

DOI: 10.12161/j.issn.1005-6521.2024.05.003

铁皮石斛多糖与 Toll 样受体 4 交互机制的计算模拟

崔萌菲^{1,3}, 张悦^{2,3}, 张志宇¹, 许慧敏¹, 刘翠³, 成颖^{1,3}, 李居行¹, 刘欢欢^{1,4}, 贺超¹, 郭庆彬^{1*}, 刘岷^{5*}

(1.天津科技大学 食品科学与工程学院, 天津 300457; 2.天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457; 3.中国科学院 天津工业生物技术研究所 低碳制造工程生物学重点实验室 生物设计中心, 天津 300308; 4.天津益膳康生物科技有限公司, 天津 300305; 5.中国科学院 天津工业生物技术研究所 人工合成淀粉研究中心, 天津 300308)

摘要:为研究铁皮石斛多糖(*Dendrobium officinale* polysaccharide, DOP)具有免疫活性片段的结构特征及与 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)的相互作用机制,基于对 TLR4 结合腔的亲疏水性分析,将 DOP 寡糖的分为疏水片段筛选和亲水片段筛选,通过分子对接和分子动力学模拟,分析作用最强的 DOP 片段的结构特征及与 TLR4 的相互作用机制。结果表明,找到作用最强的 DOP 七糖片段,具有与经典底物脂多糖相似的结合模式,其中疏水性四糖片段结合在疏水结合腔,亲水性三糖片段结合在电正性区域。具有潜在免疫活性的铁皮石斛多糖可以由乙酰基修饰的疏水四糖片段和没有乙酰基修饰的亲水三糖片段组成,主要通过氢键和疏水作用与 TLR4 进行相互作用,发挥免疫活性。

关键词:Toll 样受体 4; 铁皮石斛多糖; 分子对接; 分子动力学模拟; 交互机制

Computational Simulation of Interaction Mechanism between *Dendrobium officinale* Polysaccharide and Toll-like Receptor 4

CUI Mengfei^{1,3}, ZHANG Yue^{2,3}, ZHANG Zhiyu¹, XU Huimin¹, LIU Cui³, CHENG Ying^{1,3},
LI Juxing¹, LIU Huanhuan^{1,4}, HE Chao¹, GUO Qingbin^{1*}, LIU Pi^{5*}

(1. College of Food Science and Technology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 3. Biodesign Center, Key Laboratory of Engineering Biology for Low-carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China; 4. Tianjin Yishankang Biotechnology Co., Ltd., Tianjin 300305, China; 5. Research Center for Artificial Synthesis of Starch, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

Abstract: In this study, a computational simulation was conducted in order to investigate the structural characteristics of immunoactivity fragments of *Dendrobium officinale* polysaccharide (DOP) and the mechanism of interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4). Based on hydrophobic analysis of the TLR4 binding pocket, DOP oligosaccharides were divided into hydrophobic fragment screening and hydrophilic fragment screening. Molecular docking and molecular dynamics simulation were employed to analyze the structural characteristics of the most powerful DOP fragments and their interaction mechanism with TLR4. The results unveiled a heptasaccharide DOP fragment with the strongest activity, exhibiting a binding mode similar to that of classical substrate lipopolysaccharide. The hydrophobic tetrasaccharide fragment was bound to the hydrophobic binding cavity, and the hydrophilic trisaccharide fragment was bound to the positively charged region. In conclusions, the potentially immunomodulatory DOP was composed of an acetyl-modified hydrophobic tetrasaccharide fragment and a non-acetylated hydrophilic trisaccharide fragment, which mainly interacts with TLR4 through hy-

基金项目:国家自然科学基金面上项目(32072173);国家重点研发计划(2018YFA0901400)

作者简介:崔萌菲(1999—),女(汉),硕士研究生,研究方向:发酵食品与微生物资源开发。

*通信作者:郭庆彬(1983—),男(汉),教授,博士,研究方向:食品复杂多糖的多维结构解析;刘岷(1980—),男(汉),副研究员,博士,研究方向:蛋白结构设计。

drogen bonding and hydrophobic interaction.

Key words: toll-like receptor 4 (TLR4); *Dendrobium officinale* polysaccharide (DOP); molecular docking; molecular dynamics simulation; interaction mechanism

引文格式:

崔萌萌,张悦,张志宇,等.铁皮石斛多糖与 Toll 样受体 4 交互机制的计算模拟[J].食品研究与开发,2024,45(5):15-21.
CUI Mengfei, ZHANG Yue, ZHANG Zhiyu, et al. Computational Simulation of Interaction Mechanism between *Dendrobium officinale* Polysaccharide and Toll-like Receptor 4[J]. Food Research and Development, 2024, 45(5): 15-21.

