

丹参中甘西鼠尾新酮A通过干扰LPS与TLR4/MD2的结合发挥抗炎作用

王鸿颖^{1,2}, 何贤芳^{1,2}, 刘瑞秀^{1,2}, 易琼², 钟杭¹, 王鲁^{2*}

(1. 贵州大学药学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 西南特色药用生物资源开发利用教育部工程研究中心, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 研究丹参中是否存在能与Toll样受体4/髓样分化蛋白2 (Toll like receptor 4/myeloid differentiation protein 2, TLR4/MD2) 结合发挥抗炎活性的化合物。本文以TLR4/MD2为靶蛋白虚拟筛选了丹参已报道的化学成分, 并检测了筛选出的甘西鼠尾新酮A (neoprzewaquinone A, Neo A) 对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 与细胞膜上受体结合的影响、与蛋白的亲合力作用、对LPS介导细胞中TLR4与MD2二聚化的影响、对LPS所致细胞核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) p65蛋白磷酸化及细胞炎症因子分泌的影响。研究表明, 丹参中Neo A与TLR4/MD2虚拟结合能最高, 为 $-12.8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$; Neo A可极显著抑制LPS与细胞膜上的受体结合 ($P < 0.01$), 且Neo A能与rhTLR4/MD2、rhTLR4、rhMD2结合, 亲和力分别为 267 、 534 、 $228 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; Neo A与TLR4/MD2的氨基酸残基TYR131、PHE121等位点可能存在烷基及 π -烷基疏水作用; Neo A能极显著抑制LPS介导细胞中TLR4与MD2的二聚化 ($P < 0.01$), 显著抑制NF- κ B p65蛋白的磷酸化水平 ($P < 0.05$); Neo A能显著或极显著抑制LPS所致细胞一氧化氮 (nitric oxide, NO)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 的分泌 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。综上, Neo A可通过与TLR4/MD2结合干扰LPS与TLR4/MD2结合发挥抗炎作用, 可能是一种TLR4/MD2抑制剂, 可用于TLR4/MD2为靶点的炎症相关疾病治疗。

关键词: 丹参; 甘西鼠尾新酮A; 脂多糖; Toll样受体4/髓样分化蛋白2; 抗炎

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)06-1647-09

Neoprzewaquinone A from *Salvia miltiorrhiza* Bunge exerts anti-inflammatory activity by disrupting LPS binding to TLR4/MD2

WANG Hong-ying^{1,2}, HE Xian-fang^{1,2}, LIU Rui-xiu^{1,2}, YI Qiong², ZHONG Hang¹, WANG Lu^{2*}

(1. College of Pharmacy, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Engineering Research Center of Ministry of Education for the Development and Utilization of Southwest Characteristic Medicinal Biological Resources, Guiyang 550025, China)

Abstract: This study investigates whether compounds in *Salvia miltiorrhiza* Bunge can bind to the Toll like receptor 4/myeloid differentiation protein 2 (TLR4/MD2) protein complex and exhibit anti-inflammatory activity. Virtual screening of reported chemical components of *Salvia miltiorrhiza* Bunge against TLR4/MD2 was conducted in this study. The selected compound, neoprzewaquinone A (Neo A), was tested for its impact on the binding of lipopolysaccharide (LPS) to receptors on the cell membrane, its affinity for the protein, its influence on the dimerization of TLR4 and MD2 in LPS-induced cells, and its effects on the phosphorylation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65 protein and the secretion of inflammatory cytokines in cells. Results indicate that Neo A in *Salvia miltiorrhiza* Bunge exhibited the highest virtual binding affinity with TLR4/MD2, with a value of $-12.8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Neo A significantly inhibited the binding of LPS to receptors on the cell membrane ($P < 0.01$). Moreover, Neo A demonstrated affinity for rhTLR4/MD2, rhTLR4, and rhMD2, with K_D values of 267, 534, and

收稿日期: 2023-12-26; 修回日期: 2024-03-06.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32160849).

*通讯作者 Tel: 18985136081, E-mail: wanglu7007@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1448

228 nmol·L⁻¹, respectively. Amino acid residues like TYR131 and PHE121 in TLR4/MD2 might play a role in the alkyl and π -alkyl hydrophobic interactions with Neo A. Neo A also significantly inhibited the dimerization of TLR4 and MD2 in LPS-mediated cells ($P < 0.01$) and markedly suppressed the phosphorylation of NF- κ Bp65 protein ($P < 0.05$). Furthermore, Neo A significantly or markedly inhibited the secretion of nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β) in LPS-induced cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In conclusion, Neo A exerts its anti-inflammatory effects by binding TLR4/MD2 then disrupting the binding of LPS to TLR4/MD2. It may serve as a TLR4/MD2 inhibitor with the potential to treat inflammation-related diseases targeting TLR4/MD2.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* bunge; neoprzewaquinone A; lipopolysaccharide; Toll like receptor 4/myeloid differentiation protein 2; anti-inflammation

细胞的炎性反应源于致炎因子的刺激,脂多糖(LPS)为常见的致炎因子,通常情况下,LPS被细胞模式识别受体Toll样受体4(TLR4)识别,并与TLR4的辅助蛋白髓样分化蛋白2(MD2)结合,形成LPS-TLR4-MD2复合物,LPS结合到TLR4与MD2形成的疏水口袋中引起两个LPS-TLR4-MD2复合物的二聚化,促使信号传至胞内,最终使核转录因子- κ B(NF- κ B)入核启动相关基因的转录,诱导促炎因子的产生引起炎症^[1,2]。研究表明,LPS-TLR4-MD2信号通路的激活被认为是炎症发生的重要原因^[3]。研究发现,肠道微生物代谢产物猪去氧胆酸可竞争性地抑制LPS与TLR4/MD2的结合来减轻LPS诱导的巨噬细胞炎症反应^[4];一种新型的吡啶衍生物可通过与TLR4/MD2结合来治疗LPS致小鼠急性肺损伤^[5];人参皂苷Ro^[6]、雷公藤红素^[7]、N-乙酰多巴胺二聚体^[8]等天然成分可与TLR4/MD2蛋白结合发挥抗炎作用。因此,以TLR4/MD2作为靶点寻找抗炎药物,成为当前研究的热点^[4,5,9-11]。

