

大黄酚通过 AMPK/PGC-1 α 通路促进 线粒体生物合成影响巨噬细胞极化

王乐乐^{1,3}, 谭彩霞^{1,3}, 张薇^{1,3}, 葛睿涵^{1,3}, 李晨^{1,3}, 王新敏^{2,4}, 章乐^{1,3,4}

(¹石河子大学医学院, 新疆石河子 832002; ²石河子大学第一附属医院, 新疆石河子 832003;

³新疆地方与民族高发疾病教育部重点实验室, 新疆石河子 832002;

⁴国家卫生健康委中亚高发疾病防治重点实验室, 新疆石河子 832000

摘要 目的 探究大黄酚(CHR)是否通过 AMPK/PGC-1 α 通路促进线粒体生物合成影响巨噬细胞极化。方法 使用 Autodock vina 软件将 CHR 与 AMPK、PGC-1 α 进行分子对接和结合能力预测。人单核细胞(THP-1)添加佛波酯(PMA)诱导为 M0 巨噬细胞,使用脂多糖(LPS)联合干扰素- γ (IFN- γ)诱导为 M1 巨噬细胞,设为 Control 组;CHR 处理 M1 巨噬细胞设为 CHR 组;CHR 联合 AMPK 抑制剂(Compound C)处理 M1 巨噬细胞设为 CHR + Compound C 组。通过实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 M1 巨噬细胞标志物(iNOS、CD86)及线粒体生物合成相关基因(PGC-1 α 、NFR-1、TFAM)mRNA 表达水平;免疫荧光检测 M1 巨噬细胞标志物 iNOS 的表达水平;Western blot 检测 AMPK、p-AMPK、PGC-1 α 蛋白表达水平。结果 分子对接结果显示 CHR 与 AMPK、PGC-1 α 分子的结合能分别为 -8.4 kcal/mol、-7.4 kcal/mol。qRT-PCR 结果显示成功建立体外 M1 巨噬细胞模型。与 Control 组相比,CHR 处理导致线粒体生物合成相关基因 PGC-1 α 、NFR-1、TFAM mRNA 的表达显著升高($P < 0.001$);与 CHR 处理组相比,CHR 联合 Compound C 处理导致线粒体生物合成相关基因 PGC-1 α 、NFR-1、TFAM mRNA 表达水平显著降低($P < 0.05$)。免疫荧光结果显示,与 Control 组相比,CHR 处理抑制了 iNOS 的蛋白表达($P < 0.001$);与 CHR 处理组相比,CHR 联合 Compound C 处理逆转了 CHR 对 iNOS 蛋白表达的抑制作用($P < 0.05$)。Western blot 结果显示,与 Control 组相比,CHR 处理组 p-AMPK、PGC-1 α 蛋白表达水平显著升高($P < 0.001$);与 CHR 处理组相比,CHR 联合 Compound C 处理组 p-AMPK、PGC-1 α 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。结论 大黄酚可能通过激活 AMPK/PGC-1 α 信号通路促进线粒体生物合成抑制巨噬细胞向 M1 极化。

关键词 大黄酚;AMPK/PGC-1 α 信号通路;线粒体生物合成;巨噬细胞;极化

中图分类号 R 363.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)03-0488-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.03.014

大黄酚(chrysophanol,CHR)是中药大黄的有效成分,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等作用。Zhao et al^[1]研究发现,CHR 可以通过抑制炎症反应和细胞凋亡保护脓毒症急性心肌损伤;Wei et al^[3]进一步研究发现 CHR 能够通过抑制巨噬细胞向 M1 极化缓解脓毒症肺损伤^[2];课题组前期研究中,CHR 可以通过抑制巨噬细胞向 M1 极化保护脓毒症急性肾损伤,所以 CHR 的抗炎作用与其能够影响巨噬细胞极化有关。细胞代谢是巨噬细胞表型的重要决定因

素,线粒体作为细胞代谢的重要场所之一,对于调节巨噬细胞的极化至关重要。因此推测 CHR 可能通过线粒体影响巨噬细胞极化发挥抗炎作用。

线粒体生物合成是产生新的线粒体以维持细胞稳态的过程^[3]。腺苷酸活化蛋白激酶(Adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)和转录共激活因子(peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α , PGC-1 α),是线粒体生物合成的关键调节分子^[4],其可以协调转录机制以增加线粒体质量,从而适应增加的能量需求。AMPK 通过调控 PGC-1 α 使活化的 PGC-1 α 易位到细胞核中并激活线粒体核呼吸因子 1(nuclear respiratory factor-1, NFR-1),随后转录核编码的呼吸链成分和线粒体转录因子 A(mitochondrial transcription factor A, TFAM),从而促进线粒体生物合成维持线粒体稳态^[5]。该文旨在探究 CHR 是否通过 AMPK/PGC-1 α 通路促进线粒体生物合成影响巨噬细胞极

