

异甘草素缓解2型糖尿病小鼠能量代谢紊乱分子机制研究

丁文文, 杨晓雪, 陈姿伊, 汪逗逗, 何平*, 刘颖*

(北京中医药大学生命科学院, 北京 102488)

摘要: 异甘草素 (isoliquiritigenin, ISL) 是从甘草中分离得到的类黄酮化合物, 具有良好的抗氧化、降血糖活性, 本文旨在探究 ISL 缓解 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 引起的能量代谢紊乱的分子机制。体内实验以 8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠为实验动物, 采用高脂高糖饮食饲养合并腹腔注射链脲佐菌素的方法构建 T2DM 动物模型, 实验操作和动物福利均遵循北京中医药大学实验动物伦理委员会规定; 体外实验以人肝癌细胞 HepG2 为实验细胞系。采用酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 和实时荧光定量 PCR 法 (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测线粒体功能相关靶点的蛋白和 mRNA 水平; 采用流式细胞术检测线粒体活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 水平; 利用分子对接对 ISL 和部分靶点的相互作用进行验证。结果表明, ISL 可显著抑制小鼠肝脏和 HepG2 细胞中线粒体呼吸链复合物 I 的活性, 并提高解耦联蛋白 2 (uncoupling protein 2, UCP2) 的水平; ISL 还可显著降低 ROS 水平, 并提高 MMP 水平。此外, ISL 可通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活子 1 α (proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 α , PGC-1 α) 促进线粒体生物发生; 通过上调 Parkin 的转录和蛋白水平促进线粒体自噬; 通过提高线粒体融合素 2 (mitofusin 2, MFN2) 的转录和蛋白水平促进线粒体融合。综上, ISL 可抑制 T2DM 小鼠肝脏线粒体过度氧化磷酸化, 并通过促进线粒体生物发生、自噬和融合来缓解 T2DM 引起的能量代谢紊乱。

关键词: 异甘草素; 2 型糖尿病; 线粒体氧化磷酸化; 线粒体生物发生; 线粒体自噬; 线粒体动态

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)11-3339-10

Isoliquiritigenin alleviates energy metabolism imbalance in type 2 diabetic mice

DING Wen-wen, YANG Xiao-xue, CHEN Zi-yi, WANG Dou-dou, HE Ping*, LIU Ying*

(School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

Abstract: Isoliquiritigenin (ISL) is a flavonoid compound isolated from licorice. It possesses excellent antioxidant and anti-diabetic activities. This study aims to investigate the molecular mechanism underlying the alleviatory effect of ISL on energy metabolism imbalance caused by type 2 diabetes mellitus (T2DM). 8-week-old male C57BL/6J mice were used in *in vivo* experiments. The high-fat-high-glucose diet combined with intraperitoneal injection of streptozotocin was applied to establish T2DM animal model. All animal experiments were performed in accordance with the Institutional Guidelines of Laboratory Animal Administration issued by the Committee of Ethics at Beijing University of Chinese Medicine. HepG2 cells were used in *in vitro* experiments. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) were used to examine the protein and mRNA levels of mitochondrial function-related targets. The levels of reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential (MMP) in HepG2 cells were measured by the flow cytometry. Additionally, the molecular docking of ISL and key target proteins was analyzed. It was found that ISL significantly inhibited the activity of mitochondrial respiratory chain complex I and increased the protein levels of

收稿日期: 2023-03-20; 修回日期: 2023-05-06.

*通讯作者 Tel: 86-10-53912163, E-mail: liuyliwd@bucm.edu.cn; heping225@bucm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0331

uncoupling protein 2 (UCP2) in the livers of mice and HepG2 cells. It also obviously decreased the ROS levels and increased the MMP levels in cultured HepG2 cells. In addition, ISL promoted mitochondrial biogenesis by activating proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 α (PGC-1 α) and enhanced mitophagy by upregulating Parkin. It also improved mitochondrial fusion by increasing the mRNA and protein levels of mitofusin 2 (MFN2). In conclusion, ISL alleviates energy metabolism imbalance caused by T2DM through suppression of excessive mitochondrial oxidative phosphorylation and promotion of mitochondrial biogenesis, mitophagy, and fusion.

Key words: isoliquiritigenin; type 2 diabetes mellitus; mitochondrial oxidative phosphorylation; mitochondrial biogenesis; mitophagy; mitochondrial dynamics

糖尿病是全球突出的公共健康问题,常伴随有视网膜病变^[1]、足溃疡^[2]、心功能障碍^[3]和肾功能衰竭^[4]等并发症,严重危害人类健康。2型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 约占糖尿病总人数的90%^[5],是最主要的糖尿病类型。据国际糖尿病联盟统计,截至2021年全球成年糖尿病患者人数已达5.37亿,预计2045年将增长至7亿^[6]。我国是全球糖尿病患病率增长最快的国家之一,也是糖尿病患者最多的国家,2021年我国糖尿病患者已达1.4亿,发病情况日益严峻,国民对糖尿病药品的临床需求极大^[7]。

甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; *Glycyrrhiza inflata* Bat.; *Glycyrrhiza glabra* L.) 是我国最常用的大宗药材之一,其药用历史已有两千余年,具有补脾益气、祛痰止咳、清热解毒、缓急止痛、调和诸药的功效^[8]。异甘草素 (isoliquiritigenin, ISL) 是从甘草中分离得到的类黄酮化合物,具有良好的抗氧化^[9]和抗炎^[10]活性。课题组^[11]前期报道了ISL对高糖高脂饮食诱导的T2DM小鼠血糖和血脂的改善效果,研究同时发现ISL能够显著降低T2DM小鼠肝脏和HepG2细胞的ATP水平,提示ISL在一定程度上可以改善T2DM引发的异常能量代谢。然而,目前关于ISL调控线粒体功能的研究报道相对较少,且多从抑制氧化应激和促进线粒体凋亡角度出发,主要集中于神经保护^[12,13]、肝保护^[14]和抗肿瘤^[15,16]等方面,对于ISL缓解T2DM引起的能量代谢紊乱还缺乏相关研究。

线粒体在耦合细胞外营养水平变化和细胞内能量代谢中发挥了重要作用,胰岛素抵抗和T2DM的发展会引起线粒体呼吸链和脂肪酸 β 氧化功能受损,导致活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 过度产生,线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 下降,引发恶性循环,并最终导致线粒体功能障碍^[17]。近年来,已有多项研究表明,在肥胖条件下,胰岛素敏感细胞的ATP合成过度活跃^[18,19]。线粒体的主要功能是产生ATP^[20],这一过程需要线粒体呼吸链复合物I~V^[21]以及解偶联蛋白2 (uncoupling protein 2, UCP2) 的