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura & Migo)是一种无毒无害的中草药和新型食品资源。多糖是铁皮石斛中主要的生物活性成分之一,研究表明铁皮石斛多糖(*Dendrobium officinale* polysaccharide, DOP)具有免疫调节^[1]、抗肿瘤^[2]、抗炎^[3]、保肝^[4]和胃保护^[5]等作用。DOP 还可以与细胞表面的特定受体结合以激活各种细胞内信号转导途径^[6],主要通过抑制丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)、核因子- κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)活化,促进细胞因子的分泌^[7]和巨噬细胞的吞噬活性^[8],进而调节人体的免疫功能。多糖是铁皮石斛中最主要的生物活性物质,尤其在增强免疫方面展现了优异的活性。因此,DOP 引起越来越多研究者的关注^[9]。DOP 的组成^[10]得到广泛研究,不同来源的石斛多糖组分存在一定差异,但主要由不同比例、通过 β -1,4糖苷键连接的D-甘露糖和D-葡萄糖组成。其中有些甘露糖单元的O-2或O-3上存在乙酰基单取代,也存在少量O-2和O-3位同时取代的二取代形式^[11]。已有研究表明^[12],多糖的乙酰基取代数量和取代位置与多糖的活性有一定的关系。当所有O位都被乙酰基取代时,多糖的抗肿瘤活性完全消失。当O-3位被乙酰基取代时,多糖的抗肿瘤活性明显增强。因此,在适当的位置保有适量的乙酰基可能是铁皮石斛多糖发挥功效的关键。

Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)是先天性和适应性免疫反应的关键调节因子,并参与许多疾病的发生和发展,可直接使用或作为疫苗中的佐剂,具有潜在的治疗癌症和感染的功能^[13]。TLR4 是一种保守的 I 型跨膜蛋白,包括胞外域、跨膜区和胞内域 3 个部分,分子量约为 96 kDa^[14],其中胞外域由 608 个氨基酸残基构成,具有富含亮氨酸重复单元(leucine-rich repeats, LRR)N 端,相对保守,呈现 LRR 超家族特有的马蹄形结构,可用于识别生物大分子。胞内域由 187 个氨基酸残基构成^[15]。髓样分化因子-2(myeloid differentiation protein-2, MD-2)具有 β 折叠结构,由 160 个氨基酸组成,具有一个大的疏水口袋,可与 TLR4 形成稳

定的异二聚体复合物 TLR4-MD-2^[16]。TLR4-MD-2 的经典底物脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),主要是由 3 个结构域组成:一个相对保守的非重复核心寡糖、O 抗原和一个嵌入在外膜中被称为脂质 A 或内毒素的疏水结构域。其中核心寡糖影响外膜的渗透特性;O 抗原有助于分子的抗原性^[17];脂质 A 结构域与免疫受体相互作用,赋予 LPS 分子一系列免疫和潜在的内毒素特性。LPS 的结合能够引导两个 TLR4-MD-2-LPS 复合物对称排列,形成由两个拷贝组成的 m 形受体多聚体。

研究表明,DOP 可作为激活巨噬细胞的 TLR4 激动剂^[18]。Zhang 等^[19]研究多糖和 TLR4 的结构和生物活性之间的关系,发现葡萄糖、甘露糖和半乳糖是 TLR4 相关活性多糖的药效团。然而,由于结构的复杂性,包括 DOP 在内的多糖仍然难以确定哪一部分是免疫活性片段以及如何与 TLR4 相互作用^[20]。目前 TLR4 与 DOP 相互作用的研究也主要侧重于实验层面^[21-22],仍然缺乏在原子水平上的相互作用机制研究。分子对接、分子动力学模拟等计算模拟方法是一种通过计算机平台模拟分子性质的技术手段^[23],能够在原子水平上准确直观地预测结合模式,揭示体外实验难以捕获的机理细节^[24],是研究分子间相互作用机制的有效方法。

本文通过类比经典底物脂多糖的结合模式,通过对 TLR4-MD-2 底物结合口袋的亲疏水性分析,提出对 DOP 分别进行疏水性寡糖片段和亲水性寡糖片段的筛选,进而组合得到与 TLR4-MD-2 作用最佳的多糖结合片段。基于 DOP 的分子组成,构建由二糖、三糖、四糖组成的疏水寡糖库,借助分子对接分析,找出最佳疏水结合片段。进一步引入三糖和四糖组成的亲水结合片段,得到与 TLR4-MD2 作用最佳的多糖片段。通过分子动力学模拟和结合自由能计算(molecular mechanics generalized born surface area, MMGBSA)及残基分解结合能计算,确定最佳 DOP 寡糖片段的作用模式及与 TLR4-MD2 的作用机制。本研究所采用的模拟方法,不仅可以用于铁皮石斛多糖与受体蛋白的相互作用研究,也可为其他多糖-蛋白质的相互作用研究提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 结构处理和数据准备

