

基于分子对接方法从天然产物数据库中筛选松材线虫的乙酰胆碱脂酶抑制剂

陈双扣^{1*}, 唐 思¹, 谭小庆¹, 徐 曦¹, 杨振宁², 任风鸣³, 孙静怡¹, 胡新龙¹

¹重庆科技学院化学化工学院, 重庆

²重庆长风化学工业有限公司, 重庆

³重庆市药物种植研究所, 重庆

收稿日期: 2022年9月22日; 录用日期: 2022年10月8日; 发布日期: 2022年11月1日

摘 要

目的: 运用相似性筛选、分子对接筛选方法联合分子动力学模拟技术从天然产物数据库中挖掘松材线虫乙酰胆碱脂酶(Acetylcholinesterase, AChE)抑制剂。方法: 运用同源建模技术构建松材线虫乙酰胆碱脂酶AChE的蛋白质结构, 并将已知抑制活性的鱼藤酮作为AChE的配体小分子以获得最佳对接参数及对接网格大小。利用结构相似性筛选、类药性评价、分子对接、分子动力学模拟及结合自由能计算等多种策略, 从天然产物数据库中筛选AChE抑制剂。结果: 经过多轮筛选, 共获得21个命中分子, 其中前2位最佳命中分子为M1鱼藤素小分子, 对接分数达 $-11.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, 其次为M2槐黄烷酮G小分子, 对接分数达 $-10.6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。结合分子动力学模拟, 发现鱼藤素和槐黄烷酮G小分子与受体蛋白具有强氢键作用和疏水相互作用, 能形成稳定的复合物。结合自由能计算结果表明两分子与AChE蛋白结合具有类似的作用方式, 有较高的AChE酶抑制活性, 为AChE抑制剂开发的有效先导化合物。结论: 运用该研究思路从天然产物数据库中挖掘出了对乙酰胆碱酯酶AChE有高抑制活性的小分子化合物, 可为松材线虫AChE小分子抑制剂的开发提供物质参考。

关键词

松材线虫, 乙酰胆碱酯酶(AChE), 分子对接, 虚拟筛选, 分子动力学模拟

Virtual Screening of *Bursaphelenchus xylophilus* AChE Inhibitors Based on Molecular Docking from the Natural Products Database

Shuangkou Chen^{1*}, Si Tang¹, Xiaoqing Tan¹, Xi Xu¹, Zhenning Yang², Fengming Ren³, Jingyi Sun¹, Xinlong Hu¹

*通讯作者。

文章引用: 陈双扣, 唐思, 谭小庆, 徐曦, 杨振宁, 任风鸣, 孙静怡, 胡新龙. 基于分子对接方法从天然产物数据库中筛选松材线虫的乙酰胆碱酯酶抑制剂[J]. 药物化学, 2022, 10(4): 307-317. DOI: 10.12677/hjmce.2022.104032

¹Department of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University of Science and Technology, Chongqing

²Chongqing Changfeng Chemical Industry Co. LTD, Chongqing

³Institute of Medicinal Plant Cultivation, Chongqing

Received: Sep. 22nd, 2022; accepted: Oct. 8th, 2022; published: Nov. 1st, 2022

Abstract

Objective: Similarity screening, molecular docking and molecular dynamics simulation were used to explore Acetylcholinesterase (AChE) inhibitors of *Bursaphelenchus xylophilus* from natural product databases. **Methods:** The protein structure of *Bursaphelenchus xylophilus* AChE was constructed by homology modeling technology, and rotenone with known inhibitory activity was used as the ligand of AChE to obtain the optimal docking parameters and mesh size. The AChE inhibitors were screened from natural product databases by multiple rounds of virtual screening strategies, such as structure-based similarity screening, drug-like evaluation, molecular docking, molecular dynamics simulation and binding free energy calculation. **Result:** A total of 21 hit molecules were obtained through multiple rounds of virtual screening, among which the top two best hit molecules were rotenin (M1) small molecule with docking fraction of $-11.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, followed by sophorflavanone G (M2) small molecule with docking fraction of $-10.6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Combined with molecular dynamics simulation, rotenin and sophorflavanone G small molecules showed strong hydrogen bond and hydrophobic interaction with target receptor protein, and could form stable complexes. Binding free energy calculation found that the two molecules combined with ACE protein had similar action mode and high inhibition activity on AChE enzyme, which were effective lead compounds for AChE inhibitor development. **Conclusion:** The small molecule compounds with high inhibitory activity on AChE were discovered from natural product database by using this research idea, which could provide material reference for the development of *Bursaphelenchus xylophilus* AChE small molecule inhibitors.

