

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2025.80042

# 基于分子动力学模拟的牛奶酪蛋白与中性粒细胞表面 TLR4 受体的相互作用研究

汤 阳 蒋 菲 张 博 文 李 谢雨菲

(长沙理工大学食品与生物工程学院, 湖南 长沙 410114)

**摘要:** [目的] 探究牛奶酪蛋白(casein, CN)对中性粒细胞的激活作用及其与中性粒细胞表面 TLR4 受体的相互作用。[方法] 采用斑马鱼模型研究 CN 对中性粒细胞迁移的激活作用, 并通过蛋白三维模型构建、分子对接和分子动力学模拟等方法研究 TLR4 受体与各亚型 CN 的相互作用。[结果] 1 mg/mL 的 CN 溶液处理 3 dpf 斑马鱼 2 h 后, 可引起斑马鱼体内中性粒细胞的迁移和聚集; 各亚型 CN 均可与 TLR4 结合形成稳定的复合物; 推测维持  $\alpha_{s1}$ -CN/ $\alpha_{s2}$ -CN 与 TLR4 复合物稳定性的关键氨基酸主要通过氢键和疏水相互作用结合, 而维持  $\beta$ -CN/ $\kappa$ -CN 与 TLR4 复合物稳定性的关键氨基酸主要通过氢键结合。[结论] CN 可能通过氢键和疏水相互作用与 TLR4 结合, 介导中性粒细胞的活化, 从而发挥其免疫调控作用。

**关键词:** 牛奶酪蛋白; 中性粒细胞; TLR4 受体; 免疫反应

## Interaction between casein and TLR4 on neutrophil surface based on molecular dynamics

TANG Yang JIANG Fei ZHANG Bo WEN Li XIE Yufei

(School of Food Science and Bioengineering, Changsha University of Science &amp; Technology, Changsha, Hunan 410114, China)

**Abstract:** [Objective] To explore the activation effect of casein (CN) on neutrophils and its interaction with TLR4 receptors on the neutrophil surface. [Methods] The zebrafish model is adopted to study the activation effect of CN on neutrophil migration, with such methods as 3D model construction, molecular docking, and molecular dynamics simulations employed to study the interaction between TLR4 receptors and CN subtypes. [Results] Treatment of 3 dpf zebrafish with 1 mg/mL of CN solution for 2 h can induce neutrophil migration and accumulation inside the body of the zebrafish. All subtypes of CN can form stable complexes with TLR4. It is speculated that the key amino acids that maintain the stability of the complexes between  $\alpha_{s1}$ -CN/ $\alpha_{s2}$ -CN and TLR4 mainly bind via hydrogen bonds and hydrophobic interactions, while the key amino acids that maintain the stability of the complexes between  $\beta$ -CN/ $\kappa$ -CN and TLR4 mainly bind by hydrogen bonds. [Conclusion] CN can bind to TLR4 via hydrogen bonds and hydrophobic interactions, and mediate the activation of neutrophils, thus exerting its immunomodulatory effects.

**Keywords:** casein; neutrophil; TLR4 receptor; immune response

酪蛋白(casein, CN)作为各类哺乳动物乳汁中的主要蛋白质成分, 具有重要的促炎和免疫调控作用, 能诱导促炎细胞因子的表达, 激活机体的免疫反应<sup>[1]</sup>。Vordenbäumen 等<sup>[2-4]</sup>研究表明, 人 CN 可以不同模式结合

**基金项目:** 湖南省研究生科研创新项目(编号: LXBZZ2024230); 湖南省创新型省份建设专项青年基金项目(编号: 2022JJ40470); 湖南省教育厅科学研究项目(编号: 22C0153)

**通信作者:** 谢雨菲(1990—), 女, 长沙理工大学讲师, 博士。E-mail: yufei@csust.edu.cn

**收稿日期:** 2025-01-15 **改回日期:** 2025-03-27

**引用格式:** 汤阳, 蒋菲, 张博, 等. 基于分子动力学模拟的牛奶酪蛋白与中性粒细胞表面 TLR4 受体的相互作用研究[J]. 食品与机械, 2025, 41(4): 8-18.

**Citation:** TANG Yang, JIANG Fei, ZHANG Bo, et al. Interaction between casein and TLR4 on neutrophil surface based on molecular dynamics[J]. Food & Machinery, 2025, 41(4): 8-18.

TLR4,从而激活人单核细胞和胚胎肾细胞,促进粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白细胞介素-1(IL-1)和IL-8等细胞因子的表达和分泌;且磷酸化导致的人 $\alpha_{s1}$ -CN构象变化能调控其免疫调节作用, $\alpha$ -螺旋含量能增强其与TLR4的结合并促进IL-8等促炎因子的表达分泌<sup>[5]</sup>。此外,牛奶CN常被用于小鼠等动物的炎症模型构建,引起局部和全身性的炎症反应。Toro-Monjaraz等<sup>[6-7]</sup>研究表明,CN处理可促进炎症细胞的表达,引起IL-4、IL-6、IL-8、IL-13等促炎因子的分泌,导致中性粒细胞等免疫细胞的迁移和增殖,但牛奶CN的促炎和免疫调控机制尚不完全明确。

中性粒细胞是人类血液循环系统中数量最多的白细胞,也是先天性免疫反应的关键细胞<sup>[8]</sup>,其迁移受多种介质共同影响,而Toll样受体4(TLR4)是引起中性粒细胞活化和迁移的关键因素<sup>[9]</sup>。TLR受体是一类序列高度保守的跨膜信号传递受体,中性粒细胞可表达除TLR3外的所有TLR受体<sup>[10]</sup>。TLR4是主要的病原体识别受体,具有重要的信号转导作用<sup>[11]</sup>。TLR4为I型跨膜受体,由胞外域、跨膜区和胞内域3个部分构成,其中胞外域N端富含亮氨酸重复单元(LRR),结构为马蹄形,可与相应配体发生结合<sup>[12]</sup>。但牛奶CN与TLR4受体的相互作用尚不明确,由于CN具有多种亚型并存、结构高度灵活且不均一的特性,从根本上限制了X射线衍射及低温电镜等常规技术在其结构解析中的有效应用,且这些方法存在工作量大、试验难度较大等缺陷<sup>[13]</sup>。因此,尚需结合分子对接、分子动力学等分子模拟技术,进一步阐明牛奶CN与TLR4受体的作用机制<sup>[14]</sup>。

斑马鱼模型具有发育周期短、产卵量大、胚胎期呈透明状和饲养维护费用低等优点,可在胚胎期单独分析其先天性免疫系统,观测免疫细胞在体内的迁移情况<sup>[15]</sup>,是适宜探究中性粒细胞活化的动物模型。研究拟采用斑马鱼模型探究CN对中性粒细胞的激活作用;分析CN与中性粒细胞表面TLR4受体的结合,利用分子模拟技术,采用从头建模方法构建各亚型CN的三维结构模型,结合分子动力学对模型进行优化和质量评估,从中选取最优模型,通过分子对接和分子动力学模拟等手段构建CN与TLR4受体的复合物模型,并进一步分析两者间的作用模式,以期为进一步理解牛奶CN与中性粒细胞表面TLR4受体的相互作用和中性粒细胞的活化提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

转基因斑马鱼Tg:10尾,上海费曦生物科技有限公司;  
牛奶酪蛋白:分析纯,北京索莱宝科技有限公司;

氢氧化钠、三卡因(MS-222)、琼脂粉等:分析纯,上海麦克林生化科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

分析天平:EX125ZH型,奥豪斯仪器有限公司;