丹参是一味活血化瘀的中药,长期以来被广泛用于治疗心脑血管疾病^[12]、免疫系统疾病^[13]和肿瘤^[14]等。近来研究表明丹参具有很好的抗炎效果^[15],但多数报道其抗炎效果与酚酸及丹参酮有关,如异丹酚酸A-1可抑制LPS致斑马鱼炎症模型中白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、NF- κ B的mRNA表达发挥抗炎作用^[16];丹参酮IIA可治疗溃疡性结肠炎小鼠^[17]。而丹参中能影响炎症因子分泌的其他化学成分鲜有报道。本研究以TLR4/MD2为切入点,希望从丹参中挖掘出能以TLR4/MD2为靶点的新的潜在抗炎化合物。

材料与方法

生物信息平台与软件 PDB数据库(<https://www.rcsb.org/search>),TCMSP数据库(<https://tcmsp.com/tcmssp.php>),上海有机化学研究所数据库(<https://organchem.csdb.cn/scdb/default.htm>),台湾中医药数

据库(<http://tcm.cmu.edu.tw/>),Chem3D 19.0软件,AutoDockTools软件,PyMOL 2.6.0软件,Discovery Studio软件,BATMAN数据库(<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/#/home>),CAS Scifinder数据库(<https://scifinder-n.cas.org/>),TCM-ID数据库(<https://www.bidd.group/TCMID/>),PLIP数据库(<https://plip-tool.biotech.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>)。

细胞与试剂 RAW264.7细胞购于昆明细胞库;DMEM高糖培养基(8123233)、胎牛血清(2546854RP)、胰蛋白酶(T1300)均购于美国Gibco Life Technologies公司;LPS(L4130)、FITC-LPS(F3665)购于美国Sigma-Aldrich公司;NO检测试剂盒(13547)购买于美国Cell Signaling Technology公司;TNF- α ELISA试剂盒(20231122)购买于北京四正柏生物公司;IL-6(FN231122)、IL-1 β ELISA试剂盒(EM0109)购自武汉菲恩生物科技有限公司;DID[DiIC18(5)]细胞膜染料购自上海优宁维科技公司;Neo A($\geq 98\%$,CFN97087)购自西力生物技术有限公司;细胞蛋白提取试剂(R0010)、地塞米松(DEX,5230517001)购于北京索莱宝科技有限公司;蛋白浓度测定试剂盒(CW0014S)购于北京康为世纪生物科技有限公司;抗磷酸化NF- κ Bp65抗体(YP0191)、抗NF- κ Bp65抗体(YT3108)、抗 β -actin抗体(YM3138)、HRP*羊抗兔IgG(RS0002)和HRP*羊抗鼠IgG(RS0001)均购于Immunoway Biotechnology Company;抗MD2抗体(11784-1-AP)、抗TLR4抗体(19811-1-AP)购于武汉三鹰生物技术有限公司;重组人源TLR4/MD2蛋白(rhTLR4/MD2,3146-TM/CF)、重组人源TLR4蛋白(rhTLR4,1478-TR-050)、重组人源MD2蛋白(rhMD2,1787-MD-050/CF)均购于美国Bio-Techne公司;免疫共沉淀试剂盒(P2179S)购自上海碧云天生物技术有限公司。

主要仪器 多功能酶标仪(Multiscan GO,美国Thermo Scientific公司);多功能凝胶成像系统(Universal Hood III,美国Bio-Rad Laboratories);激光

共聚焦 (LSM900, 德国蔡司公司); 流式细胞仪 (FACS calibur, 美国 Becton Dickenson 公司); Biacore 仪器 (Biacore T200TM, 美国 Cytiva 公司)。

丹参中化学成分与 TLR4/MD2 分子对接 在 TCMSP、上海有机化学研究所数据库、台湾中医药数据库、BATMAN 数据库、TCM-ID 数据库中下载并保存丹参中化学成分的 mol 格式, 部分数据库没有 mol 格式的, 通过化合物的 CAS 号从 CAS SciFinder 数据库中下载 mol 格式, 使用 Chem Draw 19.0 将各化合物的 2D 结构转换为 3D 结构, 并保存为 mol2 格式。TLR4/MD2 晶体结构 (PDB ID: 2Z65) 从 PDB 数据库获取。运用 PyMOL2.6.0 对分子与蛋白进行去除水分子处理后以 pdb 格式保存。以 TLR4/MD2 的功能结构域为包裹区域, 设置其 grid box, 将各化合物设置为配体, 蛋白设置为受体, 采用 Autodock Vina 软件进行分子对接, 最后使用 Discovery Studio 软件进行可视化分析。

LPS/TLR4/MD2 复合物可视化分析 从 PDB 数据库中获得 LPS/TLR4/MD2 (PDB ID: 3VQ2) 复合物的晶体结构, 保存为 pdb 格式文件, 运用 PLIP 数据库和 PyMOL2.6.0 软件对 LPS 与 TLR4/MD2 相互作用力场、氨基酸位点进行可视化分析。

