

## 环维黄杨星 D 与 HMGB1 的相互作用研究

孟艳艳, 张 剑

中国药科大学 江苏南京

**【摘要】** HMGB1 (High mobility group box 1 protein 1) 作为 DAMPs (Damage-associated molecular pattern, DAMPs), 介导细胞间损伤与炎症信号的传递, 在无菌炎症、自身免疫性疾病及癌症等病理过程中发挥关键作用, 并作为药物靶点与生物标志物具有广泛研究价值。环维黄杨星 D (cyclovirobuxine D, CVB-D) 广泛应用于预防和治疗各种心血管疾病, 具有显著的抗炎潜力。但目前暂时没有 CVB-D 与 HMGB1 相互作用的研究。故本研究在细胞水平和分子水平探究 CVB-D 与 HMGB1 相互作用及其分子机制。结果表明 CVB-D 抑制 HMGB1 诱导的炎症反应, 这可能 CVB-D 能与 HMGB1 结合且能改变其构象有关。

**【关键词】** HMGB1; CVB-D; 小分子-蛋白相互作用

**【收稿日期】** 2024 年 11 月 12 日 **【出刊日期】** 2024 年 12 月 20 日 **【DOI】** 10.12208/j.imrf.20240014

### Study on the interaction between cyclovirobuxine D and HMGB1

Yanyan Meng, Jian Zhang

China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu

**【Abstract】** As DAMPs, HMGB1 mediates the transmission of intercellular damage and inflammatory signals, plays a key role in pathological processes such as aseptic inflammation, autoimmune diseases and cancer, and has extensive research value as a drug target and biomarker. CVB-D is widely used in the prevention and treatment of various cardiovascular diseases, and has significant anti-inflammatory potential. However, there is currently no study on the interaction between CVB-D and HMGB1. Therefore, this study explored the interaction between CVB-D and HMGB1 and its molecular mechanism at the cellular and molecular levels. The results showed that CVB-D inhibited HMGB1-induced inflammatory response, which may be related to the fact that CVB-D can bind to HMGB1 and change its conformation.

**【Keywords】** HMGB1; CVB-D; Small molecule-protein interaction

#### 1 背景介绍

HMGB1 是一种普遍存在于真核细胞核中的 DNA 结合蛋白, 在细胞损伤或坏死后被动释放, 或由激活的免疫或巨噬细胞主动分泌至细胞外空间<sup>[1]</sup>, 并作为一种 DAMPs, 通过受体向邻近细胞传达损伤和炎症发生的信号, 参与多种无菌炎症和自身免疫性疾病的发病机制, 包括脓毒症、类风湿性关节炎等<sup>[2,3]</sup>。其中 1999 年, H. Wang 等人<sup>[4]</sup>首次报道 HMGB1 由脂多糖 (LPS) 刺激的巨噬细胞释放, 并作为脓毒症的促炎细胞因子发挥作用。此后大量研究证实 HMGB1 在许多感染性或无菌性全身炎症性疾病的发病机制的核心作用<sup>[5]</sup>。HMGB1 已经成为了重要的药物靶点和潜在的生物标志物<sup>[6]</sup>。

环维黄杨星 D (CVB-D) 是黄杨科植物小叶黄杨及其同属植物中提取而得的一种生物碱<sup>[7]</sup>。它作为我国研发的创新药物, 临床已应用于多种心血管系统疾病<sup>[8]</sup>。有研究表明 CVB-D 可以通过抑制氧化应激、抑制铁死亡、维持  $Ca^{2+}$  稳态减轻心肌损伤, 而心肌抑制通常是脓毒症心肌病患者死亡的重要原因<sup>[9]</sup>。但目前环维黄杨星 D 与 HMGB1 的相互作用及其活性的研究暂无, 故本研究在细胞水平和分子水平探究环维黄杨星 D 与 HMGB1 的相互作用以及其作用的分子机制。

#### 2 实验方法与结果

##### 2.1 CVB-D 的细胞活力检测

分别设置空白组和给药组, 空白组中加入无血

清 DMEM, 给药组加入不同浓度的 CVB-D 的 DMEM, 每组设置 6 个平行, 继续至于细胞培养箱中培养 24 h。取出细胞培养板, 吸取每个孔中剩余的培养基, 避光加入 0.5 mg/mL 的 MTT 试剂, 置于培养箱中孵育 30 min 后弃上清, 加入 DMSO 溶解蓝色结晶, 混匀后用酶标仪分别检测 570 nm、650 nm 下的 OD 值, 使用 Graphpad Prism 进行数据处理, 根据获得的 OD 值计算出不同 HMGB1 浓度和 CVB-D 下对应的细胞存活率。

