

## 去甲二氢愈创木酸靶向 MyD88 抗肿瘤研究

王月<sup>1,2</sup>, 屈祎<sup>1,2</sup>, 柯细松<sup>1,2</sup>, 张雪<sup>1,2\*</sup>

(1. 上海中医药大学交叉科学研究院, 上海 201203; 2. 上海市中药化学生物学前沿基地, 上海 201203)

**摘要:** 本研究主要探究髓系分化初级反应蛋白 88 (myeloid differentiation primary response protein 88, MyD88) 在肿瘤发生发展中的作用, 发现靶向 MyD88 的抗肿瘤活性小分子。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术和裸鼠移植瘤模型检测 MyD88 缺失对肿瘤生长的作用, 实验动物伦理审查编号为 PZSHUTCM200828006; 利用微量热泳动技术 (microscale thermophoresis technology, MST) 筛选直接结合 MyD88 的天然产物小分子, 并进一步检测候选小分子对细胞增殖的影响。结果表明, MyD88 缺失后显著抑制结肠癌、胰腺癌和皮肤癌的肿瘤生长并且抑制肿瘤细胞的 NF- $\kappa$ B 信号通路活性; MST 结果发现, 去甲二氢愈创木酸 (nordihydroguaiaretic acid, NDGA) 与 MyD88 直接结合, 其结合解离常数  $K_d = 14.61 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 去甲二氢愈创木酸阻断 NF- $\kappa$ B 报告系统的激活, 并抑制 NF- $\kappa$ B 通路关键因子 p65 磷酸化; 此外, 克隆形成实验结果发现去甲二氢愈创木酸抑制肿瘤细胞增殖。以上结果表明, MyD88 是结肠癌、胰腺癌、皮肤癌潜在治疗靶标, 去甲二氢愈创木酸与 MyD88 直接结合并且抑制其下游 NF- $\kappa$ B 信号通路的活性, 从而抑制胰腺癌、皮肤癌及结肠癌细胞增殖。

**关键词:** 髓系分化初级反应蛋白 88; 结肠癌; 皮肤癌; 胰腺癌; NF- $\kappa$ B 信号通路; 去甲二氢愈创木酸

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)04-0946-08

## Research on the anti-tumor effect of nordihydroguaiaretic acid targeting MyD88

WANG Yue<sup>1,2</sup>, QU Yi<sup>1,2</sup>, KE Xi-song<sup>1,2</sup>, ZHANG Xue<sup>1,2\*</sup>

(1. Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai Frontiers Science Center of TCM Chemical Biology, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** This study mainly explores the role of myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88) in tumorigenesis and development, to identify active compounds targeting MyD88. CRISPR/Cas9 system and xenograft tumor model were used to detect the effect of MyD88 deletion on tumor growth, and the experimental animal ethics review number was PZSHUTCM200828006. Microscale thermophoresis technology (MST) was used to identify compounds directly bind to MyD88 and further detect the impact of candidate small molecules on cell proliferation. Results showed that depletion of MyD88 significantly inhibited xenograft tumor growth of colon cancer, pancreatic cancer and skin cancer and the activity of NF- $\kappa$ B signaling pathway. MST showed that nordihydroguaiaretic acid (NDGA) bound to MyD88, with the binding dissociation constant  $K_d$  of  $14.61 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . NDGA inhibited NF- $\kappa$ B reporting system activation and phosphorylation of p65, the key factor in NF- $\kappa$ B signal pathway. In addition, the results of colony formation assay showed that NDGA suppressed the proliferation of tumor cells. The above results show that, MyD88 is a potential therapeutic target for colon cancer, pancreatic cancer and skin cancer, NDGA directly binds to MyD88 and inhibits the activity of NF- $\kappa$ B signaling pathway, as well as inhibits the proliferation of pancreatic cancer, skin cancer and colon cancer cells.

收稿日期: 2022-11-17; 修回日期: 2023-01-03.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81803754).

\*通讯作者 Tel: 86-21-51322419, E-mail: xuezhang@shutcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1244

**Key words:** myeloid differentiation primary response protein 88; colon cancer; skin cancer; pancreatic cancer; NF- $\kappa$ B signaling pathway; nordihydroguaiaretic acid

髓系分化初级反应蛋白 88 (myeloid differentiation primary response protein 88, MyD88) 是细胞内重要的接头蛋白 (adapter)<sup>[1]</sup>, 现有研究发现 MyD88 是除了 Toll 样受体 3 (Toll-like receptor 3, TLR3)、白细胞介素-1 受体 (IL-1R) 和 IL-18R 外所有 TLRs 的适配器分子<sup>[2]</sup>。微生物、内源性配体和炎症介质刺激 TLRs 后, MyD88 二聚化并被招募与白细胞介素-1 受体相关激酶 4 (interleukin-1 receptor-associated kinase 4, IRAK4) 形成复合物, 即“Myddosome”, 介导 IRAK1、IRAK2 以及下游 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活<sup>[3,4]</sup>。结构上 MyD88 主要由死亡结构域 (death domain, DD) 和 Toll/IL-1 受体 (Toll/IL-1 receptor, TIR) 结构域组成, 中间由一个短连接序列中间域 (intermediate, INT) 相连<sup>[5]</sup>。