2024-11-07 接收

基金项目:新疆兵团指导性科技计划立项项目(编号:2022ZD073、2022ZD045)

作者简介:王乐乐,女,硕士研究生;

王新敏,男,教授,主任医师,研究生导师,通信作者, E-mail:1977602697@qq.com;

章乐,女,教授,研究生导师,通信作者, E-mail:1257067540@qq.com

化。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 人单核巨噬细胞系 THP-1, 购自于中国科学院上海生科院细胞资源中心; CHR (货号: B20238) 购自上海源叶生物科技有限公司; AMPK 抑制剂 (Compound C, 货号: HY-13418) 购自美国 MCE 公司; 脂多糖 (LPS, 货号: L2630) 购自美国 Sigma 公司; 佛波酯 (PMA) 和干扰素- γ (IFN- γ) (货号: P6741、P00028) 购自北京索莱宝科技有限公司; FITC 标记山羊抗兔 IgG (H + L) (货号: A0562) 购自江苏碧云天生物科技有限公司; AMPK 和 p-AMPK 抗体 (货号: WL02254、WL05103) 购自万类生物; PGC-1 α 抗体和 GAPDH 抗体 (货号: 66369-1-Ig、10494-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; iNOS、CD86、PGC-1 α 、NRF-1、TFAM 引物购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。酶标仪 (美国 Thermo 公司); 倒置显微镜 (日本 SANYO 公司); 转膜仪 (中国精密科学仪器有限公司); 凝胶成像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分子对接 采用分子对接技术预测 CHR 与 AMPK、PGC-1 α 之间的潜在相互作用, 使用 Autodock vina 软件进行模拟测试。AMPK 蛋白 (PDB 代码: 4cef) 的 X 射线晶体结构获自 RCSB 蛋白质数据库, PGC-1 α 蛋白 (AlphaFold 代码: Q9UBK2) 的 X 射线晶体结构获自 AlphaFold 蛋白质数据库。将 AMPK、PGC-1 α 蛋白晶体结构导入 Py-mol 软件中, 对蛋白结构进行去水, 将蛋白结构导入 Autodock tools 进行加氢处理, 然后利用该软件中的准备蛋白工具对蛋白进行处理。将 CHR 结构利用 Discovery studio 进行能量最小化处理, 使用 Autodock 软件进行分子对接研究。

1.2.2 THP-1 细胞的培养、诱导 细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 的完全培养基中培养, 将 THP-1 放入 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中培养, 细胞呈悬浮状态。按时给予细胞换液、传代。实验前首先使用终浓度 100 ng/mL 的 PMA 刺激 THP-1 细胞 24 h 贴壁, 诱导为 M0 巨噬细胞, 再向 M0 巨噬细胞的培养基中添加干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 20 ng/mL 和脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 100 ng/mL 继续刺激 48h, 诱导为 M1 巨噬细胞。

1.2.3 实验分组及处理 本研究分为 Control 组: 刺激 THP-1 细胞极化为 M1 巨噬细胞; CHR 组: 向

M1 巨噬细胞培养基中加入不含血清的 1640 培养基稀释的 10 μ mol/L 的 CHR 处理 24 h; CHR + Compound C 组: 用终浓度为 10 μ mol/L 的 AMPK 抑制剂 Compound C 对 M1 巨噬细胞预处理 2 h, 随后用不含血清的 1640 培养基稀释的 10 μ mol/L 的 CHR 处理 24 h。

1.2.4 qRT-PCR 检测 M1 型极化标志物及线粒体生物合成相关基因的表达 使用 RNA 提取试剂盒提取待测细胞中的总 RNA, 并根据反转录试剂盒说明书将其反转录为 cDNA。按照 SYBR Green PCR 试剂盒说明书在 PCR 仪上进行检测目的基因的 mRNA 表达量。反应条件: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火/延伸 20 s, 40 个循环周期。以 GAPDH 为内参, 按 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算分析目标基因 mRNA 的相对表达水平。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Tab. 1 qRT-PCR primers sequences

Gene	5'-3'
iNOS	F: TTCAGTATCACAACCTCAGCAAG R: TGGACCTGCAAGTAAATCC
CD86	F: CTGTCATCTATACACGGTTACC R: GGAACCTCGTACAGTCTGTG
PGC-1 α	F: TCTGAGTCTGTATGGAGTGACAT R: CCAAGTCGTTACATCTAGTTCA
NRF-1	F: AGGAACACGGAGTGACCCAA R: TATGCTCGGTGTAAGTAGCCA
TFAM	F: ATGGCGTTTCTCCGAAGCAT R: TCCGCCCTATAAGCATCTTGA
GAPDH	F: GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT R: GGCTGTTGCATACCTTCTCATGG

