

李润择, 曹东怡, 张中辉, 李晟, 吴嘉思, 王飞. 半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶caspase-1抑制剂体外筛选模型的构建及应用[J]. 应用与环境生物学报, 2022, 28 (3): 631-637

Li RZ, Cao DY, Zhang DH, Li S, Wu JS, Wang F. Establishment and application of screening model for caspase-1 inhibitor *in vitro* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2022, 28 (3): 631-637

半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶caspase-1抑制剂体外筛选模型的构建及应用

李润择^{1,4} 曹东怡^{1,4} 张中辉² 李晟^{1,4} 吴嘉思³ 王飞^{1✉}

¹中国科学院成都生物研究所天然产物研究中心 成都 610041

²四川大学化学工程学院 成都 610065

³成都中医药大学药学院 成都 611137

⁴中国科学院大学 北京 100049

摘要 半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白水解酶caspase-1 (Cystein-containing aspartat-specific protease-1) 通过介导白介素-1 β 和18 (interleukin-1 β , IL-1 β ; interleukin-18, IL-18) 及Gasdermin D的成熟, 启动炎症反应并诱导细胞焦亡, 参与多种疾病的发生发展. 因此构建出高效稳定的caspase-1抑制剂筛选模型对于发现新型caspase-1小分子抑制剂并深入研究caspase-1功能具有重要意义. 通过应用大肠杆菌系统克隆表达可溶的人源caspase-1蛋白活性区域, 以VX-765为阳性抑制剂, 建立caspase-1抑制剂体外筛选模型, 对实验室化合物文库中868个化合物进行筛选. 结果显示, 黄酮类化合物E-3-(4-(diethylamino)-benzylidene)-5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-7-methoxychroman-4-one (CIB-1710), 在体外对caspase-1活性有良好的抑制作用, 其IC₅₀为36.27 μ mol/L. 进一步研究发现CIB-1710在小鼠单核巨噬细胞系J774A.1上可抑制由脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 及尼日利亚菌素 (nigericin) 刺激所诱导的IL-1 β 释放, 且在高浓度下不影响细胞活力; 分子对接显示CIB-1710可与caspase-1蛋白的催化活性结构域高亲和力结合来抑制蛋白的剪切活性; 透析实验显示CIB-1710可逆抑制caspase-1剪切活性. 综上所述, 本研究所建立的caspase-1抑制剂体外筛选模型为发现新型高效的caspase-1小分子抑制剂提供了高效低成本的途径, 所发现的活性化合物CIB-1710可作为caspase-1抑制剂开展进一步研究. (图7 表1 参30)

关键词 caspase-1; 炎症小体; 抑制剂; 黄酮; 体外筛选

Establishment and application of screening model for caspase-1 inhibitor *in vitro*

LI Runze^{1,4}, CAO Dongyi^{1,4}, ZHANG Zhonghui², LI Sheng^{1,4}, WU Jiasi³ & WANG Fei^{1✉}

¹ Center for Natural Products Research, Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China

² School of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China

³ College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

⁴ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract Cysteine-containing aspartate-specific protease-1 (Caspase-1) plays a critical role in innate immunity, which initiates an inflammatory response and induces pyroptosis by mediating the maturation of interleukin (IL)-1 β , IL-18, and gasdermin D participating in the development and progression of multiple diseases. Therefore, the establishment of an efficient and stable caspase-1 inhibitor screening model is of great significance for the discovery of novel caspase-1 small-molecule inhibitors and in-depth investigation of caspase-1 functions. In this study, the soluble human caspase-1 protein was cloned and expressed in *Escherichia coli*. Using VX-765 as a positive inhibitor, an *in vitro* screening model for caspase-1 inhibitors was established and an in-house library consisting of 868 compounds was screened using this model. The results showed that a flavonoid compound, (E)-3-(4-(diethylamino)-benzylidene)-5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-7-methoxychroman-4-one (CIB-1710), had a significant inhibitory effect on caspase-1 activity *in vitro*, with an IC₅₀ of 36.27 μ mol/L. Further studies revealed that CIB-1710, acting on the mouse mononuclear macrophage cell line J774A.1, inhibited the release of IL-1 β induced by lipopolysaccharide and nigericin without affecting cellular viability. Molecular docking showed that CIB-1710 can bind to the catalytically active domain of caspase-1 with high affinity to inhibit its cleavage activity. Dialysis experiments showed that CIB-1710 reversibly inhibited the activity of caspase-1. The *in vitro* screening model for caspase-1 inhibitors established in this study provides an efficient and low-cost way

收稿日期 Received: 2021-02-27 接受日期 Accepted: 2021-03-16

国家自然科学基金项目 (22177110) 和四川省科技计划项目 (2021YFH0079) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (22177110) and the Sichuan Science and Technology Program (2021YFH0079)

✉通信作者 Corresponding author (E-mail: wangfei@cib.ac.cn)

to discover novel and efficient caspase-1 small-molecule inhibitors, and the active compound CIB-1710 warrants further investigation as a novel caspase-1 inhibitor.

Keywords caspase-1; inflammasome; inhibitor; flavonoid; *in vitro* screening

固有免疫是机体识别“自我”与“非我”的第一道防线^[1]。免疫细胞通过模式识别受体(pathogen recognition receptor, PRRs)来快速识别外源非己的病原相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)及内源损伤产生的危险相关分子模式(damage-associated molecular pattern, DAMP),从而在消除危险的同时对自身组织及有益微生物保持耐受以维持机体的正常功能^[2]。位于胞内的NOD样受体样蛋白(NOD-like receptors, NLRs)是一类负责信号转导的PRRs,对于DAMP及PAMP均能识别。在识别到来自PAMP/DAMP的危险后,特定的NLR将寡聚并与衔接蛋白和特定的caspase结合,从而激活caspase,激活的caspase通过产生成熟的炎症因子IL-1 β 、IL-18及焦亡诱导因子Gasdermin D来导致炎症与焦亡的发生发展,进而实现固有免疫的防御作用^[3]。其中NLRP3炎症小体是人类22个NLRs家族中研究最多、最成熟的成员之一。目前研究已发现多种物质可导致NLRP3激活,包括病原微生物及其代谢产物、尿酸晶体、活性氧、胞外ATP等^[4]。激活的NLRP3进行寡聚^[5],从而招募凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC)蛋白,形成纤维化聚集的ASC^[6],聚集的ASC招募无活性的pro-caspase-1,导致pro-caspase-1自裂解从而产生p20/p10四聚体而激活^[7]。激活的caspase-1通过对pro-IL-18、pro-IL-1 β 等炎症因子的前体进行剪切修饰,促进其成熟、分泌,发挥强大的促炎作用来调节宿主针对病原体感染和自身损伤所导致的固有免疫调节^[8]。