MyD88 参与癌基因诱导的细胞内在炎症和肿瘤外部炎症过程, 在多种实验性致癌模型的研究中, MyD88 对肝癌、卵巢癌、淋巴瘤及肉瘤的发生都是明确的促进作用, 但其对结肠癌、皮肤癌及胰腺癌的发生发展却起着相矛盾的作用<sup>[6]</sup>。在胰腺癌中, 抑制 MyD88 通路加剧了胰腺癌的发生和癌变<sup>[7]</sup>。然而, 胰腺癌的发生又依赖于 KRAS<sup>G12D</sup> 诱导的 IL-1 $\alpha$ -MyD88 自分泌环激活 NF- $\kappa$ B 信号通路<sup>[8]</sup>。在结肠癌中, 敲除 MyD88 的 *Apc*<sup>min/+</sup> 自发性肠道肿瘤模型小鼠的小肠腺瘤数量明显减少<sup>[9]</sup>。而在氮氧乙烷 (AOM) 结肠癌小鼠模型 (colitis-associated cancer, CAC) 中, 敲除 MyD88 导致腺瘤形成显著增加, 并进展为浸润性腺癌<sup>[10]</sup>。在 DMBA (7, 12-dimethylbenz[a]anthracene)/TPA (12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate) 和 MCA (3-methylcholanthrene) 诱导的皮肤癌模型上, MyD88 敲除小鼠比野生型小鼠产生更少的皮肤乳头状瘤<sup>[11]</sup>。然而, TLR4-MyD88 在 DMBA 单独诱发的皮肤化学癌变中起促进作用<sup>[12]</sup>。综上所述, 通过各种体内疾病模型得到 MyD88 作用机制各不相同, 故 MyD88 对结肠癌、胰腺癌、皮肤癌的发生发展作用仍有待阐明。

2015 年, Olson 等<sup>[13]</sup>通过高通量计算机虚拟筛选发现 T5910047 能够干扰 MyD88 的 TIR-TIR 同型相互作用, 从而抑制促炎症的下游信号传递; 二代药物 T6167923 靶向 MyD88 的 TIR 域, 阻止了 MyD88 同二聚体的形成, 干扰 MyD88 信号, 减轻小鼠的促炎信号。通过筛选定向合成的 MyD88 候选小分子库, 2016 年 Zhou 课题组<sup>[14]</sup>发现 TJ-M2010-5 特异性结合到 MyD88 的 TIR 结构域, 干扰其二聚化从而影响蛋白功能, 能够

显著降低 AOM/DSS 引起的结肠炎, 阻止 CAC 发展, 降低小鼠死亡率。TJ-M2010-5 可通过阻断 TLR7/MyD88/NF- $\kappa$ B 和 TLR7/MyD88/MAPK 信号通路来纠正 R848 诱导的 B 细胞狼疮样免疫紊乱<sup>[15]</sup>。2019 年, Chen 等<sup>[16]</sup>发现 2-amino-4-phenylthiazole 类似物 15d 与 MyD88 相互作用并抑制其同聚, 抑制脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的巨噬细胞炎性细胞因子, 可阻止 LPS 诱导的 MAPK 和 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活, 并且 15d 对 LPS 所致小鼠急性肺损伤有保护作用。然而, 以往这些研究主要聚焦在抑制 MyD88 治疗炎症与免疫相关心脑血管等疾病, 靶向 MyD88 抗肿瘤的研究及相关小分子鲜见报道。

## 材料与方法

**细胞株** 293FT 人胚胎肾细胞、人结肠癌细胞 HCT116、人胰腺癌细胞 PANC1、人皮肤癌细胞 A375 购自 ATCC。

**主要试剂** 去甲二氢愈创木酸 (BD145457-0.75 g) 购自上海毕得医药科技股份有限公司, 天然产物活性小分子库 (货号: HY-L021) 购自 MedChemExpress 公司。Dual-Luciferase® 双萤光素酶报告基因检测系统 (E1960) 购自普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司。RPMI 1640 培养基 (C22400500CP)、DMEM 培养基 (C11965500CP)、胰蛋白酶 (25200072)、胎牛血清 (10100147)、M-PER™ 哺乳动物蛋白抽提试剂 (78501)、RIPA 裂解和提取缓冲液 (89900)、蛋白酶抑制剂 (A32963) 购自美国 Thermo Fisher Technology 公司。CCK-8 试剂盒 (K1018) 购自美国 APEX BIO 公司。BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (P0009) 购自上海碧云天生物技术有限公司。MyD88 抗体 (4283S)、GAPDH 抗体 (5174S)、 $\beta$ -actin 抗体 (8457S) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司。Flag 抗体 (F1804) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司。NF- $\kappa$ B 荧光素酶报告基因质粒由华中科技大学周平教授赠送。

**实验动物** BALB/c 裸鼠, 5~6 周龄, 雄性, SPF 级, 购买并饲养于上海西普尔-必凯实验动物有限公司 [许可证号: SCXK (沪) 2018-0006], 温度 (20  $\pm$  2) °C, 湿度 (55  $\pm$  2)%, 自由摄食和饮水, 每日光照/黑暗各 12 h (实验动物伦理审查编号为 PZSHUTCM200828006)。