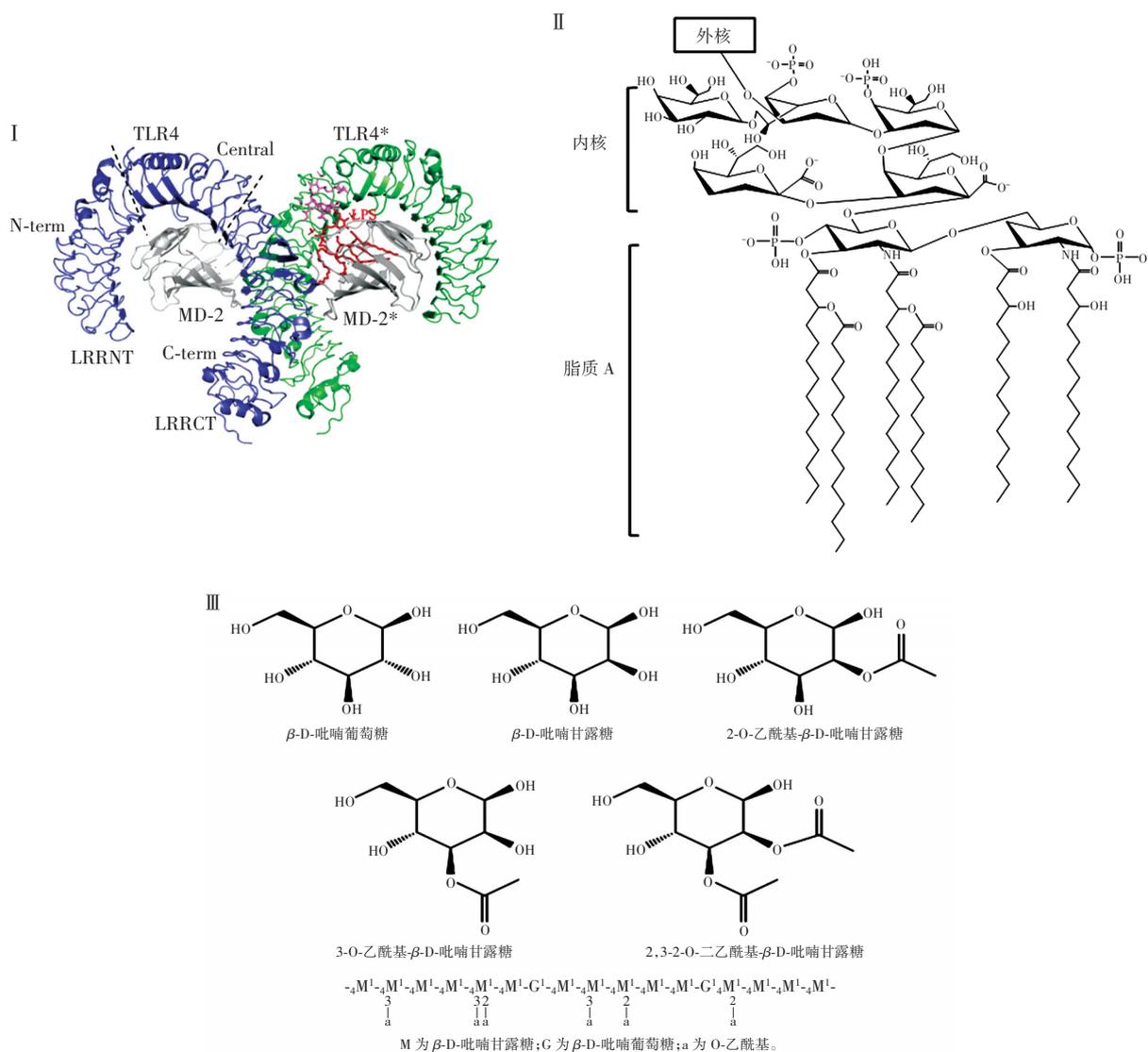
蛋白质处理:使用从蛋白质数据库(protein data bank, PDB)下载的晶体结构 3FXI 作为初始结构,使用 Schrodinger 2018 软件的 Protein Preparation Wizard 模块进行蛋白的预处理,去除水分子,在 pH7.0 条件下加氢,然后用 OPLS3e 力场进行蛋白质复合物的结构优化,去除不合理的结构冲突。利用 ExPASy^[25] 的 ProtScale 工具中氨基酸疏水性标准等级数值^[26]对 TLR4-MD-2 蛋白进行亲疏水性分析。利用 Pymol 的 APBS 插件计算 TLR4-MD2 的表面静电分布。

寡糖片段生成:为了进行疏水寡糖片段的筛选,对组成石斛多糖的 5 种主要糖残基(D-甘露糖、D-葡萄糖、O-2 或 O-3 乙酰基单取甘露糖、O-2 和 O-3 同时取代的甘露糖),利用编写的 python 脚本生成所有二糖、

三糖和四糖片段的可能组合。根据得到的组合寡糖的序列,利用 Schrodinger 2018 的 Custom R-Group Enumeration 模块完成疏水寡糖分子库的构建。对于亲水寡糖片段库的构建,考虑到葡萄糖和甘露糖的亲水性,选取 3~4 个葡萄糖和 3 个甘露糖,使用同样的方法构建得到所有可能的亲水多糖片段组合。初始结构组成及 LPS 的结构组成见图 1。