Caspase-1是caspase家族中致炎caspase中的一种,其编码基因位于染色体11q22.3,全长蛋白分子量(M_r)为45 $\times 10^3$,以无活性的酶原形式(pro-caspase-1)存在于细胞质中。其结构包括caspase招募结构域(CARD)和源于同一多肽链的具有催化活性的p20、p10亚基^[9]。当pro-caspase-1被激活的炎症小体招募时,因局部浓度增加而发生二聚,通过自剪切去除CARD域及p20、p10亚基间的连接肽段,形成具有酶活性的p20/p10异四聚体,进而剪切IL-1 β 、IL-18及Gasdermin D的前体,启动炎症及焦亡^[10]。目前已有多项研究显示caspase-1与多种疾病的发生发展密切相关,例如痛风^[11]、二型糖尿病^[12]、亨廷顿症^[13]、类风湿关节炎^[14]、急性胰腺炎^[15]等,因此是治疗炎症相关疾病的一个重要靶点。

目前已有多种具有抗炎活性的caspase-1小分子抑制剂被研发并进入临床前研究,但实际进入临床使用的化合物却为数不多且副作用较大^[16],因此开发新型高效且安全的caspase-1小分子抑制剂对于治疗炎症相关疾病具有重要意义。本研究利用大肠杆菌原核表达系统,表达纯化人源caspase-1蛋白,构建caspase-1抑制剂的体外筛选模型,对化合物文库进行筛选,通过检测蛋白剪切活性来发现caspase-1的高效抑制剂,并进一步检测化合物的细胞毒性及抑制IL-1 β 释放能力,为caspase-1高效安全抑制剂的研发奠定基础。

1 材料

1.1 细胞与试剂

小鼠单核巨噬细胞系J774A.1(武汉普诺赛公司);

caspase-1 cDNA(北京义翘神州科技有限公司); pET-30a载体(大连Takara Bio公司); Trans5 α 化学感受态细胞, Trans BL21(DE3)化学感受态细胞(北京全式金生物技术有限公司); 限制性内切酶BamHI、SalI、T4 DNA连接酶(美国Thermo Fisher Scientific公司); 通用型DNA纯化回收试剂盒, 无内毒素质粒大提试剂盒(北京天根生化科技公司); FastPure Plasmid Mini Kit(南京诺唯赞生物科技股份有限公司); caspase-1荧光底物Ac-WEHD-AMC(美国Enzo Life Sciences公司); 卡那霉素(Kanamycin, Kana)(上海生工生物工程股份有限公司); 异丙基硫代半乳糖苷(Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside, IPTG)(美国Amresco公司); 氯化钠(成都市科隆化学品有限公司); 苯甲基磺酰氟(PMSF)、二甲基亚砜(DMSO)、咪唑(北京索莱宝科技有限公司); Ni琼脂糖凝胶(江苏康为世纪生物有限公司); 酵母提取物、胰蛋白胨(英国OXOID公司); 琼脂糖(北京兰杰柯生物科技有限公司); DMEM高糖培养基、PBS、青链霉素(美国HyClone公司); 胎牛血清(上海ExCell Bio公司); 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS), 透析袋(安徽Biosharp公司); 尼日利亚菌素(美国Sigma公司); 小鼠IL-1 β 高灵敏度ELISA试剂盒(杭州联科生物公司); CCK8试剂盒(上海蓝木化工有限公司)。

1.2 化合物

待筛选化合物来自本课题组的天然产物化合物库,共868个天然产物结构改造化合物。

1.3 仪器

酶标仪、高速低温离心机、细胞培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司); 超声破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); PCR仪(杭州朗基科学仪器有限公司); 凝胶电泳仪(美国Bio-Rad公司); ImageQuant LAS500一体化成像仪(美国GE Healthcare公司); 恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司); 倒置显微镜(上海光学仪器厂); 超净工作台(苏州苏洁净化设备公司); 脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 立式压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂)。

2 方法

2.1 Caspase-1-pET30a表达质粒的构建

(1) PCR: 根据人源caspase-1的p20/p10活性区域基因序列,设计PCR引物: BamHI-caspase-1; caspase-1-SalI, 序列如表1所示。参照赛默飞世尔科技公司的产品说明在55 $^{\circ}\text{C}$ 下进行DNA 寡核苷酸退火反应, PCR 获得双链BamHI-caspase-1 -SalI, 将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,随后纯化回收,检测浓度。

(2) 酶切: 将pET-30a质粒与双链caspase-1片段共同使用限制性内切酶BamHI, SalI在37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下酶切1 h, 随后进行凝胶电泳, 纯化回收并检测浓度。

(3) 连接: 载体与插入片段按照0.03 pmol : 0.3 pmol的比例加入, 通过T4连接酶在16 $^{\circ}\text{C}$ 条件下连接2 h。

(4) 转化: 将感受态细胞Trans5 α 在冰上解冻, 吸取50

μL Trans5α加入10 μL连接产物, 轻柔吹打混匀后冰浴30 min, 42 °C热激45 s, 再冰浴2 min, 转入加有600 μL无抗性的LB培养基的EP管中, 于摇床内37 °C, 200 r/min振摇50 min使细菌复苏. 吸取50 μL菌液均匀涂布于卡那抗性固体LB培养基中, 37 °C培养箱孵育过夜.