**仪器** 细胞计数仪 (美国 Thermo Fisher 公司); 多功能酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); 流式细胞仪 (美国

Beckman 公司); 微量热泳动仪 (德国 Nano temper 公司); 核酸凝胶剂蛋白质印迹成像系统 (美国 Bio-rad 公司)。

**细胞培养** 将细胞悬液加入已含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素和链霉素培养基的细胞培养皿中, 吹打均匀, 于恒温 CO<sub>2</sub> 培养箱 (37 °C 含有 5% CO<sub>2</sub>) 培养, 待细胞密度为 70%~80% 时, 使用 0.125% 胰蛋白酶以 1:3 比例传代。HCT116 结肠癌细胞系使用 RPMI 1640 完全培养基, PANC1 胰腺癌细胞及 A375 皮肤癌细胞均使用完全 DMEM 培养基。

**Western blot 检测蛋白表达水平** 使用 RIPA 蛋白裂解液提取细胞蛋白, 冰上孵育 30 min, 4 °C、12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 收集上清。进行蛋白定量及变性后, 电泳并且使用 PVDF 膜进行转膜, 电流恒定 200 mA, 时间为 2 h。漂洗膜后加入 5% 脱脂奶粉, 室温摇床封闭 1 h, 依次孵育一抗二抗, 最后使用蛋白印迹成像系统显影。实验分组: ① 空白对照组; ② 溶剂对照组; ③ 去甲二氢愈创木酸 5 μmol·L<sup>-1</sup>; ④ 去甲二氢愈创木酸 10 μmol·L<sup>-1</sup>; ⑤ 去甲二氢愈创木酸 20 μmol·L<sup>-1</sup>。

**CRISPR/Cas9 技术敲除 MyD88** 合成表 1 靶向 MyD88 的 sgRNAs 序列, 构建到 pL-CRISPR.EFS.GFP 慢病毒载体中, 共转染至 293FT 细胞中, 待 48 h 后转染效率较高后, 提取细胞基因组, 根据表 2 的阳性引物和阴性引物进行 PCR 电泳及测序鉴定, 待电泳及测序结果显示成功敲除 MyD88 基因, 则在目的肿瘤细胞中进行 MyD88 的敲除。转染 48 h 后通过流式细胞仪分选出带有 GFP 荧光的细胞, 并以每孔一个细胞的密度将细胞种入 96 孔板中, 后续持续培养并对细胞进行扩增。通过 PCR 电泳、测序及 Western blot 鉴定, 确认 MyD88 的敲除情况。

Table 1 sgRNAs sequence

sgRNA	Sequence
sgRNA1	F: CACCGAACGTGCGGACACAGGTGG R: AAACCCACCTGTGTCCGCACGTTTC
sgRNA2	F: CACCGAGGTTGGCTAGAAGGCCAC R: AAACGTGGCCTTCTAGCCAACCTC

Table 2 Primer sequence

Primer	Sequence
Negative	F: CTGCTCGAGCTGCTTACCAA R: CAGGGGGTCAATCAAGTGTGG
Positive	F: TGCCGCAGGAGAAAGAGGA R: GCTAGGAGGAGATGCCAGTA

**裸鼠移植瘤实验** 将人结肠癌 HCT116 及对应的 MyD88 敲除细胞按照每毫升 1×10<sup>7</sup> 个细胞重悬于 PBS

中, 将人结肠癌 HCT116 细胞以每只 200 μL 接种于 5~6 周龄的雄性裸鼠右腋的皮下, 使每只接种细胞数为 1×10<sup>6</sup> 个。同样, 接种人胰腺癌细胞 PANC1 及对应的 MyD88 敲除细胞 (5×10<sup>6</sup> 个/只)、人皮肤癌细胞 A375 及对应的 MyD88 敲除细胞 (1×10<sup>6</sup> 个/只)。形成可触及的瘤块后测量瘤体大小并且取材后对取出的瘤体进行称量。

**NF-κB 荧光素酶实验** 取对数生长期的细胞, 在 96 孔板中每孔铺 20 000 个细胞, 将铺好板的细胞放入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养。24 h 后, 同时每孔转染 50 ng NF-κB 荧光素酶报告基因质粒和 5 ng 内参 Renilla 荧光素酶表达载体; 若需在 293FT 细胞中使用外源 MyD88 激活 NF-κB 信号通路, 则需同时转染 60 ng MyD88 外源表达质粒; 继续培养 24 h, 然后检测荧光素酶强度; 若需给药, 则转染 24 h 后给药, 给药处理 24 h 后检测荧光素酶强度。NF-κB 信号通路活性用 NF-κB 荧光素酶与内参的荧光比值来表示。实验分组: ① 空白对照组; ② 溶剂对照组; ③ 去甲二氢愈创木酸 5 μmol·L<sup>-1</sup>; ④ 去甲二氢愈创木酸 10 μmol·L<sup>-1</sup>; ⑤ 去甲二氢愈创木酸 20 μmol·L<sup>-1</sup>。

**微量热泳动技术 (microscale thermophoresis technology, MST) 实验筛选与鉴定小分子与 MyD88 结合情况** 在处于对数生长期的 293FT 细胞中, 将绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP)、MyD88 全序列和 3 个截断突变体的质粒转染 24 h 后, 用新鲜配置的 M-PER 细胞裂解液制备过表达了 GFP、MyD88 以及截断突变体的细胞蛋白。首先, 使用微量热泳动仪的专家模式 (expert mode) 对所有小分子进行与 MyD88 蛋白结合的初筛, 取响应值 (ΔR) 大于 7 的小分子作为候选; 再使用结合亲和力 (binding affinity) 模式对梯度稀释的小分子进行结合亲和力复筛, 如果结合则在同样的条件下重复 3 次; 再使用仅表达 GFP 的细胞裂解液作为对照。再将候选小分子与不同的 MyD88 截断突变体进行结合亲和力实验, 检测小分子的结合区域。将所有数据利用 MO. Affinity Analysis (x86) 软件分析得到组间对比的结合亲和力曲线图和平均平衡解离常数 (K<sub>d</sub>) 值。