协调^[22]。线粒体呼吸链复合物可通过氧化磷酸化产生ATP,以驱动各种生化过程^[21]。UCP2则可通过消除穿过线粒体内膜的质子梯度将呼吸链与ATP合成解耦^[22],从而导致ATP合成减少。因此,线粒体呼吸链复合物和UCP2是研究T2DM引发的ATP过度合成的重要靶点。此外,在T2DM发展过程中还可观察到线粒体形态改变^[23],线粒体生物发生和融合减少^[24,25],裂变增加^[26],自噬受损^[27]等现象。在线粒体生物发生过程中,过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活子1 α (proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 α , PGC-1 α) 是关键转录因子,其可被沉默信息调节因子2相关酶1 (sirtuin 1, SIRT1) 脱乙酰化激活^[28,29],进而激活核呼吸因子1 (nuclear respiratory factor 1, NRF1),上调线粒体转录因子A (mitochondrial transcription factor A, TFAM),从而刺激线粒体基因组 (mitochondrial DNA, mtDNA) 的复制和表达^[30]。在线粒体自噬过程中,PTEN诱导激酶1 (phosphatase and tensin homolog-induced putative kinase 1, PINK1) 和泛素连接酶Parkin是两个重要靶点,可通过自噬机制选择性清除受损或功能失调的线粒体,从而维持线粒体稳态^[31]。在线粒体融合/裂变过程中几种与动力相关的GTP酶发挥了核心作用,其中线粒体融合素1 (mitofusin 1, MFN1) 和MFN2可促进线粒体外膜融合^[32],线粒体动力相关蛋白1 (dynamin-related protein 1, DRP1) 则介导线粒体外膜裂变以响应特定的细胞信号^[33],目前已确定的线粒体外膜DRP1受体和募集因子包括线粒体分裂蛋白1 (mitochondrial fission protein 1, FIS1) 和线粒体裂变因子 (mitochondrial fission factor, MFF) 等^[34]。线粒体功能取决于其质量控制^[24],而线粒体质量控制是通过融合、裂变、自噬和线粒体生物发生的动态相互作用来完成的^[35]。综上,本论文将从调控线粒体氧化磷酸化、生物发生、自噬及线粒体动态等方面开展相关研究,解析ISL缓解T2DM引起的能量代谢紊乱的分子机制。

材料与方 法

实验动物与实验细胞系 SPF级雄性 C57BL/6J 小鼠, 购自斯贝福(北京) 生物技术有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(京) 2019-0010。将小鼠饲养于北京中医药大学屏障环境动物室(20~24 °C, 50%~70%相对湿度, 12 h/12 h 光暗循环), 实验方案经北京中医药大学动物伦理委员会批准(编号: BUCM-2022021503-1134)。人肝癌细胞 HepG2 购自北京协和医学院细胞资源中心。

实验药品和试剂盒 ISL(批号: B21525, 纯度 ≥ 98%) 和阳性药二甲双胍(metformin, MET, 批号: S30880, 纯度 ≥ 98%) 均购自上海源叶生物科技有限公司; 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, 批号: BN30130, 纯度 ≥ 98%) 购自北京百瑞极生物科技有限公司; DMEM 高糖培养基和 0.25% trypsin-EDTA 胰酶为美国 Gibco 公司产品; 胎牛血清和青霉素链霉素双抗为美国 Corning 公司产品; 线粒体呼吸链复合物 I~V ELISA 试剂盒、线粒体 UCP2 ELISA 试剂盒、PGC-1 α ELISA 试剂盒、MFN2 ELISA 试剂盒及 Parkin 蛋白(PP) ELISA 试剂盒均购自上海酶联生物科技有限公司; MFN1 检测试剂盒购自武汉云克隆科技股份有限公司; 一站式 DNA/RNA 提取试剂盒购自生工生物工程(上海) 股份有限公司; NovoStart[®] SYBR qPCR SuperMix Plus 和 NovoScript[®] Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix (gDNA Purge) 购于苏州近岸蛋白质科技股份有限公司; ROS 检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司; MMP 检测试剂盒(JC-10) 购自北京索莱宝科技有限公司。

实验仪器 EPOCH 酶标仪(美国 Biotek Epoch 公司); QuantStudio[™] 6 Flex qPCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司); Centrifuge 5424 R 低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司); CytoFLEX 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)。

T2DM 小鼠模型构建及分组给药 C57BL/6J 小鼠适应性饲养 1 周, 其后随机分为高脂高糖饲料(high-fat-high-glucose diet, HFD) 喂养组和普通饲料(normal fat diet, NFD) 喂养组。喂养 3 周后, 对于 HFD 组小鼠, 连续 5 天在其禁食 12 h 后腹腔注射 STZ 30 mg·kg⁻¹; 对于 NFD 组小鼠, 则注射等体积柠檬酸盐缓冲液(pH 为 4.5)。检测 HFD 组小鼠空腹血糖水平, 连续 3 次 ≥ 11.1 mmol·L⁻¹ 即为造模成功的 T2DM 小鼠。将 NFD 小鼠和 T2DM 小鼠随机分为 6 组, 每组 6 只, 每 3 天腹腔注射给药 1 次, 持续 3 周。分组及给药情况如下, 空白组(CTRL-vehicle): NFD 组小鼠+安慰剂(0.5% 羧甲基纤维素钠的磷酸盐缓冲液); 空白给药组(CTRL-

ISL-H): NFD 组小鼠+ISL(20 mg·kg⁻¹); 模型组(T2DM-vehicle): T2DM 小鼠+安慰剂; 低剂量给药组(T2DM-ISL-L): T2DM 小鼠+ISL(10 mg·kg⁻¹); 高剂量给药组(T2DM-ISL-H): T2DM 小鼠+ISL(20 mg·kg⁻¹); 阳性药组(T2DM-MET): T2DM 小鼠+MET(200 mg·kg⁻¹)。给药结束后处死小鼠, 收集肝脏, 保存于-80 °C 备用。

细胞培养 HepG2 细胞培养采用 DMEM 高糖培养基添加 10% 胎牛血清和 1% 青霉素链霉素双抗, 37 °C、5% CO₂。将细胞以 3.5×10⁵ 个/孔的密度接种于 6 孔板, 当细胞融合率达到 80% 时给药 ISL(0、5、10、20、40 μmol·L⁻¹) 和 MET(1、2、5、10 mmol·L⁻¹), 孵育 24 h 后用于后续实验。