Keywords

Bursaphelenchus xylophilus, Acetylcholinesterase (AChE), Molecular Docking, Virtual Screening, Molecular Dynamic Simulation

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

松材线虫病又名松树萎蔫病,是由松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)引起的一种重大的检疫性森林病害,具有致病力强,传播迅速和潜伏期长等特点[1]。自1982年于南京紫金山首次发现以来,我国已有江苏、安徽、四川和云南等18个省市成为了松材线虫病疫区[2]。且随着疫情的不断蔓延,发病面积正逐年扩大,松林毁灭面积达数十万公顷,松树累计死亡5亿株以上,而造成的经济损失已达数亿元,严重破坏我国乃至全球的森林生态,若不加以控制,在未来可能将引起巨大的生态灾难[3]。目前,我国对松材线虫病采取的防治手段主要分为对松材线虫的直接防治和对媒介昆虫的间接防治两种。其中对媒介昆虫的防治则利用化学药剂、引诱剂及引入媒介昆虫天敌的生物防治等手段将可传播松材线虫病的松墨

天牛等媒介昆虫杀死,抑制疫情在健康树木中的进一步传播。但药剂的大面积喷洒和引诱剂的放置不仅对生态环境造成破坏,还将耗费大量人力、物力和财力,防治效果仍无法达到预期[4] [5] [6]。同时,引入媒介昆虫的天敌白僵菌(*Beauveria bassiana*)等虫生菌的防治手段也将受到寄生率的影响,难以真正达到防病的要求[3]。而对于松材线虫本身,则利用注射树干法,向树木中注射鱼藤酮、阿苯哒唑、磷酸左旋咪唑、盐酸左旋咪唑、噁吩哒唑、甲苯哒唑和氟苯哒唑等 7 种植物源触杀型靶向农药,其作用机制主要通过抑制松材线虫的呼吸代谢系统直接杀死松材线虫,表现出出色的灭杀效果[7]。而天然产物具有资源丰富、耐药性低的特点,对环境的负面影响较小,符合我国发布的《“十四五”全国农药产业发展规划》中对行业指出的坚持安全发展,坚持绿色发展,坚持高质量发展和坚持创新发展的方针策略。因此,以松材线虫的相关基因为靶标,从天然产物中发现可有效抑制松材线虫的药物分子,开发出靶向明确、抗性低的新型杀线虫剂具有十分重要的意义。

乙酰胆碱脂酶(acetylcholinesterase, AChE)为生物神经传导中的一种糖蛋白,在生物神经传导过程中发挥关键作用,即通过降解乙酰胆碱来终止神经递质对突触后膜兴奋的刺激作用,以确保神经信号的正常传递,最终发挥对生物中正常肌肉活动的调节作用[8]。据相关研究报道,松材线虫中已克隆到 BxACE1, BxACE2 和 BxACE3 等 3 种 AChE 基因,并已开发出有机磷(Organo-phosphates, Ops)和氨基甲酸酯(Carbamates, CBs)两种以 AChE 为作用靶标的抑制剂,其主要作用机制为通过积累过量的 Ach 引起去极化阻断,从而阻断神经冲动的正常传递,最终导致松材线虫死亡[9]。但有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的使用,不仅污染环境,还将导致抗药性等问题。此外,研究还发现 AChE 在生物细胞凋亡、促进造血细胞形成、炎症反应和免疫反应等方面发挥重要作用[10] [11]。在诱导细胞凋亡的体外研究发现,生物体内的细胞在凋亡时将大量表达 AChE,进一步表明 AChE 的表达可加剧生物细胞的凋亡[12] [13]。因此,本文以松材线虫的乙酰胆碱脂酶 AChE 为药物靶标,利用基于配体结构的相似性筛选、类药性评估及分子对接等手段从天然产物数据库中虚拟筛选出可有效抑制松材线虫 AChE 的药物分子,为新型的环保型植物源 AChE 抑制剂的开发提供物质参考。

2. 材料和方法

2.1. 软件

基于已知活性配体结构的相似性虚拟筛选采用 Open babel 3.1.1 软件的 fingerprints 模块;天然产物数据库中筛选的小分子的类药性评估采用 DruLiTo 软件[14];受体蛋白与原晶体配体的重对接采用 PyRx 软件;分子对接的虚拟筛选均在 linux 系统下采用 AutoDockvina 软件[15];受体蛋白与配体小分子间的作用模式采用 PyMOL v2.0 [16]软件和 LigPlus v.2.2 [17]软件进行可视化;蛋白质晶体结构的构建采用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)网站在线三维建模,氨基酸序列号采用 ACZ64207.1,从 NCBI 中下载[9];并采用 PROCHECK (<http://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>)对乙酰胆碱酯酶的结构进行评估。

2.2. 受体蛋白质结构的构建及对接参数生成

为获取松材线虫乙酰胆碱酯酶的蛋白质结构,根据已报道的 BxACE1 基因,从生物数据库 NCBI 中下载序列号为 ACZ64207.1 的氨基酸序列,并利用 SWISS-MODEL 对 BxACE1 进行模板搜寻,选择同源性最高的冈比亚按蚊乙酰胆碱酯酶(PDB ID: 5ydi)为模板,其同源性为 48.3%,满足同源建模模板同源性需大于 30%的标准,通过同源建模最终获得松材线虫乙酰胆碱酯酶的蛋白结构。同时,采用 PROCHECK 分析蛋白结构的合理性。而对于其配体小分子,则运用 PyMOL 软件将模板 5ydi 的原结晶配体通过 align 命令叠合至结构中,获得其活性位点。然后根据文献报道鱼藤酮分子对松材线虫具有高效灭杀作用,可