### 2.2 CVB-D 抑制 HMGB1 诱导的验证模型的 NO 释放

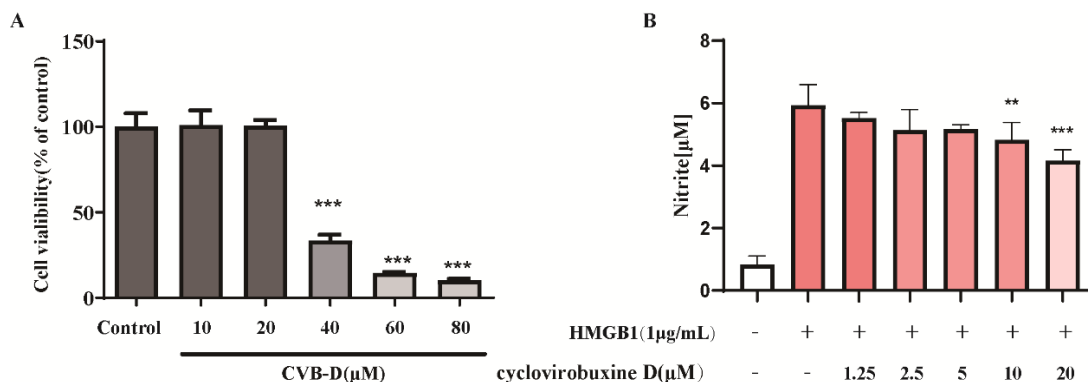


图1 CVB-D对HMGB1诱导的RAW264.7炎症模型的抑制活性(A CVB-D的细胞活力 B CVB-D对HMGB1诱导的RAW264.7炎症模型NO释放的抑制活性)

### 2.3 表面等离子共振 (SPR)

配置浓度为 50 mM 的 CVB-D 母液, 并用 PBS-P 梯度稀释, 将 CM5 芯片的 1 通路设为参比通路, 2 通路设为检测通路, 随后以 30 μL/min 的速度将待测化合物注入 Biacore S200 的检测系统中, 设置化合物与蛋白的结合时间和解离时间均为 60 s。采用 Biacore S200 Evaluation 3.0 软件对采集到的传感器图进行评估, 并采用 1:1 稳态结合等温线模型进行非线性拟合, 得到 CVB-D 与蛋白的结合常数、解离常数以及亲和力常数。CVB-D 与 HMGB1 的实时

结合-解离曲线呈现出一种快结合快解离的特征, 可以采用了稳态法来估算它们的结合与解离常数。如图 2 通过浓度-响应曲线, 我们得到 CVB-D 与 HMGB1 的结合常数 ( $K_D$ ) 值为  $7.114 \times 10^{-6} M$ , 这表明 CVB-D 与 HMGB1 之间存在显著的相互作用, 即具有较高的亲和力。为了进一步验证和深入理解这种相互作用, 我们还进行了荧光光谱分析。这能够提供关于分子间相互作用如何影响光谱特性的详细信息, 从而帮助我们更全面地理解 CVB-D 与 HMGB1 之间的结合机制。

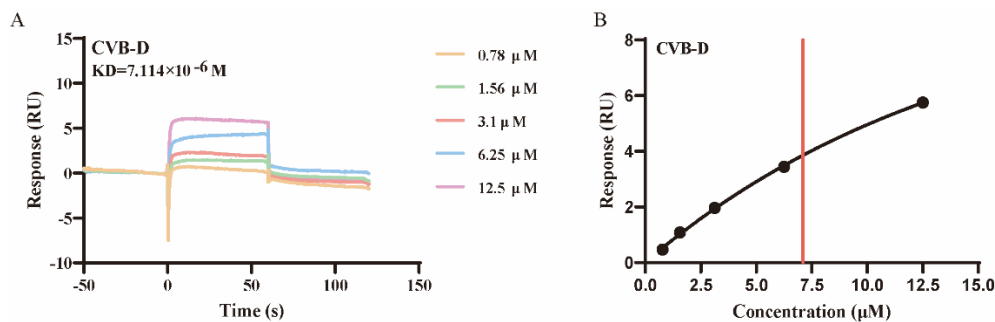


图2 CVB-D与HMGB1的结合传感图(A 实时结合-解离曲线, B 稳态拟合曲线)