**细胞克隆形成实验** 取对数生长期的细胞, 在 6 孔板中每孔铺 1 500 个细胞, 将铺好板的细胞放入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养, 3 天换 1 次液, 并在显微镜下观察克隆大小; 若需小分子处理, 则铺板 1 天后给药; 待孔中大多数单克隆中细胞个数大于 50 时, 停止实验; 然后进行结晶紫染色。根据细胞耐受不同, HCT116 细胞实验分组: 溶剂对照组和去甲二氢愈创木酸处理组 2、4、8、16 μmol·L<sup>-1</sup>; A375 细胞实验分组:

溶剂对照组和去甲二氢愈创木酸处理组 1、2、4、8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; PANC1 细胞实验分组: 溶剂对照组和去甲二氢愈创木酸处理组 0.5、1、2、4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**CCK-8 实验** 取对数生长期的细胞, 在 96 孔板中每孔铺 5 000 个细胞, 将铺好板的细胞轻轻放入 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中继续培养, 铺板后按照分组分别于 1、2、3、4 天更换培养基 100  $\mu\text{L}$ ; 若需小分子处理, 则铺板后 1 天给药, 给药 3 天后更换培养基 100  $\mu\text{L}$ ; 再每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1.5 h 后, 使用多功能酶标仪检测  $A_{450}$ , 细胞增殖率 (%) = 给药组  $A$  值/对照组  $A$  值。实验分组: 空白对照组、溶剂对照组及去甲二氢愈创木酸处理组 2、4、8、16、32、64、128  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**统计学分析** 应用 GraphPad Prism 8 软件对数据进行统计分析, 两组间数据分析采用  $t$  检验, 多组数据分析采用单因素方差分析。

## 结果

### 1 MyD88 是结肠癌、胰腺癌和皮肤癌的潜在治疗靶标

设计靶向 MyD88 DD 功能区段的 exon 1 和 exon 3 的 sgRNA1 与 sgRNA2 (图 1A), 利用 CRISPR/Cas9 系统在细胞中可将 DD 区敲除。通过 Western blot 实验鉴定在结肠癌细胞 HCT116 的 KO1、KO2 中、胰腺癌细胞 PANC1 的 KO1 中及皮肤癌细胞 A375 中的 KO1、KO2 中成功敲除 MyD88 (图 1B)。

本研究利用裸鼠移植瘤实验来检验 MyD88 的缺失对肿瘤生长的影响, 通过同时接种野生型与敲除 MyD88 的细胞, 根据测量瘤体生长体积及取材后瘤体重量发现 MyD88 的缺失使 HCT116、A375、PANC1 细胞移植瘤生长受到显著抑制 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ , 图 1C~E)。

NF- $\kappa\text{B}$  荧光素酶实验是基于含荧光素酶 (高斯荧光素酶) 启动子和数个串联的 NF- $\kappa\text{B}$  结合位点的荧光素酶表达载体, 利用激活的荧光素酶的表达强度来代表 NF- $\kappa\text{B}$  信号通路的活性强度。将荧光素酶报告系统转入野生型及 MyD88 敲除细胞中 24 h 后进行检测, 结果发现 MyD88 的敲除降低了 HCT116、A375、PANC1 细胞的 NF- $\kappa\text{B}$  信号通路活性 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , 图 1F)。

### 2 去甲二氢愈创木酸与 MyD88 直接结合

通过 MST 实验检测荧光信号的变化来筛选靶向结合 MyD88 的活性小分子, MST 实验的原理是小分子与蛋白结合后会影响到其微观热涌动的定向作用, 捕捉荧光信号并且通过平衡解离常数  $K_d$  来表示分子间的相互作用强弱。构建携带 GFP 与 Flag 标签的