有效作用于松材线虫的呼吸系统的相关靶点, 但当其作用于乙酰胆碱酯酶时对松材线虫的灭杀作用远强于以乙酰胆碱酯酶为主要靶标的克线磷[7]。因此, 采用鱼藤酮分子作为相似性虚拟筛选和分子对接虚拟筛选的阳性对照分子, 并利用 PyRx 及 Audodockvina 软件将鱼藤酮分子对接至松材线虫乙酰胆碱酯酶的蛋白活性位点中, 以对接前后两配体重叠的均方根偏差(RMSD)值对对接参数的合理性进行评判, 一般认为 $\text{RMSD} \leq 2.0 \text{ \AA}$ [18]代表对接参数能较好地重现原配体小分子的空间位置及构象, 最终确定对接参数。并采用 PyMOL 可视化鱼藤酮与 AChE 蛋白间的作用模式。

2.3. 基于已知活性配体结构的相似性计算和类药性评估的多轮虚拟筛选

以鱼藤酮小分子作为模板分子, 利用 babel 命令调用 Open babel 的 fingerprints 模板分别计算陶术 2800 数据库中的 2497 个天然产物小分子在 FP2, FP3 及 FP4 的计算方法下与模板分子间的相似性系数, 并由大到小进行排序, 然后选取 3 种分子指纹下的相似性系数排名靠前的 200 个分子, 于 Bioinformatics & Evolutionary Genomics (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn>)网站在线绘制 venn 图, 获得交集分子, 即为与模板分子高度相似的小分子。接着, 基于类药性 5 规则 “Lipinski’s Rule” [19] ($\text{MW} \leq 500$; $\text{H-bond acceptors} \leq 10$; $\text{H-bond donors} \leq 5$; $\text{Rotatable bonds} \leq 10$ 和 $\text{LogP} \leq 5$)对命中分子进行 2 轮筛选, 从氢键给体、供体、分子量、脂水分配系数及可旋转键数等方面对经过相似性筛选的小分子进行成药性评估, 获得成药性质良好的分子。

2.4. 基于分子对接的虚拟筛选

根据 AChE 受体蛋白与鱼藤酮小分子的对接参数, 以分子对接进行第 3 轮筛选。采用 obabel 命令对经过前 2 轮筛选的命中分子批量进行加氢、格式转换(SDF 转换为 PDBQT 格式)等预处理, 然后在 linux 系统下采用 AutoDockvina 软件将数据库中的命中分子与 AChE 受体蛋白进行分子对接, 计算对接分数。以鱼藤酮与 AChE 受体蛋白的对接分数为阈值, 筛选出对接分数低于阈值的小分子, 并根据对接所得的结合能 ΔG (单位为 $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$), 利用公式 $K_i = \exp\{(\Delta G \times 1000)/(R_{cal} \times T)\}$ 计算小分子与靶点蛋白的结合亲和力(K_i), 其中 T 为 298 K, R_{cal} 为 $1.98719 \text{ cal}/(\text{mol} \cdot \text{K})$ [20]。亲和力强于配体鱼藤酮的小分子即为松材线虫乙酰胆碱酯酶抑制剂的有效候选小分子。并采用 PyMOL 和 LigPlus 可视化亲和力最强的前 2 个分子与 AChE 受体蛋白间的 3D 和 2D 作用模式。

2.5. 分子动力学模拟

本文选取了前 2 位最佳命中分子 M1 和 M2, 利用 GROMACS 2020.6 软件包分别对两个蛋白 - 配体复合物进行 10ns 的分子动力学模拟(MD) [21], 以探究不同配体对 ACHE 的相互作用。其中 ACHE 晶体蛋白和配体小分子均采用 AMBER99SB 力场。运用 UCSF Chimera 结合 ACPYPE 软件在 AMBER ff99SB 力场下生成配体的拓扑文件并赋予部分电荷[22] [23] [24]。在模拟之前, 将蛋白 - 配体复合物体系置于周期边界充满水分子的立方体 SPC 水盒中, 并使用 Cl^- 和 Na^+ 来中和系统中的电荷。使用最抖下降法使系统的能量在 10,000 步内达到最小化。然后用 NVT 对整个系统进行平衡, 在 1000 ps 内缓慢加热至 300 K, 并限制系统位置。最后, 在 NPT 系综下, 对整个体系实施 10 ns 的恒温恒压分子动力学模拟。模拟完成后, 抽取最后 2 ns 的动力学轨迹计算 MM/PBSA 结合自由能, 进一步考察命中分子与松材线虫乙酰胆碱酯酶 ACHE 的结合强弱及能量组分贡献情况。

