



闫巍元,张锐,马海田. 衣康酸二甲酯对 H₂O₂ 诱导的 AML-12 细胞线粒体功能障碍的调节作用及机制研究[J]. 南京农业大学学报,2024,47(1):28-35.

YAN Weiyuan,ZHANG Rui,MA Haitian. The regulatory effect and mechanism of dimethyl itaconate on mitochondrial dysfunction induced by H₂O₂ in AML-12 cells[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(1):28-35.

衣康酸二甲酯对 H₂O₂ 诱导的 AML-12 细胞线粒体功能障碍的调节作用及机制研究

闫巍元,张锐,马海田*

(南京农业大学动物医学院/农业农村部动物生理生化重点开放实验室,江苏 南京 210095)

摘要:[目的]本文主要探究衣康酸二甲酯(dimethyl itaconate,DMI)对小鼠肝细胞线粒体功能障碍的调节作用及其机制,旨在为衣康酸二甲酯作为一种生理调节剂用于防控畜禽因线粒体功能障碍引发的相关疾病提供理论依据。[方法]以小鼠肝细胞系(AML-12细胞)为研究对象,试验分为对照组(NC)、0.5 mmol·L⁻¹ DMI处理组、150 μmol·L⁻¹ H₂O₂处理组和0.5 mmol·L⁻¹ DMI+150 μmol·L⁻¹ H₂O₂处理组。分别检测 AML-12 细胞中 ATP 含量、线粒体 DNA(mtDNA)拷贝数、线粒体活性氧(mROS)水平和线粒体膜电位(MMP)等生化指标,并用免疫印迹法检测 AMP-依赖性蛋白激酶(AMPK)信号通路关键因子的表达水平。[结果]0~0.5 mmol·L⁻¹ DMI 和 0~150 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 对细胞活力无显著影响。DMI 处理显著抑制 H₂O₂ 诱导的 AML-12 细胞中 mROS 水平升高以及 MMP 的异常下降,以及 ATP 含量和 mtDNA 拷贝数的下降($P<0.01$)。DMI 处理极显著抑制 H₂O₂ 诱导的小鼠肝细胞中 p-AMPK、NAD-依赖性去乙酰化酶 1(SIRT1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1α(PGC-1α)、核呼吸因子 1(Nrf1)和线粒体转录因子 A(TFAM)蛋白水平的下降($P<0.01$),而 AMPK 抑制剂 Compound C 预处理则可逆转这一效应。[结论]DMI 通过激活 AMPK-SIRT1-PGC1α 信号通路缓解 H₂O₂ 诱导的 AML-12 细胞线粒体功能障碍。

关键词:衣康酸二甲酯;线粒体功能障碍;AMPK-SIRT1-PGC1α 信号轴

中图分类号:S852.6

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)01-0028-08

The regulatory effect and mechanism of dimethyl itaconate on mitochondrial dysfunction induced by H₂O₂ in AML-12 cells

YAN Weiyuan,ZHANG Rui,MA Haitian*

(College of Veterinary Medicine/Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry,Ministry of Agriculture and Rural Affairs,Nanjing Agricultural University,Nanjing 210095,China)

Abstract:[Objectives]This study aimed to explore the regulatory effect and mechanism of dimethyl itaconate(DMI)on mitochondrial dysfunction in mouse hepatocytes,which will provide a theoretical basis for dimethyl itaconate as a physiological regulator in the prevention of related diseases caused by mitochondrial dysfunction in livestock and poultry. [Methods]The mice hepatocytes(AML-12 cells)were used as the research object in this study. Experimental groups were divided into control group(NC),0.5 mmol·L⁻¹ DMI treatment group,150 μmol·L⁻¹ H₂O₂ treatment group and 0.5 mmol·L⁻¹ DMI+150 μmol·L⁻¹ H₂O₂ treatment group. After treatment,the ATP content,mitochondrial DNA(mtDNA)copy number,mitochondrial ROS(mROS)level and mitochondrial membrane potential(MMP)were detected;meanwhile,the AMPK signaling pathway related factors protein level were detected by western blotting. [Results]0.5 mmol·L⁻¹ DMI and 150 μmol·L⁻¹ H₂O₂ had no significantly effect on the AML-12 cells viability. DMI treatment significantly attenuated H₂O₂-induced increasing of mROS level and the aberrant decreasing of MMP in AML-12 cells. Meanwhile,we found that the H₂O₂-stimulated caused decreasing in ATP content and mtDNA levels in AML-12 cells,and DMI treatment obviously inhibited the decreasing of ATP content and mtDNA levels in H₂O₂-stimulated AML-12 cells. In addition,DMI treatment significantly inhibited the reduction of p-AMPK,SIRT1,PGC-1α,Nrf1,and TFAM protein levels caused by H₂O₂-stimulation in AML-12 cells($P<0.01$),and these effects of DMI were obviously reversed in AML-12 cells pretreated with AMPK inhibitor Compound C. [Conclusions]This study demonstrated that dimethyl itaconate alleviates H₂O₂-induced mitochondrial dysfunction in AML-12 cells,and these beneficial effects are achieved by activating AMPK-SIRT1-PGC1α signaling axis in hepatocytes.