激光共聚焦法检测 Neo A 对 LPS 在 RAW264.7 细胞膜上定位的影响 按照每孔 2×10^5 个 (1 mL) 的细胞密度接种于预先放入载玻片的 6 孔板中, 培养 12 h 后, 设立空白组、FITC-LPS 组 ($0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、Neo A + FITC-LPS 组 (FITC-LPS: $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; Neo A: $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。加药培养 12 h 后, 弃去上清液, 各组细胞按激光共聚焦术要求, 参考文献方法^[18]进行处理。使用激光共聚焦在 480 和 630 nm 处检测 FITC-LPS 在细胞膜上的定位情况, 每组选取相同量细胞 ($n = 20$) 并统计 FITC 的平均荧光强度。

流式细胞术检测 Neo A 对 LPS 与 RAW264.7 细胞膜上受体结合的影响 将细胞以每孔 1×10^6 个 (1 mL) 的细胞密度接种于 6 孔板, 其余按照“激光共聚焦法检测 Neo A 对 LPS 在 RAW264.7 细胞膜上定位的影响”方法处理细胞。参考文献方法^[19]进行处理, 加药培养 12 h 后, 吸弃旧培养基, 加入 PBS 吹打获得细胞悬液, 低速离心获得细胞沉淀; 加 PBS 冲洗细胞沉淀, 重复 3 次, 洗去残留的 FITC-LPS, 最后加入 150 μL PBS 重悬细胞, 转移至流式管后振荡混匀, 检测各组细胞与 FITC-LPS 的结合情况, 操作过程注意避光。

表面等离子共振 (SPR) 检测 Neo A 与 rhTLR4/MD2、rhTLR4、rhMD2 的相互作用情况 SPR 结合测试使用 Biacore T200TM 生物传感器系统进行。利用不同 pH 值的 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAc 缓冲溶液 (pH 4.0、4.5、

5.0、5.5) 将 3 种配体蛋白 (rhTLR4/MD2、rhTLR4、rhMD2) 稀释至 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 后分别与芯片预富集, 选择偶联量最大时的 pH 作为稀释配体蛋白的缓冲溶液。随后将缓冲液稀释后的各蛋白固定到 CM5 芯片上, Neo A 用 PBS 缓冲溶液稀释为 10 000、5 000、2 500、1 250、625、312.5、156.25、78.125、39.062 5、19.531 25 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 以 $30 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 上样, 分析物与配体蛋白结合时间为 180 s, 自然解离 300 s。实验结果使用 Biacore T200 Evaluation Software 3.2.1 软件进行分析, 分析方法为动力学法。

免疫共沉淀检测 Neo A 对 LPS 介导 TLR4 与 MD2 二聚化的影响 将细胞每孔 1×10^6 个 (1 mL) 的细胞密度接种于 6 孔板, 培养 12 h 后, 设立空白组、LPS 组 ($0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和 Neo A 组 (LPS: $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, Neo A: $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。加药培养 12 h 后弃液, 用 PBS 洗涤后吸净残留液体, 按照免疫沉淀试剂盒说明进行操作。简而言之, 获取细胞蛋白裂解液后置于冰上备用。将抗体工作液与 Protein A+G 磁珠混合后室温翻转孵育 1 h 后弃上清液, 洗涤 3 次, 按照每 500 μL 样品使用 20 μL 磁珠悬浊液比例加入结合了抗体的 Protein A+G 磁珠, 室温翻转孵育 2 h 弃上清液, 洗涤 3 次, 按照每 20 μL 磁珠加入 100 μL $1 \times$ 蛋白上样缓冲液, 40°C 水浴加热 50 min 后取上清, 用 Western blot 检测各组 TLR4 的蛋白表达情况。

Western blot 检测 Neo A 对 LPS 致 RAW264.7 细胞中 NF- κ Bp65 蛋白磷酸化的影响 除将药物终质量浓度改为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以外, 其余的细胞处理方法均按“免疫共沉淀检测 Neo A 对 LPS 介导 TLR4 与 MD2 二聚化的影响”方法进行。加药培养 12 h 后, 获取细胞蛋白裂解液并检测蛋白浓度, 参考 Li 等^[20]的方法, 以 β -actin 作为内参, 使用 Image J 软件分析条带灰度值计算蛋白表达量, 检测 NF- κ Bp65 蛋白表达及其磷酸化情况。

Griess 法检测 Neo A 对 LPS 致 RAW264.7 细胞分泌 NO 的影响 将细胞以每孔 5×10^5 个的细胞密度接种于 24 孔板, 培养 12 h 后, 设立空白组、LPS 组 ($0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、Neo A 组 (LPS: $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; Neo A: $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和 DEX 阳性对照组 (LPS: $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; DEX: $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。加药培养 12 h 后, 收集细胞上清液, 按照 Griess 试剂亚硝酸盐检测试剂盒的使用说明, 在 550 nm 处检测样品的吸光度, 计算各组清液中 NO 的浓度。

ELISA 法检测 Neo A 对 LPS 致 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的影响 将细胞以每孔 6×10^5 个 (1 mL) 的细胞密度接种于 24 孔板, 按“Griess 法检测 Neo A 对 LPS 致 RAW264.7 细胞分泌 NO 的影响”方法处理细胞, 收集细胞上清液, 按照 ELISA 说明书进行

操作, 450 nm处检测吸光度, 参照标准曲线计算TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量。

统计学分析 实验数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 使用SPSS 23.0软件进行数据处理。组间数据比较采用单因素方差分析(ANOVA), 以 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著, 具有统计学意义。

结果

1 丹参的化学成分与TLR4/MD2虚拟筛选结果

在5个中药相关数据库中检索丹参化学成分, 共获得丹参中化学成分393个, 这些化合物与TLR4/MD2进行分子对接的对接分数从-3.4~-12.8不等(对接分数绝对值越大, 说明分子与蛋白的相互作用越强), 在此仅列举出部分对接分数绝对值大于9的对接结果。结果如表1显示, Neo A与TLR4/MD2对接分数最高, 两者虚拟亲和力最大, 为-12.8 kcal·mol⁻¹, 大于miltirone与TLR4/MD2的虚拟亲和力(-9.1 kcal·mol⁻¹)。