顶置LED光照培养箱:GDN-260A型,宁波扬辉仪器有限公司;

pH计:FE28-Bio型,梅特勒—托利多仪器有限公司;

体式显微镜:Axiocam 208 color型,德国Carl Zeiss AG公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 CN处理斑马鱼 将3 dpf的斑马鱼随机分成3组,分别为空白组、对照组和1 mg/mL CN组。空白组用60  $\mu$ g/L海盐溶液处理斑马鱼,对照组为1 mg/mL CN组相应的溶剂。处理2 h后进行中性粒细胞体内成像及计数。

1.3.2 中性粒细胞体内成像及计数 每组选择15~20只斑马鱼进行成像。用0.08% MS-222麻醉斑马鱼并置于2%琼脂平板上。每条鱼朝向相同,使用体式显微镜在相同放大倍数下进行活体成像,记录从造血组织中迁出的中性粒细胞数。

1.3.3 CN建模及结构优化 从Uniprot中获取各亚型CN氨基酸序列: $\alpha_{s1}$ -CN(P02662)、 $\alpha_{s2}$ -CN(P02663)、 $\beta$ -CN(P02666)、 $\kappa$ -CN(P02668)。利用I-TASSER、C-QUARK、SWISS-MODEL、TrRosetta和RoseTTAFold等服务器预测其三维结构。通过SAVES v6.1和Prosa服务器对三维模型进行评分,综合分析模型质量优劣。采用分子动力学模拟优化模型,对轨迹文件进行分析并选择输出能量最低点的构象,使用上述工具再次检查模型质量,评价优化效果<sup>[13]</sup>。

1.3.4 蛋白质—配体对接 使用ClusPro2.0服务器制备TLR4-CN复合物。对接前,处理TLR4文件(3FXI),并使用PyMol制备链A用于对接。该对接基于快速傅里叶变换(FFT)进行全局对接,选择TLR4作为受体,优化的各亚型CN作为配体,随后进行刚体对接模拟,生成1 000个初始姿势,将相似的蛋白质构象归为一类,并结合均方根偏差(RMSD)进行聚类分析,按照聚类数目对模型进行排名<sup>[16]</sup>。

1.3.5 分子动力学模拟 将对接后的复合物用GROMACS 2020.6软件包分子动力学模拟。使用AMBER14SB力场对其进行拓扑。将复合物置于立方盒子,各原子与盒子边缘间距离设置为1 nm,使用TIP3P水模型进行溶剂化。加入适量钠离子或氯离子以确保体系中电荷为零,进行能量最小化和体系预平衡,体系达到平衡后在298 K下进行100 ns的分子动力学模拟<sup>[17]</sup>。模拟结束后,进行周期性边界条件处理并分析轨迹,包括

RMSD、均方回转半径(Rg)、溶剂可及表面积(SASA)以及复合物结合界面的氢键。

1.3.6 复合物相互作用分析及关键氨基酸预测 通过 Ligplot 分析 TLR4 和各亚型 CN 的结合界面,直观展示蛋白质与配体间的相互作用。运用 DrugScore<sup>PP1</sup> 工具预测复合物结合界面的关键氨基酸,将氨基酸突变为丙氨酸并计算突变前后结合自由能的变化值,评估氨基酸的重要性。当结合自由能变化值 > 4.184 kJ/mol 时,认为是关键氨基酸结合位点<sup>[13]</sup>。

1.3.7 数据处理和可视化 采用 Image J 软件进行斑马鱼图像处理,采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行统计学分析及作图,结果均以“平均值±均数标准误差”表示。ns 表示无显著性差异,\*\*\*表示  $P < 0.001$ 。使用 Gromacs 的指令进行轨迹分析,所得数据使用 Excel 进行归纳处理与分析,使用 Origin 2021、PowerPoint 2021 软件作图。蛋白

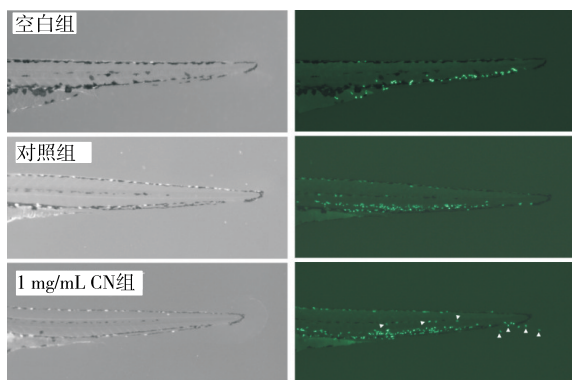
结构可视化使用 Pymol 2.5.8 展示。

## 2 结果与分析

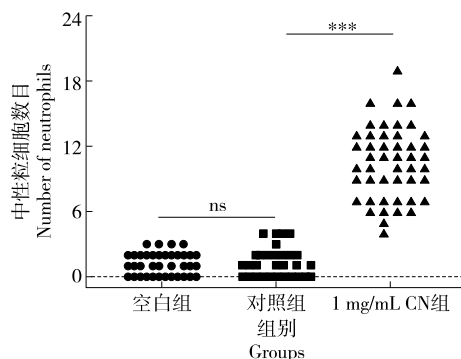
### 2.1 CN 对中性粒细胞的激活作用

免疫细胞的迁移和分布是免疫调控的关键性指标<sup>[18]</sup>。由图 1 可知,CN 处理后,中性粒细胞从造血组织迁至尾部组织内和尾鳍处(白色箭头),与对照组相比,1 mg/mL CN 组的中性粒细胞迁出数显著增加( $P < 0.001$ ),且溶解 CN 的溶剂对斑马鱼中性粒细胞迁移无影响;表明 CN 可以引起中性粒细胞的活化,与 Noursadeghi 等<sup>[3,19]</sup>的研究结果一致。

TLR4 是中性粒细胞的关键表面受体之一,激活 TLR4 可能会影响中性粒细胞迁移和聚集行为,对中性粒细胞的活化至关重要,是免疫调控过程中的重要受体<sup>[12]</sup>。因此,后续进一步探究 TLR4 与 CN 间的相互作用。



(a) 斑马鱼中性粒细胞迁移代表性图像



(b) 中性粒细胞迁出数量

图 1 CN 对斑马鱼中性粒细胞的激活作用

Figure 1 Activation effect of CN on zebrafish neutrophils

### 2.2 CN 模型的构建及评估

图 2 为最终选择的 4 种亚型 CN 结构模型,其中,  $\alpha_{S1}$ -CN 和  $\beta$ -CN 模型由 trRosetta 服务器构建,  $\alpha_{S2}$ -CN 模型使用 C-QUARK 工具构建,  $\kappa$ -CN 模型用 I-TASSER 网站构建,由于其综合评分较优,因此选择这些模型进一步分析。

ProSA 结合目前已知蛋白质结构能量分布情况来预测模型的整体能量,检验结果显示,  $\alpha_{S1}$ -CN、 $\alpha_{S2}$ -CN、 $\beta$ -CN 和  $\kappa$ -CN 模型的 Z-Score 分别为 -5.69, -6.43, -4.68,

-2.43,均在正常范围内(图 3)。ERRAT 通过分析蛋白质结构中非键合原子间的相互作用来确定结构的准确性,较高的 ERRAT 分数表示蛋白质结构的质量较高。4 个模型的 ERRAT 得分均 > 80%(表 1),模型通过了初步检测。PROCHECK 通过分析蛋白质结构中氨基酸残基的二面角( $\varphi$  和  $\psi$ )分布情况,绘制拉氏图直观体现各氨基酸残基的立体化学合理性,检查蛋白质结构的立体化学质量。拉氏图根据二面角的值将氨基酸残基分为核心区(红