(5) 菌落鉴定: 挑取平板培养基上的多个的单克隆菌, 先在20 μL灭菌水中沾一下后转入1 mL LB培养基中; 灭菌水100 °C加热5 min后, 10 000 r/min离心1 min, 取上清液为模板, 以灭菌水为阴性对照, 以cDNA为阳性对照, 进行PCR, 将阳性菌所对应的培养基加入3 mL Kana LB培养基, 于37 °C摇床内200 r/min振摇过夜.

(6) 小提质粒: 按照FastPure Plasmid Mini Kit说明书进行小提质粒, 并检测浓度.

(7) 酶切鉴定: 将所得到的caspase-1- pET-30a质粒用限制性内切酶BamHI, SalI进行酶切, 进行双酶切鉴定, 并将质粒送至公司进行测序, 同时阳性菌保菌.

2.2 Caspase-1蛋白表达纯化

(1) 转化: 将BL21 (DE3) 感受态细胞在冰上解冻, 吸取50 μL 感受态细胞加入10 μL pET-30a-caspase-1重组质粒 (图1), 轻柔吹打混匀后冰浴30 min, 42 °C热激45 s, 再冰浴2 min, 转入加有600 μL无抗性的LB培养基的EP管中, 于摇床内37 °C, 200 r/min振摇50 min使细菌复苏. 吸取50 μL菌液均匀涂布于卡那抗性的固体LB培养基中, 37 °C培养箱孵育过夜.

(2) 扩大培养: 挑取单克隆菌至10 mL Kana LB培养基中, 37 °C摇床中振摇过夜, 然后转至100 mL Kana LB培养基中继续振摇.

(3) 诱导: 当菌液的OD₆₀₀ = 0.5-0.6时, 加入IPTG, 使终浓度为0.5 mmol/L, 在25 °C条件下振摇诱导过夜.

(4) 蛋白提取纯化: 将菌液转入离心罐中, 4 °C, 4 000 r/min离心10 min, 尽量除去上清后, 加入20 mL PBS吹打混悬, 转入50 mL离心管中, 4 °C, 10 000 r/min离心15 min, 去掉上清, 加入20 mL 裂解Buffer (50 mmol/L NaH₂PO₄, pH 9, 10 mmol/L 咪唑, 0.3 mol/L NaCl) 吹打重悬后加入PMSF (终浓度为0.1 mmol/L), 置于冰上进行超声裂解破碎 (功率400 W, 工作2 s, 暂停4 s, 共30 min). 随后4 °C, 10000 r/min离心20 min, 将上清液转入用Binding Buffer (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9, 10mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl) 预平衡好的Ni琼脂糖凝胶柱中, 于冰上水平放置, 100 r/min振摇孵育1 h. 然后将上清液放出后, 用20 mL Binding Buffer清洗一次柱子后, 用10 mL Elution Buffer (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9, 300 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl) 将蛋白洗脱下来, 通过

BCA试剂盒检测蛋白浓度, 加入甘油至总体积30%, 分装冻存于-80 °C. 蛋白纯化后纯度通过SDS-PAGE进行检测.

2.3 Caspase-1酶活性检测及体外筛选模型构建

参考吴嘉思等人的实验设计^[17], 以Ac-WEHD-AMC作为caspase-1的底物, caspase-1可识别出该底物的色氨酸-谷氨酸-组氨酸-天冬氨酸的四肽序列并剪切天冬氨酸与AMC之间的肽键, 释放出荧光基团AMC (7-氨基-4-甲基香豆素) 从而产生荧光信号. 通过酶标仪以380 nm为激发波长来检测460 nm处的荧光值, 记录30 min内每分钟的荧光值, 绘制相对荧光单位 (relative fluorescence units, RFU) /时间的曲线, 计算出曲线的斜率可反映出酶活性大小. 以VX-765为阳性抑制剂, 验证筛选体系是否正确. 反应缓冲液组成为Hepes 50 mmol/L、DTT 2 mmol/L、EDTA 5 mmol/L、甘油20%, 以缓冲液稀释荧光底物至反应浓度. 反应体系组成: caspase-1蛋白; VX-765或待测化合物及荧光底物Ac-WEHD-AMC.

2.4 体外筛选

对本课题组化合物文库中的天然产物衍生物进行筛选. 将45 μL caspase-1纯化蛋白 (终浓度100 nmol/L) 置于黑色96孔板中, 分别与5 μL待测化合物 (终浓度50 μmol/L) 或阳性抑制剂VX-765 (终浓度100 nmol/L) 在4 °C下孵育30 min, 然后加入用反应缓冲液稀释的荧光底物 (终浓度为15 μmol/L), 通过酶标仪检测30 min内每分钟的荧光强度, 拟合出RFU/min曲线, 计算曲线斜率以代表酶活性. 以加药组活性比未处理组的活性, 计算化合物对caspase-1酶活性的抑制率. 使用Graphpad Prism 8.0 软件拟合出化合物的抑制率曲线, 得到IC₅₀.

2.5 CCK8检测CIB-1710对J774.1细胞的细胞毒作用

将处于对数生长期的J774A.1细胞种植于96孔板中, 当汇合率达到90%左右时, 加入不同浓度的CIB-1710 (0.1、1、10、20、50、100 μmol/L), 每个浓度做3个复孔, 作用24 h后换液, 每孔加入10 μL CCK8试剂, 在37 °C培养箱中孵育1 h后, 通过酶标仪检测450 nm处吸光度.

2.6 细胞水平检测白介素-1β释放

将处于对数生长期的J774A.1细胞种植于12孔板中, 当汇合率达到90%-100% 时将培养基换为Opti-MEM, 加入LPS (1 μg/mL) 刺激3 h后, 加入化合物CIB-1710 (1、5、10 μmol/L), 作用30 min后, 加入尼日利亚菌素 (10 μmol/L) 作用30 min, 收集上清液, 使用小鼠IL-1β高灵敏度ELISA试剂盒检测IL-1β释放.