2 Neo A影响FITC-LPS在RAW264.7细胞膜上定位的结果

在激光共聚焦显微镜下观察到DID染料(一种细胞膜染料, 进入细胞膜后可在630 nm处检测到强烈的红色荧光)能定位在细胞膜上, 呈现红色荧光, FITC-LPS定位在细胞膜上呈现为绿色荧光, 如图1A所示,

所有组的细胞膜上都有红色荧光, 空白组细胞膜上没有绿色荧光, FITC-LPS刺激组细胞膜上的绿色荧光强度镜下明显增强; 与FITC-LPS刺激组相比, 在Neo A + FITC-LPS药物组中能观察到有少许绿色荧光。通过计算各组细胞($n = 20$)细胞膜上的平均FITC荧光强度发现, 相比空白组而言, FITC-LPS组的FITC荧光强度极显著升高($P < 0.01$); 与FITC-LPS组相比, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Neo A能极显著降低FITC荧光强度($P < 0.01$)。

3 Neo A对FITC-LPS与RAW264.7细胞膜上受体结合的影响

流式细胞术检测结果如图2所示, 空白组的荧光强度几乎为零(0.043), 而与空白组相比, FITC-LPS刺激组荧光强度增高到1.59($P < 0.01$); 与FITC-LPS组相比, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Neo A能将荧光强度降低至0.56($P < 0.01$)。

4 Neo A与rhTLR4/MD2、rhTLR4、rhMD2的相互作用情况

采用SPR技术检测了Neo A与rhTLR4/MD2、rhTLR4、rhMD2的相互作用情况。如图3所示, Neo A与各蛋白的亲和力可由动力学法准确测得。结果表明, Neo A可剂量依赖性地与各个配体蛋白结合, 且相互作用表现出快速的缔合速率, 平稳缔合一段时间后呈现出快速的解离速率, 表明Neo A与各蛋白都具有强亲和力。通过计算Neo A与3个配体蛋白的亲和力,

Table 1 Partial results of compounds of *Salvia miltiorrhiza* Bunge with docking affinity of TLR4/MD2 molecules less than -9 kcal·mol⁻¹

Compound name	Affinity	Compound name	Affinity
Neoprzewaquinone A	-12.8	Dihydrotanshinone I	-9.2
2 α ,3 α -Dihydroxyurs-12-en-28-oic acid	-9.7	1,2-Dihydrotanshinone	-9.1
1,2-Didehydromiltirone	-9.5	Methylenetanshinone	-9.1
Przewalskin A	-9.5	Miltirone	-9.1
Dehydrouvaol	-9.5	1-Ketoisocryptotanshinone	-9.0
Salvianolic acid E	-9.4	3-Hydroxytanshinone	-9.0
4-Methylenemiltirone	-9.3	Salvianolic acid N	-9.0
2-Isopropyl-8-methylphenanthrene-3,4-dione	-9.2	Aethiopinone	-9.0

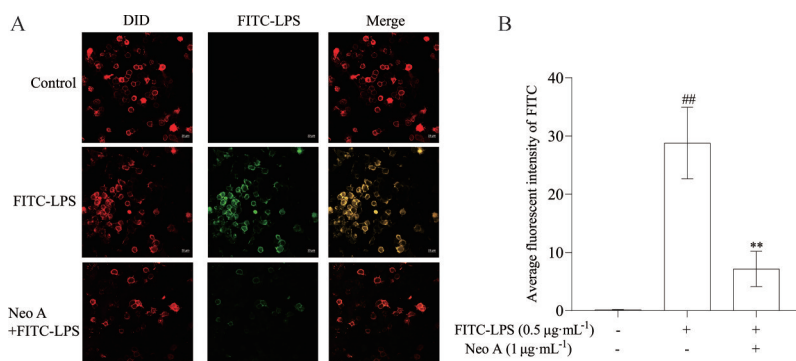


Figure 1 Laser confocal image (A) and data statistics (B) of the localization of FITC-LPS on RAW264.7 cell membrane by neoprzewaquinone A (Neo A). Cells were treated with Neo A and/or activated with FITC-LPS for 12 h, the treatment time for subsequent cell experiments is the same. The samples were observed by laser confocal microscope. Scale bar, 100 μm ; magnification, $\times 200$. $n = 20$, $\bar{x} \pm s$. ## $P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs FITC-LPS group

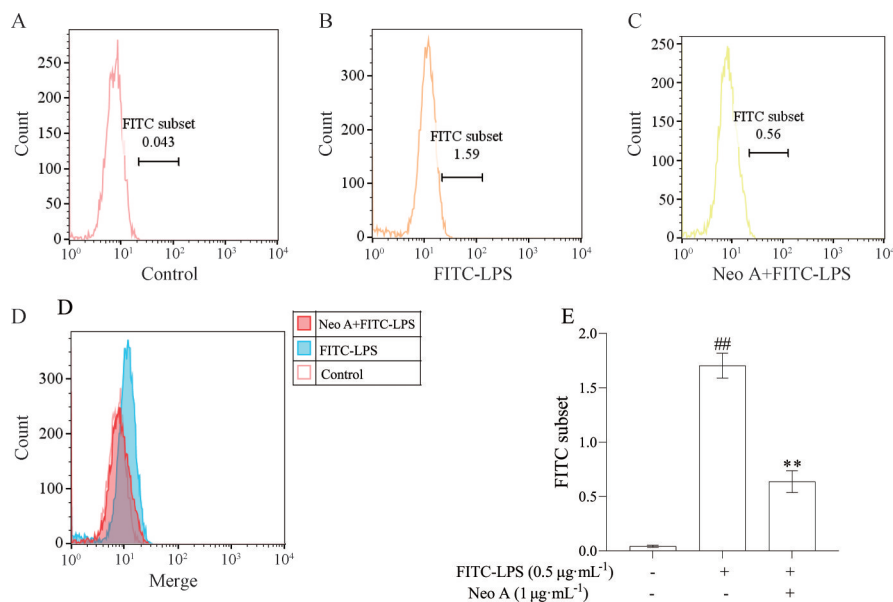


Figure 2 Flow cytometry analysis was used to determine the effect of Neo A on FITC-LPS binding to receptors on the membrane of RAW264.7 cells. A: Control group; B: FITC-LPS group; C: Neo A+FITC-LPS group; D: Fusion plot; E: Quantitative statistical plot of the FITC subset. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $###P < 0.01$ vs control group; $**P < 0.01$ vs FITC-LPS group

