

芍药苷对糖尿病周围神经病变状态下线粒体输入途径蛋白 TOM20 的作用

刘东齐¹, 闫仕祺¹, 刘浩龙², 杨鑫伟^{1*}

1. 首都医科大学中医药学院, 中医络病研究北京市重点实验室, 北京 100069

2. 首都医科大学附属北京朝阳医院, 北京 100020

摘要: **目的** 探究芍药苷对糖尿病周围神经病变 (diabetic peripheral neuropathy, DPN) 大鼠坐骨神经和高糖环境下雪旺细胞 (Schwann cells, SCs) 线粒体输入途径蛋白线粒体外膜转位酶 20 (translocase of outer mitochondrial membrane 20, TOM20) 的影响。**方法** 以 25、100、150 mmol/L 葡萄糖分别干预 RSC96 雪旺细胞株 12、24、48 h, 用高内涵分析法检测 TOM20 和线粒体硫氧还蛋白 2 (mitochondrial thioredoxin 2, Trx2) 的表达; 设置对照组 (给予 25 mmol/L 葡萄糖)、TOM20 siRNA 组、TOM20 siRNA+芍药苷 24 h 组和 TOM20 siRNA+芍药苷 48 h 组, 转染 TOM20 siRNA 后给予 10 mmol/L 芍药苷分别干预 24、48 h, 利用 Western blotting 检测 TOM20 和 Trx2 蛋白表达; 设置对照组 (给予 25 mmol/L 葡萄糖)、高糖组 (给予 150 mmol/L 葡萄糖) 和芍药苷组 (给予 150 mmol/L 葡萄糖和 10 mmol/L 芍药苷), 利用高内涵分析法检测 TOM20 和 Trx2 蛋白表达。制备 DPN 大鼠模型, 给予白芍总苷后, 利用免疫荧光法检测大鼠坐骨神经中 TOM20 和 Trx2 蛋白表达。**结果** 高内涵分析结果显示, 150 mmol/L 葡萄糖干预 12、24 h 后, TOM20 和 Trx2 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), 且 2 种蛋白的表达变化存在相关性。与对照组比较, 高糖组 TOM20 和 Trx2 蛋白表达均显著降低 ($P<0.01$); 与高糖组比较, 芍药苷组 TOM20 和 Trx2 蛋白表达均显著升高 ($P<0.01$)。Western blotting 结果显示, 与对照组比较, TOM20 siRNA 组 TOM20 和 Trx2 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01); 与 TOM20 siRNA 组比较, 芍药苷干预 24、48 h 后 TOM20 和 Trx2 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。与对照组比较, 模型组大鼠坐骨神经中 TOM20 和 Trx2 蛋白表达均显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 白芍总苷组 TOM20 和 Trx2 蛋白表达均显著升高 ($P<0.01$)。**结论** 芍药苷能够通过上调 SCs 以及大鼠坐骨神经中 TOM20 蛋白的表达, 促进 Trx2 蛋白的线粒体输入, 从而有效对抗线粒体氧化应激干预 DPN。

关键词: 芍药苷; 雪旺细胞; 糖尿病周围神经病变; 线粒体膜外转位酶 20; 线粒体硫氧还蛋白

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)09-2987-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.09.013

Effect of paeoniflorin on TOM20 of mitochondrial import pathway in diabetic peripheral neuropathy

LIU Dongqi¹, YAN Shiqi¹, LIU Haolong², YANG Xinwei¹

1. Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Research on Collaterals, School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