1.2.5 免疫荧光 将各组细胞接种于细胞爬片, 吸除培养基并用预冷的 PBS 洗涤。4% 的多聚甲醛固定细胞 30 min, 使用 0.2% Triton-100 通透 15 min, 随后用 5% 的 BSA 室温封闭 30 min, 在湿盒中 4 °C 孵育 iNOS 抗体过夜, 次日室温避光孵育荧光二抗 2 h, 上述步骤均使用 PBS 洗涤 3 次。加入抗荧光淬灭封片剂, 在荧光显微镜上观察并采图。

1.2.6 Western blot 离心收集各组细胞, 使用配置好的 RIPA 蛋白裂解液进行处理并收集入 EP 管中, 将 EP 管放入 4 °C 离心机 12 000 r/min, 离心 15 min。使用紫外分光光度计检测蛋白样本浓度。蛋白变性后, SDS-PAGE 对蛋白样本进行电泳、电转、封闭, 一抗孵育过夜。次日室温孵育抗兔、抗鼠二抗, 洗膜后使用 ECL 化学发光液显影。使用 ImageJ 软件, 以 GAPDH 为内参进行目的蛋白的半定量分

析。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 20.0 进行统计学分析,以 $\bar{x} \pm s$ 记录数据,两组之间的比较采用 t 检验,多组之间的比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CHR 与 AMPK、PGC-1 α 的对接分析 通过

分子对接技术预测 CHR 与 AMPK (PDB 代码: 4cef)、PGC-1 α (AlphaFold 代码: Q9UBK2) 之间的潜在相互作用。对接结果显示,CHR 与 AMPK 蛋白之间的结合能为 -8.4 kcal/mol,与 PGC-1 α 蛋白之间的结合能为 -7.4 kcal/mol,通常如果配体与靶蛋白的结合能小于 -5 时配体和受体蛋白可以稳定结合。见图 1。以上结果表明,CHR 与 AMPK、PGC-1 α 蛋白可以稳定结合。

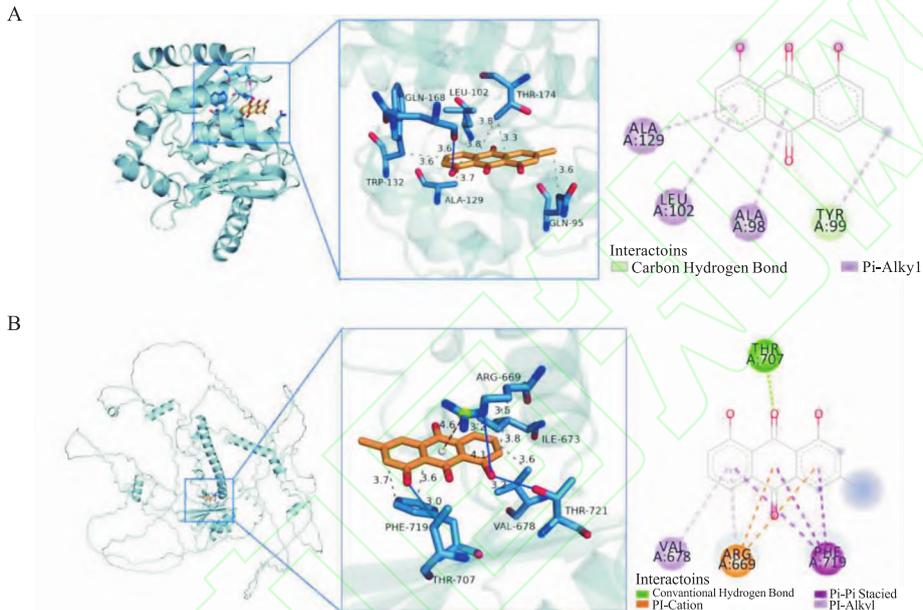


图 1 CHR 与 AMPK、PGC-1 α 分子对接

Fig. 1 CHR was docked with AMPK and PGC-1 α molecules

A: CHR docking with AMPK; B: CHR docking to PGC-1 α ; Blue ribbons were protein molecules; Yellow was CHR; The blue bars represented the interacting amino acids; The binding energy was negative, and the larger the absolute value of the negative value, the larger the binding energy

2.2 M1 巨噬细胞模型的构建及鉴定 以 GAPDH 为内参,qRT-PCR 结果显示,与 M0 巨噬细胞相比,M1 巨噬细胞 iNOS ($t = 6.691, P < 0.001$)、CD86 ($t = 5.218, P < 0.001$) 的 mRNA 水平显著升高。见图 2。以上结果表明,M1 巨噬细胞模型构建成功。