2.7 分子对接

进行分子对接运算使用的软件为Autodock 4.2.6. 化合物

表1 寡核苷酸引物及载体

Table 1 Oligonucleotide primer sequences and vector

基因 Gene	引物 Primer	引物序列 Primer sequence	限制性内切酶 Restriction enzyme	载体 Vector
Caspase-1	BamHI-caspase-1	5'GTTGGATCCAACCCAGCTATGCCACATCC3'	BamHI	pET-30a
	caspase-1-SalI	5'GTTGTCGACTTAATGTCCTGGGAAGAGGTAG3'	SalI	

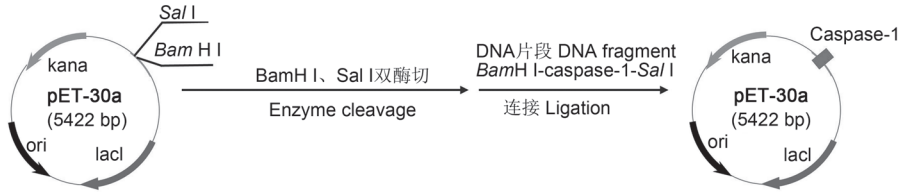


图1 Caspase-1-pET-30a重组质粒图.

Fig. 1 Schematic diagram of the caspase-1 construction in pET-30a vector.

CIB-1710经过最小能量化处理后获得稳定的构象,从Protein Data Bank网站获取到caspase-1的晶体结构(PDB ID: 2HBQ)。将晶体结构进行去除水分子、加上氢原子、去除配体的处理,获得单独的caspase-1的晶体结构与化合物进行模拟对接运算,次数为100次。选取100次计算结果中结合自由能最低的结果(最低能量具有优先选择的可能性),导出结合的复合结构,用pymol进行图像处理,获得所需要的结果。

2.8 抑制剂可逆性评价

将caspase-1蛋白(100 nmol/L)分为4组,每组1 mL,分别与DMSO(5 μ L)、caspase-1不可逆共价抑制剂Z-VAD-FMK(终浓度50 μ mol/L)、caspase-1可逆共价抑制剂VX-765(终浓度100 nmol/L)、CIB-1710(终浓度50 μ mol/L)在4 $^{\circ}$ C下孵育30 min,检测蛋白活性。同时将透析袋在沸水中加热5 min以除去甘油等杂质,冷却后将上述4组蛋白放入透析袋中,加入透析液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9, 0.5 mol/L NaCl),4 $^{\circ}$ C透析过夜,检测各组蛋白活性。

2.9 数据分析

使用Graphpad Prism 8.0软件对实验结果进行统计分析,使用该软件自带的t检验及one-way ANOVA来分析实验数据的差异性,当P值小于0.05时认为有显著性差异,具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 Caspase-1蛋白表达纯化

为检测重组caspase-1蛋白是否在大肠杆菌体外表达系统中可溶性表达,取IPTG诱导前后菌液进行SDS-PAGE电泳检测。SDS-PAGE电泳结果显示caspase-1重组蛋白在该体系中可溶表达,且在IPTG诱导后表达增加(图2A)。随后检测蛋白在纯化后的情况,SDS-PAGE结果显示,蛋白经Ni琼脂糖凝胶纯化后杂蛋白含量明显降低,纯度提高(图2B),表明成功地利用大肠杆菌体系表达并纯化出了人源caspase-1重组蛋白。

3.2 Caspase-1活性检测及筛选条件确定

使用荧光底物Ac-WEHD-AMC验证所得到的caspase-1蛋白是否具有剪切活性,并检测了caspase-1蛋白与底物的浓度关系以确定最佳的筛选条件。图3A为使用100 nmol/L蛋白分别催化不同浓度的荧光底物Ac-WEHD-AMC,结果显示提取纯化的caspase-1蛋白可高效地识别并剪切底物,反应初速率随底物浓度增加而增加,当底物浓度为15 μ mol/L时,蛋白

可在30 min内将底物完全水解,催化效果最好。图3B为分别使用50、100、200 nmol/L蛋白催化15 μ mol/L荧光底物,结果显示酶活性随蛋白浓度增加而增加,当浓度增加至200 nmol/L时,活性与100 nmol/L相差不大。图3C显示蛋白活性可被阳性抑制剂VX-765以浓度依赖的方式抑制,提示体系构建正确。基于上述结果,确定筛选体系中蛋白浓度为100 nmol/L,底物Ac-WEHD-AMC终浓度为15 μ mol/L,阳性抑制剂VX-765浓度为100 nmol/L。

3.3 体外筛选中发现小分子抑制剂

通过构建上述的caspase-1抑制剂体外筛选模型,对本课题组的化合物文库进行了筛选,初筛浓度为50 μ mol/L。发现了化合物CIB-1710(图4A,化学式为 $C_{28}H_{24}O_7$, E-3-(4-(diethylamino)-benzylidene)-5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-7-methoxychroman-4-one)对caspase-1活性的抑制率约为90.2%(图4B),进一步研究发现,该化合物以浓度依赖的方式在体外抑制caspase-1活性,IC₅₀为36.27 μ mol/L(图4C)。

3.4 CIB-1710抑制J774. A细胞系IL-1 β 释放

由于激活的caspase-1可剪切pro-IL-1 β ,产生成熟的IL-1 β 释放至胞外,而抑制caspase-1活性会减少IL-1 β 释放。因此我们在小鼠单核巨噬细胞J774.A.1上检测CIB-1710对IL-1 β 释放的影响。结果如图5A所示,在LPS预处理3 h后,加入尼日利亚菌素刺激可诱导IL-1 β 大量释放,而在尼日利亚菌素刺激前,加入VX-765或CIB-1710可明显抑制IL-1 β 的产生,且CIB-1710