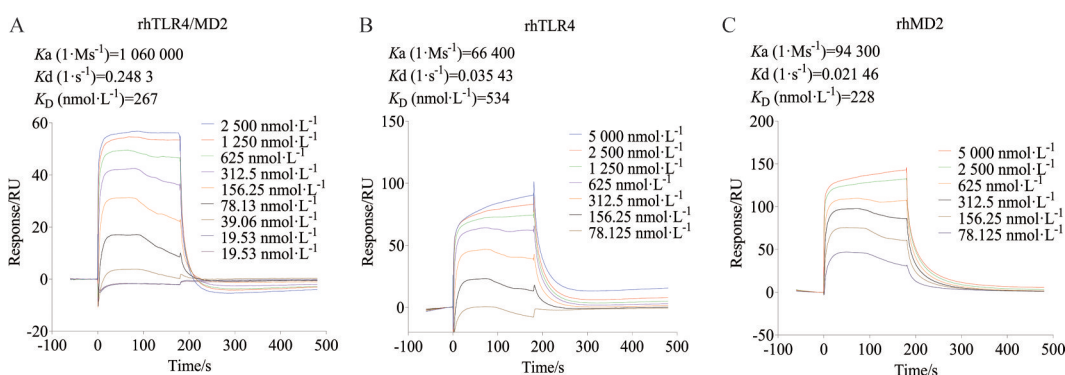


Figure 3 Concentration gradient binding curve of rhTLR4/MD2, rhTLR4, rhMD2 with Neo A. The kinetic method was employed to measure the interaction of Neo A and rhTLR4/MD2 (A), rhTLR4 (B), rhMD2 (C). Ka: Association rate constants; Kd: Dissociation rate constants; K_D : Affinity constants. The less K_D value, the more affinity between compound and tested proteins

结果表明Neo A与rhTLR4/MD2、rhTLR4、rhMD2结合的亲和力常数(K_D)值分别为267、534和228 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

5 Neo A与TLR4/MD2相互作用可视化分析结果

从PDB数据库中获得TLR4/MD2的晶体结构,并使用Discovery Studio软件对TLR4/MD2与Neo A的相互作用进行可视化分析。图4A中a为TLR4/MD2结构中的TLR4部分,b为MD2部分。如图4A所示,Neo A结构能嵌入到位于MD2亚单元的疏水口袋中。Neo A与TLR4/MD2的氨基酸残基ILE124、TYR131、PHE121、ILE153、ILE52、VAL48、LEU61、ILE63、PHE147存在烷基-烷基和 π -烷基疏水作用,并且Neo A中的环状结构也与TLR4/MD2的氨基酸残基PHE76中的环状结构形成Pi-Pi T-shaped相互作用(图4B、C)。运用PILP数据库及PyMOL软件对LPS与TLR4/MD2

进行了可视化分析,图4D中a为LPS/TLR4/MD2复合物中TLR4部分,b为MD2部分。图4D显示LPS与TLR4、MD2均具有相互作用;图4E显示,LPS与TLR4/MD2的氨基酸残基包括ILE52、ILE124、VAL61、PHE76、PHE147、TYR131、LEU149、PHE121、PHE104在内的位点存在疏水相互作用;与TLR4/MD2的氨基酸残基ARG90、ARG434、PRO118、SER120、GLU122、GLY123、ILE124、SER413存在氢键作用力;与TLR4/MD2的氨基酸残基LYS263、LYS360存在盐桥相互作用。对比Neo A与TLR4/MD2的相互作用位点及LPS与TLR4/MD2的相互作用位点,发现TLR4/MD2中的氨基酸残基ILE124、TYR131、PHE121、ILE52、PHE147及PHE76是Neo A与LPS的共同作用位点。