Keywords:dimethyl itaconate;mitochondrial dysfunction;AMPK-SIRT1-PGC1α signal axis

收稿日期:2023-02-02

基金项目:江苏省高等学校重点学科建设项目

*通信作者:马海田,教授,研究方向为畜禽营养与生物化学,E-mail:mahaitian@njau.edu.cn。

线粒体是机体产生 ATP 并维持细胞正常生理活动的主要场所,其功能异常会导致多种代谢性疾病的发生。已有研究发现,线粒体功能障碍与肥胖、胰岛素抵抗和脂肪肝病等多种营养代谢性疾病密切相关^[1-2]。活性氧(ROS)主要由线粒体产生,且线粒体是其主要的攻击靶点,其可通过破坏线粒体的结构进而导致线粒体功能障碍^[3]。线粒体功能障碍主要体现为 ATP 合成减少,呼吸链功能减弱,抗氧化能力下降^[4]。AMP-依赖性蛋白激酶(AMPK)是一种参与多种代谢调控的关键蛋白,其在调节线粒体生物学功能、脂质代谢、氧化应激及炎症等方面起着至关重要的作用^[5]。有研究表明,AMPK 下游关键蛋白 NAD-依赖性去乙酰化酶 1(SIRT1)和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α (PGC-1 α)参与调节线粒体功能^[6]。营养性代谢疾病与线粒体功能障碍联系紧密,因而通过活化 AMPK 缓解线粒体功能障碍可作为预防相关营养代谢性疾病的有效手段。

衣康酸是线粒体三羧酸循环的次生代谢物,其由三羧酸循环直接产物柠檬酸盐脱水生成顺乌头酸,再通过免疫应答基因 1 催化脱羧而生成^[7]。衣康酸含有共轭双键和 2 个羧基的高极性 α 、 β -不饱和二羧酸,不易穿过细胞膜;因此,衣康酸的衍生物如衣康酸 4-辛酯(4-OI)或衣康酸二甲酯(DMI)通常被用于其分子机制研究^[8]。已有研究表明,衣康酸在抗氧化与免疫调节中发挥重要的作用^[9-10]。衣康酸可将 Keap1 上的半胱氨酸残基烷基化,进而促进 Nrf2 入核,激活下游抗氧化因子的转录表达而发挥其抗氧化功能^[11]。然而,目前对 DMI 的研究主要涉及其对机体抗氧化能力的调节方面,对其缓解线粒体功能障碍的效应及机制方面的研究报道较少。因此,本试验以 H₂O₂ 诱导的小鼠肝细胞系(AML-12 细胞)为研究对象,旨在探究 DMI 对线粒体功能障碍的缓解效应,并围绕 AMPK-SIRT1-PGC1 α 信号通路揭示其作用机制,为其作为一种生理调节剂用于防控畜禽因线粒体功能障碍引发的相关疾病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

主要仪器:超净工作台、倒置荧光显微镜(美国 Thermo Fisher 公司);全波长酶标仪、Western blot 电泳及转印系统、曝光仪(美国 BIO-RAD 公司);实时荧光定量 PCR 仪(美国 Agilent Technologies 公司);核酸浓度测定仪、高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

主要试剂:DMI 购于美国 Sigma 公司;AML-12 细胞购置于南京宏昇生物科技有限公司;胎牛血清购于美国 Gibco 公司;DME/F-12 培养基购于美国 Hyclone 公司;BCA 试剂盒、RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂购于上海碧云天生物科技有限公司;AMPK、p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 、核呼吸因子 1(Nrf1)、线粒体转录因子 A(TFAM)和 Tubulin β 抗体购于美国 Abcam 公司;HRP-二抗购于武汉博士德生物工程有限公司。ATP 含量测定试剂盒以及 DNA 提取试剂盒购于索莱宝科技有限公司;Compound C(AMPK 抑制剂)购于美国 Selleck 公司;线粒体活性氧检测试剂盒以及线粒体膜电位试剂盒购于上海碧云天生物科技有限公司;所有引物均使用 Premier 5 软件设计,并由赛默飞生物科技有限公司负责合成。

1.2 细胞培养

取液氮中冻存的 AML-12 细胞置于 37 °C 水浴锅中迅速融化,1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 后弃上清液,加入含有 10%胎牛血清的 DME/F-12 培养基,吹散悬浮后转移至 10 cm 培养皿,于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中进行培养,然后制成细胞密度为 1×10⁵ mL⁻¹ 的细胞悬浮液,用于后续试验。

1.3 细胞活力检测

将 100 μ L AML-12 细胞悬浮液接种于 96 孔细胞培养板并孵育 24 h,分别用 0、0.031 25、0.062 5、0.125、0.25、0.5、0.75 和 1 mmol·L⁻¹ DMI 处理 4 h 后,每孔加入 20 μ L MTT 试剂(5 mg·mL⁻¹)继续孵育 4 h 后弃上清液,再向每孔加入 150 μ L 二甲亚砷(DMSO)并低速振荡 10 min,使蓝紫色结晶物充分溶解,酶标仪测定吸光值(D_{490})。

1.4 H₂O₂ 致细胞损伤模型的建立

将 100 μ L AML-12 细胞悬浮液接种于 96 孔细胞培养板并孵育 24 h,分别用 0、25、50、100、150、200、300、400 和 500 μ mol·L⁻¹ H₂O₂ 处理 4 h,然后向每孔加入 20 μ L MTT 试剂(5 mg·mL⁻¹),继续孵育 4 h 后弃上清液,向每孔加入 150 μ L DMSO 并低速振荡 10 min,使蓝紫色结晶物充分溶解,酶标仪测定吸光值(D_{490})。