1.2 分子对接

利用 Schrodinger 2018 软件中的 LigPrep 模块,选用 OPLS 分子力场,对构建好的疏水寡糖片段库进行结构优化处理。与准备好的 TLR4-MD-2 蛋白结构一起载入 Ligand Docking 模块进行分子对接分析。基于晶体结构 3FXI 中的天然配体脂多糖分子,使用 Receptor Grid Generation 模块设置对接盒子位置,根据对接打分挑选最佳疏水性片段。在最佳疏水性片段的基



I. TLR4-MD-2 与经典底物脂多糖 LPS 复合物的结构展示; II. 脂多糖结构; III. 石斛多糖的组成及 5 种主要单糖的结构。*为二聚体的另外一条链。

图 1 初始结构组成及 LPS 的结构组成

Fig.1 Initial structural composition and LPS structural composition

基础上引入亲水性片段组合后,同样参照脂多糖的位置进行DOP片段的分子对接。

1.3 分子动力学模拟

使用分子动力学模拟软件 Amber 20^[27]对最后得到的DOP片段与TLR4-MD-2蛋白的复合体系进行分子动力学模拟。在模拟中,使用了ff19SB力场,采用SHAKE方法约束键长振动,将所有的模拟体系放入水层厚度为15 Å的矩形TIP3P水盒子中,采用周期性边界条件,使用Na⁺作为抗衡离子使整体电荷保持中性。所有的体系首先经过2轮4 000步的能量最小化,其中2 000步为最陡下降法,2 000步为共轭梯度法。第一轮优化,给体系施加2 kcal/(mol·Å)的限制力常数,第二轮优化无限制。之后进行了500 ps的加热模拟,目标温度为300 K。紧接着使用20轮密度平衡模拟,每轮20 ps,使体系密度达到均衡。之后是500 ps的平衡模拟,使体系达到300 K下的平衡状态。最后进行3条平行的1 000 ns的长时生产模拟。使用average linkage聚类方法对力学轨迹中非氢原子进行叠合,基于底物的距离进行聚类分析,得到体系的代表性结合构象。对优势结合模式进行结合能和残基分解结合能计算分析,找到有重要贡献的结合残基和作用机制。

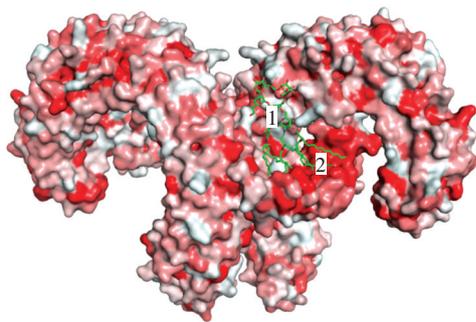
1.4 数据处理和可视化

轨迹分析使用 Amber 20 的 Cpptraj 模块进行,所得数据使用 Excel 进行归纳处理与分析,用 Origin 2021、PowerPoint 2021 对所得到的数据进行作图。通过将复合物的 PDB 文件上传至蛋白质配体相互作用分析器 (protein-ligand interaction profiler, PLIP)^[28]进行寡糖-蛋白相互作用分析。使用三维结构显示软件 Pymol^[29]对结果进行可视化展示。

2 结果与讨论

2.1 TLR4-MD-2 蛋白性质

TLR4-MD-2 蛋白的亲疏水性分布如图 2 所示。



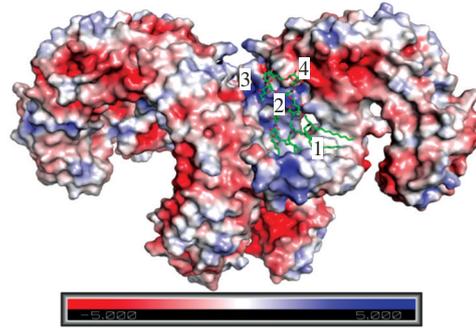
位置 1 为结合口袋的亲水性区域;位置 2 为结合口袋的疏水性区域。

图 2 TLR4-MD-2 亲疏水性分布

Fig.2 Hydrophilic and hydrophobic distribution of TLR4-MD-2

图 2 中红色代表疏水性区域,颜色越深代表疏水性越强。由图 2 可知,TLR4 结合口袋呈现亲水性特征

(位置 1 附近),为经典底物 LPS 的多糖结合区。MD-2 结合口袋(位置 2 附近)形成大的疏水性结合腔,LPS 的疏水性脂质 A 结构域插入该结合腔中形成疏水性相互作用。因此,TLR4-MD-2 的底物结合口袋可以认为由亲水性区域和疏水性区域两部分组成。TLR4-MD-2 的表面静电势分布如图 3 所示,蓝色、红色和白色分别表示电正性、电负性和电中性,颜色越深,则表示电势越强。



位置 1 为 TLR4 的底物结合区;位置 2 为 MD-2 的疏水性结合口袋;位置 3 为 TLR4 亚基作用界面;位置 4 为 TLR4 与 MD-2 的作用界面。