2. Beijing Chao-Yang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of paeoniflorin (PF) on the protein involved in mitochondrial import pathway mitochondrial translocase of outer mitochondrial membrane 20 (TOM20) in the sciatic nerve of diabetic peripheral neuropathy (DPN) rats and high glucose environment of Schwann cells (SCs). **Methods** RSC96 cells was used to intervene with 25, 100 and 150 mmol/L glucose for 12, 24 and 48 h, respectively, and the expressions of TOM20 and mitochondrial thioredoxin 2 (Trx2) were detected by high content analysis; Control group (25 mmol/L glucose), TOM20 siRNA group, TOM20 siRNA + paeoniflorin 24 h group, and TOM20 siRNA + paeoniflorin 48 h group were set up. After transfection with TOM20 siRNA, 10 mmol/L paeoniflorin was given for 24, 48 h, respectively, Western blotting was used to detect TOM20 and Trx2 protein expressions; Control group (25 mmol/L glucose), high

收稿日期: 2023-11-18

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82174184); 北京市教育委员会科技计划一般项目 (KM202210025021); 北京市科学技术协会青年人才托举工程 (BYESS2023386); 国家自然科学基金青年项目 (82204826)。

作者简介: 刘东齐 (2001—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药防治糖尿病周围神经病变的机制研究。E-mail: 15801564517@163.com

*通信作者: 杨鑫伟 (1989—), 女, 副教授, 硕士生导师, 从事中药及复方药效和作用机制研究。E-mail: yxw0226@ccmu.edu.cn

glucose group (150 mmol/L glucose), and paeoniflorin group (150 mmol/L glucose + 10 mmol/L paeoniflorin) were set up, high connotation analysis was used to detect TOM20 and Trx2 protein expressions. DPN rat model was prepared and given total glucosides of paeony, immunofluorescence was used to detect TOM20 and Trx2 protein expressions in sciatic nerve of rats. **Results** The results of high content analysis showed that after 12, 24 h of 150 mmol/L glucose intervention, TOM20 and Trx2 protein expressions were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), and there was a correlation between the expressions of the two proteins. Compared with control group, TOM20 and Trx2 protein expressions in high glucose group were significantly decreased ($P < 0.01$); Compared with high glucose group, TOM20 and Trx2 protein expressions in paeoniflorin group were significantly increased ($P < 0.01$). The results of Western blotting showed that compared with control group, TOM20 and Trx2 protein expressions in TOM20 siRNA group were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$); Compared with TOM20 siRNA group, TOM20 and Trx2 protein expressions were significantly increased after intervention with paeoniflorin for 24, 48 h ($P < 0.05, 0.01$). Compared with control group, TOM20 and Trx2 protein expressions were significantly decreased in sciatic nerve of rats in model group ($P < 0.01$); Compared with model group, TOM20 and Trx2 protein expressions were significantly increased in total glucosides of paeony group ($P < 0.01$). **Conclusion** Paeoniflorin can effectively counteract mitochondrial oxidative stress by up-regulating the expression of TOM20 protein in SCs as well as rat sciatic nerve and promoting the mitochondrial input of Trx2, which has therapeutic potential for the treatment of DPN.

Key words: paeoniflorin; Schwann cells; diabetic peripheral neuropathy; translocase of outer mitochondrial membrane 20; mitochondrial thioredoxin

根据国际糖尿病联盟的最新数据显示, 目前全球有 5.37 亿成人患有糖尿病, 其中至少 50% 的患者会发展为糖尿病周围神经病变 (diabetic peripheral neuropathy, DPN)^[1]。DPN 患者表现为神经性疼痛、肢体感觉丧失以及足溃疡和下肢截肢的风险增加, 但目前临床上仍缺少针对 DPN 发病机制的有效疗法^[2]。现今使用的主流抗氧化应激药物 α -硫辛酸虽具有较好的疗效, 但有可能提高 2 型糖尿病患者细胞对胰岛素的敏感度, 导致患者的血糖过低^[3]。故而阐明 DPN 的发病机制, 寻找更为有效的治疗药物是目前亟待解决的问题。