3. 结果

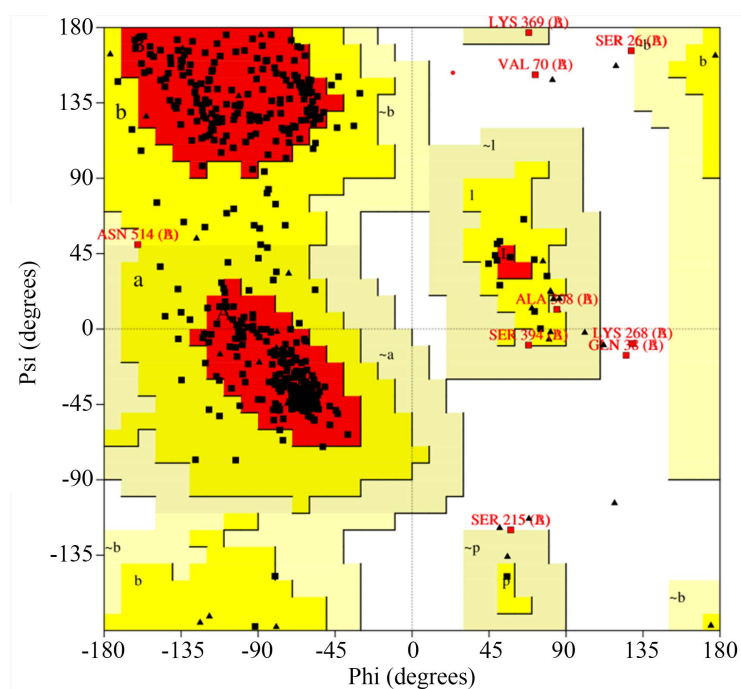
3.1. 材线虫乙酰胆碱酯酶的同源建模

采用 SWISS-MODEL 对材线虫乙酰胆碱酯酶蛋白进行同源建模, 并利用 Procheck 获得 Ramachandran

图对蛋白结构的合理性进行评估。如图 1 所示, 86.7%的氨基酸位于最合适的 A, B, L 区域, 代表氨基酸构象具有非常高的稳定性。11.5%的氨基酸位于较合适的 a, b, l, p 区域, 说明此区间的氨基酸构象仍然拥有较高的稳定性。而 0.8%的氨基酸位于一般合理的~a, ~b, ~l, ~p 区域, 此区间的氨基酸拥有基本稳定的构象。对于不合理区, 仅有 1%氨基酸位于该区域, 允许区和最佳合理区的氨基酸占整个蛋白质的比例大于 90%, 表明该蛋白结构具有合理性, 可应用于进一步研究。此外, 采用 PyMOL、PyRx 及 Autodockvina 为蛋白添加了配体并获得对接参数, 其相互作用模式如图 2 所示。通过分子对接, 发现配体鱼藤酮分子与乙酰胆碱酯酶的对接分数达 -9.4 kcal/mol, 表明两者具有较高的结合活性。由图 2 可知, 乙酰胆碱酯酶的活性口袋主要由 SER215、HIS470、GLU214、GLY133、TYR350、TRP98、ALA308、PHE351、GLU306 等氨基酸残基组成, 而鱼藤酮配体小分子在活性口袋中与氨基酸残基以疏水作用结合, 并与 GLN355 (2.8 Å)和 TRP137 (2.8 Å)氨基酸残基形成两个氢键, 最终形成稳定的复合物, 进一步表明蛋白及其配体的构建合理。

3.2. 基于相似性的虚拟筛选

基于生物活性较高的鱼藤酮小分子的结构, 对数据库中 2497 个天然分子进行了相似性虚拟筛选, 3 种相似性方法共筛选出相似性系数较高的 69 个分子, 交集 Venn 图及前 10 个分子的相似性系数如图 3 所示。由相似性筛选发现, T2970 为鱼藤酮分子, 三种相似性方法计算的相似性系数均等于或接近 1, 表明相似性计算方法的合理性。与鱼藤酮分子结构高度相似的分子为鱼藤素, 属鱼藤酮类化合物, 可抑制昆虫的生长发育和食欲, 具有毒杀昆虫的生物活性[25]。随着研究的深入, 发现鱼藤素还具有较强的抗癌活性[26]。接着, 对上述 69 个天然分子进行了类药性评估, 发现仅有 10 个分子不满足类药 5 原则, 其余 49 个分子均具有较好的成药性, 可进行下一步研究。