1.5 线粒体活性氧水平检测

将 2 mL AML-12 细胞悬浮液接种于 6 孔细胞培养板并孵育 24 h 后,分别加入 0 或 0.5 mmol·L⁻¹ DMI 培养 4 h 后,再加入 0 或 150 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 继续培养 4 h。根据线粒体活性氧检测试剂盒说明书配制 MitoSOX Red 稀释液,再将其与处理后的细胞样品混匀,配制成 5 μmol·L⁻¹ 的稀释液,置于 37 °C 细胞培养箱孵育 20 min,吸去稀释液,PBS 清洗 3 次,用倒置荧光显微镜观察并拍摄 mROS 堆积情况。

1.6 线粒体膜电位(mROS)变化情况

将 2 mL AML-12 细胞悬浮液接种于 6 孔细胞培养板并孵育 24 h,分别加入 0 或 0.5 mmol·L⁻¹ DMI 并培养 4 h,再加入 0 或 150 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 继续培养 4 h。根据线粒体膜电位试剂盒说明书配制 JC-1(线粒体膜电位荧光探针)染色工作液与 JC-1 缓冲液,细胞加入适量 JC-1 染色工作液置于 37 °C 细胞培养箱避光孵育 20 min,弃去上清液后用 JC-1 缓冲液洗涤 2 次,用倒置荧光显微镜观察并拍摄线粒体膜电位(MMP)状态。

1.7 ATP 含量测定

将 2 mL AML-12 细胞悬浮液接种于 6 孔细胞培养板并孵育 24 h,分别加入 0 或 0.5 mmol·L⁻¹ DMI 培养 4 h,再加入 0 或 150 μmol·L⁻¹ 的 H₂O₂ 继续培养 4 h,收集细胞,按照试剂盒说明书检测 ATP 含量。

1.8 mtDNA 拷贝数分析

将 2 mL AML-12 细胞悬浮液接种于 6 孔细胞培养板并孵育 24 h,分别加入 0 或 0.5 mmol·L⁻¹ DMI 并培养 4 h,再加入 0 或 150 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 继续培养 4 h,收集细胞,利用 DNA 提取试剂盒提取细胞中的 DNA,使用 RT-qPCR 测量 mtDNA 拷贝数。线粒体 DNA 特定引物对序列为 5'-AGGTTGTCTCCTGTGACT-TCAA-3',5'-CTGTTGCTGTAGCCATATTCATTG-3'。采用 2^{-ΔΔC_T}法分析目的基因相对表达量。

1.9 AMPK 通路关键因子蛋白表达水平分析

1.9.1 蛋白样本的制备 将 2 mL AML-12 细胞悬浮液接种于 6 孔细胞培养板并孵育 24 h,分别加入 0 或 0.5 mmol·L⁻¹ 的 DMI 并培养 4 h,加入 0 或 150 μmol·L⁻¹ 的 H₂O₂ 并继续培养 4 h。弃上清液,PBS 清洗细胞后加入蛋白提取液(RIPA 和蛋白酶抑制剂体积比为 100)并于冰上静置 15 min 以充分裂解,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后取上清液,BCA 法检测蛋白浓度并将各组蛋白样本校准至同一浓度,随后将蛋白样本与 SDS-PAGE 上样缓冲液混匀,100 °C 条件下煮沸 10 min,冷却后置-20 °C 保存备用。

1.9.2 蛋白表达水平的相对定量分析 配制不连续的 SDS-PAGE 胶(上层为 50 g·L⁻¹ 浓缩胶,下层为 100 g·L⁻¹ 分离胶),将蛋白样本加入 SDS-PAGE 胶中进行电泳。电泳过程中,电压设置为 80 V,电泳 30 min 后调整电压为 110 V,待溴酚蓝迁移至分离胶底部时停止电泳。将分离胶中的蛋白转印 PVDF 膜,(100 V 电压下转膜 90 min)。转印结束后,参考蛋白标准分子质量裁剪目的条带,置于 50 g·L⁻¹ 脱脂奶粉中常温封闭 2 h。封闭结束后,使用 TBST 清洗 PVDF 膜 5 次,分别加入 p-AMPK、AMPK、SIRT1、PGC-1α、Nrf1、TFAM 或 Tubulin β 一抗稀释液,4 °C 条件下摇床孵育过夜。回收一抗,TBST 清洗 PVDF 膜 5 次(每次 10 min),随后加入 TBST 稀释的相应二抗,室温中孵育 2 h。弃二抗,TBST 清洗 5 次,每次 10 min。加入 ECL 发光液,在凝胶成像分析系统中曝光并拍照,以 Tubulin β 作为内参,使用 Image J 软件对蛋白条带灰度值进行分析。

1.10 AMPK 在衣康酸二甲酯(DMI)缓解 H₂O₂ 诱导的线粒体功能紊乱中的作用

1.10.1 AMPK 及线粒体功能相关蛋白表达水平分析 AML-12 细胞使用 10 μmol·L⁻¹ AMPK 抑制剂 Compound C 预处理 1 h。Compound C 使用剂量参照文献[12]。预处理结束,AML-12 细胞分别加入 0 或 0.5 mmol·L⁻¹ DMI 继续培养 4 h,加入 0 或 150 μmol·L⁻¹ H₂O₂,孵化 4 h,收集细胞后提取总蛋白,采用 Western blot 法检测 p-AMPK、AMPK、SIRT1、PGC1α 或 Nrf1 蛋白的表达水平。具体检测方法同 1.9.2 节。