脱髓鞘是 DPN 的主要病理改变之一, 而雪旺细胞 (Schwann cells, SCs) 作为周围神经系统髓鞘形成细胞, 在维持周围神经结构和功能方面发挥至关重要的作用^[4-5]。现代研究认为, 氧化应激所引起的 SCs 线粒体功能障碍是 DPN 的主要发病机制之一^[6-7]。线粒体蛋白由 99% 的核编码蛋白和 1% 的线粒体编码蛋白组成。其中线粒体基因组编码内膜氧化磷酸化机制的几个疏水核心亚基, 而核编码蛋白则面向所有 4 个线粒体亚室 (外膜、膜间空间、内膜和基质)。大多数核编码的线粒体前蛋白是通过氨基末端前序定向途径这一线粒体蛋白输入机制进入线粒体。前体蛋白在 N 端导向序列线粒体靶向信号肽的作用下, 依次通过线粒体外膜转位酶 (translocase of outer mitochondrial membrane, TOM) 复合物和线粒体内膜转位酶 (translocase of inner mitochondrial membrane, TIM) 复合物转运至线粒体基质。其中,

定位于线粒体外膜的 TOM20, 被认为是线粒体蛋白输入的启动子^[8-10]。线粒体硫氧还蛋白 2 (mitochondrial thioredoxin 2, Trx2) 在抗氧化应激和维持线粒体功能方面发挥重要作用。Trx2 是一种小分子 (相对分子质量约 1.2×10^4) 的氧化还原蛋白, 能够直接清除线粒体中的活性氧 (reactive oxygen species, ROS)。同时, Trx2 的线粒体相互作用网络 (目前已鉴定出 53 个蛋白) 参与线粒体完整性、线粒体内蛋白质合成与折叠、氨基酸和脂质代谢、糖酵解、三羧酸循环和氧化磷酸化等^[11]。而线粒体中的 Trx2 蛋白依赖于 TOM20 介导的线粒体蛋白输入机制转运至线粒体基质, 而后通过线粒体蛋白加工发挥抗氧化应激等功能^[12-14]。

课题组前期研究证实, 芍药苷能够通过上调核因子 E2 相关因子 2 的核转位, 增加血红素氧合酶 1、 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶表达, 从而降低高糖环境下 SCs 氧化应激, 纠正线粒体动力学失衡, 升高 SCs 线粒体膜电位, 通过改善线粒体结构和功能发挥抗细胞凋亡作用^[15-16]。进一步研究发现, 芍药苷及白芍总苷 (芍药苷质量分数 $> 90\%$) 能够增加 DPN 大鼠坐骨神经和高糖环境下 SCs 中成熟型 Trx2 和前体 Trx2 的表达, 直接或间接降低氧化应激, 改善线粒体功能, 降低坐骨神经脱髓鞘, 改善大鼠的神经传导速度, 干预 DPN^[17]。现代药理学研究表明, 芍药苷具有抗炎、抗氧化、止痛、促进 SCs 增殖以改善周围神经功能等作用, 具有治疗 DPN 的潜力, 但其作用机制尚未阐明^[18-19]。课题组通过 SCs 线粒

体的 4D-label free 蛋白组学筛选发现,在高糖环境下 TOM20 表达降低。本研究重点探究芍药苷是否通过 TOM20 依赖的线粒体输入途径介导 Trx2 的线粒体输入和加工,从而发挥改善线粒体功能而干预 DPN。

1 材料

1.1 动物和细胞

SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 180~220 g,8 周龄,购自维通利华动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2021-0003,饲养于首都医科大学实验动物中心国家标准实验室[SYXK(京)2019-00207]。动物实验经首都医科大学伦理委员会批准(批准号 AEEI-2022-191)。