“A, B, L”为最佳合理区; “a, b, l, p”为额外允许区; “~a, ~b, ~l, ~p”为一般合理区; 白色区域为不合理区。

Figure 1. Ramachandran diagram of AChE protein

图 1. 乙酰胆碱酯酶蛋白的 Ramachandran 图

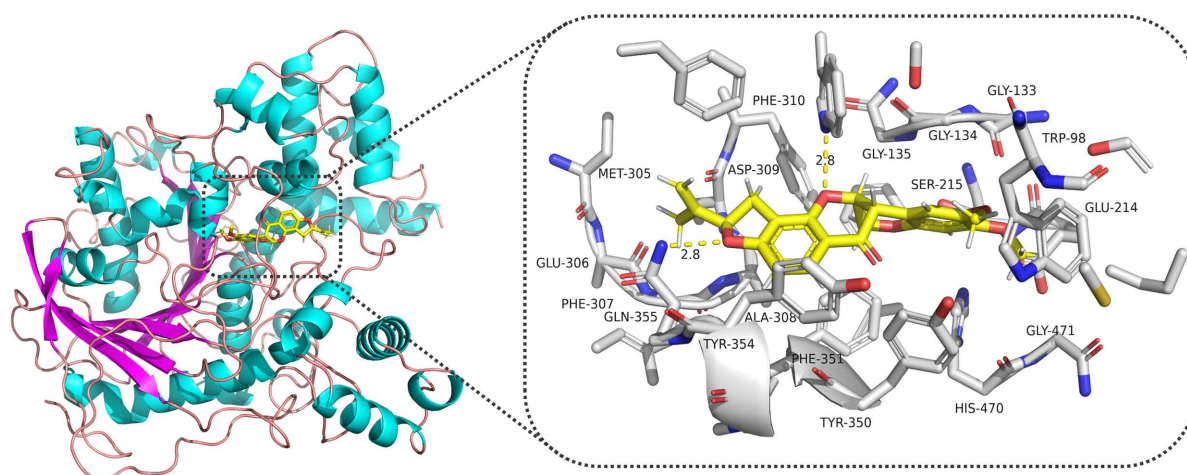


Figure 2. Protein structure of AChE and its binding pattern to rotenone
图 2. 乙酰胆碱酯酶 AChE 的蛋白质结构及与鱼藤酮的结合模式

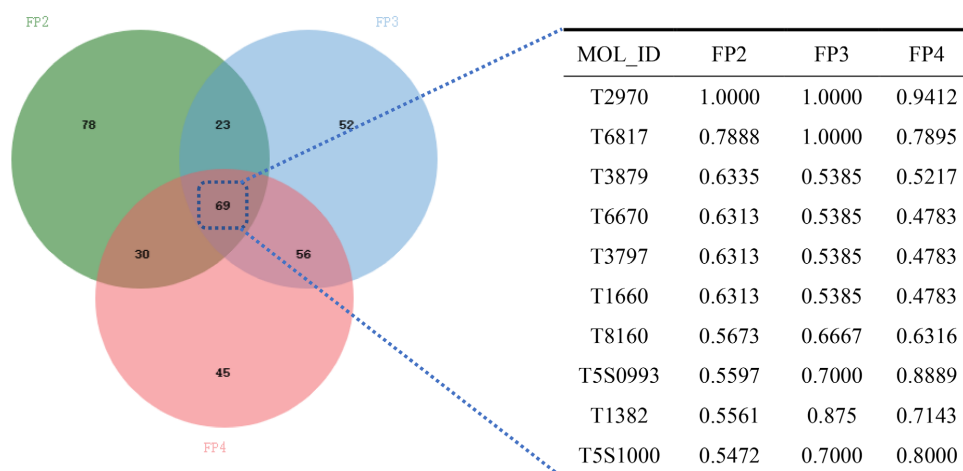


Figure 3. Venn diagram of the top 200 molecules in the similarity calculation methods of FP2, FP3 and FP4

图 3. FP2、FP3 和 FP4 三种相似性计算方法中前 200 个分子的 Venn 图

3.3. 基于分子对接的虚拟筛选

基于靶标乙酰胆碱酯酶 AChE 的三维空间结构, 对成药性良好的 49 个天然分子进行分子对接, 计算其与松材线虫靶点蛋白的结合亲和力。其中, 鱼藤酮分子的亲和力 K_i 为 $127.71 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 最终筛选获得结合亲和力高于鱼藤酮的 21 个候选化合物, 其亲和力 K_i 及类药性相关数据列于表 1 中。21 个候选化合物中与受体蛋白结合亲和力最高的为 M1 鱼藤素小分子, K_i 为 $8.57 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其次为 M2 槐黄烷酮 G 小分子, K_i 为 $16.83 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。为进一步探究上述两分子与乙酰胆碱酯酶受体蛋白间的作用模式, 分别采用 PyMOL 和 LigPlus 软件可视化了 AChE-M1 和 AChE-M2 两蛋白复合物的 3D 和 2D 相互作用关系, 如图 4 所示。从相互作用可视化图 3 发现, M1 和 M2 小分子与鱼藤酮相似, 在与乙酰胆碱酯酶蛋白结合时, 紧紧包裹于由 SER215、HIS470、GLU214、GLY133、TYR350、TRP98、ALA308、PHE351 和 GLU306 等氨基酸残基形成的活性口袋中。其中, 通过图 4 的 2D 相互作用图可知, 在 AChE-M1 蛋白复合物中, M1 小分子主要与活性口袋中的 GLN355、TYR354、TRP98、GLN214、HIS470、TRP137 及 PHE310 等

氨基酸残基形成疏水作用, 最终与 AChE 受体蛋白形成稳定的复合物。而 M2 小分子, 不仅与上述氨基酸残基形成疏水作用, 还分别与 ASP309、ALA308 和 GLU306 氨基酸残基形成 4 个氢键, 研究报道氢键在药物分子与靶标蛋白的作用中是最重要的一种结合作用, 因此, M2 小分子可与 AChE 蛋白紧密结合, 形成稳定的复合物。上述结果在蛋白-配体复合物的 3D 作用关系图中被进一步验证。研究表明 M1 和 M2 小分子与 AChE 蛋白的作用方式与鱼藤酮的一致, 均为氢键和疏水作用等作用力促进复合物的形成, 以抑制松材线虫乙酰胆碱酯酶 AChE 的活性, 最终导致松材线虫神经冲动的阻断, 发挥灭杀松材线虫的作用, 为最佳命中分子。