图 3 TLR4-MD-2 表面静电势分布

Fig.3 Electrostatic potential distribution on the surface of TLR4-MD-2

在 TLR4 的底物结合区(位置 1)附近,TLR4 亚基作用界面呈现强的正电性(位置 3 附近),TLR4 与 MD-2 的作用界面呈现强的电负性(位置 4 附近)。TLR4 底物结合区本身主要呈正电性,LPS 带有两个磷酸基团,具有一定的电负性,能够和该正电区域进行结合,其末端糖基向 TLR4 与 MD-2 作用界面的电负性区域延伸。MD-2 的疏水性口袋主要表现为电中性(位置 2 附近)。此外,C 端 TLR4 亚基作用界面也呈现比较强的电负性。

2.2 DOP 疏水性片段筛选结果

2.2.1 疏水寡糖片段分子库

基于 TLR4-MD-2 蛋白体系具有亲水和疏水结合腔的结构特点,对铁皮石斛多糖片段的筛选分为疏水性寡糖片段的筛选和亲水性寡糖片段的筛选。对于疏水性片段的筛选,使用组成石斛多糖的 5 种主要糖残基,组合构建 25 个二糖、125 个三糖以及 625 个四糖共 775 个疏水寡糖片段,具体如图 4 所示。

2.2.2 疏水片段分子对接

将处理好的 775 个 DOP 寡糖分别对接到 TLR4-MD-2 的活性口袋中,对接盒子的中心坐标为-7.334、-12.03、-23.18 Å,外部盒子的长宽高分别为 30、42、33 Å,内部盒子的长宽高分别为 10、22、13 Å。表 1 展示了二糖、三糖和四糖中对接排名前十的结果。对接打分是对对接的寡糖片段与蛋白匹配程度的评价指

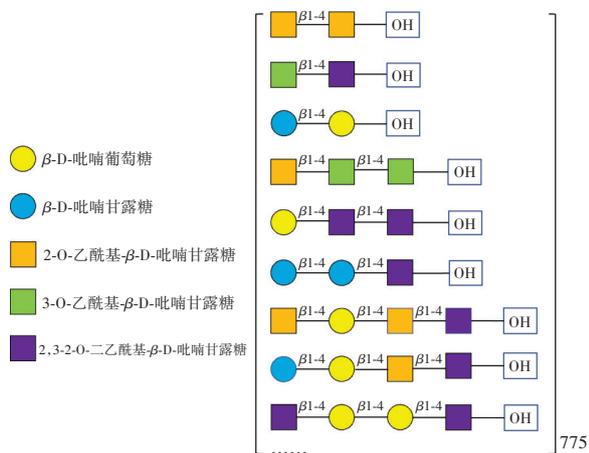


图4 疏水寡糖片段分子库示意图

Fig.4 Schematic diagram of the molecular library of hydrophobic oligosaccharide fragments

表1 疏水片段库对接结果

Table 1 Docking results of hydrophobic fragment library

排名	二糖	对接打分/(kcal/mol)	三糖	对接打分/(kcal/mol)	四糖	对接打分/(kcal/mol)
1	M-2、M-2	-5.39	M-2、M-3、M-3	-6.86	M-2、3、M-2、3、M-2、G	-8.06
2	M-3、M-2、3	-5.12	G、M-2、3、M-2、3	-6.71	M、G、M-2、M-2、3	-7.57
3	M、G	-5.06	M、M、M-2、3	-6.34	M-2、3、G、G、M-2、3	-7.57
4	M-2、3、M-2、3	-4.83	M-2、3、M-2、3、M	-6.12	G、G、M-2、3、M-2	-7.35
5	M-2、3、M-2	-4.83	M-2、M-2、3、M	-5.94	M-2、3、M-2、3、M-2、G	-7.02
6	M-3、M	-4.79	M-2、M-2、M	-5.77	M-2、3、M-2、3、M-2、3、G	-6.96
7	M-2、M	-4.76	M-2、3、M-3、M	-5.77	G、M-2、M-2、3、M	-6.88
8	M-3、M-2	-4.76	M-2、G、M	-5.75	M-2、3、M-2、3M-2、3、M	-6.84
9	M-2、3、G	-4.68	M-3、M、M-3	-5.75	M-2、3、M-3、M-2、G	-6.84
10	G、M	-4.62	M-2、3、G、M-3	-5.70	M-2、3、M-2、M-3、M-2	-6.76

注:G为β-D-吡喃葡萄糖;M为β-D-吡喃甘露糖;M-2为2-O-乙酰基-β-D-吡喃甘露糖;M-3为3-O-乙酰基-β-D-吡喃甘露糖;M-2、3为2,3-2-O-乙酰基-β-D-吡喃甘露糖。

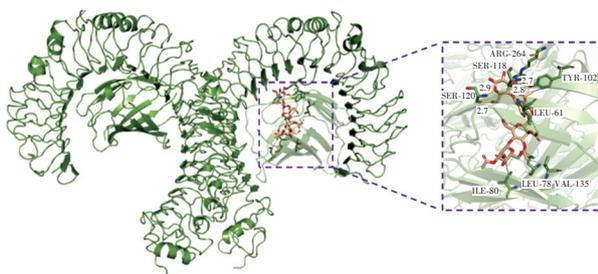


图5 最佳四糖片段与TLR4-MD-2的相互作用

Fig.5 Interaction between the optimal tetrasaccharide fragment and TLR4-MD-2

2.3 DOP亲水性片段筛选结果

考虑到葡萄糖和甘露糖的亲水性,在得到的最佳疏水性四糖片段的基础上引入3~4个葡萄糖和3个甘露糖,组合得到8个七糖和16个八糖多糖片段。同样参照经典底物LPS的结合模式设置对接盒子进行分子对接,结果见表2。