1.10.2 mtDNA 拷贝数分析 使用 10 μmol·L⁻¹ AMPK 抑制剂 Compound C 预处理 AML-12 细胞 1 h,分别加入 0 或 0.5 mmol·L⁻¹ 的 DMI 培养 4 h,加入 0 或 150 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 继续培养 4 h,然后分析 mtDNA 拷贝数。检测方法同 1.8 节。

1.11 数据分析

利用 SPSS 17.0 软件对数据先进行单因素方差分析,再进行差异显著性检验;利用 Graph Pad Prism 5.0 软件绘图。统计结果均以平均值±标准误表示。

2 结果与分析

2.1 衣康酸二甲酯(DMI)及H₂O₂对AML-12细胞活力的影响

与对照组相比,0.031 25~0.5 mmol·L⁻¹ DMI 和0~150 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 处理对 AML-12 细胞活力均无显著影响($P>0.05$),但0.75~1 mmol·L⁻¹ DMI 和200~500 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 处理则显著降低了 AML-12 的细胞活力($P<0.05$)(图1)。结果提示,0~0.5 mmol·L⁻¹ DMI 和0~150 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 处理对 AML-12 细胞无毒副作用。因此,本试验后续选择0.5 mmol·L⁻¹ DMI 和150 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 作为最终处理浓度。

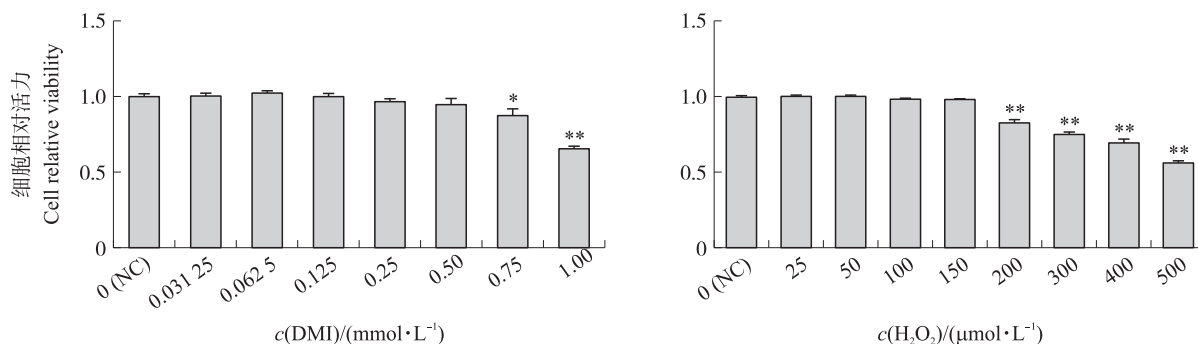


图1 衣康酸二甲酯(DMI, A)及H₂O₂(B)对AML-12细胞活力的影响

Fig. 1 Effect of dimethyl itaconate(DMI, A) or H₂O₂(B) on AML-12 cells viability

*、**表示与对照(NC)组相比差异显著($P<0.05$)和差异极显著($P<0.01$)。下同。*、** indicate significant difference($P<0.05$) and extremely significant difference($P<0.01$) compared with the control(NC) group. The same below.

2.2 衣康酸二甲酯(DMI)对AML-12细胞mROS水平及线粒体膜电位的影响

结果如图2所示,红色荧光强度代表细胞中mROS堆积水平(图2-A);线粒体单体染色呈绿色荧光,越强代表线粒体膜电位水平越低;红色代表线粒体聚集体,越强代表线粒体膜电位水平越高(图2-B)。根据荧光强度的结果,与H₂O₂处理组相比,DMI处理显著抑制H₂O₂诱导的AML-12细胞中mROS水平的升高(图2-A)以及线粒体膜电位的异常降低(图2-B)。结果提示,DMI处理可抑制H₂O₂诱导的AML-12细胞中mROS的过度产生以及线粒体膜电位的降低。