RT-qPCR 检测 收集细胞样品, 采用一站式 DNA/RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA, 逆转录为 cDNA。以 β -actin 作为内参基因, 进行 RT-qPCR 分析, 检测线粒体生物发生相关基因 *PGC-1 α* 、*SIRT1*、*TFAM*、*NRF1*, 线粒体自噬相关基因 *PINK1*、*Parkin*; 线粒体融合相关基因 *MFN1*、*MFN2* 以及线粒体裂变相关基因 *DRP1*、*MFF*、*FIS1* 的转录水平, 各基因引物序列见表 1, 反应程序为: 95 °C 1 min, 95 °C 20 s、60 °C 1 min, 共 40 个循环。

Table 1 The primers using for RT-qPCR analyses. *PGC-1 α* : Proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 α ; *SIRT1*: Sirtuin 1; *TFAM*: Mitochondrial transcription factor A; *NRF1*: Nuclear respiratory factor 1; *PINK1*: Phosphatase and tensin homolog-induced putative kinase 1; *MFN1*: Mitofusin 1; *DRP1*: Dynamin-related protein 1; *FIS1*: Mitochondrial fission protein 1; *MFF*: Mitochondrial fission factor

Gene	Sequence
<i>PGC-1α</i>	F: 5'-CCAAACCAACAACCTTATCTCTCC-3'
	R: 5'-CACACTTAAGGTGCGTTCAATAGTC-3'
<i>SIRT1</i>	F: 5'-TAGCCTTGTCAGATAAGGAAGGA-3'
	R: 5'-ACAGCTTACAGTCAACTTTGT-3'
<i>TFAM</i>	F: 5'-CATCTGTCTTGCCAAGTTGTCC-3'
	R: 5'-CCACTCCGCCCTATAAGCATC-3'
<i>NRF1</i>	F: 5'-AGGAACACGGAGTGACCCAA-3'
	R: 5'-TATGCTCGGTGTAAGTAGCCA-3'
<i>PINK1</i>	F: 5'-GCTTGGGACCTCTCTTGGAT-3'
	R: 5'-CGAAGCCATCTTGAACACAA-3'
Parkin	F: 5'-GTCCAGCAAAGCATCGTTCA-3'
	R: 5'-CAACGATGGAAGGATGTGG-3'
<i>MFN1</i>	F: 5'-GTTGCCGGGTGATAGTTGGA-3'
	R: 5'-TGCCACCTTCATGTGTCTCC-3'
<i>MFN2</i>	F: 5'-CAGGTGTAAGGGACGATTGG-3'
	R: 5'-CAAATGGGATGAAGCACTGA-3'
<i>DRP1</i>	F: 5'-GAATGACCAAGGTGCCTGTAG-3'
	R: 5'-AGCTAGGGTCTGCGACCAT-3'
<i>FIS1</i>	F: 5'-TGGTGCGGAGCAAGTACAAT-3'
	R: 5'-TGCCACGAGTCCATCTTTC-3'
<i>MFF</i>	F: 5'-TCTCAGCCAACCCTCTGA-3'
	R: 5'-TGAGAGCCACTTTTGTCCCC-3'

ELISA 检测 细胞样品: 收集各组细胞, 用 PBS (pH 7.4) 重悬, 调整每毫升细胞数至 1×10^6 个, 反复冻融, 离心 20 min ($2\ 500\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$), 收集上清, 按照各 ELISA 试剂盒说明书操作, 测定线粒体呼吸链复合物 I~V 的活性和 UCP2、PGC-1 α 、Parkin、MFN1、MFN2 的蛋白含量。肝脏样品: 取小鼠肝脏, 称重, 按比例加入 PBS (pH 7.4), 充分匀浆, 离心 20 min ($2\ 500\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$), 收集上清, 按照各 ELISA 试剂盒说明书操作, 测定线粒体呼吸链复合物 I~V 的活性和 UCP2 蛋白含量。

ROS 检测 当 6 孔板中细胞融合率达到 80% 时, 弃去旧培养基, 以无血清 DMEM 培养基清洗 3 次, 每孔加入 $10\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DCFH-DA, $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 20 min, 以无血清 DMEM 培养基清洗细胞 3 次, 加入 ISL (5 、 10 、 20 、 $40\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 MET ($10\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 2 h, 并设置空白对照, 采用流式细胞仪检测细胞 ROS 水平。

MMP 检测 当 6 孔板细胞融合率达到 80% 时, 给药 ISL (5 、 10 、 20 、 $40\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 MET ($10\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 并设置空白对照, 孵育 2 h 后收集细胞, 加入 JC-10 染色工作液, $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 20 min, 以 JC-10 染色缓冲液洗涤 3 次后采用流式细胞仪检测。

分子对接 采用 Discovery Studio 2019 软件进行分子对接验证, 通过分子与蛋白质之间的相互作用分析, 鉴定 Parkin 和 MFN2 蛋白与 ISL 之间的结合能力, 从 RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>) 数据库获取所需蛋白质的三维结构。

统计学分析 采用 IBM SPSS Statistic 26.0 统计分析软件, 以单因素方差分析 (ANOVA) 进行统计分析, 以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示全部数据。

结果

1 ISL 可显著抑制 T2DM 小鼠肝脏和 HepG2 细胞的线粒体氧化磷酸化

小鼠肝脏和 HepG2 细胞中线粒体呼吸链复合物 I~V 的活性及 UCP2 的蛋白水平如图 1 所示。与空白组相比, 模型组小鼠肝脏线粒体呼吸链复合物 I 的活性显著提高; 与模型组相比, ISL 治疗可显著抑制线粒体呼吸链复合物 I 的活性 (图 1A), 阳性药 MET 则可显著抑制线粒体呼吸链复合物 I、III 和 V 的活性 (图 1A、C 和 E)。体外结果与体内相似, ISL 表现出对 HepG2 细胞中线粒体呼吸链复合物 I 活性的显著抑制效果 (图 1A), 并在高浓度水平 ($40\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可抑制线粒体呼吸链复合物 II 和 IV (图 1B、D) 的活性; 阳性药 MET 则可显著抑制线粒体呼吸链复合物 I、III 和 V 的活性 (图 1A、C、E)。以上结果表明, ISL 可通过抑制线粒体呼吸链复合物 I 的活性抑制线粒体氧化磷酸化, 从而

减少 ATP 的合成, 与本课题组前期研究中观察到的 ATP 合成下降的现象相吻合^[11]。UCP2 的体内检测结果显示, 与模型组相比, ISL 治疗可显著提高小鼠肝脏 UCP2 的水平, 阳性药 MET 也表现出相似的效果; 体外检测结果显示 $20\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 及以上浓度的 ISL 可显著提高 UCP2 的水平, 表明 ISL 可通过上调 UCP2 抑制 ATP 的合成 (图 1F)。