标,以判断两者的结合强弱。

由表1可知,随着糖残基的增加,结合强度逐渐增大,说明分子量对结合强度有一定的影响。其中结合最强片段为一个四糖片段,结合能为-8.06 kcal/mol,由M-2、3、M-2、3、M-2、G组成,含有3个乙酰基取代的甘露糖片段。

2.2.3 最佳疏水片段与TLR4-MD-2的相互作用

最佳四糖片段与TLR4-MD-2的相互作用见图5。

由图5可知,DOP寡糖已插入TLR4-MD-2的活性位点,结合在MD-2的疏水性口袋内。与氨基酸残基Leu 61、Leu 78、Ile 80、Tyr 102、Ser 118、Ser 120、Val 135和Arg 264形成相互作用。其中,与氨基酸残基Tyr 102、Ser 118、Ser 120和Arg 264之间存在氢键相互作用,与氨基酸残基Leu 61、Leu 78、Ile 80、Tyr 102和Val 135之间通过疏水形成相互作用。

表2 最佳七糖和八糖片段分子对接结果

Table 2 Molecular docking results of the optimal heptasaccharide and octasaccharide fragments

片段	组成	对接打分/(kcal/mol)
七糖	M-2、3、M-2、3、M-2、G、G、G、G	-8.2
八糖	M-2、3、M-2、3、M-2、G、G、M、M、G	-7.89

表2表明,最佳八糖片段对接打分为-7.89 kcal/mol,最佳七糖片段对接打分为-8.2 kcal/mol。八糖与TLR4-MD-2的结合能力较弱且不能对接至亲水区域,通过对比七糖片段发现,在可对接区域内,增加的糖环并未再进一步增强与亲水性结合区域的结合强度,反而由于去溶剂化等不利因素,造成结合能下降。因此,使用七糖来进一步研究铁皮石斛多糖与TLR4-MD-2的可能作用机制。

2.4 分子动力学模拟结果

为进一步研究七糖片段与TLR4-MD-2的可能作用机制,对七糖与TLR4-MD-2的复合物进行3条平行

的1 000 ns长时分子动力学模拟。对3条轨迹后900 ns共225 000×3帧结构的分簇分析,结果见图6。

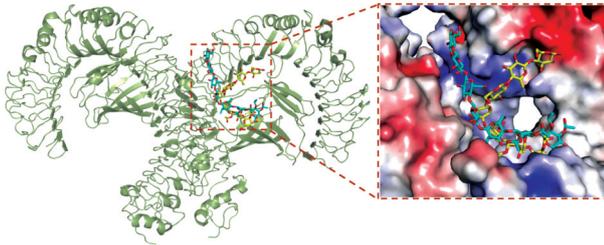


图6 七糖两种结合模式对比

Fig.6 Comparison of two binding modes of heptasaccharides

由图6可知,在得到的代表性构象中,七糖有两种结合模式:在第一种结合模式中(图6黄色底物),最佳四糖片段结合在MD-2的疏水口袋中,亲水性的3个葡萄糖结合在TLR4正电性底物结合区,末端糖基像经典底物LPS一样向TLR4与MD-2作用界面的电负性区域延伸(图3位置4附近)。第二种结合模式中(图6青色底物),四糖片段同样位于MD-2的疏水口袋中,3个葡萄糖片段经TLR4电正性底物结合区向电正性的TLR4亚基作用界面延伸(图3位置3附近)。其中,第一种结合模式为优势结合模式,在整个动力学过程中占到70.8%,与经典底物LPS结合模式类似。

为了进一步研究优势结合模式中DOP寡糖片段与TLR4-MD-2的作用机制,进行结合自由能和分解残基结合能的计算分析,结果见表3。

表3 对七糖片段结合有重要贡献的氨基酸残基

Table 3 Amino acid residues that contribute significantly to the binding of the heptasaccharide fragment

氨基酸残基	结合能贡献/(kcal/mol)	氨基酸残基	结合能贡献/(kcal/mol)
Arg 90	-4.97	Leu 87	-0.37
Phe 121	-3.16	Glu 150	-0.32
Leu 78	-2.22	Val 48	-0.29
Ile 80	-2.15	Val 82	-0.29
Phe 119	-2.08	Ile 32	-0.28
Ser 120	-1.93	Leu 54	-0.27
Ile 124	-1.86	Val 134	-0.27
Lys 58	-1.76	Gly 56	-0.24
Phe 151	-1.59	Tyr 79	-0.24
Leu 61	-1.58	Ile 46	-0.23
Cys 133	-1.55	Val 152	-0.22
Phe 440	-1.52	Thr 116	-0.21
Gln 436	-1.43	Leu 149	-0.20
Ile 52	-1.39	Lys 132	-0.20
Ser 118	-1.37	Tyr 131	-0.19
Phe 126	-1.14	Tyr 296	-0.17
Leu 60	-1.13	Tyr 295	-0.16