## 2.4 荧光光谱检测

在 298 K 下, 配制不同浓度 CVB-D 的 HMGB1 混合溶液, 设置不加小分子的蛋白溶液为对照组, HMGB1 的终浓度固定为  $3.0 \mu\text{M}$ , CVB-D 的浓度范围均为  $2.5\text{--}100 \mu\text{M}$ 。室温下孵育 20 min, 立即利用荧光分光光度计(Agilent, 美国)进行荧光测定。检测中使用光程路径为  $0.1 \text{ cm}$  的石英比色皿, 实验参数设置如下: 激发波长为  $273 \text{ nm}$ , 激发狭缝宽度和发射狭缝宽度均设定为  $10 \text{ nm}$ , 扫描速度设定为  $1200 \text{ nm/min}$ 。

使用 Stern-Volmer 和双对数方程来计算出 CVB-D 猝灭 HMGB1 的猝灭常速率  $K_{SV}$  和猝灭速率常数  $K_q$ , 进而判断荧光猝灭机理。公式计算如下:

$$F_0/F = 1 + K_q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q]$$

式中,  $F_0$  和  $F$  分别为未添加 CVB-D 和添加 CVB-D 溶液的最大荧光强度;  $[Q]$  为 CVB-D 的浓度 ( $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ );  $K_q$  为荧光猝灭速率常数 ( $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ );  $\tau_0$  为生物大分子荧光团在没有猝灭剂的情况下的平均荧光寿命 ( $10^{-8} \text{ s}$ );  $K_{SV}$  为 Stern-Volmer 猝灭常数 ( $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ )。为了研究 CVB-D 猝灭 HMGB1 的机理, 利用下式计算了配合物的结合常数  $K_a$  和结合位点  $n$

$$\log[(F_0 - F)/F] = \log K_a + n \log[Q]$$

式中  $K_a$  为复缔合常数 ( $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), 由双对数公式的斜率计算;  $n$  是结合位点的数目, 由双对数图的截距决定。

HMGB1 在  $273 \text{ nm}$  激发下展现出强烈的荧光发射, 这一特性主要源自其分子中的色氨酸残基、酪

氨酸残基以及苯丙氨酸残基。这些芳香族氨基酸残基在特定条件下能够吸收光能并发出荧光, 从而成为研究蛋白质结构和功能的重要工具。在进一步的研究中, 荧光结果显示, 随着 CVB-D 浓度的增加, HMGB1 的荧光强度降低并发生蓝移, 说明 CVB-D 使 HMGB1 发色氨基酸的微环境疏水性增强。

荧光猝灭机制在生物化学和分子生物学研究中至关重要, 它主要包括三种类型: 动态猝灭、静态猝灭和非辐射能量转移。其中, 动态猝灭和静态猝灭两种机制都遵循 Stern-Volmer 方程, 这是判断猝灭类型的重要依据。

在该研究中, 通过测量 CVB-D 对 HMGB1 荧光的影响, 并绘制了 Stern-Volmer 图, 从斜率中得到了不同温度下的  $K_{SV}$  和  $K_q$  值。如图 3 结果指出,  $K_q$  为  $6.433 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , 显著低于最大动态荧光猝灭速率常数 ( $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), 这一发现强烈支持了动态猝灭是主导机制。

在配体和受体之间的相互作用之后, 可以使用结合常数 ( $K_a$ ) 和结合位点的数目 ( $n$ ) 来评估亲和力。使用双对数方程计算得到的 CVB-D 与 HMGB1 的结合常数 ( $K_a$ ) 和结合位点数目 ( $n$ )。数据显示, 结合常数  $K_a$  为  $1.995 \times 10^2 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$  和结合位点  $n$  为  $0.8792$ , 接近于 1, 表明 CVB-D 很可能与 HMGB1 分子上的单一的结合位点发生相互作用, 而不是多个分散的位点。这种单一结合位点的相互作用模式对于理解 CVB-D 与 HMGB1 之间的分子识别机制具有重要意义。