2 ISL 可显著降低 HepG2 细胞 ROS 水平并提高其 MMP 水平

HepG2 细胞中 ROS 检测结果如图 2A 所示: ISL (5 、 10 、 20 、 $40\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 给药后, ROS 水平分别降低 $30.20\% \pm 4.245\%$ 、 $25.30\% \pm 5.909\%$ 、 $23.18\% \pm 7.463\%$ 及 $24.35\% \pm 7.891\%$ ($P < 0.01$), $10\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 给药后, ROS 水平降低 $15.74\% \pm 7.467\%$ ($P < 0.05$), 表明 ISL 和阳性药 MET 均可显著降低 HepG2 细胞 ROS 水平, 减轻细胞的氧化应激。线粒体膜电位较高时, JC-10 形成聚合物, 产生红色荧光, 以四象限左上区域 (Q1-UL) 细胞数百分比表示 MMP 水平, 检测结果如图 2B 所示: ISL (5 、 10 、 20 、 $40\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 给药后, MMP 水平分别提高 $2.267\% \pm 1.451\ 0\%$ 、 $4.543\% \pm 0.414\ 8\%$ 、 $4.307\% \pm 0.663\ 8\%$ 及 $4.430\% \pm 1.169\ 0\%$ ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而 $10\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 给药后, MMP 水平降低 $2.380\% \pm 1.091\ 0\%$ ($P < 0.05$), 结果表明 ISL 可显著提高 HepG2 细胞 MMP 水平, 具有一定的线粒体保护作用。

3 ISL 对 HepG2 细胞线粒体生物发生、自噬及线粒体动态相关靶点的调控作用

线粒体总量的检测结果如图 3A 所示: ISL 可剂量依赖性地提高 HepG2 细胞中 mtDNA 的水平, 且在 $20\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 及以上浓度达到显著性差异 (图 3A), 表明 ISL 可提高 HepG2 细胞的线粒体总量。线粒体生物发生相关靶点的检测结果如图 3B~D 所示: ISL 处理可显著提高 PGC-1 α 的 mRNA 和蛋白水平, 还可显著提高 SIRT1 和 TFAM 的 mRNA 水平, 但对 NRF1 无显著性影响, 阳性药 MET 表现出相似的效果, 以上结果表明 ISL 可促进线粒体生物发生。

线粒体自噬相关靶点的检测结果如图 3E、F 所示: ISL 和阳性药 MET 均可显著上调 PINK1 和 Parkin 的 mRNA 水平及 Parkin 的蛋白水平, 表明 ISL 可促进线粒体自噬。

线粒体融合相关靶点的检测结果如图 3G、H 所示: $20\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 及以上浓度的 ISL 可显著提高 MFN1 的 mRNA 水平, 但对 MFN1 的蛋白水平无显著性影响; $1 \sim 10\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ISL 可显著提高 MFN2 的转录水平, $2 \sim 5\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ISL 可显著提高 MFN2 的蛋白水平, 可见

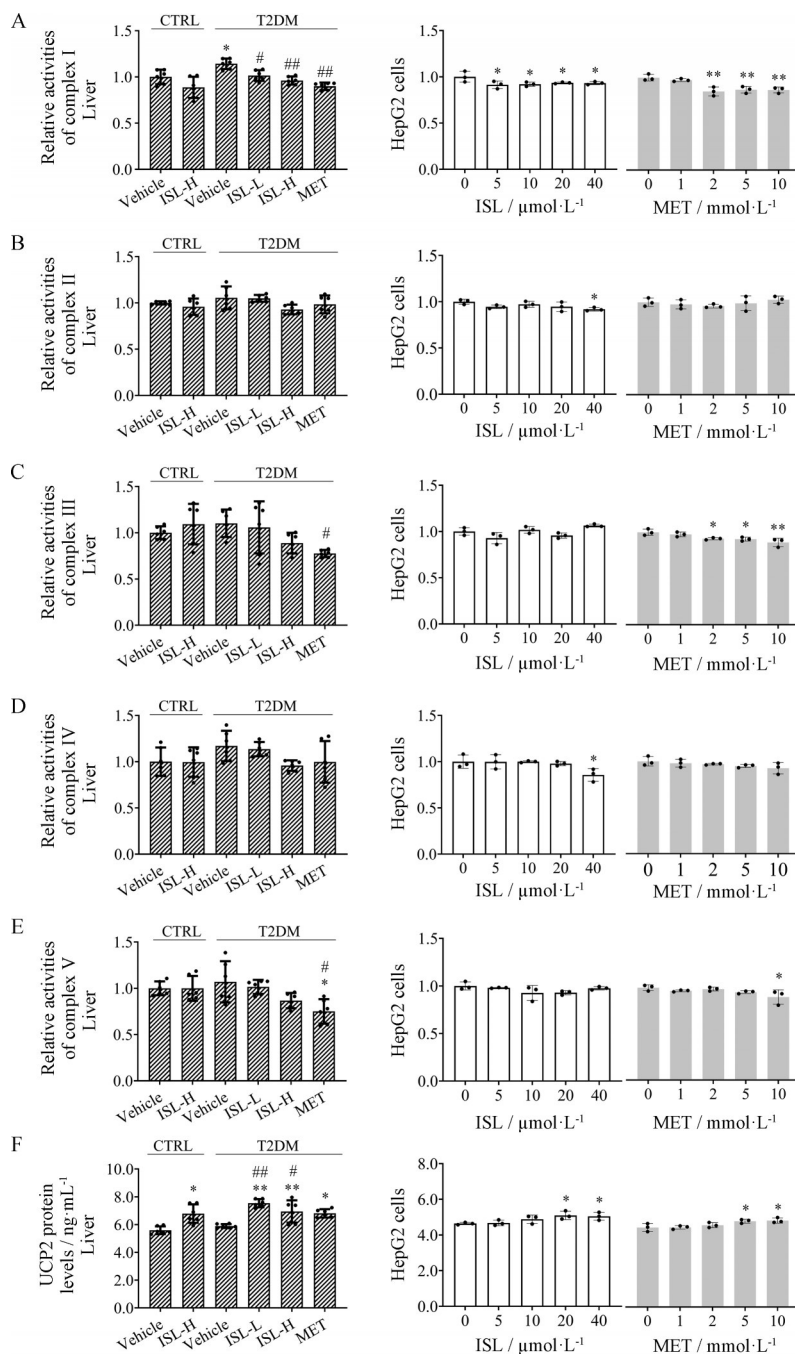


Figure 1 Isoliquritigenin (ISL) inhibits mitochondrial oxidative phosphorylation in the livers of mice and HepG2 cells. A–E: Relative activities of mitochondrial respiratory chain complex I–V; F: Protein levels of uncoupling protein 2 (UCP2). $n = 6$ (*in vivo* experiments) or $n = 3$ (*in vitro* experiments), $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs CTRL-vehicle (*in vivo* experiments) or CTRL group (*in vitro* experiments); # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs T2DM-vehicle