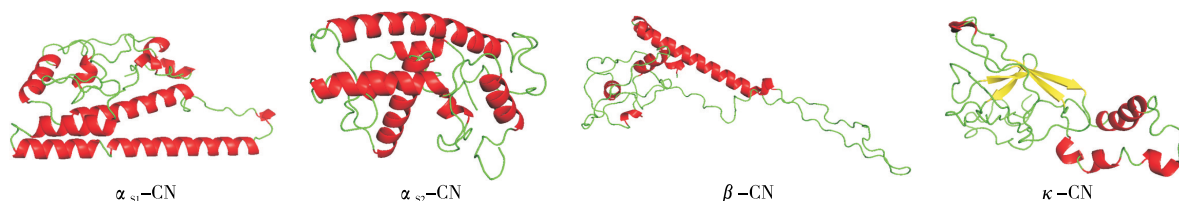


图 2 各亚型 CN 的结构图

Figure 2 Structures plot of the model of CN subtypes

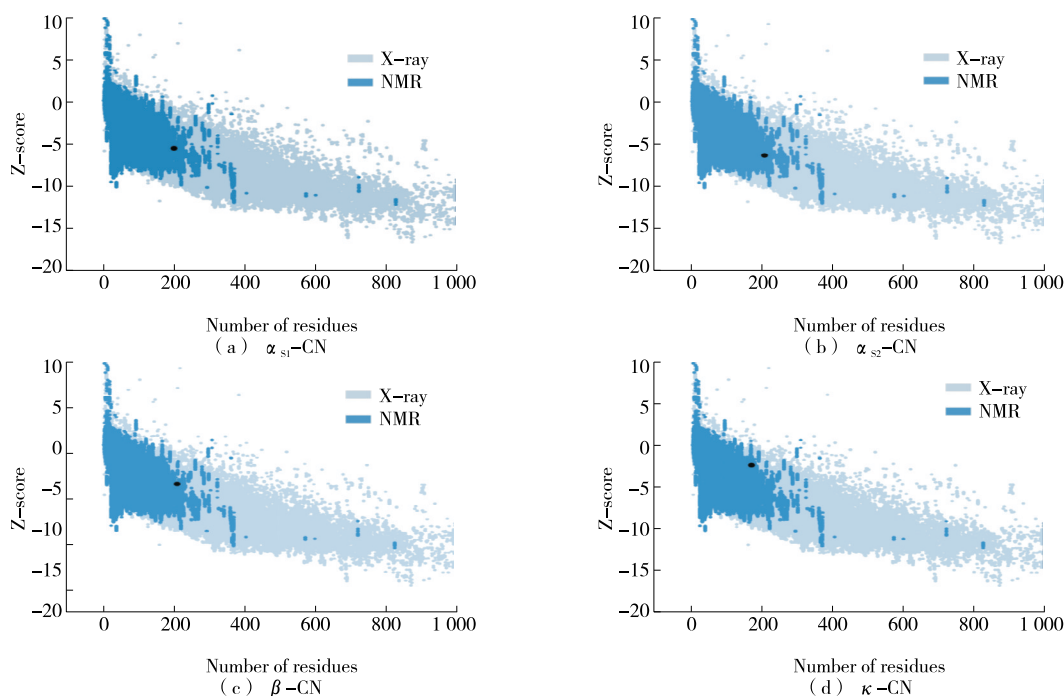


图 3 各亚型 CN 的 Z-Score 图

Figure 3 Z-score plot of the model of CN subtypes

色)、允许区(黄色)、大致允许区(浅黄色)和禁止区(白色)。在分析蛋白质结构的立体化学质量时,除甘氨酸和脯氨酸外,如果核心区的残基所占比例 > 90%,则认为该结构具有良好的立体化学特性<sup>[20]</sup>。由图 4 可知,对于

$\alpha_{s1}$ -CN 和  $\beta$ -CN 模型,位于核心区和允许区域的残基百分比分别为 90.1%, 7.6% 和 91.0%, 8.4%; 对于  $\alpha_{s2}$ -CN 和  $\kappa$ -CN 模型,分别为 72.5%, 21.2% 和 57.2%, 35.2%。综上,所有亚型 CN 的三维模型初步构建成功,其中  $\alpha_{s2}$ -CN、

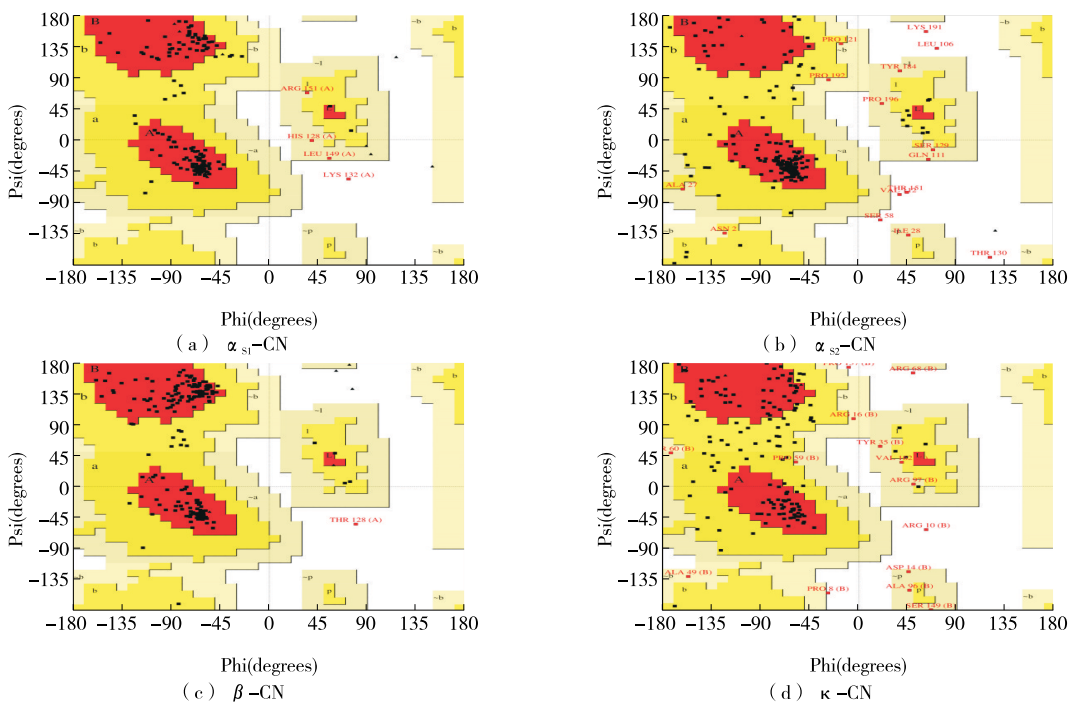


图 4 各亚型 CN 的拉氏图

Figure 4 Ramachandran plot the model of CN subtypes



表 1 各亚型 CN 模型评估<sup>†</sup>

Table 1 Model evaluation of CN subtypes

蛋白质模型	ERRAT/ %	拉氏图/%				Prosa
		核心区	允许区	大致允许区	禁止区	
$\alpha_{s1}$ -CN	93.6	90.1	7.6	1.8	0.6	-5.69
$\alpha_{s1}$ -CN*	84.4	90.6	8.8	0.6	0.0	-6.30
$\alpha_{s2}$ -CN	88.9	72.5	21.2	3.1	3.1	-6.43
$\alpha_{s2}$ -CN*	88.8	87.0	7.8	3.6	1.6	-7.81
$\beta$ -CN	80.0	91.0	8.4	0.0	0.6	-4.68
$\beta$ -CN*	84.2	92.2	6.6	0.0	1.2	-4.82
$\kappa$ -CN	85.1	57.2	35.2	6.2	1.4	-2.43
$\kappa$ -CN*	87.1	87.6	11.0	1.4	0.0	-3.52