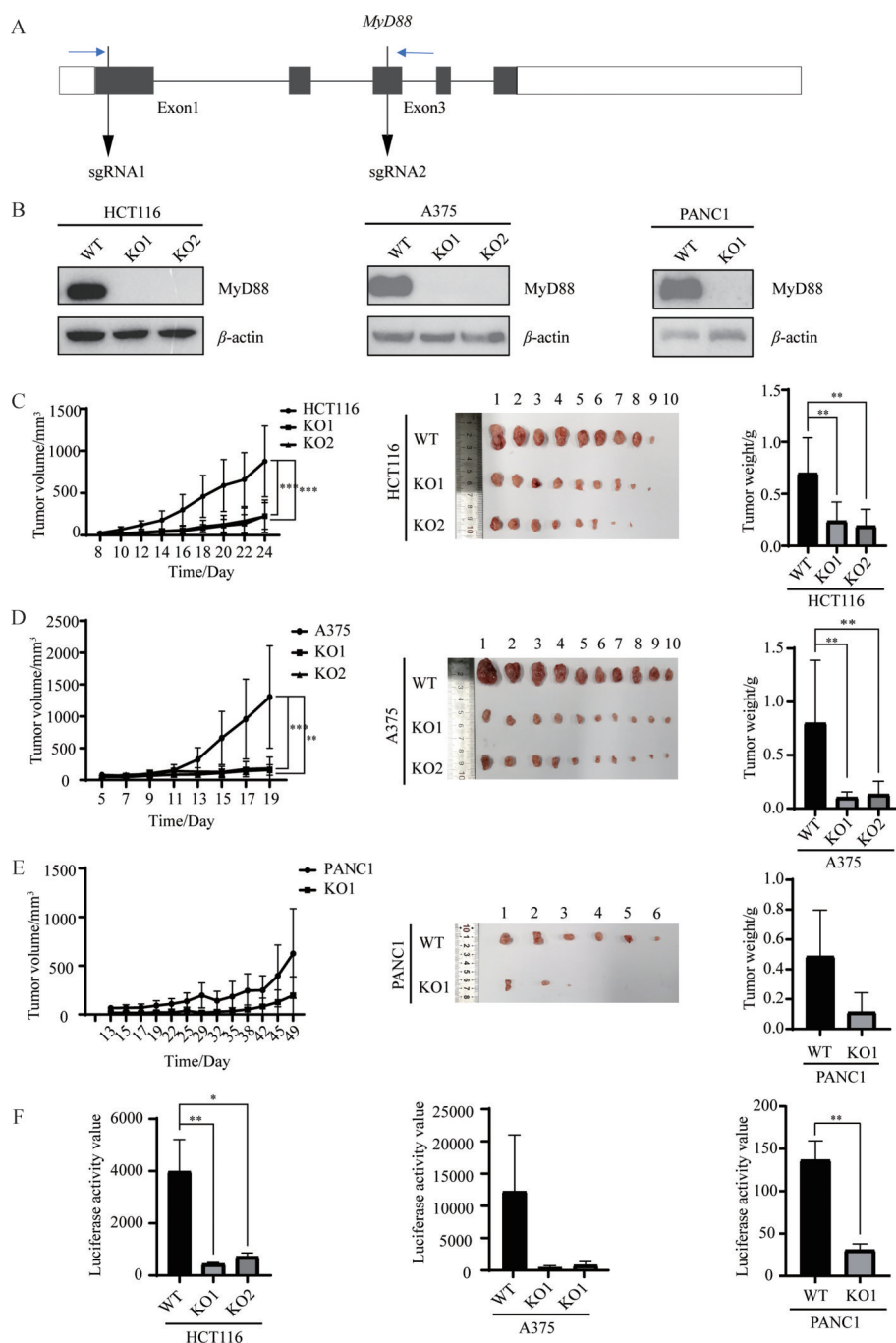
MyD88 融合蛋白, 利用 Western blot 实验鉴定其大小正确。最终筛选到去甲二氢愈创木酸 (图 2A) 与 MyD88 拟合出结合曲线 ( $K_d = 14.61 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 但与 GFP 没有结合, 其信噪比 (signal to noise ratio, S/N) 低, 未能得到  $K_d$  值, 表明去甲二氢愈创木酸与 MyD88 结合 (图 2B)。

MyD88 主要由两个结构域组成: 死亡结构域 (氨基酸 19~109) 和 Toll/IL-1 受体结构域 (氨基酸 159~296), 中间由一个短连接序列中间域 (氨基酸 110~155) 相连。由于 MyD88 的 3 个功能域 DD、INT 和 TIR 较小, 其单独的突变体可能不能形成正确的结构, 因此为了检测去甲二氢愈创木酸与 MyD88 的结合位点, 设计合成 3 个仅突变一个结构域并且保留另外两个结构域, 同时携带 GFP 与 Flag 标签的 MyD88 截断突变体 (图 2C), 利用 Western blot 实验鉴定突变体表达成功 (图 2D)。将去甲二氢愈创木酸与 MyD88 的 3 个突变体蛋白分别进行 MST 结合亲和力检测, 发现去甲二氢愈创木酸与 M2 有明显结合 ( $K_d = 8.01 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 而与 M1 和 M3 有微弱的结合趋势 (图 2E), 结果信噪比低, 未能得到  $K_d$  值。分析结果发现, 去甲二氢愈创木酸与 MyD88 的结合同时需要 DD 和 TIR 结构域。

### 3 去甲二氢愈创木酸抑制 MyD88 激活的 NF- $\kappa\text{B}$ 通路发挥肿瘤抑制作用

Western blot 实验发现去甲二氢愈创木酸在肿瘤细胞中均无明显的降低 MyD88 蛋白的作用 (图 3A)。为了进一步探究候选活性小分子能否通过靶向 MyD88 在肿瘤细胞中发挥功能作用, 利用 NF- $\kappa\text{B}$  荧光素酶报告系统来检测去甲二氢愈创木酸对 NF- $\kappa\text{B}$  信号通路的影响, 在易转染的 293FT 细胞中发现外源转入的 MyD88 能够显著激活 NF- $\kappa\text{B}$  通路活性 ( $P < 0.01$ , 图 3B)。进一步使用去甲二氢愈创木酸处理, 发现在浓度 10 和 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 去甲二氢愈创木酸能够显著抑制外源转入 MyD88 激活的 NF- $\kappa\text{B}$  信号通路活性 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , 图 3B)。利用 Western blot 实验发现 PANC1 细胞中, 去甲二氢愈创木酸减少胞内 p65 及 p-p65 水平 (图 3C)。p65 也被称为 RelA, 是构成 NF- $\kappa\text{B}$  转录因子家族的 5 种成分之一, 与 p50 能够构成在 NF- $\kappa\text{B}$  信号传导通路中最为常见的异源二聚体, 其磷酸化表示 NF- $\kappa\text{B}$  信号通路的激活。分析结果提示, 去甲二氢愈创木酸抑制肿瘤细胞中的 NF- $\kappa\text{B}$  及其磷酸化蛋白表达。