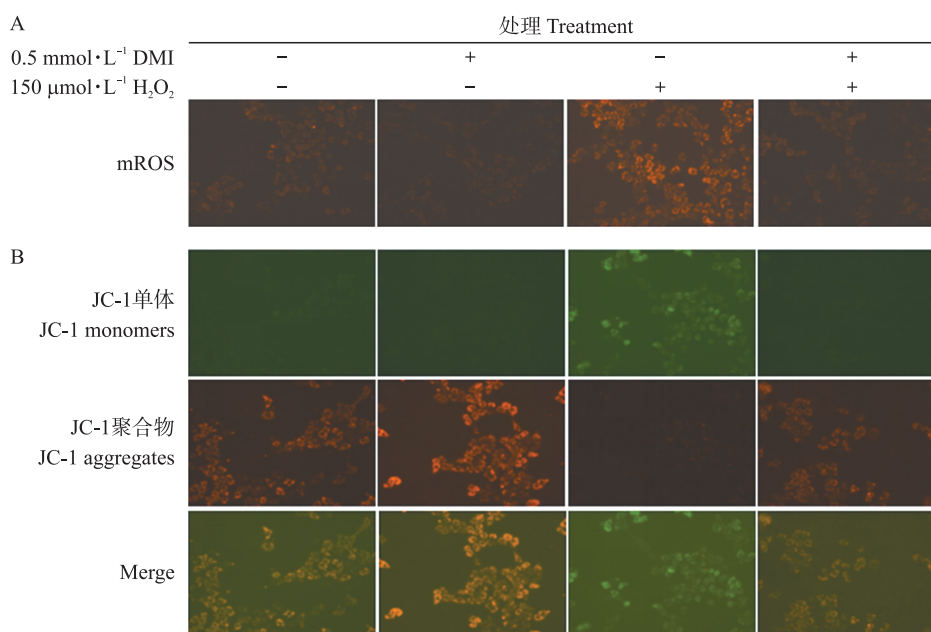


图2 DMI对H₂O₂诱导的AML-12细胞线粒体活性氧(mROS)(A)及线粒体膜电位(B)的调节作用(×200)

Fig. 2 Regulation of mROS(A) and mitochondrial membrane potential(B) in H₂O₂-induced AML-12 cells by DMI

+、-分别表示添加、不添加此物质处理。图4、图5同此。

+ and - indicate the addition and non-addition of this substance, respectively. Fig. 4, Fig. 5 are the same.

2.3 衣康酸二甲酯(DMI)对 AML-12 细胞 ATP 含量及 mtDNA 拷贝数的影响

由图 3-A 可见,与 H_2O_2 处理组相比,DMI 处理显著缓解了 H_2O_2 诱导的 AML-12 细胞中 ATP 水平的下降($P<0.01$)。同时,DMI 处理可显著逆转 H_2O_2 诱导导致的 mtDNA 拷贝数的降低(图 3-B)($P<0.01$)。结果提示,DMI 处理可抑制 H_2O_2 诱导的 AML-12 细胞中 ATP 合成的减少并保护线粒体的正常功能。

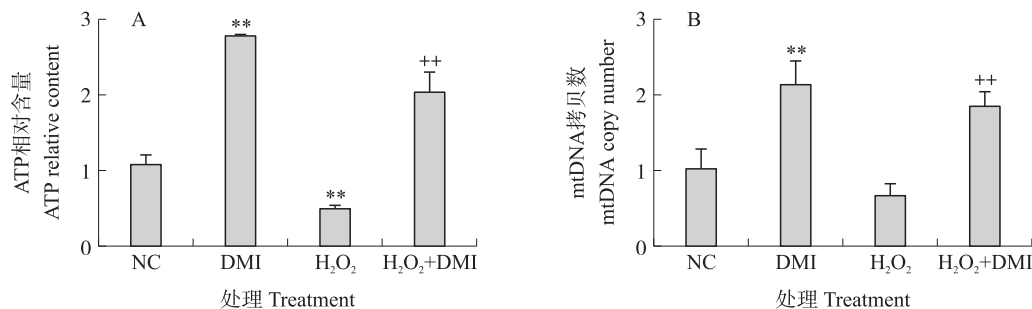


图 3 DMI 对 AML-12 细胞 ATP 含量(A)和 mtDNA 拷贝数(B)的影响

Fig. 3 Effects of DMI on ATP content(A) and mtDNA copy number(B) in AML-12 cells

++表示与 H_2O_2 组相比差异极显著($P<0.01$)。下同。++ indicate extremely significant difference ($P<0.01$) compared with the H_2O_2 group. The same below.

2.4 衣康酸二甲酯(DMI)通过激活 AMPK-SIRT1 信号通路缓解线粒体功能障碍

如图 4 所示,与 NC 组相比, H_2O_2 处理显著降低 AML-12 细胞中 p-AMPK、SIRT1、PGC1 α 、Nrf1 和 TFAM 蛋白表达量($P<0.01$)。与 H_2O_2 处理组相比,DMI 处理则可显著升高 H_2O_2 诱导的 AML-12 细胞中 p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 、Nrf1 和 TFAM 蛋白的表达量($P<0.01$)。结果提示,DMI 处理可激活 H_2O_2 诱导的 AML-12 肝细胞中 AMPK-SIRT1-PGC1 α 信号通路。

由图 5 可知:DMI 处理可显著提高 H_2O_2 诱导的 AML-12 肝细胞中 p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 和 Nrf1 蛋白表达量,而 AMPK 抑制剂 Compound C (CC) 预处理则可明显消除 DMI 对 p-AMPK、SIRT1、PGC1 α 和 Nrf1 蛋白表达的上调作用($P<0.01$)。此外,Compound C 预处理同样可明显消除 DMI 对 H_2O_2 诱导的 AML-12 细胞 mtDNA 拷贝数的上调(图 5-F)($P<0.01$)。结果提示,DMI 通过激活 AMPK-SIRT1-PGC1 α 信