<sup>†</sup> \*代表优化的蛋白质结构。

$\beta$ -CN 和  $\kappa$ -CN 的部分结构未达到最优,将对各亚型 CN 的三维模型进行进一步优化。

### 2.3 CN 模型优化

RMSD 表示模型在模拟过程与初始位置的偏差,也可以反映复合物的稳定性,是判断模型是否达到稳定的重要指标<sup>[21]</sup>。由图 5 可知,模拟期间,各亚型 CN 的 RMSD 值在 175 ns 后达到稳定<sup>[22]</sup>,稳定在 1.0~2.5 nm 区间内。Rg 反映了分子的尺寸和形状特征,通过监测其变化可以了解分子构象的变化情况。模拟过程中,Rg 呈下降趋势并在 175 ns 后达到稳定,表明蛋白质结构经过模拟后变得更为紧凑。基于 RMSD 和 Rg 值绘制各亚型 CN 的自由能景观图(图 6),从吉布斯自由能最低点中提取最稳定的蛋白质结构(图 7),并进行模型质量评估。其中,4 种模型的 ERRAT 和 Prosa 值在优化前后均达标;PROCHECK 结果显示, $\alpha_{s1}$ -CN 和  $\beta$ -CN 模型核心区和允许区的残基变化不大,禁止区残基减少或消失; $\alpha_{s2}$ -CN 模型核心区和允许区的残基从 72.5%,21.2%变为 87.0%,7.8%, $\kappa$ -CN 模型核心区和允许区的残基从 57.2%,35.2%变为 87.6%,

11.0%,表明动态模拟显著改善了各亚型 CN 的结构模型。因此,所有亚型 CN 的模型优化成功,可用于进一步的分子对接研究。

### 2.4 TLR4 与 CN 的分子对接及分子动力学模拟

使用 ClusPro 工具制备 TLR4-CN 复合物。在对接模型中,具有较大的聚类结构更接近天然构象<sup>[23]</sup>。当配体与 TLR4 的中心区域或 C 端结构域结合时,可诱导 TLR4 构象变化<sup>[24]</sup>并与下游的信号分子相互作用,从而启动信号转导通路。因此,针对 Cluspro 生成的模型进行初步筛选,去除两组分间结合位置不理想的模型,选择聚类数目最高且能量评分最低的模型,结果见表 2。由表 2 可知,TLR4 与 CN 的复合物模型成功构建,但部分复合物的结合界面存在残基冲突等问题需进一步优化。

对 TLR4 与各亚型 CN 复合物进行 100 ns 的分子动力学模拟,并对轨迹文件进行分析,结果如图 8 所示。通过蛋白质的骨架 RMSD 来评估分子动力学模拟中分子结构的变化程度,由图 8(a)可知,TLR4- $\alpha_{s1}$ -CN、TLR4- $\alpha_{s2}$ -CN 和 TLR4- $\kappa$ -CN 复合物在 40 ns 后逐渐稳定在 0.4 nm; TLR4- $\beta$ -CN 复合物在 30 ns 后逐渐稳定在 0.55 nm,表明系统在模拟过程中达到平衡<sup>[25]</sup>。

SASA 可以反映复合物相互作用界面的溶剂暴露情况,较大的 SASA 可能意味着更强的分子间相互作用力<sup>[26]</sup>。由图 8(b)可知,4 种复合物的 SASA 在整个模拟过程中趋势类似,在模拟初期上升,然后呈下降趋势。30 ns 后,TLR4- $\alpha_{s1}$ -CN、TLR4- $\alpha_{s2}$ -CN 和 TLR4- $\beta$ -CN 复合物大致稳定在 145 nm<sup>2</sup>,TLR4- $\kappa$ -CN 复合物稳定在 120 nm<sup>2</sup>。而 TLR4- $\kappa$ -CN 复合物的 SASA 低于其他 3 种复合物,可能由于  $\kappa$ -CN 的结构以短  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠为主,这种构象与熔融球状蛋白质的构象相似,是一种具有流变性的开放结构<sup>[27]</sup>。在与 TLR4 对接时, $\kappa$ -CN 的疏水残基在蛋白质折叠过程中倾向于隐藏在分子内部,减少与溶剂的接触面积。总体而言,在分子动力学模拟过