ISL对MFN2的上调作用在低剂量下即达到饱和。线粒体裂变相关靶点的检测结果如图3I所示:低剂量ISL(5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和阳性药MET均可显著抑制DRP1的mRNA水平,但ISL对FIS1和MFF的转录水平无显著影响。以上结果表明,ISL可通过提高MFN2的转录和蛋白水平促进线粒体融合,并通过下调DRP1的转录水平对线粒体裂变产生一定影响,从而

调控线粒体动态。

4 分子对接验证ISL与Parkin及MFN2蛋白的结合能力

根据上述线粒体自噬及融合相关靶点ELISA实验结果(图3F、H),本研究选择了Parkin及MFN2两个关键蛋白,通过分子对接进一步验证ISL与其相互作用,结果如图4所示:ISL可与Parkin蛋白的ALA206、

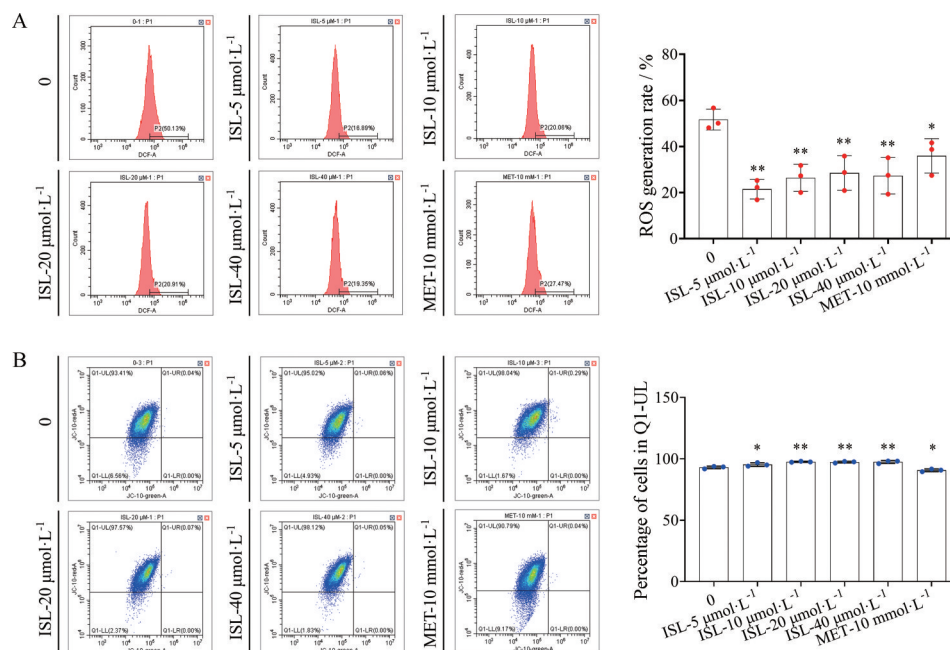


Figure 2 ISL reduces mitochondrial ROS (A) levels and increases MMP (B) levels in HepG2 cells. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs CTRL group. ROS: Reactive oxygen species; MMP: Mitochondrial membrane potential

ASN190 和 SER223 氨基酸残基形成氢键相互作用, 与 PRO189 氨基酸残基形成疏水相互作用, 与 GLU207 形成静电相互作用 (图 4A、B); ISL 可与 MFN2 蛋白的 LYS30、HIS31 氨基酸残基形成氢键相互作用, 和 TYR752 氨基酸残基形成疏水相互作用, 和 LYS38 氨基酸残基形成静电相互作用 (图 4C、D)。分子对接结果表明: Parkin 和 MFN2 是 ISL 的潜在靶蛋白。

讨论

本论文以 8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠为实验动物, 采用高糖高脂饮食饲养合并腹腔注射 STZ 的方法构建 T2DM 模型, 并以 HepG2 细胞为实验细胞系, 探究 ISL 缓解 T2DM 引起的能量代谢紊乱的分子机制。研究表明, ISL 可通过抑制线粒体呼吸链复合物 I 的活性, 提高 UCP2 的水平, 抑制线粒体过度氧化磷酸化, 从而降低 T2DM 小鼠肝脏 ATP 的合成, 并通过促进线粒体生物发生、自噬和融合而改善 T2DM 引起的线粒体功能障碍, 同时表现出对 ROS 生成的抑制和 MMP 水平的提高效果。

近年来, T2DM 已成为世界上增长最快的代谢性疾病之一^[36]。能量代谢紊乱是 T2DM 患者的主要症状之一, 线粒体作为细胞的“能量工厂”, 对细胞能量稳态的维持发挥着至关重要的作用^[37]。越来越多的证据表明, T2DM 的发生发展与线粒体功能障碍密切相关^[38,39]。本课题组在前期研究中发现 ISL 可显著降低 T2DM 小鼠肝脏和 HepG2 细胞中的 ATP 水平^[11], 提示

ISL 具有一定的调控能量代谢的潜力。已有多项研究表明, 2 型糖尿病的一线药物 MET 可通过抑制线粒体呼吸链复合物 I 的活性而降低 T2DM 小鼠中 ATP 的合成, 从而改善 T2DM 引起的能量代谢紊乱^[40,41]。因此, 本论文也开展了线粒体呼吸链复合物的活性检测, 并发现 ISL 表现出与阳性药 MET 类似的效果, 可显著抑制 T2DM 小鼠肝脏和 HepG2 细胞中线粒体呼吸链复合物 I 的活性 (图 1A), 同时可显著提高线粒体 UCP2 的水平 (图 1F), 从而抑制了线粒体过度氧化磷酸化, 改善了 T2DM 小鼠异常能量代谢。

当葡萄糖水平持续升高时, 线粒体会增强 ROS 的产生, 并因此诱导氧化应激和组织损伤^[42], 本论文发现 ISL 处理可显著抑制 HepG2 细胞中 ROS 生成 (图 2A), 从而抑制 T2DM 引起的氧化应激。由于线粒体呼吸链复合物 I 是 ROS 产生的主要位点^[43], 同时 UCP2 过表达可降低 ROS 的产生^[44], 因此 ISL 对线粒体呼吸链复合物 I 的抑制作用以及对 UCP2 的促进作用均可导致 ROS 生成的降低。MMP 是质子动力 (线粒体电化学跨膜势) 的主要组成部分, 其在线粒体生物能量学、代谢和信号功能中发挥关键作用, MMP 的耗散是线粒体功能障碍的标志^[45], 本论文研究结果表明 ISL 可显著提高 MMP 水平 (图 2B), 对线粒体具有一定的保护作用。由于过量的 ROS 会破坏线粒体膜, 改变膜的通透性, 使得膜内外离子浓度差减小, 从而导致线粒体膜电位降低^[46]。因此, 本论文中 ROS 的降低和 MMP 的升高结果相吻合。