2.3 大黄酚对线粒体生物合成相关基因 mRNA 表达的影响 以 GAPDH 为内参,qRT-PCR 结果显示,与 Control 组相比,CHR 组细胞 PGC-1 α 、NFR-1、TFAM 的 mRNA 水平显著升高 ($t = 6.012, P < 0.001$; $t = 11.16, P < 0.001$; $t = 7.688, P < 0.001$),与 CHR 组相比,CHR + Compound C 组细胞 PGC-1 α 、NRF1、TFAM mRNA 水平显著降低 ($t = 3.213, P < 0.05$; $t = 6.281, P < 0.001$; $t = 3.093, P < 0.05$)。见图 3。以上结果表明,CHR 可以促进线粒体生物合成,Compound C 抑制了线粒体生物合成。

2.4 各组细胞 iNOS 的表达 与 Control 组相比,

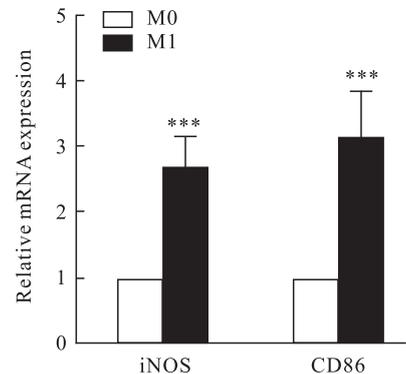


图 2 M1 巨噬细胞极化标志物的水平

Fig. 2 The level of M1 macrophages polarization markers

*** $P < 0.001$ vs M0 macrophages.

CHR 组细胞 iNOS 表达显著降低 ($t = 13.84, P < 0.001$),与 CHR 组相比,CHR + Compound C 组细胞

iNOS 表达显著升高 ($t = 3.498, P < 0.05$)。见图 4。以上结果表明,CHR 可以抑制巨噬细胞向 M1 极化。

2.5 Western blot 法检测各组细胞 AMPK、PGC-1 α 的蛋白表达水平 与 Control 组相比,CHR 组细胞 p-AMPK 及 PGC-1 α 蛋白表达显著增加 ($t = 11.55, P < 0.001; t = 10.06, P < 0.001$),与 CHR 组相比,CHR + Compound C 组细胞 p-AMPK 及 PGC-1 α 蛋白表达显著降低 ($t = 3.166, P < 0.05; t = 6.655, P < 0.01$)。见图 5。

3 讨论

巨噬细胞是先天免疫系统的主要细胞类型之

一,参与许多炎症性疾病的发生发展。包括自身免疫性疾病(类风湿性关节炎、克罗恩病、炎症性肠病等),慢性炎症(哮喘、动脉粥样硬化等)以及急性炎症(脓毒症、急性胰腺炎等)等^[6]。巨噬细胞具有高度的异质性,其在不同的环境下可以极化为不同的表型,目前关注最广泛的是 M1 和 M2 两种亚型,M1 巨噬细胞主要通过分泌一系列炎症因子来促进炎症反应,M2 巨噬细胞通过分泌一系列抗炎因子抑制炎症反应,并促进组织修复^[7]。因此靶向巨噬细胞极化可能是治疗炎症性疾病的关键。细胞代谢是巨噬细胞表型的重要决定因素,线粒体作为细胞代谢的重要场所之一,对于调节巨噬细胞的极化至关重要。

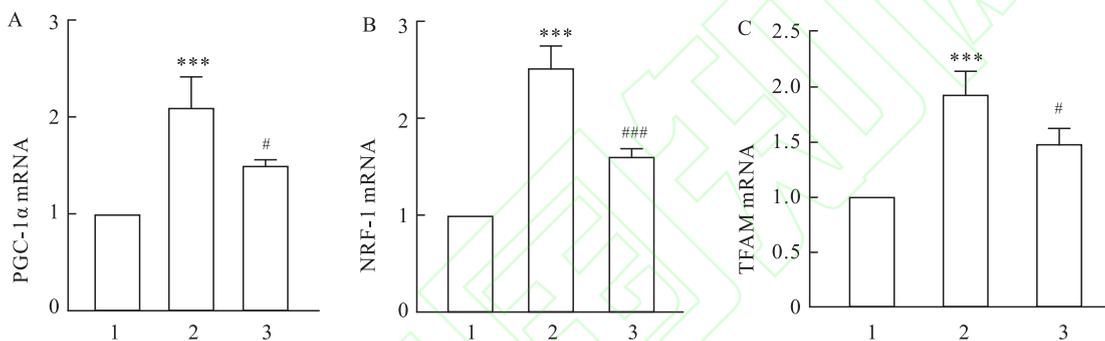


图 3 线粒体相关基因 mRNA 的表达水平

Fig. 3 mRNA expression levels of mitochondrial related genes

A: Relative expression level of PGC-1 α mRNA; B: Relative expression level of NRF-1 mRNA; C: Relative expression level of TFAM mRNA; 1: Control group; 2: CHR group; 3: CHR + Compound C group; Compared with Control group: *** $P < 0.001$ vs Control group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs CHR group