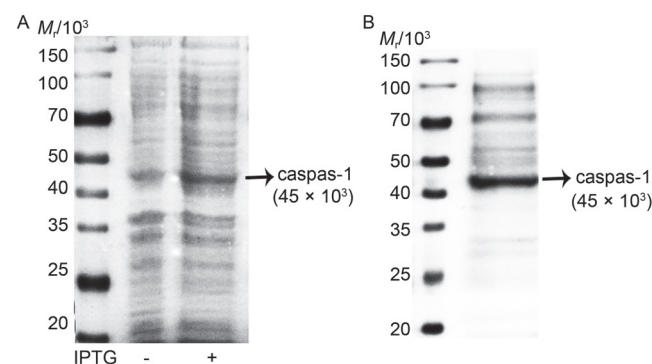


图2 重组caspase-1蛋白SDS-PAGE电泳分析。A图为重组caspase-1经IPTG诱导前后表达对比;B图为纯化后的重组caspase-1蛋白。

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant caspase-1 protein. A: Expression comparison of recombinant caspase-1 before and after IPTG induction; B: Purification of recombinant caspase-1.

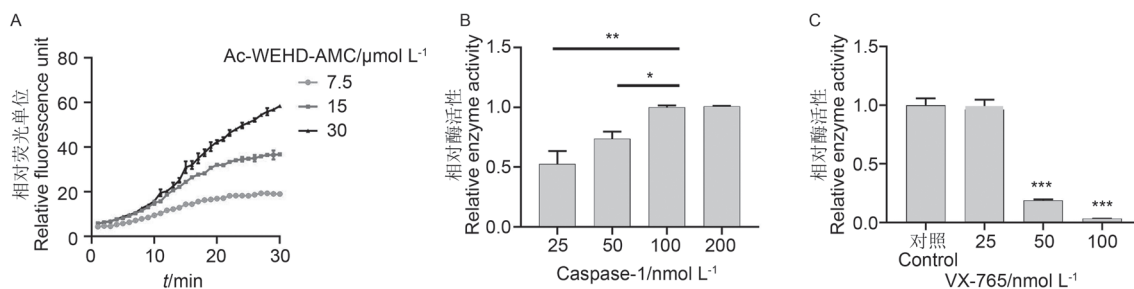


图3 Caspase-1活性检测及筛选条件优化。A图为100 nmol/L caspase-1蛋白剪切不同浓度的荧光底物Ac-WEHD-AMC;B图为不同浓度caspase-1蛋白剪切15 μ mol/L荧光底物Ac-WEHD-AMC;C图为不同浓度VX-765对caspase-1蛋白剪切活性的抑制作用。数值为平均值 $\pm$ 标准误($N=3$)。

Fig. 3 Caspase-1 activity assay and optimization of screening conditions. A: 100 nmol/L caspase-1 protein cleaved the fluorescent substrate AC-WEHD-AMC at different concentrations; B: 15 μ mol/L fluorescence substrate AC-WEHD-AMC was cleaved by different concentrations of protein; C: Inhibitory effect of different concentrations of VX-765 on protein activity. Values are mean $\pm$ SE ($N=3$).

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

在10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对IL-1 β 释放的抑制作用最为明显. 细胞毒实验显示CIB-1710在高浓度时不会影响细胞增殖, 说明CIB-1710对IL-1 β 释放的抑制不是由细胞毒产生.

3.5 CIB-1710与caspase-1分子对接

为了解CIB-1710与caspase-1之间的结合方式及位点, 我

们利用caspase-1蛋白的X射线晶体结构 (PDB ID: 2HBQ), 通过Autodock 4.2.6软件进行分子对接研究. 结果显示, CIB-1710与caspase-1的自由结合能为-8.21 kcal/mol, 表明化合物可自发高亲和地与蛋白发生相互作用. 图6C、6D显示CIB-1710可与位于p20亚基的Asp185, 位于p10亚基的Arg352残

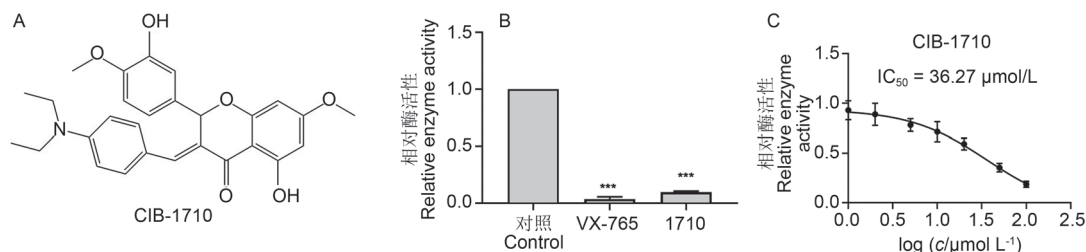


图4 CIB-1710抑制caspase-1活性. A图为CIB-1710结构式; B图为50 $\mu\text{mol/L}$ CIB-1710对caspase-1活性的抑制作用; C图为CIB-1710的 IC_{50} 值. 数值为平均值 $\pm$ 标准误 ($N=3$).

Fig. 4 CIB-1710 inhibits caspase-1 activity. A: Structure of CIB-1710; B: The inhibitory effect of 50 $\mu\text{mol/L}$ CIB-1710 on caspase-1 activity; C: The IC_{50} value of CIB-1710. Values are mean $\pm$ SE ($N=3$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$.