RSC96 细胞株(货号 CL-0199)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药品与试剂

芍药苷(批号 B21148,质量分数 $\geq 98\%$)购自上海源叶生物科技有限公司;白芍总苷胶囊(国药准字 H20055058,批号 210609)购自宁波立华制药有限公司;链脲佐菌素(streptozotocin, STZ,批号 242-648-8,质量分数 $>98\%$)购自北京克尔慧科技有限公司;TOM20 siRNA(批号 P202302230043)购自广州锐博生物技术有限公司;*D*-葡萄糖(批号 G8270)、DAPI(批号 D9542)购自美国 Sigma 公司;DMEM 高糖培养基(批号 PM150210)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;澳洲胎牛血清(批号 10099-141)购自美国 Gibco 公司;0.25%胰酶(批号 T1360)、青链霉素混合液(批号 P1400)、PBS 缓冲液(批号 P1020-500)、高效 RIPA 组织/细胞快速裂解液(批号 R0010)、PMSF(批号 R0100)、蛋白上样缓冲液(含 DTT,批号 P1015)、封闭用驴血清(批号 SL050)、抗荧光衰减封片剂(含 DAPI,批号 S2110)购自北京索莱宝科技有限公司;Triton[®] X-100(批号 0694-100 mL)、牛血清白蛋白(批号 0332-100G)购自美国 Amresco 公司;重组 TOM20 抗体(批号 ab186735)、重组 Trx2 抗体(批号 ab185544)、Alexa Fluor[®] 488 标记的猴抗兔 IgG 二抗(批号 150061)、Alexa Fluor[®] 594 标记的猴抗小鼠 IgG 二抗(批号 150108)购自英国 Abcam 公司;S-100 β 多克隆抗体(批号 15146-1-AP)、FlexAble CoraLite[®] Plus 488 兔 IgG 抗体标记试剂盒(批号 KFA001)、FlexAble CoraLite[®] Plus 555 兔 IgG 抗体标记试剂盒(批号 KFA002)、FlexAble CoraLite[®] Plus 647 兔 IgG

抗体标记试剂盒(批号 KFA003)购自美国 Proteintech 公司;蛋白酶抑制剂(批号 4693116001)、磷酸酶抑制剂(批号 4906845001)购自瑞士 Roche 公司;SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(批号 P0012A)、SDS(批号 ST627)购自 Beyotime 公司;Tris(批号 1115GR500)、甘氨酸(批号 1275GR500)购自 BioFroxx 公司;脱脂奶粉(批号 232100)购自美国 BD 公司;三色预染蛋白标准品(批号 A3A2362)购自艾科瑞生物公司;超敏发光液(批号 WBKLS0100)购自美国 Millipore 公司;异氟烷(批号 2022101601)购自瑞沃德生命科技有限公司。

1.3 仪器

DV215CD 型电子天平(美国 OHAUS 公司);AC2-4E1 型二级生物安全柜(新加坡 ESCO 公司);INC153 型二氧化碳培养箱(德国 Memmert 公司);PowerPac[™]基础电泳仪电源、Mini-PROTEAN[®] Tetra 电泳槽、Trans-Blot[®]转印槽(美国 Bio-Rad 公司);FUSION FX 凝胶&化学发光成像分析系统(法国 Vilber 公司);ULT-2186-4-V49 型超低温冰箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);3K15 型低温离心机(美国 Sigma 公司);Eppendorf ThermoMixer[®] C 恒温混匀仪(德国 Eppendorf 公司);Allegra X-30 型冷冻离心机(美国 Beckman 公司);TE300 型倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);DHG-9245A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海恒一精密仪器有限公司);Opera Phenix Plus 高内涵筛选系统(美国 PerkinElmer 公司);Matrx VIP 3000[®] Veterinary Vaporizer 气体麻醉机(美国 Midmark 公司)。

2 方法

2.1 体外实验

2.1.1 细胞培养 RSC96 细胞用 DMEM 完全培养基,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养。

2.1.2 高内涵分析 取对数生长期的 RSC96 细胞,制备成细胞悬液。用 DMEM 完全培养基将细胞密度调整至 4×10^4 个/mL,按 100 μL /孔接种于 96 孔板中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。吸弃培养基,加入不同浓度(25、100、150 mmol/L)葡萄糖分别干预 12、24、48 h。