Table 1. Related parameters of 21 candidate compounds
表 1. 21 个候选化合物的相关参数

| NO. | MOL_ID | 对接分数 (kcal/mol) | Cas 号 | 分子量 | HBA | HBD | logp | nRB | K_i (nmol·L ⁻¹) |
|--------|---------|--------------------|------------|--------|-----|-----|-------|-----|----------------------------------|
| ligand | 鱼藤酮 | -9.4 | 83-79-4 | 396.16 | 6 | 0 | 3.96 | 3 | 127.71 |
| M1 | T6817 | -11.0 | 522-17-8 | 371.97 | 6 | 0 | 2.341 | 2 | 8.57 |
| M2 | T5S1000 | -10.6 | 97938-30-2 | 395.97 | 6 | 4 | 4.05 | 6 | 16.83 |
| M3 | TN1774 | -10.5 | 52801-22-6 | 303.98 | 4 | 2 | 2.834 | 3 | 19.93 |
| M4 | T3931 | -10.4 | 31524-62-6 | 303.98 | 4 | 2 | 2.494 | 3 | 23.60 |
| M5 | T3056 | -10.4 | 19879-30-2 | 315.98 | 4 | 2 | 2.815 | 4 | 23.60 |
| M6 | T3846 | -10.4 | 19879-32-4 | 303.98 | 4 | 0 | 2.494 | 3 | 23.60 |
| M7 | T8188 | -10.3 | 477-49-6 | 391.96 | 8 | 0 | 0.999 | 4 | 27.94 |
| M8 | T3S0136 | -10.3 | 20784-60-5 | 315.98 | 4 | 2 | 3.613 | 6 | 27.94 |
| M9 | T5703 | -10.3 | 34539-65-6 | 347.97 | 6 | 2 | 2.343 | 6 | 27.94 |
| M10 | T4586 | -10.3 | 5162-01-6 | 347.97 | 6 | 2 | 2.343 | 6 | 27.94 |
| M11 | T3S2344 | -10.1 | 24502-79-2 | 347.97 | 6 | 2 | 2.343 | 6 | 39.16 |
| M12 | T4S0999 | -10.1 | 70872-29-6 | 331.97 | 5 | 2 | 2.734 | 4 | 39.16 |
| M13 | T4S1545 | -10.0 | 51020-87-2 | 303.98 | 4 | 0 | 3.738 | 3 | 46.37 |
| M14 | T6S1543 | -9.8 | 2680-81-1 | 303.98 | 4 | 1 | 3.490 | 4 | 65.00 |
| M15 | T5S0993 | -9.8 | 34981-26-5 | 407.97 | 6 | 3 | 4.371 | 7 | 65.00 |
| M16 | T6S0525 | -9.7 | 24211-30-1 | 283.97 | 5 | 3 | 1.152 | 1 | 76.95 |
| M17 | T3373 | -9.7 | 5058-13-9 | 307.97 | 5 | 0 | 2.794 | 4 | 76.95 |
| M18 | T5S2350 | -9.6 | 69091-17-4 | 403.96 | 8 | 2 | 2.203 | 9 | 91.11 |
| M19 | T5S0229 | -9.5 | 480-43-3 | 271.97 | 5 | 2 | 1.111 | 2 | 107.87 |
| M20 | T3777 | -9.5 | 73069-27-9 | 363.96 | 7 | 0 | 2.770 | 5 | 107.87 |
| M21 | T5S2343 | -9.5 | 24502-78-1 | 311.97 | 6 | 2 | 1.465 | 5 | 107.87 |

打分高低一致。从各组分的能量发现，范德华力、静电势能及表面溶剂化作用均有利于配体小分子与受体蛋白结合，其中范德华力对体系的结合最有利，而极性溶剂化作用则不利于体系结合。MM/PBSA 结合自由能分析表明，命中药物分子主要利用疏水作用和氢键相互作用与受体蛋白紧密结合，从而发挥抑制乙酰胆碱酯酶的作用，有望成为松材线虫 AChE 抑制剂的候选分子。

