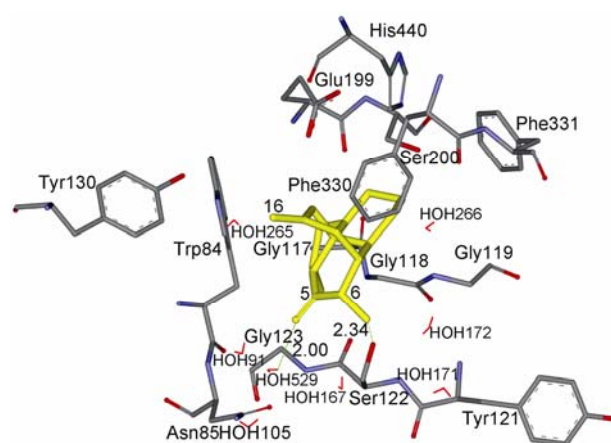


图4 HLD与AChE结合示意图. 黄色表示HLD, 碳编号用数字标出, 绿线为可能的氢键, 并标注形成氢键两原子间距离

时看到在结合过程中, 水分子参与了氢键的形成, 这种参与在 AChE 催化过程中不可或缺^[21, 22].

进一步分析 HLD 结合部位, 可以看到 AChE 活性位点入口处的残基 Phe330 和 Tyr121 此刻处于开放构象, HLD 进入了活性位点中. 构象分析可知此处较为狭窄, 而 HLD 的六氢久洛里定结构较为庞大^[23], 可能不利于分子进出, 这是降低 HLD 抑制性能的一个可能原因. HLD 上的羰基氧与羟基分别与水分子和残基形成氢键, 在结合过程中发挥了重要作用. 对比于 HupA 结合 AChE 的过程^[16], 大部分残基均与这两种抑制剂作用. 本实验中, Trp84 与 HLD 的 C16 较为接近, 形成 C-H- π 作用, 同时, Phe330 与 C14, C7 接近, 这与 TR-NOE 中的实验数据吻合, 残基的影响使得与 H14, H7 有交叉质子峰的 NOE 正信号被观测到. Lycopodine 类似物较少被报道有 AChE 的抑制活性, 而 HLD 的抑制性能可通过多种实验被观测, 羟基可能起着主要作用.

3.6 分子动力学模拟与结合自由能计算

从模拟轨迹文件中提取出 HLD 与 AChE 复合物的平均结构, 与对接时产生的位点结构相比, 小分子周围的残基大部分均保留, 表明经过较长时间模拟, 小分子与蛋白的结合位点未产生较大偏差. 同时, 我们从轨迹文件中取 200 帧进行自由能计算. 由表 2 可以看出, 在 HLD 与 AChE 的结合过程中, 范德华相互作用对结合自由能起主要贡献作用. 并且, HLD 与 HupA 对 AChE 的结合自由能大小顺序也与实验数据相吻合.

4 讨论

通过 NMR 方法、酶活性测定、分子对接、分子动力学模拟及结合自由能计算, 研究了 HLD 对 AChE 的抑制作用及其结合位点. 弛豫速率研究发现, 结合酶后, 小分子的弛豫速率由皮秒级变到纳秒级, 分子运动由于结合酶的影响明显减慢. 转移 NOE 实验表明 HLD 可以较好地结合 AChE, 而对于结合性较差的体系, 在毫摩尔数量级浓度下很难观察到小分子 NOE 信号的性质变化. HLD 对 AChE 抑制类型为混合型抑制剂, 这已由酶活性实验证实. 实验测得的抑制常数与分子对接给出的打分值吻合, 表明 HLD 在 AChE 中的结合位点可信. HLD 的六氢久洛里定结构不利于 HLD 进出 AChE 催化位点, 可能会降低抑制性能, 而羟基和羰基氧在与蛋白结合过程中起重要作用, 增加小分子的极性可能对抑制性能有较好的改善作用. 由分子动力学模拟及 MM_PBSA 计算结合自由能, 与实验结果得到较好吻合, 并发现范德华相互作用是 HLD 与 AChE 结合的主要驱动力, 这为之后的分子基团改造和抑制性能改善提供了思路.

HLD 作为石松碱类化合物的代表, 其与 AChE 的结合作用研究, 为 AChE 的抑制剂设计与开发提供了一种较为完善的基于实验的技术和方法. 对于这种中等结合力的分子, 可以经过逐步的基团修饰, 提高与酶的结合亲和力, 增加对酶的抑制作用. 而本研究所采取的多种方法联用技术可广泛应用于其他小分子与大分子结合体系研究中.

表 2 HLD-AChE 与 HupA-AChE 复合物体系的结合自由能 (kcal/mol)

能量项 ^{a)}	HLD-AChE		HupA-AChE	
	平均值	偏差	平均值	偏差
ELE	-4.44	2.88	-21.40	2.68
VDW	-34.14	1.73	-33.43	2.28
INT	0.00	0.00	0.00	0.00
GAS	-38.57	2.94	-54.83	3.46
PBSUR	-4.49	0.24	-4.68	0.11
PBCAL	23.67	3.67	34.65	3.12
PBSOL	19.18	3.60	29.97	2.09
PBTOT	-19.39	4.20	-24.86	4.23

a) ELE 为静电作用能; VDW 为范德华作用能; INT 为键, 键角, 二面角能; GAS 为 ELE+VDW+INT 之和; PBSUR 为非极性溶剂作用; PBCAL 为极性溶剂作用; PBSOL 为总溶剂作用; PBTOT 为总结合自由能

致谢 本工作得到国家科技重大专项“重大新药创制”基金(2009ZX09311-003, 2009ZX09301-001)和上海市“东方学者”人才计划的资助, 特此一并致谢.