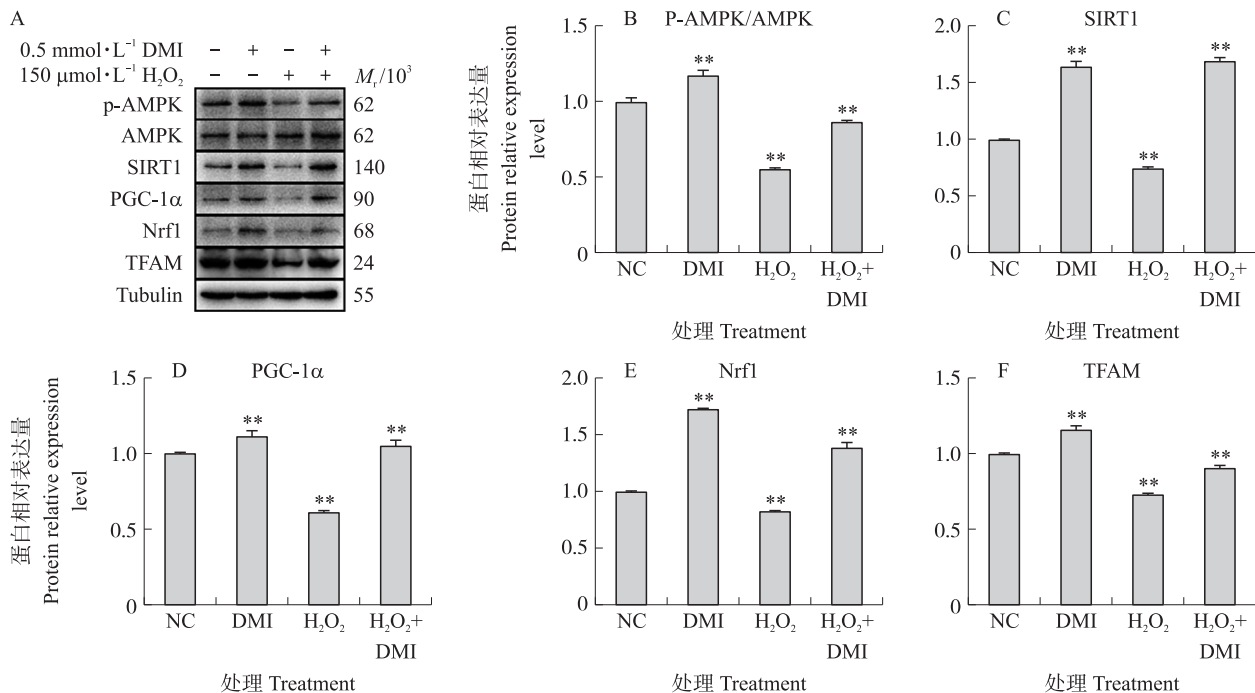


图 4 DMI 对 AML-12 细胞 AMPK-SIRT1-PGC1 α 信号通路关键蛋白表达量的影响

Fig. 4 Effect of DMI on the expression level of key proteins in AMPK-SIRT1-PGC1 α signaling pathway in AML-12 cells

A. 蛋白免疫印迹条带 Protein Western blot; B-F. AMPK-SIRT1-PGC1 α 信号通路关键蛋白表达量 Expression levels of key proteins in AMPK-SIRT1-PGC1 α signaling pathway.