续表3 对七糖片段结合有重要贡献的氨基酸残基
Continue table 3 Amino acid residues that contribute significantly to the binding of the heptasaccharide fragment

氨基酸残基	结合能贡献/(kcal/mol)	氨基酸残基	结合能贡献/(kcal/mol)
Val 135	-1.08	Ile 63	-0.15
Ser 415	-1.07	Cyx 51	-0.15
Arg 264	-1.02	Thr 319	-0.15
Ile 117	-0.87	Asn 77	-0.13
Ile 153	-0.83	Gly 363	-0.13
Phe 76	-0.82	Lys 122	-0.12
Lys 341	-0.76	Ser 438	-0.11
Glu 439	-0.75	Cyx 148	-0.11
Met 414	-0.66	Gly 123	-0.11
Gly 59	-0.58	Tyr 292	-0.10
Thr 413	-0.57	Thr 81	-0.10
Lys 362	-0.53		

表3显示,找到的DOP七糖片段与TLR4-MD-2有较强的相互作用,结合能达到-67.528 9 kcal/mol。对该模式的分解残基结合能计算找到了对七糖结合有重要贡献的氨基酸残基,其相互作用见图7。

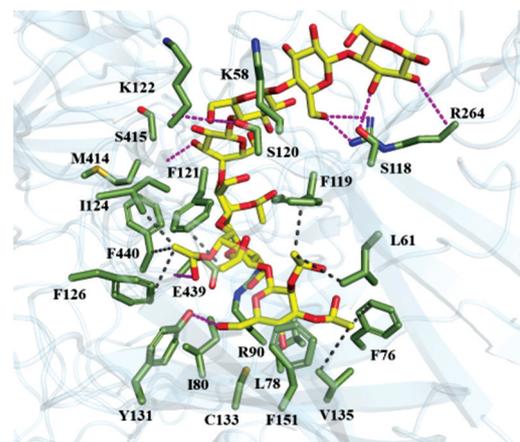


图7 最佳七糖片段与TLR4-MD-2的相互作用

Fig.7 Interaction of the optimal heptasaccharide fragment with TLR4-MD-2

由图7可知,氨基酸残基R90、S120、F121、S118、R264、K122、E439及M414主骨架与七糖底物形成氢键作用(图7洋红色虚线表示)。残基F121、L78、I80、F119、I124、K58、F151、L61、C133、F440、I52、F126、L60和V135与底物形成疏水相互作用(图7灰色虚线表示)。由此可知,铁皮石斛多糖主要通过氢键和疏水作用与TLR4-MD-2进行相互作用,发挥免疫活性。

3 结论

在本研究中,根据对TLR4-MD-2结合腔的亲疏水性分析,将DOP寡糖的研究分为疏水片段筛选和亲水片段筛选两个部分。通过分子对接和动力学模拟找到了与TLR4-MD-2有较强结合能力的七糖DOP片段,

具有与经典底物脂多糖相似的结合模式。其中的疏水性四糖片段结合在 MD-2 的疏水结合腔,亲水性三糖片段结合在电正性区域。作用机制分析表明,DOP 和 TLR4-MD-2 主要通过氢键和疏水作用力进行相互作用,其中疏水四糖片段带有的 4 个乙酰基,可能是 DOP 具有潜在免疫活性的关键。

参考文献:

- [1] XIE S Z, LIU B, ZHANG D D, et al. Intestinal immunomodulating activity and structural characterization of a new polysaccharide from stems of *Dendrobium officinale*[J]. Food & Function, 2016, 7(6): 2789-2799.
- [2] WEI Y, WANG L W, WANG D J, et al. Characterization and anti-tumor activity of a polysaccharide isolated from *Dendrobium officinale* grown in the Huoshan County[J]. Chinese Medicine, 2018, 13: 47.
- [3] YANG K, LU T T, ZHAN L H, et al. Physicochemical characterization of polysaccharide from the leaf of *Dendrobium officinale* and effect on LPS induced damage in GES-1 cell[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 149: 320-330.
- [4] LIANG J, CHEN S X, HU Y D, et al. Protective roles and mechanisms of *Dendrobium officinale* polysaccharides on secondary liver injury in acute colitis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 107(Pt B): 2201-2210.
- [5] ZHANG L J, HUANG X J, SHI X D, et al. Protective effect of three glucmannans from different plants against DSS induced colitis in female BALB/c mice[J]. Food & Function, 2019, 10(4): 1928-1939.
- [6] HUANG Y P, HE T B, CUAN X D, et al. 1, 4- β -D-Glucomanan from *Dendrobium officinale* activates NF- κ B via TLR4 to regulate the immune response[J]. Molecules, 2018, 23(10): 2658.
- [7] YU W X, REN Z Y, ZHANG X F, et al. Structural characterization of polysaccharides from *Dendrobium officinale* and their effects on apoptosis of HeLa cell line[J]. Molecules, 2018, 23(10): 2484.
- [8] TAO S C, LEI Z X, HUANG K W, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of two novel polysaccharides derived from the stem of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 57: 121-134.
- [9] YUE H, ZENG H, DING K. A review of isolation methods, structure features and bioactivities of polysaccharides from *Dendrobium* species[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2020, 18(1): 1-27.
- [10] XING X H, CUI S W, NIE S P, et al. Study on *Dendrobium officinale* O-acetyl-glucomannan (Dendronan[®]): Part II. Fine structures of O-acetylated residues[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 117: 422-433.
- [11] 单政欣. 铁皮石斛多糖基于小鼠免疫调节功能的构效机制研究[D]. 天津:天津科技大学,2022.
CHAN Zhengxin. The structure-activity mechanism of *Dendrobium officinale* polysaccharide based on the immunoregulatory function in mice[D]. Tianjin:Tianjin University of Science & Technology, 2022.
- [12] HUANG S Y, CHEN F, CHENG H, et al. Modification and application of polysaccharide from traditional Chinese medicine such as *Dendrobium officinale*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 157: 385-393.
- [13] ADHIKARI A, MAJUMDER S, BANERJEE S, et al. *Mycobacterium indicus pranii* (Mw)-mediated protection against visceral leishmaniasis: Involvement of TLR4 signalling[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012, 67(12): 2892-2902.
- [14] 张晓铮,张天舒,崔凤超,等. 靶向 Toll 样受体 4 的小分子调节剂[J]. 应用化学,2016, 33(8): 876-886.
ZHANG Xiaozheng, ZHANG Tianshu, CUI Fengchao, et al. Toll-like receptor 4 small molecule modulators[J]. Chinese Journal of Applied Chemistry, 2016, 33(8): 876-886.
- [15] MEDZHITOV R, PRESTON-HURLBURT P, JANEWAY C A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity[J]. Nature, 1997, 388(6640): 394-397.
- [16] OHTO U, FUKASE K, MIYAKE K, et al. Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVA[J]. Science, 2007, 316(5831): 1632-1634.
- [17] LI H, LIAO T T, DEBOWSKI A W, et al. Lipopolysaccharide structure and biosynthesis in *Helicobacter pylori*[J]. Helicobacter, 2016, 21(6): 445-461.
- [18] 吴蓓丽,吴月国,赵铮蓉,等. 铁皮石斛免疫调节作用及相关活性成分多糖的研究进展[J]. 中草药,2019, 50(21): 5373-5379.
WU Beili, WU Yueguo, ZHAO Zhengrong, et al. Advances in immunoregulatory effects and bioactive compounds of polysaccharides from *Dendrobium officinale*[J]. Chinese Herbal Medicines, 2019, 50(21): 5373-5379.
- [19] ZHANG X R, QI C H, GUO Y, et al. Toll-like receptor 4-related immunostimulatory polysaccharides: Primary structure, activity relationships, and possible interaction models[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 149: 186-206.
- [20] WU Y G, WANG K W, ZHAO Z R, et al. A novel polysaccharide from *Dendrobium devonianum* serves as a TLR4 agonist for activating macrophages[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 133: 564-574.
- [21] WEN Y F, XIAO H Y, LIU Y, et al. Polysaccharides from *Dendrobium officinale* ameliorate colitis-induced lung injury via inhibiting inflammation and oxidative stress[J]. Chemico-Biological Interactions, 2021, 347: 109615.
- [22] YANG K, ZHAN L H, LU T T, et al. *Dendrobium officinale* polysaccharides protected against ethanol-induced acute liver injury *in vivo* and *in vitro* via the TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. Cytokine, 2020, 130: 155058.
- [23] YU Y D, XU S Q, HE R, et al. Application of molecular simulation methods in food science: Status and prospects[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(6): 2684-2703.
- [24] LOLOK N, SUMIWI S A, MUHTADI A, et al. Molecular docking and molecular dynamics studies of bioactive compounds contained in noni fruit (*Morinda citrifolia* L.) against human pancreatic α -amylase[J]. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2022, 40(15): 7091-7098.
- [25] WILKINS M R, GASTEIGER E, BAIROCH A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server[M]//2-D Proteome Analysis Protocols. New Jersey: Humana Press, 2003: 531-552.
- [26] EISENBERG D, SCHWARZ E, KOMAROMY M, et al. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot[J]. Journal of Molecular Biology, 1984, 179(1): 125-142.
- [27] LEE T S, ALLEN B K, GIESE T J, et al. Alchemical binding free energy calculations in AMBER20: Advances and best practices for drug discovery[J]. Journal of Chemical Information and Modeling, 2020, 60(11): 5595-5623.
- [28] ADASME M F, LINNEMANN K L, BOLZ S N, et al. PLIP 2021: Expanding the scope of the protein-ligand interaction profiler to DNA and RNA[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(W1): W530-W534.
- [29] ROSIGNOLI S, PAIARDINI A. Boosting the full potential of PyMOL with structural biology plugins[J]. Biomolecules, 2022, 12(12): 1764.