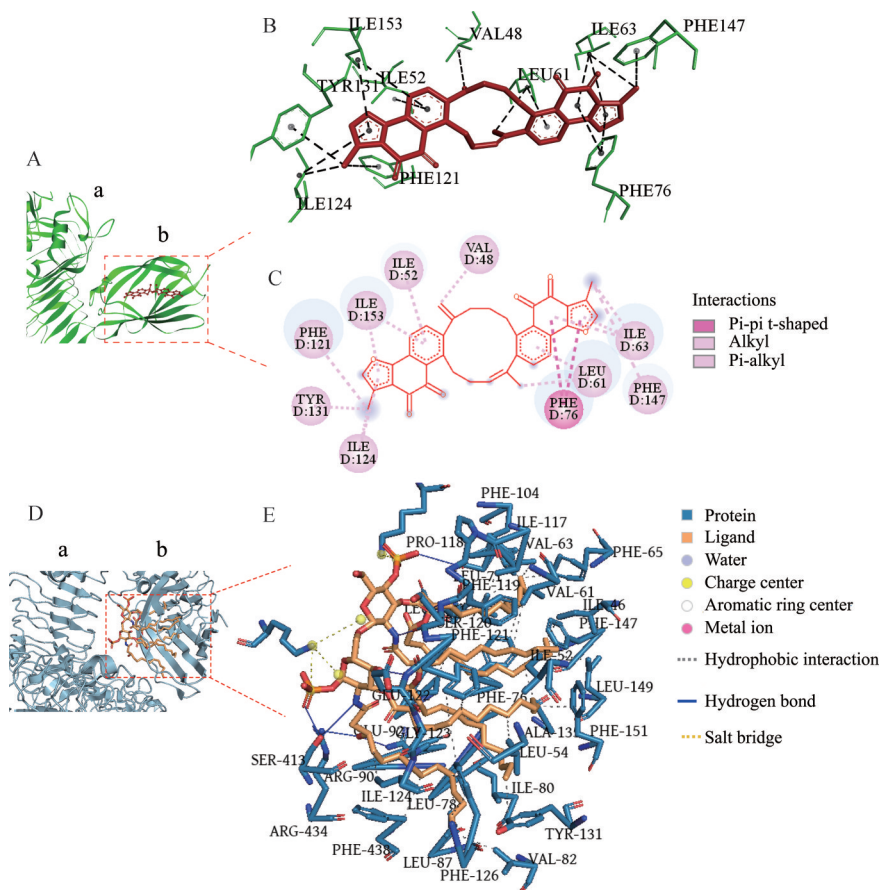


Figure 4 Visualization of the interaction between Neo A, LPS, and TLR4/MD2. A: Three-dimensional view of the combination of Neo A and TLR4/MD2. a indicates the TLR4 part of the TLR4/MD2 structure, and b indicates the MD2 part; B indicates a stereogram of the interaction sites between Neo A and TLR4/MD2; C: Plane diagram of the interaction sites between Neo A and TLR4/MD2; D: Three-dimensional view of the LPS/TLR4/MD2 complex, where a indicates the TLR4 part of the LPS/TLR4/MD2 complex and b indicates the MD2 part; E: Stereogram of LPS/TLR4/MD2 interaction sites

6 Neo A 影响 LPS 介导 RAW264.7 细胞中 TLR4 与 MD2 二聚化的影响

通过免疫共沉淀探讨 Neo A 对 LPS 诱导的 TLR4 与 MD2 的二聚化影响。如图 5A 所示, 每组内参蛋白 β -actin 表达相当, 同时每组标定的 MD2 蛋白也相当, 在此基础上分析每组 TLR4 蛋白表达情况, 图 5B 显示, 与空白组相比, LPS 组的 TLR4 蛋白表达量极显著高于空白组 ($P < 0.01$); 与 LPS 组相比, $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Neo A 能显著抑制 TLR4 的蛋白表达水平 ($P < 0.01$)。

7 Neo A 影响 LPS 致 RAW264.7 细胞中 NF- κ Bp65 磷酸化的影响

采用 Western blot 实验检测 Neo A 对 LPS 致 RAW264.7 细胞中 NF- κ Bp65 蛋白磷酸化水平的影响。如图 6 所示, 3 个组的 NF- κ Bp65 蛋白表达水平并无显著差异 ($P > 0.05$); 而 LPS 刺激细胞后使得 NF- κ Bp65 蛋白的磷酸化水平极显著增高 ($P < 0.01$), 而 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Neo A 处理后显著抑制了 NF- κ Bp65 蛋白的磷酸化

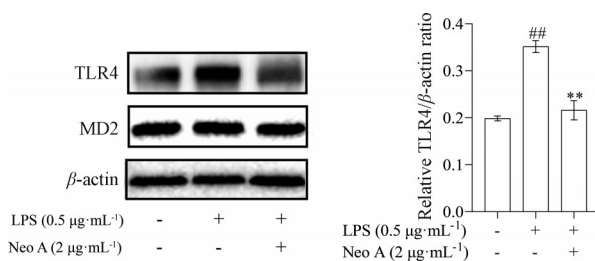


Figure 5 Effects of Neo A on the dimerization of TLR4 and MD2 in LPS-induced RAW264.7 cells. The co-immunoprecipitation method was taken to explore the effect of Neo A on the dimerization of TLR4 and MD2 in LPS-induced RAW264.7 cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs LPS group

水平 ($P < 0.05$)。

8 Neo A 影响 LPS 致 RAW264.7 细胞分泌 NO、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的结果

使用 ELISA 检测细胞上清液中促炎因子 (TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β) 的分泌情况, Griess 法检测细胞中 NO 浓度的变化。如图 7 显示, 与空白组相比, LPS 能显著增

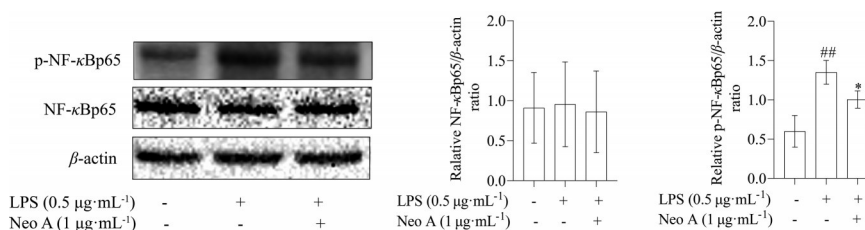


Figure 6 Effect of Neo A on phosphorylation NF- κ Bp65 protein expression in LPS induced RAW264.7 cells. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{###}P < 0.01$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ vs LPS group