CCK-8 实验结果表明, 去甲二氢愈创木酸对结肠癌细胞 HCT116、胰腺癌细胞 PANC1、皮肤癌细胞 A375 均有抑制增殖的作用 (图 3D), 进一步利用克隆形成实验发现, 胰腺癌细胞 PANC1 对去甲二氢愈创木



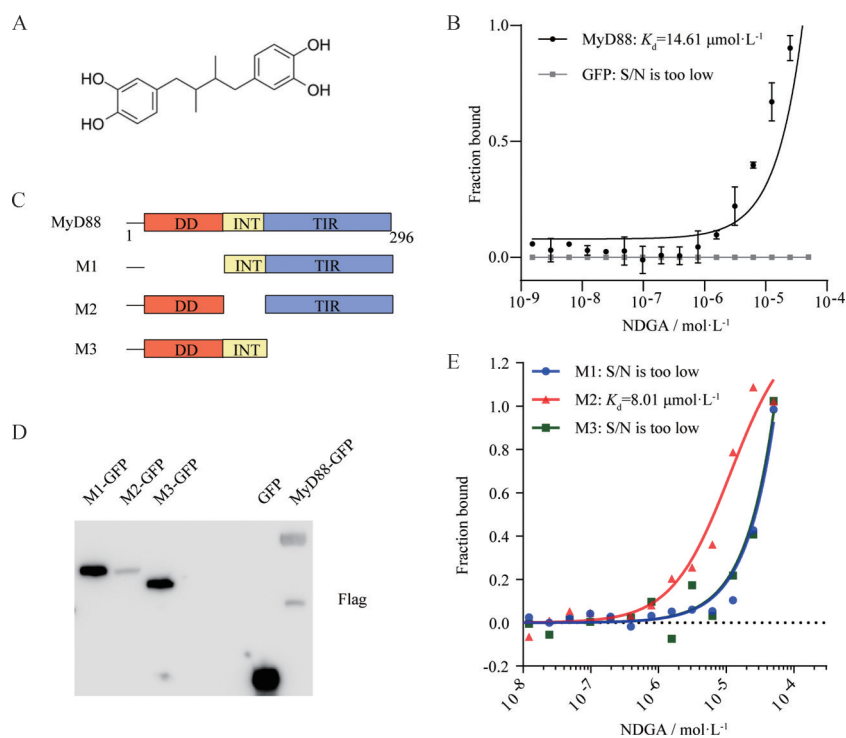
**Figure 1** MyD88 is a potential therapeutic target for colon, pancreatic and skin cancer. A: Schematic diagram of sgRNAs targeting MyD88 exons; B: Western blot to detect the expression of MyD88 in HCT116, A375 and PANC1-wild type and MyD88-KO cells ( $n = 3$ ); C: MyD88-KO HCT116 cells xenograft growth curve, tumor figure and weight of transplanted tumor in nude mice ( $n = 10$ ); D: MyD88-KO A375 cells xenograft growth curve, tumor figure and weight of transplanted tumor in nude mice ( $n = 10$ ); E: MyD88-KO PANC1-wild type cells xenograft growth curve, tumor figure and weight of transplanted tumor in nude mice ( $n = 6$ ); F: NF- $\kappa$ B luciferase reporting system to testing the luciferase activity of MyD88-KO HCT116, A375 and PANC1 cell ( $n = 3$ ).  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . MyD88: Myeloid differentiation primary response protein 88

酸最为敏感 (图3E)。

### 讨论

关于 MyD88 的研究, 以往多采用 MyD88 敲除动

物<sup>[9]</sup>或 MyD88 敲低肿瘤细胞, 包括来源于敲除动物的髓样细胞<sup>[17]</sup>及免疫细胞<sup>[18]</sup>, 但是得到的关于 MyD88 对肿瘤的驱动作用却截然不同。本研究则建立了多种 MyD88 敲除的肿瘤细胞, 直接利用肿瘤细胞作为研究



**Figure 2** Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) binds MyD88. A: Schematic diagram of chemical structure of NDGA; B: Microscale thermophoresis technology (MST) to detect the binding affinity of NDGA with MyD88 ( $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ ); C: Illustration of MyD88 full-length and truncated mutants; D: Western blot to identify the expression of MyD88 and truncated mutants; E: MST to detect the binding affinity of NDGA with MyD88 truncated mutants

的模型, 并且利用裸鼠移植瘤探究 MyD88 的作用。本研究使用 CRISPR/Cas9 技术对靶基因进行敲除, 使目标基因的表达完全丧失, 建立的单克隆细胞中目标基因的缺失具有确定性并且效率很高, 即可以得到大量的、目的蛋白完全敲除的单克隆细胞株。