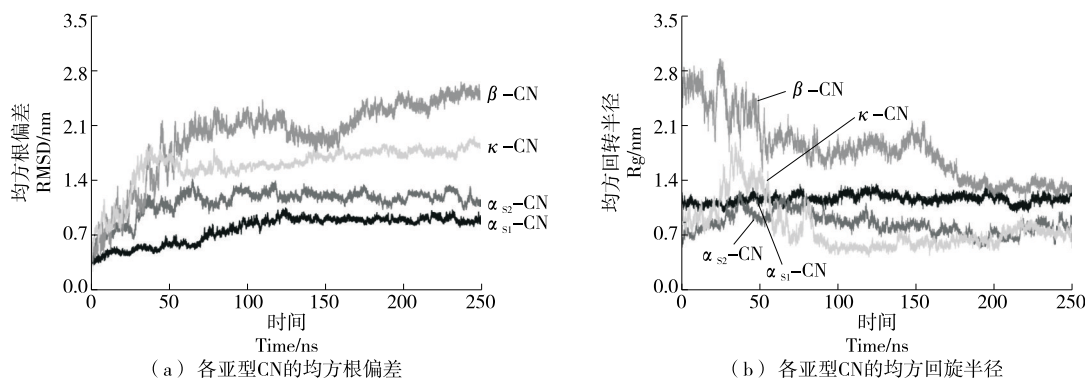


图 5 各亚型 CN 模型的轨迹分析

Figure 5 Trajectory analysis of the conformation of the models of CN subtypes

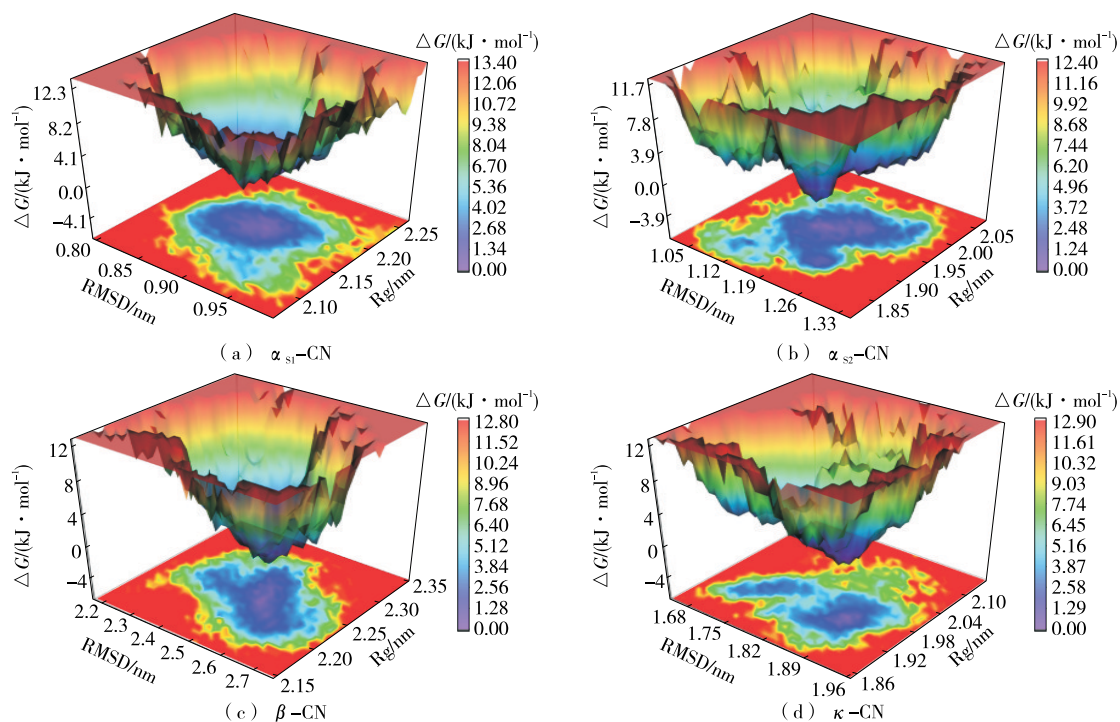


图6 各亚型CN的自由能景观图

Figure 6 Free energy landscapes of the models of CN subtypes

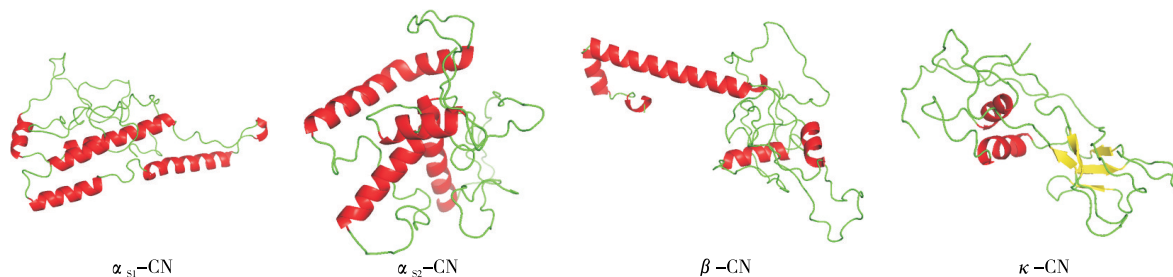


图7 各亚型CN优化后的模型结构图

Figure 7 Structural plot of the models of CN subtypes after optimized

表2 TLR4与各亚型CN的对接评分

Table 2 Docking scores for TLR4 and CN subtypes

与TLR4对接的配体	聚类数目	最低能量状态评分
$\alpha_{s1}$ -CN	36	-1 018.4
$\alpha_{s2}$ -CN	72	-1 026.4
$\beta$ -CN	64	-1 224.6
$\kappa$ -CN	30	-1 087.9

程中,SASA在很长一段时间内保持稳定,表明复合物已达到平衡。

氢键作为分子间相互作用力,对维持复合物稳定性具有重要意义。由图8(c)可知,复合物结合界面上的氢键数量基本维持稳定;其中,TLR4与 $\alpha_{s1}$ -CN、 $\alpha_{s2}$ -CN间的氢键数目平均为20个,而TLR4与 $\beta$ -CN、 $\kappa$ -CN间的氢键数目平均为10个。这种差异可能与各亚型CN的结构特

性有关, $\alpha_{s1}$ -CN、 $\alpha_{s2}$ -CN与TLR4结合界面上可能存在着更多的氢键供体和受体位点,其界面残基更易于与TLR4接触并形成氢键,使其复合物结构更为稳定。综上,通过100 ns的分子动力学模拟,所有亚型CN与TLR4形成的复合物结构均达到了稳定,表明所有亚型CN均可与TLR4结合。Vorendenbaumen等<sup>[2,4-5]</sup>通过MST和细胞转染试验证明,人 $\alpha_{s1}$ -CN能与TLR4受体结合,发挥其免疫调控作用,与试验结果类似,说明不同物种的CN均可与TLR4结合。

## 2.5 TLR4与CN的相互作用

使用GROMACS对分子动力学模拟的轨迹文件进行主成分分析,并绘制自由能景观图(图9),从自由能景观图能量最低的区域提取4种最稳定的复合物(图10)。使用PyMOL和LigPlot对4种复合物进行可视化作图分析