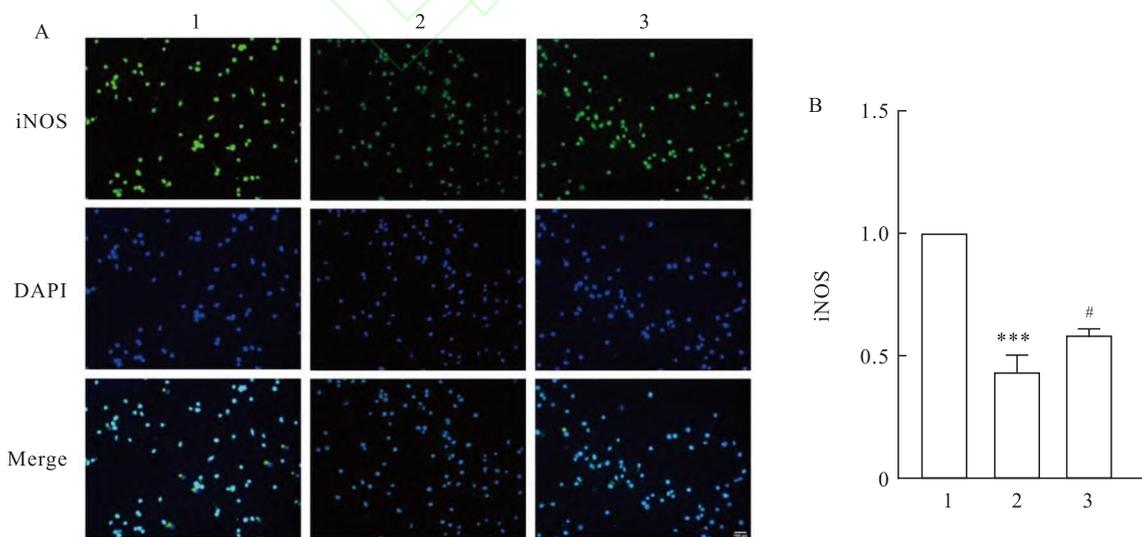


图 4 各组细胞 iNOS 的表达 $\times 200$

Fig. 4 Expression of iNOS in each group $\times 200$

A: Fluorescent expression of iNOS in different groups; B: Relative levels of iNOS fluorescence intensity; 1: Control group; 2: CHR group; 3: CHR + Compound C group; *** $P < 0.001$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs CHR group.

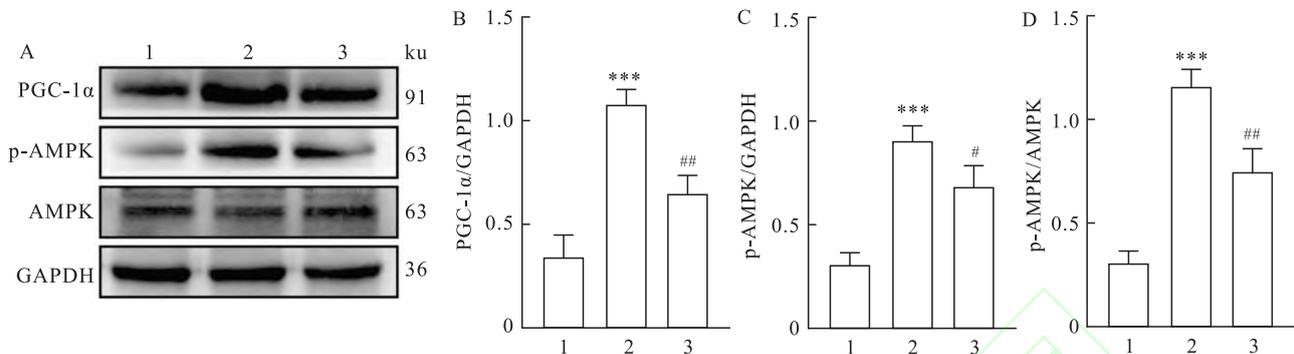


图5 p-AMPK、AMPK 及 PGC-1 α 蛋白的相对表达

Fig. 5 Relative expression of p-AMPK, AMPK and PGC-1 α proteins

A: The protein expression of p-AMPK, AMPK and PGC-1 α ; B: Ratio of PGC-1 α to GAPDH; C: Ratio of p-AMPK to GAPDH; D: Ratio of p-AMPK to AMPK; 1: Control group; 2: CHR group; 3: CHR + Compound C group; *** $P < 0.001$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs CHR group.