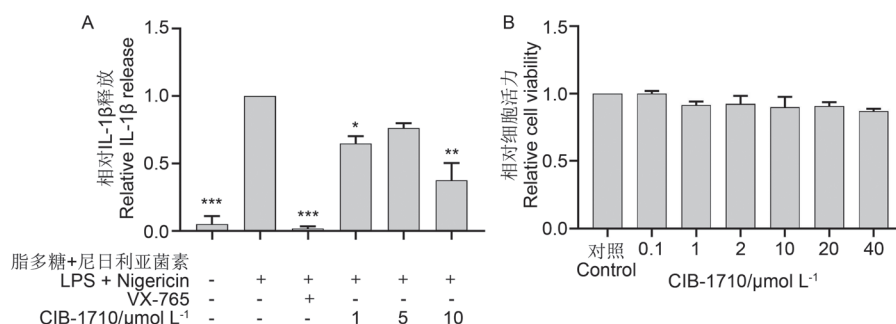


图5 CIB-1710抑制IL-1 β 释放及对细胞增殖的影响. 图A为CIB-1710在J774A.1细胞上对IL-1 β 释放的影响. 图B为CIB-1710对J774A.1细胞增殖的影响. 数值为平均值 $\pm$ 标准误 ($N=3$).

Fig. 5 Effect of CIB-1710 on IL-1 β release and cell proliferation. A: Effect of CIB-1710 on IL-1 β release on J774A.1 cell line. B: Effect of CIB-1710 on cell viability on J774A.1 cell line. Values are mean $\pm$ SE ($N=3$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$.

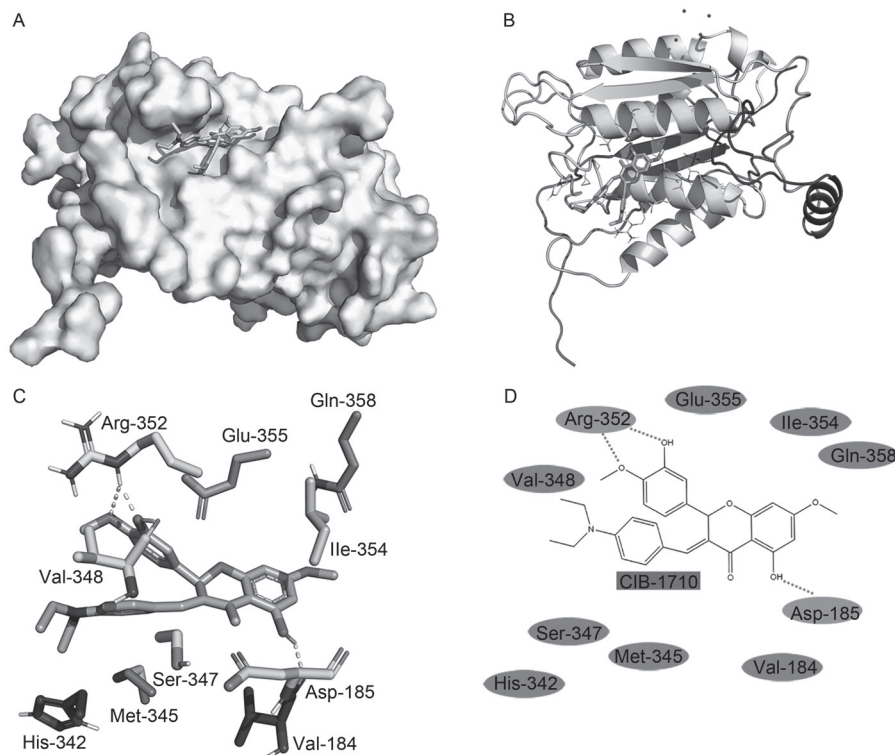


图6 Caspase-1与CIB-1710分子对接. 图A、B显示CIB-1710与caspase-1结合的空间结构, 图C、D显示CIB-1710与caspase-1具体的结合位点及方式. **Fig. 6 Molecular docking of CIB-1710 on caspase-1.** A and B: The spatial structure of CIB-1710 binding to caspase-1; C and D: The specific binding sites and ways of CIB-1710 binding to caspase-1.

基形成氢键,并通过疏水作用与氨基酸残基Val184、His342、Met345、Ser347、Val348、Ile354、Glu355及Gln358结合。

3.6 CIB-1710非共价可逆抑制caspase-1

我们以caspase-1的可逆共价抑制剂VX-765^[18]和不可逆共价抑制剂Z-VAD-FMK^[19]为对照,采用化合物与蛋白孵育后透析的方法,评价了CIB-1710与caspase-1的结合方式。结果如图7所示,caspase-1在与不可逆共价抑制剂Z-VAD-FMK孵育后,其活性在透析后不能恢复;与可逆共价抑制剂VX-765孵育后,其活性在透析后恢复70%左右;CIB-1710对caspase-1的抑制作用在透析后完全消失。通过与Z-VAD-FMK及VX-765比较,表明CIB-1710与caspase-1之间的结合方式为可逆结合。

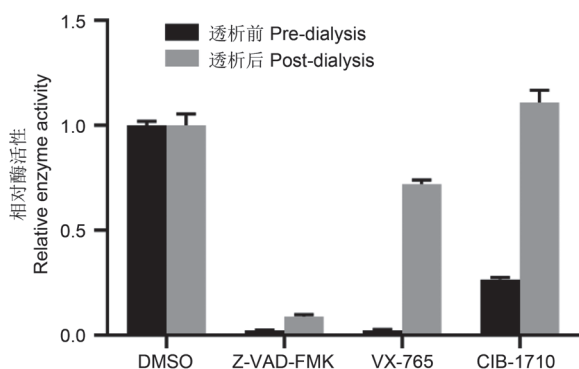


图7 CIB-1710可逆抑制caspase-1. 图7为caspase-1蛋白与DMSO、不同类型抑制剂及CIB-1710共孵育后在透析前后的酶活性。数值为平均值±标准误(N=3)。

Fig. 7 CIB-1710 reversibly inhibits caspase-1. Fig. 7 shows the activity of caspase-1 incubated with DMSO, different types of inhibitors, and cib-1710 pre and post dialysis. Values are mean ± SE (N = 3).