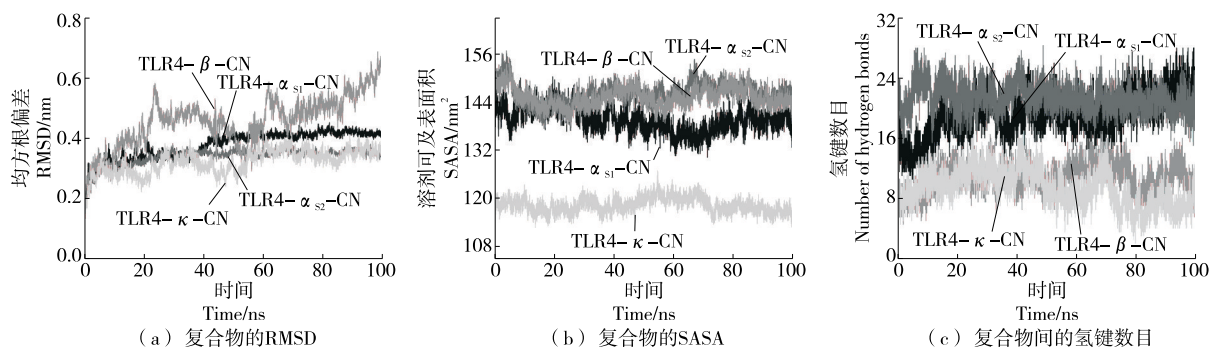


图 8 TLR4-CN 复合物构象的轨迹分析

Figure 8 Trajectory analysis of conformation of TLR4-CN complexes

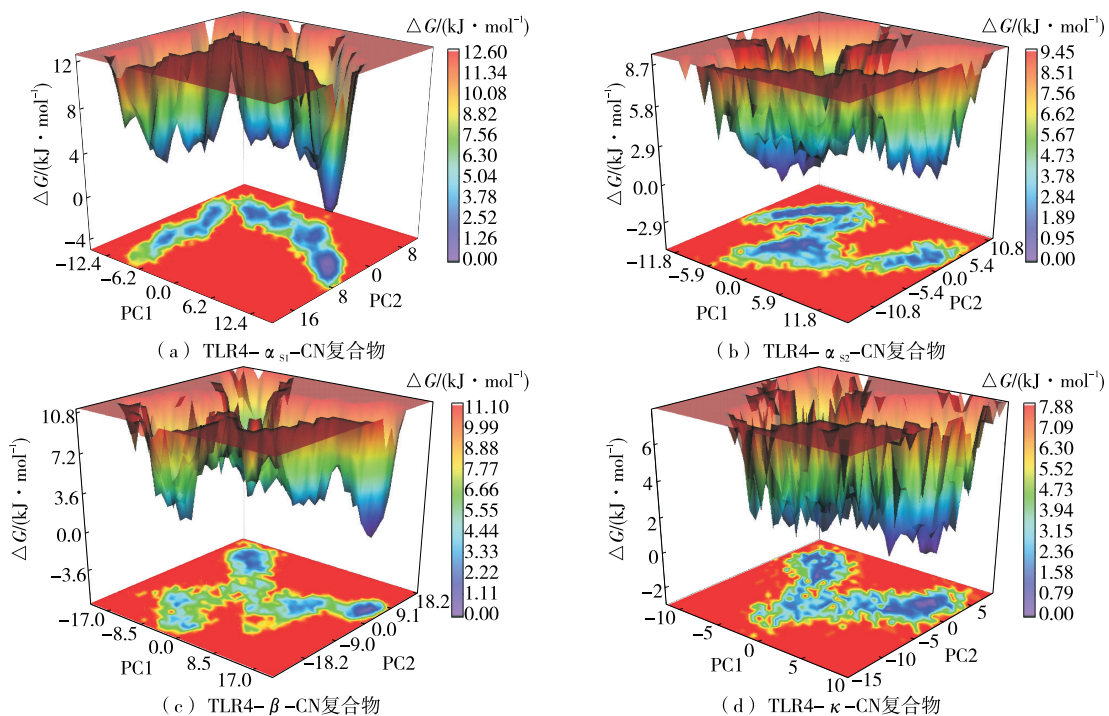


图 9 TLR4-CN 复合物基于 PCA 的自由能景观图

Figure 9 Free energy landscapes of TLR4-CN complex based on PCA

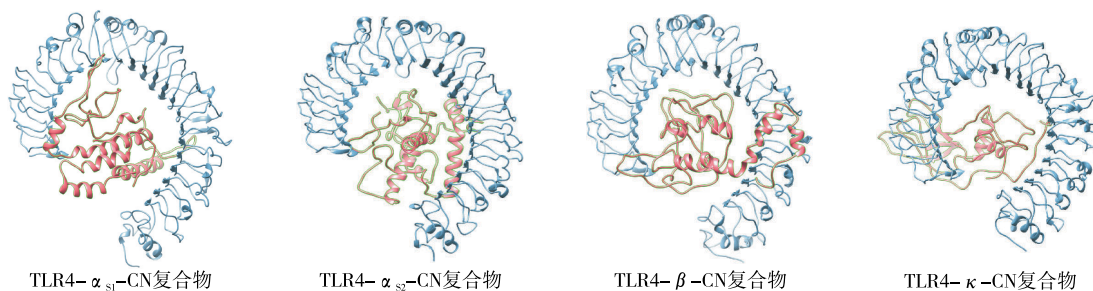


图 10 TLR4-CN 复合物的最佳构象图

Figure 10 Optimal conformation plot of TLR4-CN complex

其相互作用力(图 11)。结果表明,α<sub>s1</sub>-CN 通过 15 个关键氨基酸(K59、P134、Q140、E148、S188 等)与 TLR4 结合,形成 22 个强氢键;α<sub>s2</sub>-CN 通过 11 个关键氨基酸(D75、N86、Q97、I194、R205 等)与 TLR4 结合,形成 19 个强氢



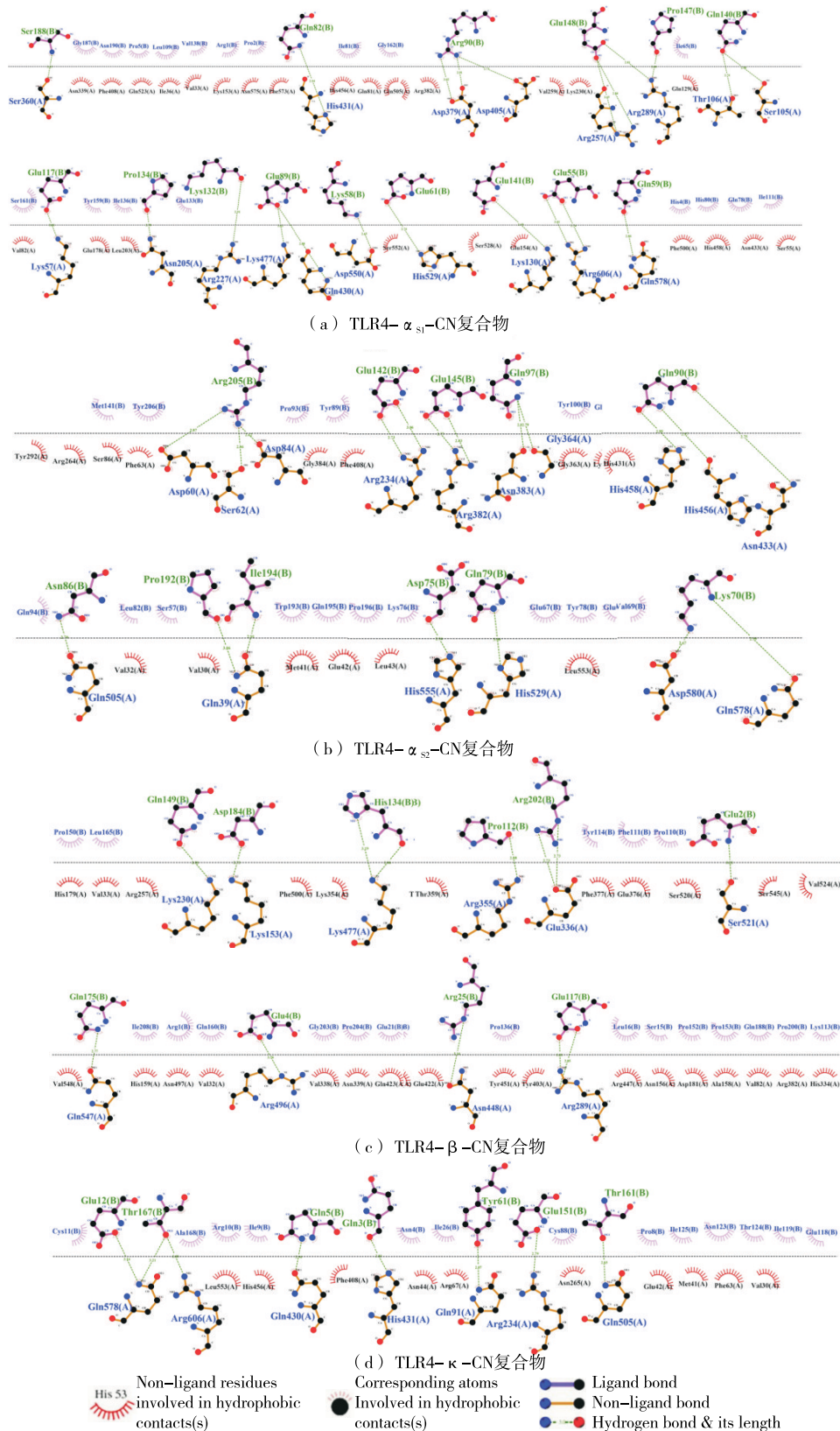


图 11 TLR4-CN复合物二维分子相互作用图

Figure 11 Two-dimensional molecular interaction of TLR4-CN complex



键; $\beta$ -CN 通过 10 个关键氨基酸(R25、P112、E117、H134、D184 等)与 TLR4 结合,形成 10 个强氢键; $\kappa$ -CN 通过 7 个关键氨基酸(Q3、Y61、E151、T161、T167 等)与 TLR4 结合,形成 7 个强氢键,与 gmx Hbond 计算模拟的结果一致。

基于复合物分子表面的疏水/亲水性质的互补性发现,4 种亚型 CN 与 TLR4 的部分氨基酸间具有强疏水作用, $\alpha_{s1}$ -CN 中有 18 个氨基酸(I65、I136、Y159 等)被识别为潜在活性位点; $\alpha_{s2}$ -CN 中有 17 个氨基酸(Y78、Y89、Y100、Y206 等)被识别为潜在活性位点; $\beta$ -CN 中有 19 个氨基酸(F111、P152 等)被识别为潜在活性位点; $\kappa$ -CN 中有 13 个氨基酸(C88、E118、I125 等)被识别为潜在活性位点。表明 4 种亚型的 CN 均主要通过氢键和疏水作用与 TLR4 进行相互作用。有研究表明,铁皮石斛多糖<sup>[28]</sup>、牛血红蛋白肽<sup>[29]</sup>、地黄苷 A<sup>[30]</sup>等也是通过氢键和疏水相互作用与 TLR4 相互结合,发挥其免疫活性。