越来越多的证据表明,线粒体代谢通过影响信号转导、染色质调控和转录调控来影响巨噬细胞极化并调节免疫反应^[8]。Zhang et al^[9]发现敲除 Prdx1 能够通过损伤巨噬细胞线粒体来降低其氧化磷酸化功能,而促进巨噬细胞向 M1 极化,抑制其向 M2 极化; Dong et al^[10]阐述了在慢性肺部疾病中线粒体功能障碍在巨噬细胞表型及功能中的作用。本研究结果显示,与对照组相比,CHR 处理组细胞线粒体生物合成相关转录因子 PGC-1 α 、NRF-1、TFAM 表达增加,并且 M1 极化标志物 (iNOS) 表达显著降低。以上结果说明 CHR 可能通过促进线粒体生物合成抑制巨噬细胞向 M1 极化。

AMPK 作为代谢控制中心^[11],在调节巨噬细胞代谢、线粒体稳态以及维持免疫活性中起着至关重要的作用。AMPK 通过上调 PGC-1 α 的表达,作用于 NRF-1 和 TFAM 等转录因子,介导线粒体生物合成,促进巨噬细胞向 M2 极化^[12]。有研究^[13]发现,二甲双胍可以通过激活 AMPK 改善线粒体损伤减轻心肌细胞凋亡而保护脓毒症心肌损伤; β -羟基异戊酰紫草素可以通过激活 AMPK 调节巨噬细胞极化^[14]; TH2 型细胞因子 IL-25 可以通过激活 AMPK 来诱导线粒体自噬刺激巨噬细胞向 M2 型极化^[15]; 所以 AMPK/PGC-1 α 信号通路不仅是线粒体的核心通路而且是影响巨噬细胞极化的重要信号通路。本研究通过分子对接技术预测 CHR 与 AMPK、PGC-1 α 之间的结合能力,发现 CHR 与 AMPK、PGC-1 α 蛋白可以稳定结合,说明 CHR 可能通过 AMPK/PGC-1 α 信号通路发挥作用。实验结果显示,与 CHR 处理组相比,Compound C 能拮抗 CHR 对线粒体生物合成的促进作用及对 M1 极化的抑制作用,

说明 CHR 通过激活 AMPK 促进线粒体生物合成抑制巨噬细胞向 M1 极化,Western blot 结果与分子对接的结果一致。本研究证实 CHR 通过激活 AMPK/PGC-1 α 通路促进线粒体生物合成抑制巨噬细胞向 M1 型极化,但并未深入探索 CHR 如何调控 AMPK 的机制,在后续实验过程中将继续相关研究。

参考文献

- [1] Zhao H, Wang Y, Zhu X. Chrysophanol exerts a protective effect against sepsis-induced acute myocardial injury through modulating the microRNA-27b-3p/Peroxisomal proliferating-activated receptor gamma axis[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(5): 12673 - 90. doi: 10.1080/21655979.2022.2063560.
- [2] 魏攀,郭晋祥,于德意,等. 大黄酚促进巨噬细胞 M2 型极化缓解脓毒症大鼠肺损伤[J]. *免疫学杂志*, 2020, 36(9): 748 - 55. doi: 10.13431/j.cnki.immunol.j.20200117. Wei P, Guo J X, Yu D, et al. Chrysophanol promotes macrophage M2 polarization and alleviates lung injury in septic rats [J]. *Immunological Journal*, 2020, 36(9): 748 - 55. doi: 10.13431/j.cnki.immunol.j.20200117.
- [3] Zhao T, Zhang J, Lei H, et al. NRF1 - mediated mitochondrial biogenesis antagonizes innate antiviral immunity[J]. *EMBO J*, 2023, 42(16): e113258. doi: 10.15252/embj.2022113258.
- [4] Shi W, An L, Zhang J, et al. Periplaneta americana extract ameliorates lipopolysaccharide induced liver injury by improving mitochondrial dysfunction via the AMPK/PGC-1 α signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(4): 1138. doi: 10.3892/etm.2021.10572.
- [5] Yuan Y, Tian Y, Jiang H, et al. Mechanism of PGC-1 α -mediated mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia - reperfusion injury [J]. *Front Mol Neurosci*, 2023, 16: 1224964. doi: 10.3389/fnmol.2023.1224964.
- [6] Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity [J]. *Annu Rev Pathol*,