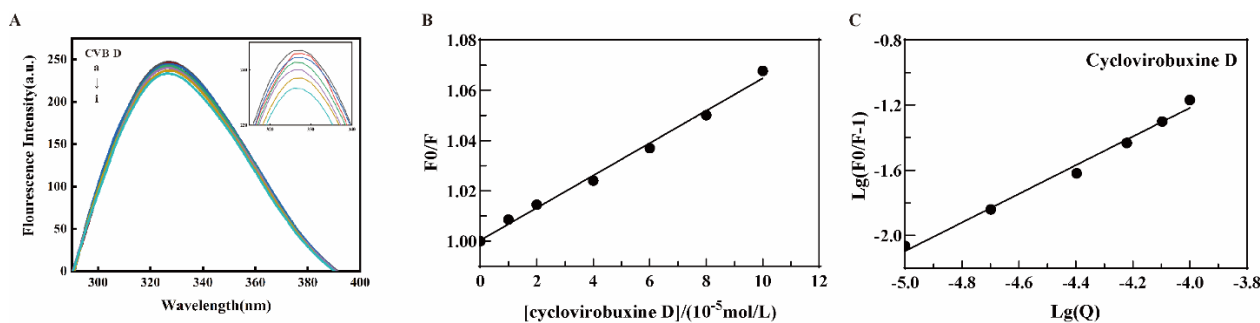


图 3 CVB-D 与 HMGB1 的荧光光谱 (A: CVB-D 猝灭 HMGB1 的荧光光谱, B: Stern-Volmer, C: 双对数方程)

## 3 总结与展望

探索小分子和蛋白质之间的相互作用一直是治疗应用中的焦点。本研究旨在细胞水平和分子水平深入探索 CVB-D 与 HMGB1 蛋白之间的相互作用, 并评估其在抗炎治疗中的潜在应用。在 RAW264.7

细胞模型中, 无毒剂量下的 CVB-D 能够显著抑制了 HMGB1 诱导的炎症模型的 NO 释放。接着在分子水平, 通过 SPR 技术直接证明 CVB-D 与 HMGB1 有强结合, 这为 CVB-D 抑制 HMGB1 诱导的炎症提供的支撑。为了探究其结合的分子机制, 通过稳态

荧光光谱分析发现, CVB-D 可以剂量依赖性地猝灭 HMGB1 的内源荧光, 并改变了 HMGB1 发色氨基酸的微环境, CVB-D 对 HMGB1 的猝灭类型为动态猝灭, CVB-D 与 HMGB1 的结合位点为 0.8792, 接近于 1。该研究结果表明 CVB-D 通过改变 HMGB1 的构象及抑制其下游信号转导, 为 HMGB1 抑制剂的开发及抗炎治疗提供了新的分子靶点和理论依据。

### 参考文献

- [1] Voong, C.K., Goodrich, J.A. & Kugel, J.F. Interactions of HMGB Proteins with the Genome and the Impact on Disease. *Biomolecules* 11(2021).
- [2] Kaur, I., et al. Exploring the therapeutic promise of targeting HMGB1 in rheumatoid arthritis. *Life sciences* 258, 118164 (2020).
- [3] Wang, S. & Zhang, Y. HMGB1 in inflammation and cancer. *Journal of hematology & oncology* 13, 116 (2020).
- [4] Wang H, B.O., Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285, 248-251 (1999).
- [5] Tang, D., Kang, R., Zeh, H.J. & Lotze, M.T. The multifunctional protein HMGB1: 50 years of discovery. *Nature reviews. Immunology* 23, 824-841 (2023).
- [6] Nishibori, M., Mori, S. & Takahashi, H.K. Anti-HMGB1 monoclonal antibody therapy for a wide range of CNS and PNS diseases. *Journal of pharmacological sciences* 140, 94-101 (2019).
- [7] Zhou, L., et al. Cycloviobuxine D inhibits cell proliferation and migration and induces apoptosis in human glioblastoma multiforme and low-grade glioma. *Oncology reports* 43, 807-816 (2020).
- [8] Zhong, J., et al. Therapeutic contribution of melatonin to the treatment of septic cardiomyopathy: A novel mechanism linking Ripk3-modified mitochondrial performance and endoplasmic reticulum function. *Redox biology* 26, 101287 (2019).
- [9] Beesley, S.J., et al. Septic Cardiomyopathy. *Critical care medicine* 46, 625-634 (2018).

**版权声明:** ©2024 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

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



**OPEN ACCESS**