另取接种 RSC96 细胞的 96 孔板,设置对照组、高糖组和芍药苷组,对照组加入 25 mmol/L 葡萄糖干预 24 h,高糖组和芍药苷组加入 150 mmol/L 葡萄糖干预 24 h,芍药苷组同时加入 10 mmol/L 芍药苷干预 24 h。

吸弃培养基, 加入 4%多聚甲醛室温固定并用 PBS 缓冲液浸洗细胞。0.1% Triton-X 100/PBS 冰浴上透膜, PBS 缓冲液浸洗细胞。加入 3%牛血清白蛋白/PBS 封闭, 分别滴加 TOM20 和 Trx2 一抗, 4 ℃ 孵育 16 h; PBS 缓冲液浸洗细胞。滴加相应荧光二抗, 室温孵育 2 h, PBS 缓冲液浸洗细胞。加入 DAPI 工作液, 室温孵育, 用 PBS 缓冲液浸洗细胞。每孔加入新鲜 PBS 缓冲液。96 孔板送至清华大学药学院药物活性筛选平台, 应用 Opera Phenix 高内涵筛选系统对目标蛋白进行定量分析。利用 SPSS 软件对 2 种蛋白进行相关性分析。

2.1.3 细胞转染 将对数生长期的 RSC96 细胞, 制备成细胞悬液, 用 DMEM 基础培养基将细胞密度调整至 2.5×10^5 个/mL。取 4 个 6 cm 的培养皿, 分别加入 3.8 mL DMEM 完全培养基和 200 μ L 细胞悬液, 分别标记为对照组、TOM20 siRNA 组、TOM20 siRNA+芍药苷 24 h 组、TOM20 siRNA+芍药苷 48 h 组, 于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。前期预实验结果表明, 100 nmol/L siRNA 干预 72 h 阻断效果最佳。根据 TOM20 siRNA 说明书制备终浓度为 100 nmol/L 的转染复合物, 随后避光孵育 15 min。吸弃培养皿中培养基, 各组加入 3.716 mL DMEM 基础培养基, TOM20 siRNA 组、TOM20 siRNA+芍药苷 24 h 组、TOM20 siRNA+芍药苷 48 h 组分别加入 284 μ L 转染复合物, 对照组加入含 25 mmol/L 葡萄糖的 284 μ L DMEM 基础培养基。37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 每组加入 0.4 mL 胎牛血清。TOM20 siRNA+芍药苷 24 h 组、TOM20 siRNA+芍药苷 48 h 组分别于加入转染复合物后 24、48 h 加入 0.4 μ L 10 mmol/L 芍药苷。待 TOM20 siRNA 干预 72 h 后进行后续实验。

2.1.4 Western blotting 检测 TOM20 及 Trx2 蛋白表达 按“2.1.3”项下方法处理细胞并给药, 收集细胞, 加入裂解液提取蛋白, 蛋白样品经 12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5%脱脂牛奶, 室温封闭 2 h, 加入 TBST 洗涤液, 于摇床上振荡洗膜; 分别加入 Trx2、TOM20 和 β -actin 一抗, 孵育 16 h, 加入 TBST 洗涤液于摇床上振荡洗膜。加入相应二抗孵育 1 h, 加入 TBST 洗涤液于摇床上振荡洗膜。滴加发光液显影, 用 Image J 软件进行定量分析。