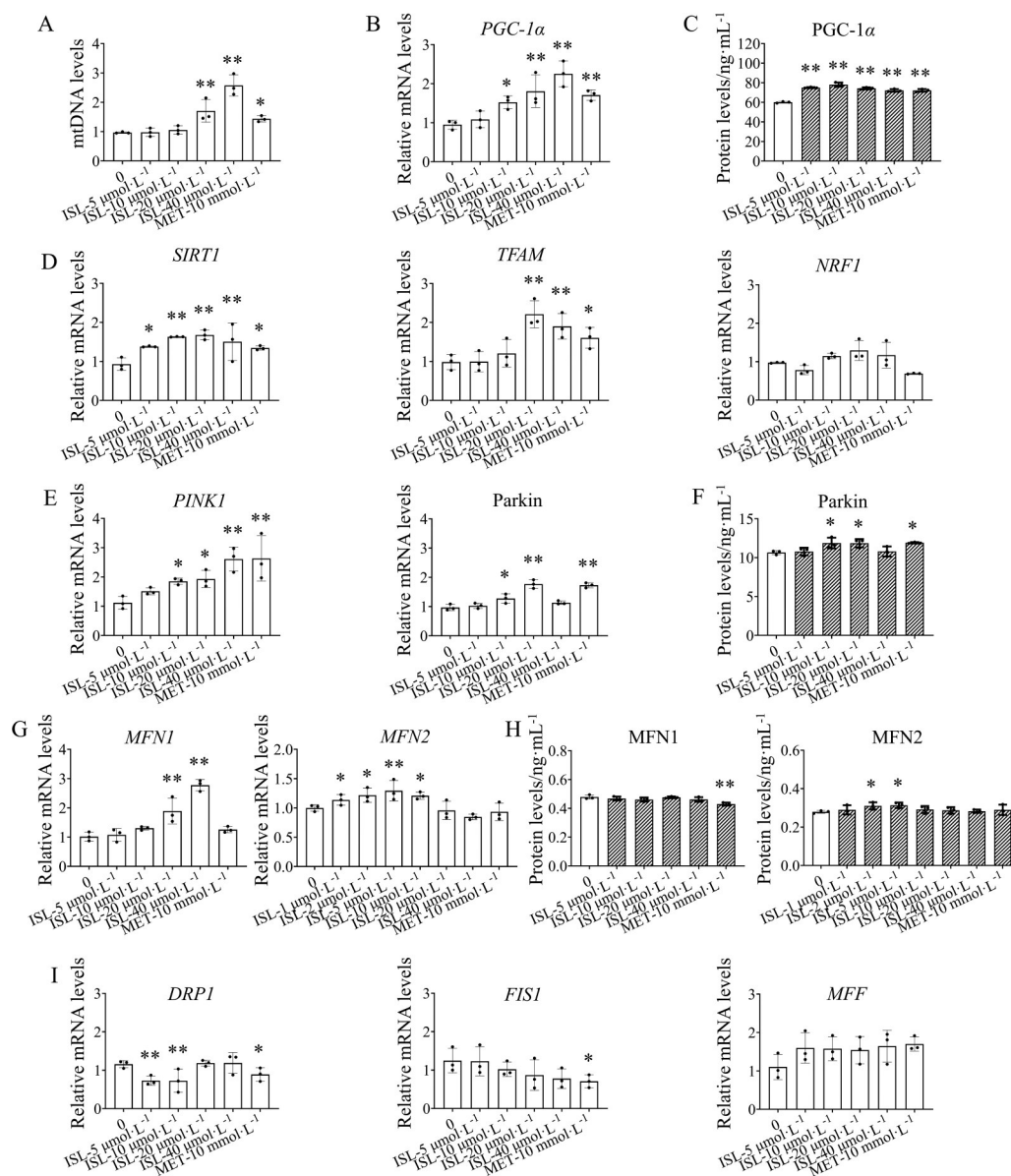


Figure 3 ISL promotes mitochondrial biogenesis, mitophagy, and fusion. A: Relative mtDNA levels; B: Relative mRNA levels of *PGC-1 α* ; C: Protein levels of *PGC-1 α* ; D: Relative mRNA levels of mitochondrial biogenesis genes (*SIRT1*, *TFAM*, and *NRF1*); E: Relative mRNA levels of mitophagy genes (*PINK1* and *Parkin*); F: Protein levels of *Parkin*; G: Relative mRNA levels of mitochondrial fusion genes (*MFN1* and *MFN2*); H: Protein levels of *MFN1* and *MFN2*; I: Relative mRNA levels of mitochondrial fission genes (*DRP1*, *FIS1* and *MFF*). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs CTRL group

在 T2DM 发生发展过程中, 可见明显的线粒体生物发生^[24]、自噬^[27]及动态改变^[47]。PGC-1 α 是一种共转录调节因子, 其通过激活不同的转录因子来诱导线粒体生物发生^[48,49], 本论文研究发现 ISL 可显著提高 HepG2 细胞中 PGC-1 α 的转录 (图 3B) 和蛋白水平 (图 3C), 同时提高其上游 *SIRT1* 以及其下游 *TFAM* 的 mRNA 水平 (图 3D), 从而促进线粒体生物发生。据报道, T2DM 患者的氧化应激增加会造成线粒体自噬异常, 从而损害线粒体功能, 并导致胰岛素抵抗和 β 细胞衰竭^[50]。PINK1 积聚在功能失调的线粒体外膜上, 同

时募集 *Parkin* 并激活其 E3 泛素连接酶活性, 共同介导线粒体自噬^[51]。本论文研究表明, ISL 可显著提高 *PINK1* 和 *Parkin* 的转录水平 (图 3E) 及 *Parkin* 的蛋白水平 (图 3F), 从而促进线粒体自噬。此外, 暴露于过量的营养环境 (如 T2DM) 会导致线粒体动态改变^[24], *MFN1* 和 *MFN2* 是线粒体融合必需的 GTP 酶^[52], *DRP1* 是驱动线粒体裂变的主调节因子^[53]。本论文研究发现, ISL 可通过提高 *MFN2* 的转录和蛋白水平 (图 3G、H) 促进线粒体融合, 通过下调 *DRP1* 的转录水平 (图 3I) 在一定程度上抑制线粒体裂变。综上所述, 本论文