### 2.6 TLR4 与 CN 复合物的关键氨基酸预测

在蛋白质-蛋白质相互作用中,通常结合界面的小部分关键氨基酸在稳定其复合物结构中发挥极其重要的

作用<sup>[31]</sup>。由图 6 可知, $\alpha_{s1}$ -CN 的氨基酸 I65、I136、Q140、Y159 突变为丙氨酸后的结合自由能变化均 $>4.184$  kJ/mol,对维持复合物的稳定性有显著影响,I65、I136、Y159 主要通过疏水相互作用与 TLR4 结合,Q140 通过氢键与 TLR4 结合,Zeng 等<sup>[17]</sup>研究发现, $\alpha_{s1}$ -CN 和免疫球蛋白 G(IgG)的结合中,Y159 氨基酸也发挥了关键作用; $\alpha_{s2}$ -CN 的氨基酸 Y78、Y89、Q97、Y100、I194、Y206 突变为丙氨酸后的结合自由能变化均 $>4.184$  kJ/mol,Y78、Y89、Y100、Y206 主要通过疏水相互作用与 TLR4 结合,Q97、I194 通过氢键与 TLR4 结合; $\beta$ -CN 的氨基酸 R25 和 D184 突变为丙氨酸后的结合自由能变化均 $>4.184$  kJ/mol,其通过氢键与 TLR4 结合,Liu 等<sup>[32]</sup>研究发现, $\beta$ -CN 的 IgG 表位中,R25 氨基酸也发挥了关键作用; $\kappa$ -CN 的氨基酸 Y61 突变为丙氨酸后的结合自由能变化 $>4.184$  kJ/mol,其通过氢键与 TLR4 结合。综上,对于 $\alpha_{s1}$ -CN 和 $\alpha_{s2}$ -CN 而言,维持蛋白质复合物稳定性至关重要的氨基酸可能是通过氢键和疏水相互作用与 TLR4 结合;而对于 $\beta$ -CN 和 $\kappa$ -CN,维持蛋白质复合物稳定的关键氨基酸可能是通过氢键相互作用与 TLR4 结合。

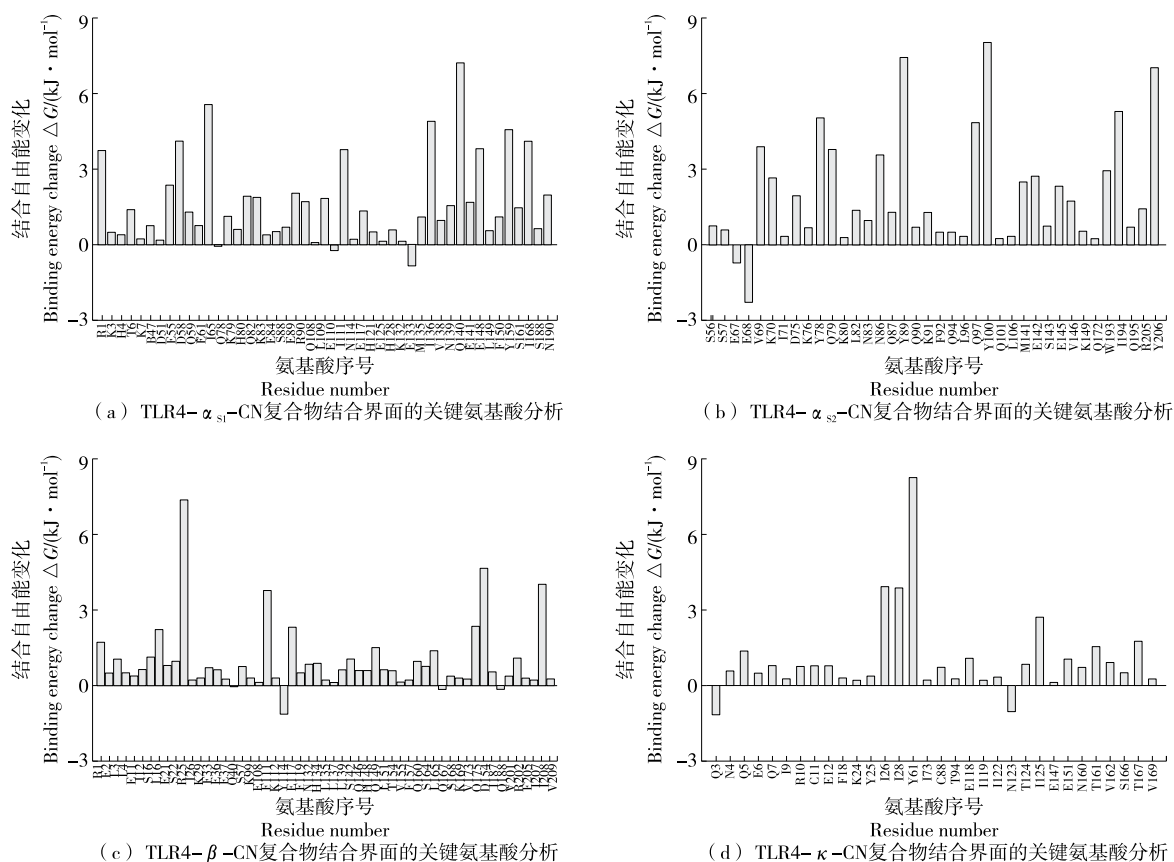


图 12 TLR4-CN 复合物结合界面的关键氨基酸分析

Figure 12 Analysis of key amino acids on binding interface of TLR4-CN complexes

### 3 结论

通过斑马鱼模型研究了酪蛋白对中性粒细胞的激活作用,并通过生物信息学方法分析了 TLR4 受体与各亚型酪蛋白的相互作用。结果表明,经酪蛋白处理后,斑马鱼的中性粒细胞从造血岛迁移至尾部组织内和尾鳍处; $\alpha_{s1}$ -酪蛋白、 $\alpha_{s2}$ -酪蛋白、 $\beta$ -酪蛋白和  $\kappa$ -酪蛋白均可与 TLR4 形成稳定复合物,且复合物主要通过氢键和疏水作用形成;维持  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白-TLR4 复合物稳定的关键氨基酸 I65、I136 等主要通过疏水相互作用与 TLR4 结合, Q140 通过氢键与 TLR4 结合;维持  $\alpha_{s2}$ -酪蛋白-TLR4 复合物稳定的关键氨基酸 Y78、Y89 等主要通过疏水相互作用与 TLR4 结合, Q97、I194 通过氢键与 TLR4 结合;维持  $\beta$ -酪蛋白、 $\kappa$ -酪蛋白与 TLR4 复合物稳定性的关键氨基酸 (R25 和 D184/Y61) 主要通过氢键结合,这些氨基酸可能是酪蛋白发挥其免疫调控作用的关键。综上,酪蛋白能激活斑马鱼的中性粒细胞,各亚型酪蛋白均可与 TLR4 形成复合物,且其结合机制类似,可能与氢键、疏水相互作用等有关。后续可在动物水平探讨酪蛋白与 TLR4 的结合及其下游调控通路,以明确酪蛋白的免疫调控机制。