号通路可缓解 H₂O₂ 诱导的 AML-12 细胞线粒体功能障碍。

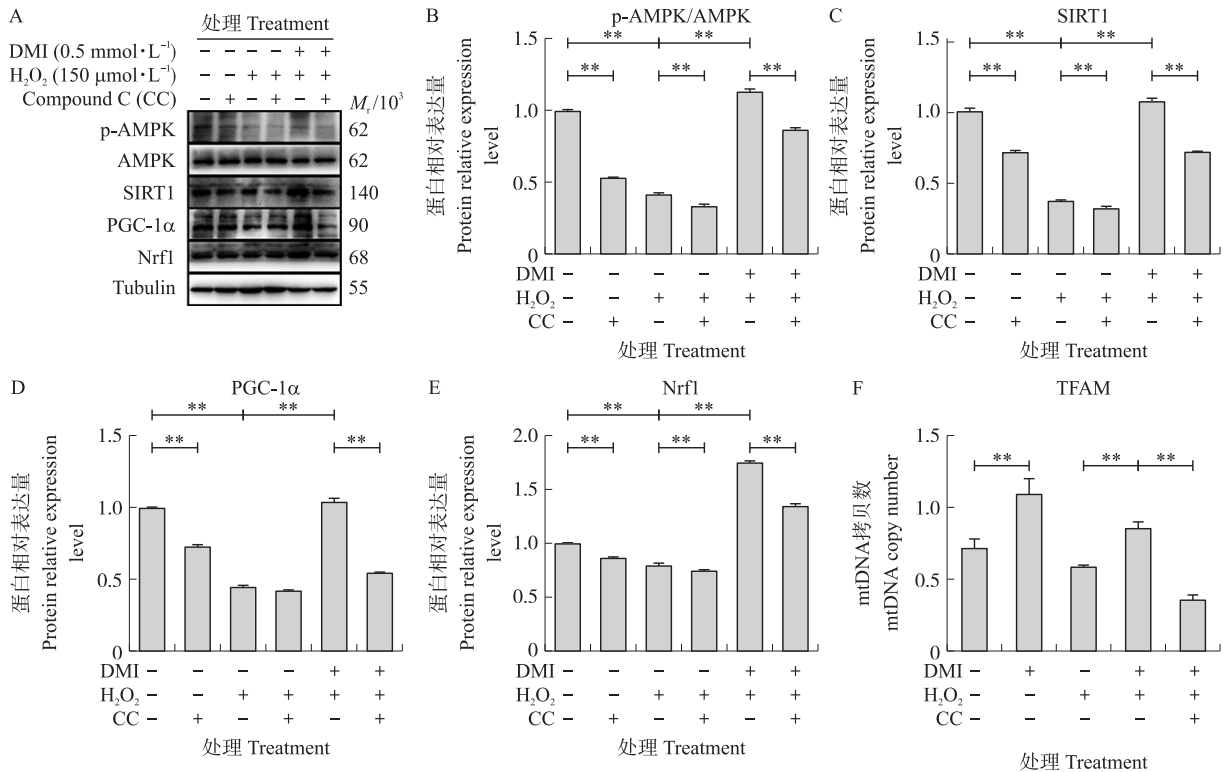


图 5 DMI 通过激活 AMPK-SIRT1-PGC1 α 信号通路缓解 H₂O₂ 诱导的线粒体功能紊乱

Fig. 5 DMI alleviates H₂O₂-induced mitochondrial dysfunction by activating the AMPK-SIRT1-PGC1 α signaling pathway

A. 蛋白免疫印迹条带 Protein Western blot; B—E. AMPK-SIRT1-PGC1 α 信号通路关键蛋白表达水平 Expression levels of key proteins in AMPK-SIRT1-PGC1 α signaling pathway; F. mtDNA 拷贝数 mtDNA copy number.

3 讨论

作为营养物质代谢和联系的中心枢纽,线粒体是机体脂肪酸 β -氧化、三羧酸循环及氧化磷酸化的主要场所^[13];因而,维持线粒体正常的生理功能是保障机体代谢稳态的关键^[14]。衣康酸作为三羧酸循环途径中产生的重要次生代谢产物,具有抗氧化、抗炎、抵抗病原体感染等多种生物学作用。作为衣康酸的功能类似物,DMI 被发现在抗炎、免疫机能、氧化应激等方面同样具有广泛的调节作用^[15],但关于 DMI 对线粒体功能障碍引发的相关代谢性疾病的调节效应及机制的研究仍然较少。

本研究发现,DMI 可明显增强 H₂O₂ 诱导的 AML-12 细胞中 ATP 水平以及 mtDNA 拷贝数。线粒体是机体产生 ATP 的主要场所,而 mtDNA 的转录翻译与线粒体生物合成密切相关,其可编码一系列线粒体呼吸的相关蛋白,包括氧化磷酸化的核心亚基^[16];mtDNA 突变将引起氧化磷酸化功能障碍而导致 ATP 合成减少,进一步影响线粒体生物学功能^[17-18]。因此,线粒体 DNA 拷贝数降低和 ATP 合成能力减弱是线粒体功能障碍的主要表现^[19]。此外,本研究发现 DMI 处理可明显抑制 H₂O₂ 诱导的 AML-12 细胞 mROS 的过度产生。已有研究表明,位于线粒体基质中的 mtDNA 往往容易受到 ROS 的攻击而造成损伤^[20]。以上结果提示,DMI 缓解 H₂O₂ 诱导的肝细胞线粒体功能障碍与其抑制活性氧的过度产生密切相关。同时,本研究发现 DMI 显著缓解 H₂O₂ 刺激导致的 AML-12 细胞线粒体膜电位水平的降低。Zandalinas 等^[21]的研究表明,较高水平的 MMP 可促进 ATP 合成。以上结果证明 DMI 可通过抑制线粒体膜电位的降低以及活性氧过度产生而缓解肝细胞线粒体功能障碍。

本研究发现,H₂O₂ 处理可明显降低 AML-12 细胞中 p-AMPK 蛋白水平,而 DMI 处理则可明显增强 H₂O₂ 诱导的 AML-12 细胞中 p-AMPK 蛋白水平。AMPK 是调节线粒体生物发生的关键效应因子,其对线粒体功能的调控多是通过激活下游相关转录因子实现的^[22]。通过对 AMPK 下游分子检测,我们发现 DMI 处理显著上调了 H₂O₂ 诱导的 AML-12 肝细胞中 SIRT1、PGC-1 α 和 Nrf1 蛋白表达,提示 DMI 可激活 AMPK-SIRT1-PGC1 α 信号通路。Cantó 等^[23]研究表明,在成肌细胞 (C2C12) 肌管中,AMPK 通过调节

NAD⁺代谢和SIRT1活性来下调PGC-1 α 的乙酰化水平,从而控制机体的能量消耗。作为一种转录共激活因子^[24],PGC-1 α 主要通过上调Nrf1和TFAM的表达水平来刺激线粒体生物发生,从而促进mtDNA的复制与转录,改善线粒体功能^[25-26]。因此,AMPK-SIRT1-PGC-1 α 信号通路在维持线粒体功能中发挥着至关重要的作用。为了进一步验证AMPK是否在DMI预防AML-12细胞线粒体功能障碍中起关键作用,我们使用AMPK抑制剂Compound C预处理细胞。结果发现,Compound C预处理逆转了DMI对SIRT1、PGC-1 α 和Nrf1蛋白表达的上调作用;尤为重要的是,本研究发现Compound C预处理同样明显消除了DMI对H₂O₂诱导的AML-12细胞mtDNA拷贝数的上调。以上结果证明DMI通过激活AMPK-SIRT1-PGC1 α 信号通路来调节mtDNA的转录,进而缓解由H₂O₂诱导的肝细胞线粒体功能障碍。

综上所述,本研究证实了DMI通过激活AMPK-SIRT1-PGC1 α 信号通路缓解肝细胞线粒体功能障碍,研究结果为DMI作为一种生理调节剂用于预防畜禽线粒体功能障碍引发的相关营养代谢性疾病提供一定的理论依据及应用基础。