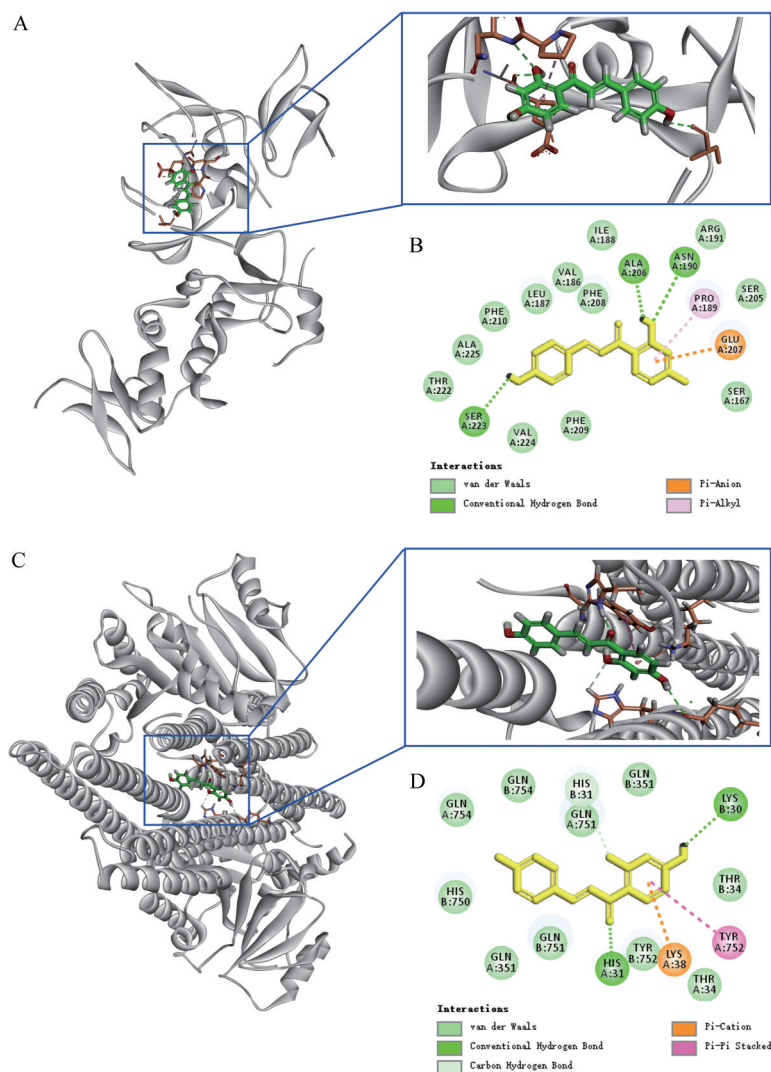


Figure 4 Molecular docking of ISL with Parkin and MFN2. A: Three-dimensional structure diagram of ISL and Parkin protein molecule docking (PDB ID: 5c9v); B: Two-dimensional structure diagram of ISL and Parkin protein molecule docking; C: Three-dimensional structure diagram of ISL and MFN2 protein molecule docking (PDB ID: 6jfm); D: Two-dimensional structure diagram of ISL and MFN2 protein molecule docking

证明了 ISL 可缓解 T2DM 引起的线粒体功能障碍, 有助于 T2DM 的改善和治疗, 为开发靶向线粒体功能障碍治疗 T2DM 的小分子制剂提供了参考。

作者贡献: 丁文文完成了实验并撰写了论文; 刘颖和何平构思设计了实验方案并修改了论文; 杨晓雪、陈姿伊和汪逗逗协助相关实验操作, 并参与了实验数据的分析; 所有作者均阅读并参与修改了本论文。

利益冲突: 本文作者均没有利益冲突。

References

[1] Santovito D, Toto L, De Nardis V, et al. Plasma microRNA signature associated with retinopathy in patients with type 2 diabetes [J]. *Sci Rep*, 2021, 11: 4136.
 [2] Lim JZ, Ng NS, Thomas C. Prevention and treatment of diabetic

foot ulcers [J]. *J R Soc Med*, 2017, 110: 104-109.
 [3] Jia G, Hill MA, Sowers JR. Diabetic cardiomyopathy: an update of mechanisms contributing to this clinical entity [J]. *Circ Res*, 2018, 122: 624-638.
 [4] Saulnier PJ, Looker HC, Mauer M, et al. Intraglomerular dysfunction predicts kidney failure in type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 2021, 70: 2344-2352.
 [5] Keshavarz K, Lotfi F, Sanati E, et al. Linagliptin *versus* sitagliptin in patients with type 2 diabetes mellitus: a network meta-analysis of randomized clinical trials [J]. *Daru*, 2017, 25: 23.
 [6] Teo ZL, Tham YC, Yu M, et al. Global prevalence of diabetic retinopathy and projection of burden through 2045: systematic review and meta-analysis [J]. *Ophthalmology*, 2021, 128: 1580-1591.