- 2020, 15: 123 – 47. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718.
- [7] Wang Z, Wang Z. The role of macrophages polarization in sepsis-induced acute lung injury [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1209438. doi: 10.3389/fimmu.2023.1209438.
- [8] Wang Y, Li N, Zhang X, et al. Mitochondrial metabolism regulates macrophage biology [J]. *J Biol Chem*, 2021, 297(1): 100904. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100904.
- [9] 张翔, 张子悦, 祁一鸣, 等. Prdx1 通过维持线粒体稳态调节巨噬细胞的极化[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(5): 1509 – 22. doi: 10.13345/j. ejb.230667.
- Zhang X, Zhang Z Y, Qi Y, et al. Prdx1 regulates macrophage polarization by maintaining mitochondrial homeostasis[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(5): 1509 – 22. doi: 10.13345/j. ejb.230667.
- [10] Dong T, Chen X, Xu H, et al. Mitochondrial metabolism mediated macrophage polarization in chronic lung diseases[J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 239: 108208. doi: 10.1016/j. pharmthera.2022.108208.
- [11] Trefts E, Shaw R J. AMPK: restoring metabolic homeostasis over space and time[J]. *Mol Cell*, 2021, 81(18): 3677 – 90. doi: 10.1016/j. molcel.2021.08.015.
- [12] Popov L D. Mitochondrial biogenesis: An update[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(9): 4892 – 9. doi: 10.1111/jcmm.15194.
- [13] 田勇, 周颖, 古雍翔, 等. 二甲双胍诱导心肌细胞自噬对脓毒症小鼠心肌损伤的保护机制[J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(1): 92 – 8. doi: 10.19405/j. cnki. issn1000-1492.2024.01.015.
- Tian Y, Zhou Y, Gu Y X, et al. Protective mechanism of metformin-induced cardiomyocyte autophagy against myocardial injury in septic mice[J]. *Journal of Anhui Medical University*, 2024, 59(1): 92 – 8. doi: 10.19405/j. cnki. issn1000-1492.2024.01.015.
- [14] Pan T, Chang Y, He M, et al. β -Hydroxyisovalerylshikonin regulates macrophage polarization via the AMPK/Nrf2 pathway and ameliorates sepsis in mice[J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 729 – 42. doi: 10.1080/13880209.2022.2046111.
- [15] Tsai M L, Tsai Y G, Lin Y C, et al. IL-25 induced ROS-mediated M2 macrophage polarization via AMPK-associated mitophagy [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 3. doi: 10.3390/ijms23010003.

Chrysophanol affects macrophage polarization by promoting mitochondrial biosynthesis through AMPK/PGC-1 α pathway

Wang Lele^{1,3}, Tan Caixia^{1,3}, Zhang Wei^{1,3}, Ge Ruihan^{1,3}, Li Chen^{1,3}, Wang Xinmin^{2,4}, Zhang Le^{1,3,4}

(¹Medical College, Shihezi University, Shihezi 832002; ²The First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi 832003; ³Xinjiang Provincial and Ethnic High Incidence

Key Laboratory of Ministry of Education, Shihezi 832002; ⁴State Key Laboratory of Pathogenesis, Prevention and Treatment of High Incidence Diseases in Central Asia, Shihezi 832000)

Abstract Objective To explore whether chrysophanol (CHR) affects macrophage polarization by promoting mitochondrial biosynthesis through AMPK/PGC-1 α pathway. **Methods** The molecular docking and binding ability of CHR with AMPK and PGC-1 α were predicted by Autodock vina software. Human monocytes (THP-1) were induced to M0 macrophages by phorbol myristate acetate (PMA), and to M1 macrophages by lipopolysaccharide (LPS) combined with interferon- γ (IFN- γ), which were set as Control group. M1 macrophages treated with CHR were set as CHR group. M1 macrophages treated with CHR combined with AMPK inhibitor (Compound C) were set as CHR + Compound C group. The mRNA expression levels of M1 macrophage markers (iNOS, CD86) and mitochondrial biosynthesis related genes (PGC-1 α , NFR-1, TFAM) were detected by Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The expression level of M1 macrophage marker iNOS was detected by immunofluorescence. The protein expression levels of AMPK, p-AMPK and PGC-1 α were detected by Western blot. **Results** The docking results showed that the binding energies of CHR with AMPK and PGC-1 α were -8.4 kcal/mol and -7.4 kcal/mol, respectively. qRT-PCR results showed that the in vitro model of M1 macrophages was successfully established. Compared with the Control group, CHR treatment significantly increased the mRNA expression of mitochondrial biosynthesis-related genes PGC-1 α , NFR-1, and TFAM ($P < 0.001$). Compared with CHR treatment group, CHR combined with Compound C treatment significantly decreased the mRNA expression levels of mitochondrial biosynthesis-related genes PGC-1 α , NFR-1, and TFAM ($P < 0.05$). Immunofluorescence results showed that CHR treatment inhibited the protein expression of iNOS compared with the Control group ($P < 0.001$). Compared