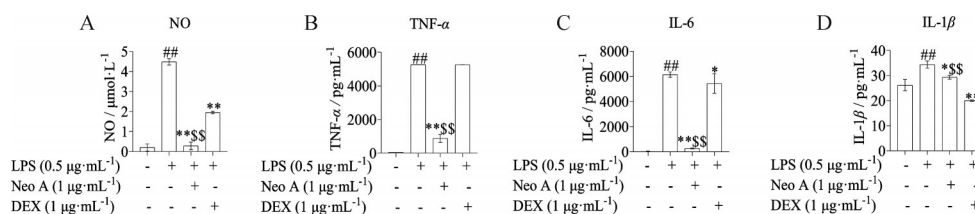


Figure 7 Effects of Neo A on the secretion of nitric oxide (NO, A), tumor necrosis factor- α (TNF- α , B), interleukin-6 (IL-6, C), and interleukin-1 β (IL-1 β , D) in LPS-induced RAW264.7 cells. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{###}P < 0.01$ vs control group; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs LPS group; $^{SS}P < 0.01$ vs DEX group

强 NO、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的分泌 ($P < 0.01$); 而与 LPS 组相比, $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Neo A 能极显著或显著抑制这 4 种细胞因子的分泌 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 值得注意的是, 与 LPS 组相比, $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DEX 并没有显著抑制细胞中 TNF- α 的分泌 ($P > 0.05$); 而与同浓度下的 DEX 相比, $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Neo A 对 NO、TNF- α 和 IL-6 三种细胞因子均有显著的抑制作用 ($P < 0.01$), 而 Neo A 对 IL-1 β 的抑制作用却显著低于 DEX 的抑制作用 ($P < 0.01$)。

讨论

近年来研究发现丹参中含有一些抗炎效果显著的化合物, 如 miltirone 可抑制由 LPS 刺激的 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 分泌和 MyD88、NF- κ Bp65 的基因和蛋白表达, 减轻细胞炎症反应^[21]; 丹参酮 IIA 可抑制由 LPS 诱导的 TAK1 磷酸化、NF- κ Bp65 表达来降低大鼠血管平滑肌细胞的炎症发生^[22]。而不管是 miltirone 还是丹参酮 IIA, 它们都与 LPS-TLR4/MD2-NF- κ B 信号通路有关。因此, 细胞膜上的 TLR4/MD2 蛋白是由 LPS 引发细胞炎症的关键所在, 靶向 TLR4/MD2 寻找抗炎药物更具有研究意义。

丹参中是否也有与 TLR4/MD2 结合发挥抗炎作用的化合物? 为此, 本研究以 TLR4/MD2 为靶点, 虚拟筛选了能与 TLR4/MD2 相互作用强的化合物, 从丹参的 393 个成分中, 发现 Neo A 从众多化合物中脱颖而出, 虚拟筛选结果提示其与 TLR4/MD2 相互作用极强, 远高于已报道的抗炎化合物 miltirone。

但 Neo A 与 TLR4/MD2 是否具有真实的相互作用

还需要进一步研究。激光共聚焦实验和流式细胞术结果表明, 化合物竞争性结合了细胞膜表面的 LPS 受体, FITC-LPS 无法与膜表面受体结合, 导致荧光强度减弱。因此, 推测细胞膜上的 TLR4/MD2 可能为其作用靶点。SPR 数据显示, Neo A 在相同浓度范围内可与 rhTLR4/MD2、rhTLR4、rhMD2 结合, 但 Neo A 与 rhMD2 的作用强度 (K_D 值 $267 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 是其与 rhTLR4 (K_D 值 $534 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的两倍多, Neo A 与 rhTLR4/MD2 的结合作用和 Neo A 与 rhMD2 的结合作用 (K_D 值 $228 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 相当, 提示 Neo A 与 rhTLR4/MD2 的亲合作用很可能是因为 Neo A 与 rhMD2 的亲和力造成的, 提示 MD2 蛋白比 TLR4 蛋白更可能是化合物的作用靶点。LPS 作为 TLR4/MD2 的天然配体, 在与 TLR4/MD2 结合时, 其结构上的 5 条支链被埋入 MD2 口袋中, 剩余链与 TLR4 上保守的苯丙氨酸形成 1 个疏水相互作用^[1] (如图 4D、E 所示)。虚拟可视化分析结果显示, Neo A 可嵌入 MD2 亚单元的疏水口袋中; 对比 Neo A 和 LPS 分别与 TLR4/MD2 相互作用位点来看, 位于 MD2 亚单元疏水口袋中的氨基酸残基 PHE121 等均与 Neo A 和 LPS 有相互作用, 提示 Neo A 可能通过占据这些氨基酸位点阻碍 LPS 5 条支链的插入, 从而竞争性地抑制 LPS 与 TLR4/MD2 的结合作用。

当细胞膜上的 TLR4/MD2 识别并结合 LPS 后, 三者形成“LPS/MD2/TLR4”复合物, 复合物中的 LPS 则与另一分子复合物中的 TLR4 形成“M”形样式的“LPS/MD2/TLR4” (2:2:2) 复合物, 此时 TLR4 胞内结构域在 LPS 的牵引下发生扭转与摆动, 进而激活 TLR4 信

号通路引起胞内信号传导^[23,24]。抑制TLR4胞内结构域的扭转与摆动可能是阻断TLR4信号通路激活的关键。Neo A与TLR4/MD2的结合是否阻碍了LPS对TLR4的牵引从而阻断TLR4通路的信号传导?结果表明Neo A可破坏TLR4与MD2的二聚化,阻止LPS、TLR4、MD2形成“M”形样式的“LPS/MD2/TLR4”(2:2:2)复合物,抑制NF- κ Bp65蛋白的磷酸化水平,从而干扰信号传导,这是Neo A发挥抗炎作用的机制。最后对Neo A产生的抗炎效应进行了评价,结果表明Neo A可显著抑制LPS致细胞TNF- α 等炎性相关因子的分泌(效果强于同浓度下的地塞米松)发挥抗炎作用。