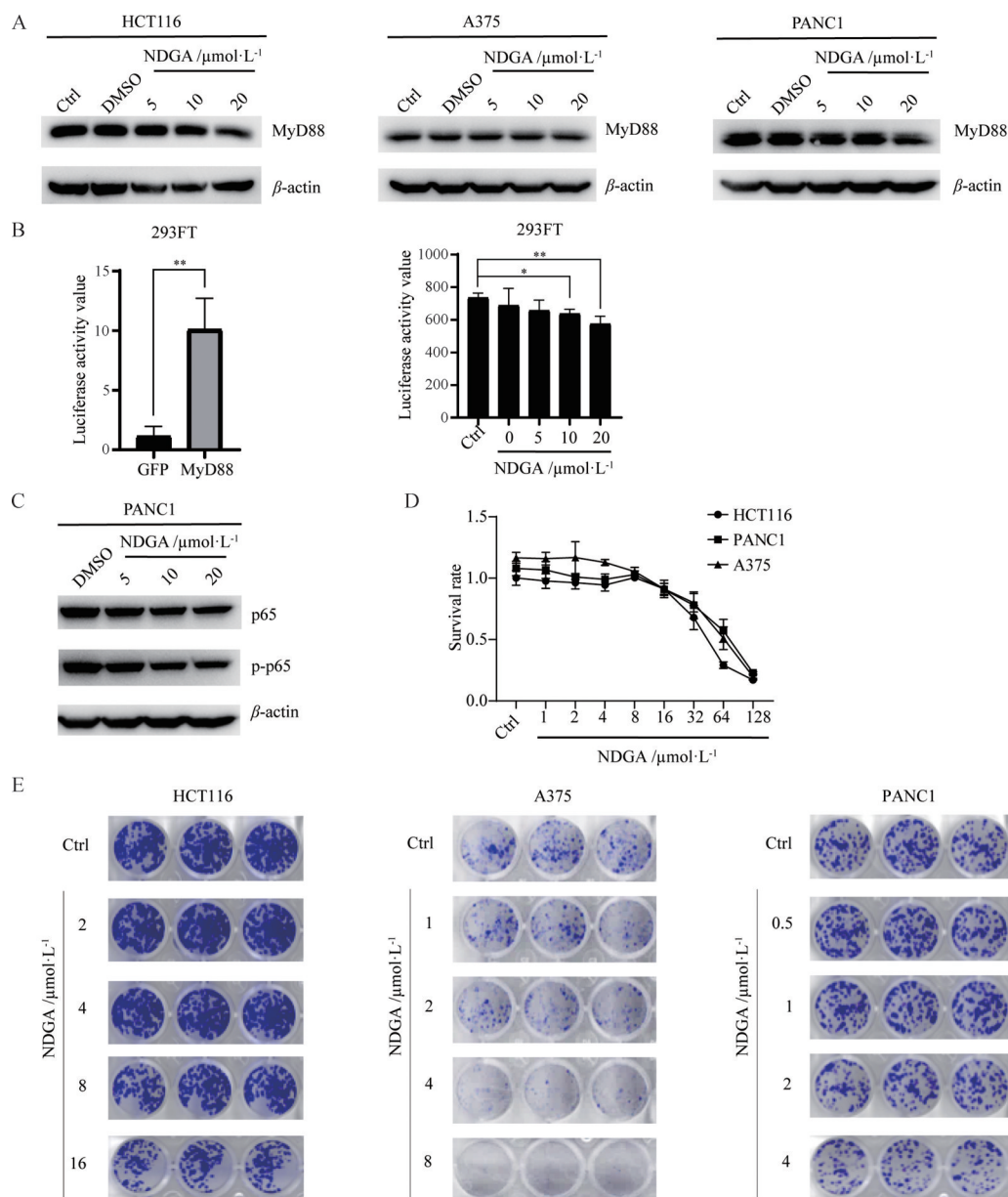
本研究结果表明, MyD88 的缺失抑制了人结肠癌 HCT116、人胰腺癌 PANC1、人皮肤癌 A375 的裸鼠移植瘤生长。此外, NF- $\kappa$ B 荧光素酶报告系统实验揭示了 MyD88 敲除能够显著抑制 NF- $\kappa$ B 通路活性。MyD88 是介导肿瘤发生发展的关键蛋白, 其可能是通过 NF- $\kappa$ B 信号通路影响肿瘤生长, 因此, 靶向 MyD88 来治疗肿瘤具有重要意义。

同时本研究旨在发现靶向 MyD88 的小分子化合物。与靶蛋白的直接结合是小分子调控靶标的必要条件。本研究利用 MST 技术, 从小分子与蛋白结合的角度出发筛选出靶向 MyD88 的小分子去甲二氢愈创木酸, 并且通过与截断突变体的结合实验发现去甲二氢愈创木酸与 MyD88 的结合同时需要 DD 和 TIR 结构域。

去甲二氢愈创木酸对 MyD88 的蛋白水平没有明显改变, 但是显著抑制外源转入 MyD88 激活的 NF- $\kappa$ B 信号通路活性, 其作用可能是通过结合 MyD88 来抑制