支链氨基酸通过 Stat3 通路双向调控 3T3-L1 前脂肪细胞分化

蔡兴华^{1,2},高洁³,徐媛颖³,张会会³,买热艳木·肉孜³,沙雯君³,鲁郡^{1,2,3},雷涛^{1,2,3}

(¹ 安徽医科大学上海普陀中心临床学院,上海 200062;² 安徽医科大学第五临床医学院,合肥 230032;
³ 上海中医药大学附属普陀医院内分泌科,上海 200062)

摘要 目的 探讨不同浓度支链氨基酸(BCAA)对3T3-L1前体脂肪细胞分化的作用及其机制。方法 将3T3-L1前体脂肪细胞分为空白对照(Control)组、分化介质(DM)组、低浓度BCAA组和高浓度BCAA组;CCK-8法检测不同浓度BCAA对前脂肪细胞存活率的影响;油红O染色观察各组脂肪细胞脂滴形成情况;酶法检测细胞内三酰甘油(TG)和总胆固醇(TC)含量;RT-qPCR和Western blot检测Stat3和脂肪细胞分化相关基因mRNA和蛋白表达情况。结果 CCK-8结果显示,当BCAA浓度 ≤ 10 mmol/L时,3T3-L1细胞的存活率不受BCAA的影响。与DM组相比,低浓度BCAA组(0.5、1.0 mmol/L)细胞内脂滴明显增大、脂滴数目明显增加,且细胞内TC(0.88 vs 0.68 mmol/g; 0.83 vs 0.68 mmol/g, $P < 0.01$)和TG水平(0.77 vs 0.40 mmol/g; 0.62 vs 0.40 mmol/g, $P < 0.01$)明显上升;而高浓度BCAA组(5.0、10 mmol/L)细胞分化较DM组明显下降。RT-qPCR和Western blot检测显示低浓度BCAA组PPAR γ 、C/EBP α 、Adiponectin、FABP4的mRNA和蛋白表达均明显上升,而高浓度BCAA组上述基因表达均明显下降($P < 0.01$)。此外,低浓度BCAA促进Stat3磷酸化水平,而高浓度BCAA抑制其磷酸化水平($P < 0.01$)。结论 BCAA通过Stat3双向调控前脂肪细胞脂肪分化,即低浓度BCAA可通过促进Stat3磷酸化水平诱导其向成熟脂肪细胞分化;而高浓度BCAA则抑制Stat3磷酸化及细胞分化。

关键词 BCAA;3T3-L1;脂肪细胞分化;Stat3;脂肪生成;肥胖

中图分类号 R 589.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)03-0494-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.03.015

2024-08-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81774083);上海市普陀区卫生健康系统临床特色专科建设项目(编号:2020tszk01);上海市卫生健康委员会课题(编号:202240309);上海市普陀区卫生健康系统科技创新项目(编号:ptkwws202003、ptkwws202302)

作者简介:蔡兴华,女,硕士研究生;

雷涛,男,博士,主任医师,博士生导师,通信作者,E-mail:taolei_12@sina.com;

鲁郡,男,博士,副主任医师,硕士生导师,通信作者,E-mail:lujundocor@163.com

目前肥胖呈流行趋势,据报道,我国约20%的儿童和50%的成年人超重或肥胖^[1]。肥胖可引起多种疾病的发生和发展,如2型糖尿病、冠心病以及部分肿瘤。在细胞水平上,肥胖是由脂肪细胞数量和体积增加而引起的一种临床综合征。而3T3-L1作为一种前体脂肪细胞系,被广泛用于基础和临床研究。近年来,研究提示支链氨基酸(branched-chain amino acid, BCAA)具有调控脂肪细胞分化的作用。BCAA是人体必需氨基酸,包括亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸。目前关于BCAA对脂肪细胞分化的

with CHR treatment group, CHR combined with Compound C treatment reversed the inhibitory effect of CHR on iNOS protein expression ($P < 0.05$). Western blot results showed that compared with the Control group, the CHR treatment group had significant increase in the protein expression levels of p-AMPK and PGC-1 α ($P < 0.001$). Compared with CHR treatment group, CHR combined with Compound C treatment significantly decreased the protein expression levels of p-AMPK and PGC-1 α ($P < 0.05$). **Conclusion** Chrysophanol may inhibit macrophage polarization to M1 by activating AMPK/PGC-1 α signaling pathway to promote mitochondrial biosynthesis.

Key words chrysophanol;AMPK/PGC-1 α signaling pathway;mitochondrial biosynthesis;macrophages;polarization

Fund program Instructive Scientific and Technological Project of Xinjiang Production and Construction Corps (Nos. 2022ZD073, 2022ZD045)

Corresponding authors Wang Xinmin, E-mail:1977602697@qq.com; Zhang Yue, E-mail: 1257067540@qq.com