参考文献

- Goedert M, Spillantini MG. A century of Alzheimer's disease. *Science*, 2006, 314: 777—781
- Castro A, Martinez A. Targeting beta-amyloid pathogenesis through acetylcholinesterase inhibitors. *Curr Pharm Des*, 2006, 12: 4377—4387
- Cummings JL. Treatment of Alzheimer's disease: Current and future therapeutic approaches. *Rev Neurol Dis*, 2004, 1: 60—69
- Scarpini E, Scheltens P, Feldman H. Treatment of Alzheimer's disease: Current status and new perspectives. *Lancet Neurol*, 2003, 2: 539—547
- Coyle JT, Price DL, De Long MR. Alzheimer's disease: A disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*, 1983, 219: 1184—1190
- Sims NR, Bowen DM, Allen SJ, Smith CC, Neary D, Thomas DJ, Davison AN. Presynaptic cholinergic dysfunction in patients with dementia. *J Neurochem*, 1983, 40: 503—509
- 王静, 高锦孝, 白永泽, 王静, 高锦孝, 白永泽, 席向红. 肝硬化患者血清胆碱酯酶临床研究. *中华检验医学杂志*, 2005, 28: 68—68
- Ma XQ, Gang DR. The *Lycopodium* alkaloids. *Nat Prod Rep*, 2004, 21: 752—772
- Liu JS, Zhu YL, Yu CM, Zhou YZ, Han YY, Wu FW, Qi BF. The structures of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity. *Can J Chem*, 1986, 64: 837—839
- Li Y, Yin GW, Wei W, Wang HB, Jiang SH, Zhu DY, Du WH. Interaction of *Lycopodium* alkaloids with acetylcholinesterase investigated by ¹H NMR relaxation rate. *Biophys Chem*, 2007, 129: 212—217
- Du WH, Li YM, Gan QL, Jiang SH, Tan CH, Zhu DY. ¹H NMR relaxation investigation of huperzineE binding to acetylcholinesterase. *Acta Chimica Sinica*, 2007, 65: 415—420
- Freeman R, Hill HDW, Tomlinson BL, Hall LD. Dipolar contribution to NMR spin-lattice relaxation of protons. *J Chem Phys*, 1974, 61: 4466—4473
- Clore GM, Gronenborn AM. Theory and applications of the transferred nuclear overhauser effect to the study of the conformations of small ligands bound to proteins. *J Magn Reson*, 1982, 48: 402—417
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 1961, 7: 88—95
- Sybyl, version 7.3. St. Louis: Tripos Inc., 2007
- Dvir H, Jiang HL, Wong DM, Harel M, Chetrit M, He XC, Jin GY, Yu GL, Tang XC, Silman I, Bai DL, Sussman JL. X-ray structures of *Torpedo californica* acetylcholinesterase complexed with (+)-huperzine A and (–)-huperzine B: structural evidence for an active site rearrangement. *Biochemistry*, 2002, 41: 10810—10818
- Xu J, Yin GW, Huang FJ, Wang BH, Du WH. Molecular dynamics simulation of a carboxy murine neuroglobin mutated on the proximal side: heme displacement and concomitant rearrangement in loop regions. *J Mol Model*, 2010, 16: 759—770
- Kollman PA, Massova I, Reyes C, Kuhn B, Huo S, Chong L, Lee M, Lee T, Duan Y, Wang W, Donini O, Cieplak P, Srinivasan J, Case DA, Cheatham TE. Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Acc Chem Res*, 2000, 33: 889—897
- Tan CH, Zhu DY. Lycopodine-type *Lycopodium* alkaloids from *Huperzia serrata*. *Helv Chim Acta*, 2004, 87: 1963—1967
- 林东海, 洪晶. 用 NMR 技术研究蛋白质-配体相互作用. *波谱学杂志*, 2005, 22: 321—341
- 郑青川, 楚慧郢, 牛瑞娟, 孙家钺. 人类乙酰胆碱酯酶(AChE)与抑制剂小分子的对接研究. *中国科学 B 辑: 化学*, 2009, 39: 1454—1460
- Colletier JP, Fournier D, Greenblatt HM, Stojan J, Sussman JL, Zaccari G, Silman I, Weik M. Structure insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. *EMBO J*, 2006, 25: 2746—2756
- 王龙, 林翠梧. 石松碱的合成方法综述. *有机化学*, 2008, 28: 755—760

Interaction of 6-hydroxylycopodine with acetylcholinesterase

WANG YanLi¹, LI YiMing², HE Ying¹, TAN ChangHeng³, ZHU DaYuan³ & DU WeiHong¹

¹ Department of Chemistry, Renmin University of China, Beijing 100872, China

² School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

³ State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

Abstract: Acetylcholinesterase inhibitors (AChEI) are mainly used in the treatment of Alzheimer's disease(AD). In order to investigate the inhibition of lycopodium alkaloids on acetylcholinesterase, the compound 6-hydroxylycopodine(HLD) was used as a potential candidate in the present work. The interaction of HLD with AChE was studied combining NMR, molecule docking, enzymatic activity determination, molecular dynamics simulation and binding free energy analysis. Experimental data reveal that HLD can inhibit AChE in a mixed type, and the HLD-AChE binding is mainly from the hydrogen bond and the Van der Waals interaction.

Keywords: 6-hydroxylycopodine, acetylcholinesterase, interaction