其活性及下游通路。在 PANC1 细胞中, 去甲二氢愈创木酸减少胞内 p65 及 p-p65 水平, 抑制 NF- $\kappa$ B 及其磷酸化蛋白表达。但需要更多关于去甲二氢愈创木酸抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的研究, 来更好地支持这一结论。通过 CCK-8 实验发现去甲二氢愈创木酸对胰腺癌、皮肤癌及结肠癌细胞均有抑制增殖的作用, 进一步利用克隆形成实验发现, 胰腺癌细胞 PANC1 对去甲二氢愈创木酸最为敏感, 可能是由于不同肿瘤细胞的蛋白表达及内环境差异较大, 去甲二氢愈创木酸对 MyD88 的靶向作用受到影响, 从而改变对细胞的影响。而且本文报道的小分子去甲二氢愈创木酸, 其抑制而非完全阻断 MyD88 介导的下游信号通路, 较为温和的效果可能会使去甲二氢愈创木酸具有较高的安全性。另外, 与以往抑制剂不同, 此研究关注的是去甲二氢愈创木酸靶向 MyD88 后对肿瘤的作用, 其可能为靶向 MyD88 抗肿瘤的研究提供一定参考, 同时丰富了 MyD88 靶向先导化合物的骨架。

本研究发现 MyD88 是介导肿瘤发生发展的关键蛋白, 揭示了去甲二氢愈创木酸可以靶向结合调控 MyD88 及其信号通路, 为后续 MyD88 的肿瘤靶向机制研究及去甲二氢愈创木酸抗肿瘤机制研究提供参考。



**Figure 3** NDGA is a candidate for MyD88 as a potential target small molecule. A: Western blot to detect the expression of MyD88 in HCT116, A375 and PANC1 wild type cells with NDGA dose course; B: NF- $\kappa$ B luciferase reporting system to testing the luciferase activity of exogenous transfer MyD88 in 293FT cells; C: Western blot to detect the expression of p53 and p-p53 in PANC1 wild type cells with NDGA acid dose course; D: CCK-8 assay to detect the inhibition of NDGA on HCT116, A375 and PANC1-wild type cells, NDGA treatment for 72 h; E: Colony formation assay to detect the inhibition of NDGA on HCT116, A375 and PANC1-wild type cells, NDGA treatment for 72 h with dose course.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

**作者贡献:** 柯细松、屈祎负责课题总体设计; 王月负责完成实验的具体实施、实验数据分析和文章撰写; 柯细松、屈祎、张雪对课题及论文撰写进行指导。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

**References**

[1] Warner N, Núñez G. MyD88: a critical adaptor protein in innate immunity signal transduction [J]. *J. Immunol*, 2012, 190: 3-4.  
 [2] O'Neill LAJ, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-

containing adaptors in Toll-like receptor signalling [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7: 353-364.  
 [3] Lin S, Lo Y, Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling [J]. *Nature*, 2010, 465: 885-890.  
 [4] Castillo JJ, Hunter ZR, Yang G, et al. Novel approaches to targeting MyD88 in Waldenström macroglobulinemia [J]. *Expert Rev Hematol*, 2017, 10: 739-744.  
 [5] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, et al. MyD88 is an

- adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways [J]. *Mol Cell*, 1998, 2: 253-258.
- [6] Salcedo R, Cataisson C, Hasan U, et al. MyD88 and its divergent toll in carcinogenesis [J]. *Trends Immunol*, 2013, 34: 379-389.
- [7] Zambirinis CP, Miller G. Signaling *via* MyD88 in the pancreatic tumor microenvironment: a double-edged sword [J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2: e22567.
- [8] Ling J, Kang Y, Zhao R, et al. KrasG12D-induced IKK2/beta/NF-kappaB activation by IL-1alpha and p62 feedforward loops is required for development of pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Cancer Cell*, 2012, 21: 105-120.
- [9] Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88 [J]. *Science*, 2007, 317: 124-127.
- [10] Salcedo R, Worschech A, Cardone M, et al. MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18 [J]. *J Exp Med*, 2010, 207: 1625-1636.
- [11] Mittal D, Saccheri F, Venereau E, et al. TLR4-mediated skin carcinogenesis is dependent on immune and radioresistant cells [J]. *EMBO J*, 2010, 29: 2242-2252.
- [12] Yusuf N, Nasti TH, Long JA, et al. Protective role of Toll-like receptor 4 during the initiation stage of cutaneous chemical carcinogenesis [J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 615-622.
- [13] Olson MA, Lee MS, Kissner TL, et al. Discovery of small molecule inhibitors of MyD88-dependent signaling pathways using a computational screen [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 14246.
- [14] Xie L, Jiang F, Zhang L, et al. Targeting of MyD88 homodimerization by novel synthetic inhibitor TJ-M2010-5 in preventing colitis-associated colorectal cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2015, 108: v364.
- [15] Zou Z, Du D, Miao Y, et al. TJ-M2010-5, a novel MyD88 inhibitor, corrects R848-induced lupus-like immune disorders of B cells *in vitro* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 85: 106648.
- [16] Chen L, Chen H, Chen P, et al. Development of 2-amino-4-phenylthiazole analogues to disrupt myeloid differentiation factor 88 and prevent inflammatory responses in acute lung injury [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 161: 22-38.
- [17] Hong E, Chang S, Lee B, et al. Blockade of Myd88 signaling induces antitumor effects by skewing the immunosuppressive function of myeloid-derived suppressor cells [J]. *Int J Cancer*, 2013, 132: 2839-2848.
- [18] Song J, Chen Z, Geng T, et al. Deleting MyD88 signaling in myeloid cells promotes development of adenocarcinomas of the colon [J]. *Cancer Lett*, 2018, 433: 65-75.