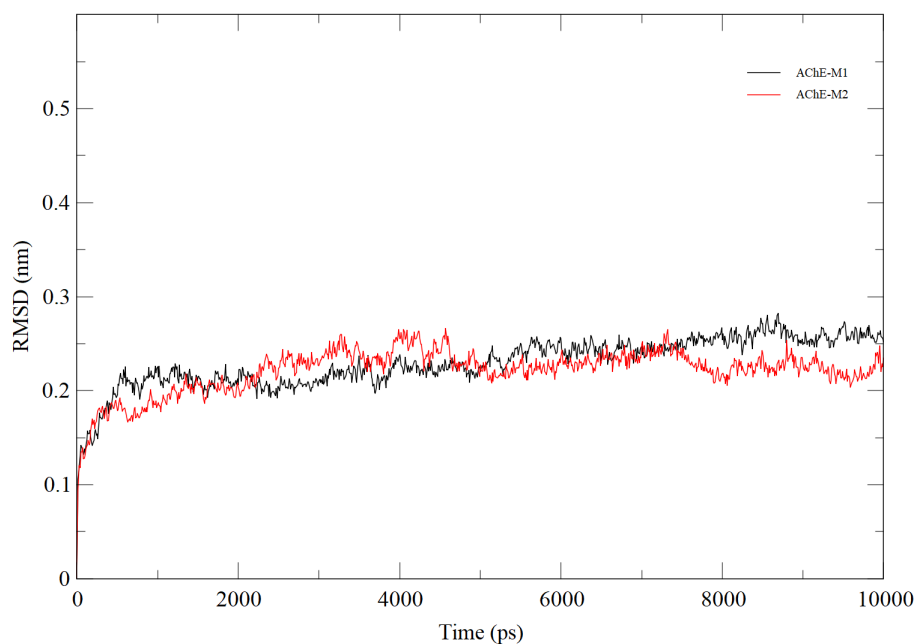


Figure 5. RMSD value of $C\alpha$ atom of acetylcholinesterase protein backbone during MD
图 5. 乙酰胆碱酯酶蛋白主链 $C\alpha$ 原子随时间变化的 RMSD 值

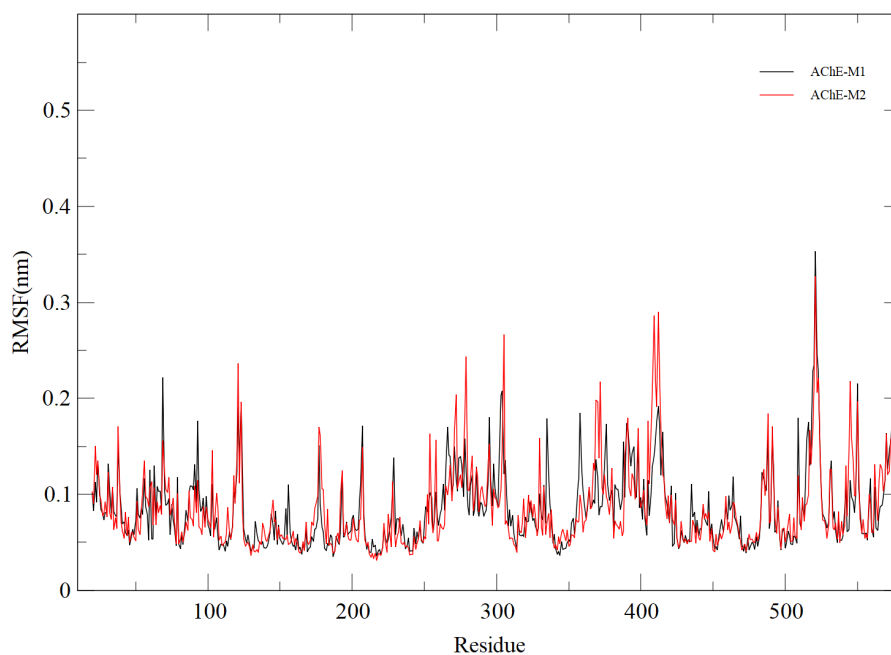


Figure 6. Distribution of RMSF values of protein skeleton atoms in protein-ligand complexes
图 6. 蛋白 - 配体复合物中蛋白骨架原子的 RMSF 值分布图

Table 2. Binding free energy and related energy components of AChE-M1 and AChE-M2 complex system
表 2. AChE-M1 和 AChE-M2 复合物体系的结合自由能及相关能量组分

| 化合物 | 范德华力 | 静电势能 | 极性溶剂化作用 | 表面溶剂化作用 | 结合自由能 |
|-----|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| M1 | -170.639 ± 0.577 | -51.028 ± 0.299 | 65.182 ± 0.672 | -19.216 ± 0.059 | -175.701 ± 0.724 |
| M2 | -216.047 ± 0.922 | -60.328 ± 0.922 | 160.319 ± 0.802 | -22.779 ± 0.056 | -138.828 ± 1.049 |

4. 结论

松材线虫的乙酰胆碱脂酶 AChE 作为生物神经传导中的一种糖蛋白, 可通过降解乙酰胆碱来终止神经递质对突触后膜兴奋的刺激, 最终发挥对生物中正常肌肉活动的调节作用, 可成为灭杀松材线虫抑制剂开发的一个有效靶标。本文通过对松材线虫乙酰胆碱脂酶蛋白的同源建模, 构建了靶标的蛋白质结构。运用基于已知活性配体结构的相似性筛选、类药性评估、分子对接的虚拟筛选及分子动力学模拟等从天然产物数据库中经过多轮筛选, 发现抑制活性较高的 2 个最佳命中分子。M1 和 M2 小分子与参考化合物(鱼藤酮)的结构类似, 分子对接分数远高于参考化合物, 且通过分子动力学模拟发现, 两个分子与 AChE 受体蛋白结合形成的复合物具有较高的稳定性, 结合自由能计算结合受体-配体相互作用模式分析进一步发现 M1 和 M2 小分子主要通过静电、疏水作用及范德华力与受体蛋白稳定结合, 发挥酶抑制作用, 可作为 AChE 抑制剂的先导化合物, 为开发灭杀松材线虫强效 AChE 酶抑制剂提供参考。