- [7] Gao MF, Hu RY, Hu CG. Research progress on epidemiological characteristics of death of diabetes in China [J]. *Prev Med (预防医学)*, 2022, 34: 692-695.
- [8] Yang R, Li WD, Ma YS, et al. The molecular identification of licorice species and the quality evaluation of licorice slices [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 318-326.
- [9] Zeng J, Chen YZ, Ding R, et al. Isoliquiritigenin alleviates early brain injury after experimental intracerebral hemorrhage *via* suppressing ROS-and/or NF-kappaB-mediated NLRP3 inflammasome activation by promoting Nrf2 antioxidant pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14: 119.
- [10] Huang XZ, Shi YJ, Chen HJ, et al. Isoliquiritigenin prevents hyperglycemia-induced renal injuries by inhibiting inflammation and oxidative stress *via* SIRT1-dependent mechanism [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11: 1040.
- [11] Yang L, Wang DD, Zhang ZX, et al. Isoliquiritigenin alleviates diabetic symptoms *via* activating AMPK and inhibiting mTORC1 signaling in diet-induced diabetic mice [J]. *Phytomedicine*, 2022, 98: 153950.
- [12] Yang EJ, Min JS, Ku HY, et al. Isoliquiritigenin isolated from *Glycyrrhiza uralensis* protects neuronal cells against glutamate-induced mitochondrial dysfunction [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 421: 658-664.
- [13] Denzer I, Munch G, Friedland K. Modulation of mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases *via* activation of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 by food-derived compounds [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 103: 80-94.
- [14] Park SM, Lee JR, Ku SK, et al. Isoliquiritigenin in licorice functions as a hepatic protectant by induction of antioxidant genes through extracellular signal-regulated kinase-mediated NF-E2-related factor-2 signaling pathway [J]. *Eur J Nutr*, 2016, 55: 2431-2444.
- [15] Hsu YL, Chia CC, Chen PJ, et al. Shallot and licorice constituent isoliquiritigenin arrests cell cycle progression and induces apoptosis through the induction of ATM/p53 and initiation of the mitochondrial system in human cervical carcinoma HeLa cells [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53: 826-835.
- [16] Jung JI, Lim SS, Choi HJ, et al. Isoliquiritigenin induces apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes in prostate cancer cells [J]. *J Nutr Biochem*, 2006, 17: 689-696.
- [17] Liu XL, Zhang JY, Ming YN, et al. The aggravation of mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease accompanied with type 2 diabetes mellitus [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2015, 50: 1152-1159.
- [18] Ye JP. Mechanism of insulin resistance in obesity: a role of ATP [J]. *Front Med*, 2021, 15: 372-382.
- [19] Koster JC, Permutt MA, Nichols CG. Diabetes and insulin secretion: the ATP-sensitive K⁺ channel (K ATP) connection [J]. *Diabetes*, 2005, 54: 3065-3072.
- [20] Moran M, Moreno-Lastres D, Marin-Buera L, et al. Mitochondrial respiratory chain dysfunction: implications in neurodegeneration [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 53: 595-609.
- [21] Kobayashi A, Azuma K, Ikeda K, et al. Mechanisms underlying the regulation of mitochondrial respiratory chain complexes by nuclear steroid receptors [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 6683.
- [22] Donadelli M, Dando I, Fiorini C, et al. UCP2, a mitochondrial protein regulated at multiple levels [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71: 1171-1190.
- [23] Petersen KF, Dufour S, Befroy D, et al. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350: 664-671.
- [24] Rovira-Llopis S, Banuls C, Diaz-Morales N, et al. Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: pathophysiological implications [J]. *Redox Biol*, 2017, 11: 637-645.
- [25] Ramasubramanian B, Griffith C, Hanson M, et al. Protective effects of chaya against mitochondrial and synaptic toxicities in the type 2 diabetes mouse model TallyHO [J]. *Cells*, 2022, 11: 744.
- [26] Diaz-Morales N, Rovira-Llopis S, Banuls C, et al. Are mitochondrial fusion and fission impaired in leukocytes of type 2 diabetic patients? [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 25: 108-115.
- [27] Tong M, Saito T, Zhai P, et al. Mitophagy is essential for maintaining cardiac function during high fat diet-induced diabetic cardiomyopathy [J]. *Circ Res*, 2019, 124: 1360-1371.
- [28] Xue HY, Li PP, Luo YS, et al. Salidroside stimulates the Sirt1/PGC-1alpha axis and ameliorates diabetic nephropathy in mice [J]. *Phytomedicine*, 2019, 54: 240-247.
- [29] Zhang W, Song JK, ZHU XY, et al. Isorhamnetin activates Sirt1/PGC-1 α signaling pathway to inhibit MPP⁺-induced SH-SY5Y cell injury [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1976-1981.
- [30] Cardanho-Ramos C, Morais VA. Mitochondrial biogenesis in neurons: how and where [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 13059.
- [31] Sun K, Jing XZ, Guo JC, et al. Mitophagy in degenerative joint diseases [J]. *Autophagy*, 2021, 17: 2082-2092.
- [32] van der Blik AM, Shen Q, Kawajiri S. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5: a011072.
- [33] Youle RJ, van der Blik AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress [J]. *Science*, 2012, 337: 1062-1065.
- [34] Wai T, Langer T. Mitochondrial dynamics and metabolic regulation [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2016, 27: 105-117.
- [35] Carreira RS, Lee P, Gottlieb RA. Mitochondrial therapeutics for cardioprotection [J]. *Curr Pharm Des*, 2011, 17: 2017-2035.
- [36] Liu LL, Zhang JH, Cheng Y, et al. Gut microbiota: a new target for T2DM prevention and treatment [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 958218.
- [37] Du Y, Zhu YJ, Zeng B, et al. Super-resolution quantification of T2DM-induced mitochondrial morphology changes and their implications in pharmacodynamics of metformin and sorafenib

- [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 932116.
- [38] Hesselink MK, Schrauwen-Hinderling V, Schrauwen P. Skeletal muscle mitochondria as a target to prevent or treat type 2 diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, 12: 633-645.
- [39] Fiorentino TV, Monroy A, Kamath S, et al. Pioglitazone corrects dysregulation of skeletal muscle mitochondrial proteins involved in ATP synthesis in type 2 diabetes [J]. *Metabolism*, 2021, 114: 154416.
- [40] Fujita Y, Hosokawa M, Fujimoto S, et al. Metformin suppresses hepatic gluconeogenesis and lowers fasting blood glucose levels through reactive nitrogen species in mice [J]. *Diabetologia*, 2010, 53: 1472-1481.
- [41] Hunter RW, Hughey CC, Lantier L, et al. Metformin reduces liver glucose production by inhibition of fructose-1-6-bisphosphatase [J]. *Nat Med*, 2018, 24: 1395-1406.
- [42] Szendroedi J, Phielix E, Roden M. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2011, 8: 92-103.
- [43] Onukwufor JO, Farooqi MA, Vodickova A, et al. A reversible mitochondrial complex I thiol switch mediates hypoxic avoidance behavior in *C. elegans* [J]. *Nat Commun*, 2022, 13: 2403.
- [44] Nagao Y, Yokoi A, Yoshida K, et al. Novel therapeutic strategies targeting UCP2 in uterine leiomyosarcoma [J]. *Pharmacol Res*, 2023, 189: 106693.
- [45] Audi SH, Cammarata A, Clough AV, et al. Quantification of mitochondrial membrane potential in the isolated rat lung using rhodamine 6G [J]. *J Appl Physiol*, 2020, 128: 892-906.
- [46] Rizwan H, Pal S, Sabnam S, et al. High glucose augments ROS generation regulates mitochondrial dysfunction and apoptosis *via* stress signalling cascades in keratinocytes [J]. *Life Sci*, 2020, 241: 117148.
- [47] Yoon Y, Galloway CA, Jhun BS, et al. Mitochondrial dynamics in diabetes [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14: 439-457.
- [48] Jornayvaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis [J]. *Essays Biochem*, 2010, 47: 69-84.
- [49] Puigserver P, Wu Z, Park CW, et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis [J]. *Cell*, 1998, 92: 829-839.
- [50] Bhansali S, Bhansali A, Dhawan V. Metformin promotes mitophagy in mononuclear cells: a potential *in vitro* model for unraveling metformin's mechanism of action [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2020, 1463: 23-36.
- [51] Nguyen TN, Padman BS, Lazarou M. Deciphering the molecular signals of PINK1/Parkin mitophagy [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26: 733-744.
- [52] Rodrigues T, Ferraz LS. Therapeutic potential of targeting mitochondrial dynamics in cancer [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 182: 114282.
- [53] Yang H, Sibilla C, Liu R, et al. Clueless/CLUH regulates mitochondrial fission by promoting recruitment of DRP1 to mitochondria [J]. *Nat Commun*, 2022, 13: 1582.