4 讨论

Caspase-1的过度激活与多种疾病的发生发展密切相关,因此是治疗炎症相关疾病的重要靶点。目前已有高效的caspase-1抑制剂进入临床试验阶段,例如VX-765、VX-740和沙利度胺^[20]。其中VX-765与VX-740是caspase-1可逆抑制剂^[18,21],目前主要用于治疗癫痫和牛皮癣进入二期临床试验,但因为严重的肝毒性而未能进入临床三期试验^[22]。沙利度胺最早作为一种镇静剂来治疗孕妇孕吐,但因为严重的先天致畸而停止使用^[23]。最近的研究显示沙利度胺可以通过抑制caspase-1以及抑制血管生成来发挥抗肿瘤作用^[20],目前主要被用于治疗晚期多发性骨髓瘤及前列腺癌,但对其他肿瘤却无明显作用^[24]。综上所述,目前已开发的caspase-1抑制剂虽然能高效抑制caspase-1活性并发挥显著的抗炎作用,但严重的毒副作用导致它们不能被广泛使用。因此有必要研发新型高效且毒性小的caspase-1抑制剂用于炎症小体相关疾病的治疗。本研究所发现的化合物CIB-1710在有效抑制caspase-1酶活性及促炎因子IL-1 β 释放的同时,对细胞活力基本无影响,因此可作为先导化合物进行进一步的结构修饰改造,以发现效果更好且使用安全的caspase-1抑制剂。

黄酮类化合物具有广泛的生物活性,可通过调控NF- κ B、IRF、MAPK等信号通路,来抑制例如NO、COX-2、IL-1 β 、

PGE2等炎症介质的释放来发挥抗炎作用^[25],目前也发现多种黄酮类化合物通过抑制炎症小体的激活以及下调炎症小体成分的表达及抑制炎症小体装配,从而导致caspase-1激活的抑制及促炎因子的成熟和分泌来发挥其抗炎作用。例如槲皮素通过降低肝脏中NLRP3及caspase-1的表达来抑制代谢综合征和肝脏脂肪变性^[26];芹菜素通过干扰NLRP3炎症小体的装配从而抑制caspase-1的激活及IL-1 β 的产生^[27];木犀草素可通过下调NLRP3和ASC等炎症小体组成部分的表达并降低心肌缺血再灌注损伤大鼠和缺氧复氧诱导的H9c2细胞的IL-1 β 和IL-18血清水平来改善心肌缺血再灌注损伤的症状^[28],但尚未发现可直接抑制caspase-1剪切活性的黄酮类化合物。我们首次发现了黄酮类化合物具有caspase-1抑制剂的活性,为进一步了解黄酮类化合物的抗炎作用提供了新的角度。由于caspase家族基因高度保守,同源性很高且结构相似,因此CIB-1710是否会影响其他caspases的结构与功能,是否是caspase-1的特异性抑制,还需进一步研究。

我们通过分子对接计算出了CIB-1710在caspase-1蛋白中的结合位点,为进一步证明化合物在该位点的结合能抑制caspase-1活性,我们将CIB-1710与2个已报道的高效caspase-1抑制剂Ac-YVAD-H^[29]和化合物14^[30]进行结合位点的对比。通过对比发现Ac-YVAD-H、化合物14及CIB-1710在caspase-1蛋白p10亚基的一个口袋空间中存在相似的非共价结合,提示CIB-1710在该位点的结合的确可抑制caspase-1活性。但除此之外,Ac-YVAD-H及化合物14还可与caspase-1的催化活性位点Cys285形成共价结合,产生更强烈的抑制作用。与上述caspase-1高效抑制剂的结构对比,CIB-1710缺乏可进入Cys285活性中心的基团,因此限制了其对caspase-1的抑制能力,这也进一步支持我们所发现的CIB-1710以非共价可逆结合的方式抑制caspase-1剪切活性。因此,有必要对CIB-1710进行进一步的结构修饰,适当延长分子尺寸并添加合适基团,使化合物结构能进入caspase-1的Cys285活性中心,产生更高效抑制作用。

5 结论

我们利用大肠杆菌原核表达表达纯化了人源caspase-1蛋白,通过构建caspase-1抑制剂体外筛选模型,发现黄酮类化合物CIB-1710可在体外有效抑制caspase-1蛋白活性。进一步试验发现CIB-1710可通过非共价可逆的方式与caspase-1的催化区域相互作用来抑制其剪切活性。此外,CIB-1710在小鼠单核巨噬细胞内能抑制由脂多糖和尼日利亚菌素刺激诱导的IL-1 β 释放,且细胞毒性很低,因此具有成为caspase-1新型抑制剂的潜力。本研究首次发现黄酮类化合物可通过直接抑制caspase-1活性来抑制促炎因子的释放,可为研究黄酮类化合物抗炎机制提供新的方向。

CIB-1710在细胞上对于IL-1 β 释放的抑制效果优于体外对caspase-1活性的抑制效果,部分原因是体外表达纯化的蛋白受到多种因素的影响,导致构象与活性与细胞内源蛋白存在差异,另一方面也提示CIB-1710可能还通过其他方式调控IL-1 β 的释放。因此有必要进一步开展CIB-1710的构效关系研究,在提高其抑制caspase-1活性外,明确其发挥抗炎活性所调控的信号通路。

参考文献 [References]

- Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes [J]. *Cell*, 2010, **140** (6): 821-832
- LaRock CN, Nizet V. Inflammasome/IL-1 β Responses to streptococcal pathogens [J]. *Front Immunol*, 2015, **6**: 518
- Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, Zhuang Y, Cai T, Wang F, Shao F. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death [J]. *Nature*, 2015, **526** (7575): 660-665
- Davis BK, Wen H, Ting JPY. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases [J]. *Annu Rev Immunol*, 2011; **29** (1):707
- Swanson KV, Deng M, Ting JPY. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics [J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, **19** (8): 477-489
- Schmidt FI, Lu A, Chen JW, Ruan J, Tang C, Wu H, Ploegh HL. A single domain antibody fragment that recognizes the adaptor ASC defines the role of ASC domains in inflammasome assembly [J]. *J Exp Med*, 2016, **213** (5): 771-790
- Boucher D, Monteleone M, Coll RC, Chen KW, Ross CM, Teo JL, Gomez GA, Holley CL, Bierschenk D, Stacey KJ, Yap AS, Bezradica JS, Schroder K. Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity [J]. *J Exp Med*, 2018, **215** (3): 827-840
- Gaidt MM, Hornung V. Alternative inflammasome activation enables IL-1 β release from living cells [J]. *Curr Opin Immunol*, 2017, **44**: 7-13
- Elliott EI, Sutterwala FS. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly [J]. *Immunol Rev*, 2015, **265** (1): 35-52
- Yang Y, Jiang G, Zhang P, Fan J. Programmed cell death and its role in inflammation [J]. *Milit Med Res*, 2015, **2** (1): 12-12
- Terkeltaub R, Sundry JS, Schumacher HR, Murphy F, Bookbinder S, Biedermann S, Wu R, Mellis S, Radin A. The IL-1 inhibitor rilonacept in treatment of chronic gouty arthritis: results of a placebo-controlled, monosequence crossover, nonrandomized, single-blind pilot study[J]. *Ann Rheum Dis*, 2009, **68** (10): 1613-1617
- Vandanmagsar B, Youm Y-H, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, Ravussin E, Stephens JM, Dixit VD. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance [J]. *Nat Med*, 2011, **17** (2): 179-188
- Kumar A, Kumar V, Singh K, Kumar S, Kim Y-S, Lee Y-M, Kim J-J. Therapeutic advances for huntington's disease [J]. *Brain Sci*, 2020, **10** (1): 43
- Guo C, Fu R, Wang S, Huang Y, Li X, Zhou M, Zhao J, Yang N. NLRP3 inflammasome activation contributes to the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2018, **194** (2): 231-243
- Jin HZ, Yang XJ, Zhao KL, Mei FC, Zhou Y, You YD, Wang WX. Apocynin alleviates lung injury by suppressing NLRP3 inflammasome activation and NF- κ B signaling in acute pancreatitis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, **75**: 105821
- Xu S, Li X, Liu Y, Xia Y, Chang R, Zhang C. Inflammasome inhibitors: promising therapeutic approaches against cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, **12** (1): 64
- Wu J, Luo Y, Jiang Q, Li S, Huang W, Xiang L, Liu D, Hu Y, Wang P, Lu X, Zhang G, Wang F, Meng X. Coptisine from *Coptis chinensis* blocks NLRP3 inflammasome activation by inhibiting caspase-1 [J]. *Pharmacol Res*, 2019, **147**: 104348
- Wannamaker W, Davies R, Namchuk M, Pollard J, Ford P, Ku G, Decker C, Charifson P, Weber P, Germann UA, Kuida K, Randle JC. (S)-1-((S)-2-[[1-(4-amino-3-chloro-phenyl)-methanoyl]-amino]-3,3-dimethyl-butanoyl)-pyrrolidine-2-carboxylic acid ((2R,3S)-2-ethoxy-5-oxo-tetrahydro-furan-3-yl)-amide (VX-765), an orally available selective interleukin (IL)-converting enzyme/caspase-1 inhibitor, exhibits potent anti-inflammatory activities by inhibiting the release of IL-1 β and IL-18 [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, **321** (2): 509-516
- Sheen-Chen SM, Ho HT, Chen WJ, Eng HL. Effect of ZVAD-fmk on hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in rat [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, **11** (15): 2330-2333
- Hamarsheh S, Zeiser R. NLRP3 inflammasome activation in cancer: a double-edged sword [J]. *Front Immunol*, 2020, **11**: 1444
- Rudolphi K, Gerwin N, Verzijl N, van der Kraan P, van den Berg W. Pralnacasan, an inhibitor of interleukin-1 β converting enzyme, reduces joint damage in two murine models of osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2003, **11** (10): 738-746
- MacKenzie SH, Schipper JL, Clark AC. The potential for caspases in drug discovery [J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2010, **13** (5): 568-576
- Gao S, Wang S, Fan R, Hu J. Recent advances in the molecular mechanism of thalidomide teratogenicity [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, **127**: 110114
- Ott PA, Chang JL, Oratz R, Jones A, Farrell K, Muggia F, Pavlick AC. Phase II trial of dacarbazine and thalidomide for the treatment of metastatic melanoma [J]. *Chemotherapy*, 2009, **55** (4): 221-227
- Yi YS. Regulatory roles of flavonoids on inflammasome activation during inflammatory responses [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2018, **62** (13): e1800147
- Porras D, Nistal E, Martínez-Flórez S, Pisonero-Vaquero S, Olcoz JL, Jover R, González-Gallego J, García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S. Protective effect of quercetin on high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice is mediated by modulating intestinal microbiota imbalance and related gut-liver axis activation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, **102**: 188-202
- Zhang X, Wang G, Gurley EC, Zhou H. Flavonoid apigenin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through multiple mechanisms in macrophages [J]. *PLoS ONE*, 2014, **9** (9): e107072
- Zhang X, Du Q, Yang Y, Wang J, Dou S, Liu C, Duan J. The protective effect of Luteolin on myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury through TLR4/NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, **91**: 1042-1052
- Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA. Structure and mechanism of interleukin-1 β converting enzyme [J]. *Nature*, 1994, **370** (6487): 270-275
- Fournier J-F, Clary L, Chambon S, Dumais L, Harris CS, Millois C, Pierre R, Talano S, Thoreau É, Aubert J, Aurelly M, Bouix-Peter C, Brethon A, Chantalat L, Christin O, Comino C, El-Bazbouz G, Ghilini A-L, Isabet T, Lardy C, Luzy A-P, Mathieu C, Mebrouk K, Orfila D, Pascau J, Reverse K, Roche D, Rodeschini V, Hennequin LF. Rational drug design of topically administered caspase 1 inhibitors for the treatment of inflammatory acne [J]. *J Med Chem*, 2018, **61** (9): 4030-4051