#### 参考文献

- [1] VORDENBÄUMEN S, BRAUKMANN A, PETERMANN K, et al. Casein  $\alpha$  s1 is expressed by human monocytes and upregulates the production of GM-CSF via p38 MAPK[J]. *The Journal of Immunology*, 2011, 186(1): 592-601.
- [2] VORDENBÄUMEN S, SAENGER T, BRAUKMANN A, et al. Human casein alpha s1 induces proinflammatory cytokine expression in monocytic cells by TLR4 signaling[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2016, 60(5): 1 079-1 089.
- [3] NOURSADEGHI M, BICKERSTAFF M C M, HERBERT J, et al. Production of granulocyte colony-stimulating factor in the nonspecific acute phase response enhances host resistance to bacterial infection[J]. *Journal of Immunology*, 2002, 169(2): 913-919.
- [4] SAENGER T, VORDENBÄUMEN S, GENICH S, et al. Human  $\alpha_{s1}$ -casein induces IL-8 secretion by binding to the ecto-domain of the TLR4/MD2 receptor complex[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2019, 1 863(3): 632-643.
- [5] SAENGER T, SCHULTE M F, VORDENBÄUMEN S, et al. Structural analysis of breast-milk  $\alpha_{s1}$ -casein: an  $\alpha$ -helical conformation is required for TLR4-stimulation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(3): 1 743.
- [6] TORO-MONJARAZ E M, FONSECA-CAMARILLO G, ZÁRATE-MONDRAGÓN F, et al. Differential cytokine expression in the duodenum and rectum of children with non-immunoglobulin E-mediated cow's milk protein allergy[J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2021, 66(11): 3 769-3 775.
- [7] CAUBET J C, BENCHARITIWONG R, ROSS A, et al. Humoral and cellular responses to casein in patients with food protein - induced enterocolitis to cow's milk[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2017, 139(2): 572-583.
- [8] YAMASHIRO S, KAMOHARA H, WANG J M, et al. Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2001, 69(5): 698-704.
- [9] RAYMOND S L, HAWKINS R B, MURPHY T J, et al. Impact of toll-like receptor 4 stimulation on human neonatal neutrophil spontaneous migration, transcriptomics, and cytokine production [J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2018, 96(7): 673-684.
- [10] HAYASHI F, MEANS T K, LUSTER A D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function[J]. *Blood*, 2003, 102(7): 2 660-2 669.
- [11] SABROE I, DOWER S K, WHYTE M K B. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2005, 41(Suppl 7): S421-S426.
- [12] PARKER L C, WHYTE M K B, DOWER S K, et al. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2005, 77(6): 886-892.
- [13] HOU Z, YIN W, HAO Z L, et al. Molecular simulation study on the interaction between porcine CR1-like and C3b[J]. *Molecules*, 2023, 28(5): 2 183.
- [14] 毕新健, 文诗雨, 屈婷敏, 等. 分子模拟技术在食品领域中的应用研究进展[J]. *食品与机械*, 2024, 40(5): 1-10, 95.
- [15] BI X J, WEN S Y, QU T M, et al. Research and application status of molecular simulation technology in food field[J]. *Food & Machinery*, 2024, 40(5): 1-10, 95.
- [15] 王荣春, 韩利文, 何秋霞, 等. 斑马鱼胚胎固有免疫研究进展及应用[J]. *中南药学*, 2016, 14(10): 1 079-1 083.
- [15] WANG R C, HAN L W, HE Q X, et al. Research progress and application of innate immunity of zebrafish embryo[J]. *Central*

- South Pharmacy, 2016, 14(10): 1 079-1 083.
- [16] DESTA I T, PORTER K A, XIA B, et al. Performance and its limits in rigid body protein-protein docking[J]. Structure, 2020, 28(9): 1 071-1 081.
- [17] ZENG J H, LIN K, ZHANG X Q, et al. Insight into the molecular-level details of  $\alpha$ 1 casein interactions with IgG: combining with LC-MS/MS and molecular modelling techniques[J]. Food Chemistry, 2023, 399: 133987.
- [18] KAKAR R, GHOSH C, SUN Y. Phosphoinositide signaling in immune cell migration[J]. Biomolecules, 2023, 13(12): 1 705.
- [19] BICER S, REISER P J, CHING S, et al. Induction of muscle weakness by local inflammation: an experimental animal model[J]. Inflammation Research, 2009, 58(4): 175-183.
- [20] LASKOWSKI R A, MACARTHUR M W, MOSS D S, et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures[J]. Journal of Applied Crystallography, 1993, 26(2): 283-291.
- [21] KIRCHMAIR J, MARKT P, DISTINTO S, et al. Evaluation of the performance of 3D virtual screening protocols: RMSD comparisons, enrichment assessments, and decoy selection: what can we learn from earlier mistakes? [J]. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 2008, 22(3/4): 213-228.
- [22] 李军, 符禹婷, 俞健, 等. 两条鲢鱼小清蛋白源抗冻肽的活性及作用机制比较[J]. 食品与机械, 2024, 40(4): 7-12, 58.  
LI J, FU Y T, YU J, et al. Comparison of the activities and cryoprotective mechanism of two antifreeze peptides derived from silver carp parvalbumin[J]. Food & Machinery, 2024, 40(4): 7-12, 58.
- [23] KOZAKOV D, BEGLOV D, BOHNUUD T, et al. How good is automated protein docking? [J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2013, 81(12): 2 159-2 166.
- [24] KIM H M, PARK B S, KIM J I, et al. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist eritoran[J]. Cell, 2007, 130(5): 906-917.
- [25] LIU J Y, SONG G S, ZHOU L K, et al. Comparison of non-covalent binding interactions of six caffeoylquinic acids with  $\beta$ -lactoglobulin: Spectroscopic analysis, molecular docking and embedding of curcumin[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 137: 108391.
- [26] SHRAKE A, RUPLEY J A. Environment and exposure to solvent of protein atoms. Lysozyme and insulin[J]. Journal of Molecular Biology, 1973, 79(2): 351-371.
- [27] HIDALGO M E, PIRES M S, RISSO P H. A study on bovine kappa-casein aggregation after the enzymatic action of chymosin[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010, 76(2): 556-563.
- [28] 崔萌菲, 张悦, 张志宇, 等. 铁皮石斛多糖与 Toll 样受体 4 互作机制的计算模拟[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(5): 15-21.  
CUI M F, ZHANG Y, ZHANG Z Y, 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.
- [29] XIN X Y, RUAN C H, LIU Y H, et al. Identification of novel antioxidant and anti-inflammatory peptides from bovine hemoglobin by computer simulation of enzymolysis, molecular docking and molecular dynamics[J]. Current Research in Food Science, 2024, 9: 100931.
- [30] YANG G F, LI M F, ZHANG Y, et al. Mechanisms of rehmannioside A against systemic lupus erythematosus based on network pharmacology, molecular docking and molecular dynamics simulation[J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2024, 82(4): 3 489-3 498.
- [31] YAO S J, ZHENG C H, WANG B, et al. A two-step ensemble learning for predicting protein hot spot residues from whole protein sequence[J]. Amino Acids, 2022, 54(5): 765-776.
- [32] LIU F H, GAO J Y, LI X, et al. Molecular modeling and conformational IgG epitope mapping on bovine  $\beta$ -casein[J]. European Food Research and Technology, 2016, 242(11): 1 893-1 902.

## 信息窗

## 更正启事

因作者疏忽,刊登在我刊2025年第3期《枸杞子的抗炎活性成分及作用机理》一文中,作者史小飞学历书写错误:

错误内容为:“硕士”

更正为:“本科”

特此说明。

《食品与机械》编辑部  
2025年4月8日