基金项目

重庆英才计划-创新创业示范团队项目(CQYC20210309793)资助; 重庆英才计划-基础研究与前沿探索项目(cstc2022ycjh-bgzxm0029)资助。

参考文献

- [1] 王伟妙. 松材线虫病的分布, 危害及防治应对措施[J]. 南方农业, 2022, 16(12): 69-71.
- [2] 叶建仁. 松材线虫病在中国的流行现状、防治技术与对策分析[J]. 林业科学, 2019, 55(9): 1-10
- [3] 李成, 刘波. 我国松材线虫病的发生与防治技术研究进展[J]. 吉林林业科技, 2021, 50(2): 39-41+48
- [4] 杨忠岐, 王小艺, 张翌楠, 等. 释放花绒寄甲和设置诱木防治松褐天牛对松材线虫病的控制作用研究[J]. 中国生物防治学报, 2012, 28(4): 490-495.
- [5] 王敏敏, 叶建仁, 潘宏阳. 松材线虫病致病机理和防治技术研究进展[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2006, 30(2): 103-107.
- [6] 朱宁波. 《松材线虫病防治技术方案》和《松材线虫病疫区和疫木管理办法》重新修订发布[J]. 中国森林病虫, 2019, 38(1): 47-48
- [7] 胡林, 黄晓东, 夏坚, 等. 鱼藤酮及六种吡啶、咪唑类医用驱虫剂对松材线虫的作用[J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(2): 204-207.
- [8] 熊玉芬. 松材线虫乙酰胆碱酯酶基因 Bx-ace-2 克隆和序列分析及 RNAi 研究[D]: [硕士学位论文]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- [9] 刘立宏, 王峰, 马玲, 等. 松材线虫乙酰胆碱酯酶 1 基因沉默及蛋白抑制剂[J]. 林业科学, 2015, 51(1): 66-73.
- [10] Huang, X., Lee, B., Johnson, G., *et al.* (2005) Novel Assay Utilizing Fluorochrome-Tagged Physostigmine (Ph-F) to *in Situ* Detect Active Acetylcholinesterase (AChE) Induced during Apoptosis. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, **4**, 140-147. <https://doi.org/10.4161/cc.4.1.1322>
- [11] Jin, Q.H., He, H.Y., Shi, Y.F., *et al.* (2004) Overexpression of Acetylcholinesterase Inhibited Cell Proliferation and Promoted Apoptosis in NRK Cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, **25**, 1013-1021.
- [12] Zhuang, Y., Briminioin, S. and Tang, X. (2003) Apoptosis Induced by Beta-Amyloid 25-35 in Acetylcholinesterase-Overexpressing Neuroblastoma Cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, **24**, 853-858.

- [13] 杨磊. 乙酰胆碱酯酶与细胞凋亡的相关性的研究[D]: [博士学位论文]. 上海: 中国科学院研究生院(上海生命科学研究院), 2003.
- [14] Sakhteman, A., Pasdaran, A., Afifi, M., *et al.* (2020) An Assay on the Possible Effect of Essential Oil Constituents on Receptors Involved in Women's Hormonal Health and Reproductive System Diseases. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*, **25**. <https://doi.org/10.1177/2515690X20932527>
- [15] Trott, O. and Olson, A.J. (2010) AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, **31**, 455-461.
- [16] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0. Schrödinger, LLC.
- [17] Laskowski, R.A. and Swindells, M.B. (2011) LigPlot+: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **51**, 2778-2786. <https://doi.org/10.1021/ci200227u>
- [18] Lohning, A.E., Levonis, S.M., Williams-Noonan, B. and Schweiker, S.S. (2017) A Practical Guide to Molecular Docking and Homology Modelling for Medicinal Chemists. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **17**, 2023-2040. <https://doi.org/10.2174/1568026617666170130110827>
- [19] Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., *et al.* (2001) Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **46**, 3-26. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0)
- [20] 刘永杰, 向慧龙, 陈浩, 徐凌云. 基于分子对接技术石菖蒲中抗抑郁活性成分的筛选[J]. 中草药, 2019, 50(11): 2612-2619.
- [21] Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., *et al.* (2005) GROMACS: Fast, Flexible, and Free. *Journal of Computational Chemistry*, **26**, 1701-1718. <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>
- [22] Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D., *et al.* (2008) GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation*, **4**, 435-47. <https://doi.org/10.1021/ct700301q>
- [23] Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., *et al.* (2004) UCSF Chimera—A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *Journal of Computational Chemistry*, **25**, 1605-1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- [24] Silva, A. and Vranken, W.F. (2012) ACPYPE-Antechamber Python Parser Interface. *BMC Research Notes*, **5**, Article No. 367. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-367>
- [25] Preston, S., Korhonen, P.K., Mouchiroud, L., *et al.* (2017) Deguelin Exerts Potent Nematocidal Activity via the Mitochondrial Respiratory Chain. *FASEB Journal*, **31**, 4515-4532. <https://doi.org/10.1096/fj.201700288R>
- [26] Tuli, H.S., Mittal, S., Loka, M., *et al.* (2021) Deguelin Targets Multiple Oncogenic Signaling Pathways to Combat Human Malignancies. *Pharmacological Research*, **166**, Article ID: 105487. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105487>