参考文献 References:

- [1] Duchon M R. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2004, 25(4): 365-451.
- [2] Thauvin M, de Sousa M R, Alves M, et al. An early Shh-H₂O₂ reciprocal regulatory interaction controls the regenerative program during zebrafish fin regeneration[J]. *Journal of Cell Science*, 2022, 135(6): jcs259664.
- [3] Herb M, Schramm M. Functions of ROS in macrophages and antimicrobial immunity[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(2): 313.
- [4] Granata S, Dalla-Gassa A, Tomei P, et al. Mitochondria: a new therapeutic target in chronic kidney disease[J]. *Nutrition & Metabolism*, 2015, 12: 49.
- [5] Green C L, Lamming D W, Fontana L. Molecular mechanisms of dietary restriction promoting health and longevity[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2022, 23(1): 56-73.
- [6] Guo Z, Fan D, Liu F Y, et al. NEU1 regulates mitochondrial energy metabolism and oxidative stress post-myocardial infarction in mice *via* the SIRT1/PGC-1 α axis[J]. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2022, 9: 821317.
- [7] Mills E L, Ryan D G, Prag H A, et al. Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1[J]. *Nature*, 2018, 556(7699): 113-117.
- [8] Liao S Y, Chen L, Song Z Y, et al. The fate of damaged mitochondrial DNA in the cell[J]. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research*, 2022, 1869(5): 119233.
- [9] Olagnier D, Farahani E, Thyrdsted J, et al. SARS-CoV2-mediated suppression of NRF2-signaling reveals potent antiviral and anti-inflammatory activity of 4-octyl-itaconate and dimethyl fumarate[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 4938.
- [10] Yi Z J, Deng M H, Scott M J, et al. Immune-responsive gene 1/itaconate activates nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in hepatocytes to protect against liver ischemia-reperfusion injury[J]. *Hepatology*, 2020, 72(4): 1394-1411.
- [11] Zheng Y H, Chen Z, She C, et al. Four-octyl itaconate activates Nrf2 cascade to protect osteoblasts from hydrogen peroxide-induced oxidative injury[J]. *Cell Death & Disease*, 2020, 11: 772.
- [12] Chu X, Li L L, Yan W Y, et al. 4-octyl itaconate prevents free fatty acid-induced lipid metabolism disorder through activating Nrf2-AMPK signaling pathway in hepatocytes[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 2022: 5180242.
- [13] 孙诗谣, 饶钦雄, 程琳, 等. PINK1/Parkin 通路介导的线粒体自噬在十溴联苯醚诱导肉鸡肾脏损伤中的作用[J]. *南京农业大学学报*, 2021, 44(4): 756-765. DOI: 10.7685/jnau.202008022.
Sun S Y, Rao Q X, Cheng L, et al. Effects of mitochondrial autophagy mediated by PINK1/Parkin pathway in kidney injury of broilers exposed to decabromodiphenyl ether[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2021, 44(4): 756-765 (in Chinese with English abstract).
- [14] Tomita K, Kuwahara Y, Igarashi K, et al. Mitochondrial dysfunction in diseases, longevity, and treatment resistance: tuning mitochondria function as a therapeutic strategy[J]. *Genes*, 2021, 12(9): 1348.
- [15] Nonnenmacher Y, Hiller K. Biochemistry of proinflammatory macrophage activation[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2018, 75(12): 2093-2109.
- [16] Mishra P, Chan D C. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, 15(10): 634-646.
- [17] Lomb D J, Laurent G, Haigis M C. Sirtuins regulate key aspects of lipid metabolism[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Proteins and Proteomics*, 2010, 1804(8): 1652-1657.
- [18] Yan C J, Duanmu X Y, Zeng L, et al. Mitochondrial DNA: distribution, mutations, and elimination[J]. *Cells*, 2019, 8(4): 379.
- [19] Chaturvedi R K, Flint Beal M. Mitochondrial diseases of the brain[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2013, 63: 1-29.
- [20] Nicholls T J, Gustafsson C M. Separating and segregating the human mitochondrial genome[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2018, 43(11): 869-881.

- [21] Zandalinas S I, Mittler R. ROS-induced ROS release in plant and animal cells[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2018, 122:21–27.
- [22] Marino A, Hausenloy D J, Andreadou I, et al. AMP-activated protein kinase: a remarkable contributor to preserve a healthy heart against ROS injury[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2021, 166:238–254.
- [23] Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige J N, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity[J]. *Nature*, 2009, 458(7241):1056–1060.
- [24] Kuczynska Z, Metin E, Liput M, et al. Covering the role of PGC-1 α in the nervous system[J]. *Cells*, 2021, 11(1):111.
- [25] 孙立晨, 许晓玲, 白佳桦, 等. 哺乳动物体外成熟卵母细胞的线粒体调控机制研究进展[J]. *畜牧与兽医*, 2023, 55(10):116–120.
Sun L C, Xu X L, Bai J H, et al. Progress in research on mitochondrial regulation mechanism of mammalian *in vitro* maturation oocyte[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 55(10):116–120(in Chinese with English abstract).
- [26] Kang C, Ji L L. Role of PGC-1 α signaling in skeletal muscle health and disease[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2012, 1271(1):110–117.

责任编辑:周广礼