综上所述,Neo A有望成为一种新的潜在抗炎药物。本研究报道了Neo A的这种抗炎活性,这将为Neo A作为TLR4/MD2抑制剂提供研究基础,但是Neo A在体内的抗炎作用如何,还需进一步探讨;Neo A与TLR4、MD2在生物学层面的相互作用情况及Neo A与TLR4/MD2结合的氨基酸位点是否是干扰LPS与TLR4/MD2的真正关键位点还需进一步研究。

作者贡献: 王鸿颖进行了实验研究、数据收集及初稿的撰写;何贤芳、刘瑞秀、易琼是实验参与者;钟杭和王鲁进行了技术指导并修改论文。所有作者都阅读并认可终稿。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Resman N, Vasl J, Oblak A, et al. Essential roles of hydrophobic residues in both MD-2 and Toll-like receptor 4 in activation by endotoxin [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 15052-15060.
- [2] Luo M, Yan D, Sun Q, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates cardiomyocyte apoptosis and inflammation via the TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121: 2994-3004.
- [3] Leon CG, Tory R, Jia J, et al. Discovery and development of Toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists: a new paradigm for treating sepsis and other diseases [J]. *Pharm Res*, 2008, 25: 1751-1761.
- [4] Li J, Chen Y, Li R, et al. Gut microbial metabolite hydroxytyrosol acid targets the TLR4/MD2 complex to attenuate inflammation and protect against sepsis [J]. *Mol Ther*, 2023, 31: 1017-1032.
- [5] Liu Z, Chen L, Yu P, et al. Discovery of 3-(indol-5-yl)-indazole derivatives as novel myeloid differentiation protein 2/Toll-like receptor 4 antagonists for treatment of acute lung injury [J]. *J Med Chem*, 2019, 62: 5453-5469.
- [6] Xu HL, Chen GH, Wu YT, et al. Ginsenoside Ro, an oleanolic saponin of *Panax ginseng*, exerts anti-inflammatory effect by direct inhibiting Toll like receptor 4 signaling pathway [J]. *J Ginseng Res*, 2022, 46: 156-166.
- [7] Lee JY, Lee BH, Kim ND, et al. Celastrol blocks binding of lipopolysaccharides to a Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 2 complex in a thiol-dependent manner [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 172: 254-260.
- [8] Huang L, Gong L, Huo X, et al. N-Acetyldopamine dimer inhibits neuroinflammation through the TLR4/NF- κ B and NLRP3/caspase-1 pathways [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2022, 55: 23-33.
- [9] Shen W, Li L, Liu QH, et al. Characteristic chromanone acids from *Calophyllum membranaceum*: determination of C-3 configuration and anti-inflammatory activity [J]. *Phytochemistry*, 2024, 217: 113902.
- [10] Yang L, Luo W, Zhang Q, et al. Cardamonin inhibits LPS-induced inflammatory responses and prevents acute lung injury by targeting myeloid differentiation factor 2 [J]. *Phytomedicine*, 2021, 93: 153785.
- [11] Zhang Y, Liang X, Bao X, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4) inhibitors: current research and prospective [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 235: 114291.
- [12] Shi M, Huang F, Deng C, et al. Bioactivities, biosynthesis and biotechnological production of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 59: 953-964.
- [13] Wang Y, Zhou C, Gao H, et al. Therapeutic effect of cryptotanshinone on experimental rheumatoid arthritis through downregulating p300 mediated-STAT3 acetylation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 138: 119-129.
- [14] Lu M, Lan X, Wu X, et al. *Salvia miltiorrhiza* in cancer: potential role in regulating microRNAs and epigenetic enzymes [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1008222.
- [15] Tian S, Guo L, Song Y, et al. Radix *Salvia miltiorrhiza* ameliorates burn injuries by reducing inflammation and promoting wound healing [J]. *J Inflamm Res*, 2023, 16: 4251-4263.
- [16] Zou LF, Liu DF, Yang H, et al. Salvianolic acids from *Salvia miltiorrhiza* Bunge and their anti-inflammatory effects through the activation of $\alpha 7nAChR$ signaling [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 317: 116743.
- [17] Zhu G, Wu X, Jiang S, et al. The application of omics techniques to evaluate the effects of tanshinone IIA on dextran sodium sulfate induced ulcerative colitis [J]. *Mol Omics*, 2022, 18: 666-676.
- [18] Peng JC. Screening of Anti-inflammatory Components from *Blumea balsamifera* (L.) DC via Molecular Docking based on TLR4 Signal Pathway (基于TLR4信号通路的分子对接筛选艾纳香中抗炎成分) [D]. Guiyang: Guizhou University, 2023.
- [19] Gao XH. Regulation Effect on MD2 and TLR4 Proteins of Benzoxazolone Compound W3D with Anti-inflammatory Activity (苯并噁唑酮类抗炎化合物W3D对MD2和TLR4蛋白调控作用的研究) [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2021.
- [20] Li Y, He S, Tang J, et al. Andrographolide inhibits inflammatory cytokines secretion in LPS-stimulated RAW264.7 cells through suppression of NF- κ B/MAPK signaling pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 8248142.
- [21] Wang H, Gu J, Hou X, et al. Anti-inflammatory effect of miltirone on inflammatory bowel disease via TLR4/NF- κ B/

- IQGAP2 signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85: 531-540.
- [22] Meng Z, Si CY, Teng S, et al. Tanshinone IIA inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through the TLR4/TAK1/NF- κ B signaling pathway in vascular smooth muscle cells [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43: 1847-1858.
- [23] Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes [J]. *Exp Mol Med*, 2013, 45: e66.
- [24] Gioannini TL, Teghanemt A, Zhang D, et al. Purified monomeric ligand MD-2 complexes reveal molecular and structural requirements for activation and antagonism of TLR4 by Gram-negative bacterial endotoxins [J]. *Immunol Res*, 2014, 59: 3-11.