2.2 体内实验

2.2.1 大鼠造模 造模前检测大鼠空腹血糖, 剔除

血糖不符合要求的大鼠后, 随机分为对照组 (8 只) 和造模组 (16 只)。用 0.1 mol/L 无菌枸橼酸缓冲液 (pH 4.4) 配制成 1% STZ 的溶液, 造模组大鼠 ip STZ (60 mg/kg)。1 周后空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L 视为高血糖模型造模成功, 连续饲养 12 周。期间每 2 周测定 1 次大鼠空腹血糖, 空腹血糖 ≥ 25.5 mmol/L 的大鼠 sc 胰岛素以降低死亡率。每 4 周测定鼠尾热敏感性和足底机械敏感性, 监测周围神经病变情况。高血糖持续 12 周, 以热痛阈值、坐骨神经传导速度及坐骨神经病理变化脱髓鞘形成确定 DPN 模型造模成功。

2.2.2 分组及给药 将成模大鼠随机分为模型组和白芍总苷 (5.6 mg/kg) 组, 每组 8 只。白芍总苷以生理盐水配制质量浓度为 2 mg/mL 的药液, 白芍总苷组 ig 药液, 对照组和模型组 ig 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续给药 12 周。大鼠末次给药 1 h 后, 采用气体麻醉机, 异氟烷气体麻醉, 随后立刻进行坐骨神经传导速度测试, 腹主动脉取血后大鼠自然死亡, 取大鼠坐骨神经进行后续检测。

2.2.3 免疫荧光法测定坐骨神经中 TOM20 及 Trx2 蛋白表达 取大鼠坐骨神经进行石蜡包埋切片, 切片厚度 5 μ m。各组随机选取 9 只大鼠, 每只制备 1 个坐骨神经组织切片, 组织切片经脱蜡、水化后, 使用微波法进行抗原修复。采用驴血清室温封闭 1 h, 配制 TOM20、Trx2 以及 S-100 β 抗体染料混合物, 4 ℃孵育过夜 (16 h 以上), 滴加含 DAPI 封片剂室温孵育, 送至首都医科大学医学实验与测试中心形态学研究测试室, 应用荧光显微镜 (倒置) 于 40 倍镜下观察坐骨神经组织的形态并拍照, 每个样本随机选取 6 个不同区域, 用 Image J 软件计算荧光强度并进行共定位分析。TOM20 以红色荧光为阳性表达, 激发波长为 555 nm; Trx2 以绿色荧光为阳性表达, 激发波长为 488 nm; S100 β 以紫色为阳性表达, 激发波长为 647 nm。

2.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析。分析前检验数据是否符合正态分布 (One-Sample Kolmogorow-Smirnov Test), 符合正态分布的数据采用 $\bar{x} \pm s$ 描述, 多组独立样本比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 在方差齐性 (equal variances assumed) 条件下, 选择最小显著性差异 (least significant difference, LSD) 分析。相关性分析采用 SPSS 软件进行 Spearman 分析。

3 结果

3.1 高糖环境对 RSC96 细胞中 TOM20 和 Trx2 蛋白表达的影响

为确定高糖浓度对 RSC96 细胞 TOM20 及 Trx2 蛋白表达的影响, RSC96 细胞给予不同浓度 (25、100、150 mmol/L) 葡萄糖分别干预 12、24、48 h。如图 1 所示, 与 25 mmol/L 葡萄糖组比较, 给予高糖干预 12、24 h, 150 mmol/L 葡萄糖组 Trx2 和 TOM20 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。给予高糖干预 24 h, 100 mmol/L 葡萄糖组 Trx2 蛋

白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。而给予高糖干预 72 h 后, 与 25 mmol/L 葡萄糖组比较, 100、150 mmol/L 葡萄糖组 Trx2 和 TOM20 蛋白表达水平均无显著差异。表明一定程度的葡萄糖浓度及适当的干预时间能显著影响 RSC96 细胞线粒体内 Trx2 及 TOM20 蛋白的表达量, 其中以 150 mmol/L 葡萄糖干预 24 h 的影响最为显著。进一步对 24 h 组的 Trx2 和 TOM20 数据进行相关性分析, 发现 Trx2 和 TOM20 在高糖环境下的表达具有相关性 (相关系数为 0.790, $P < 0.01$)。

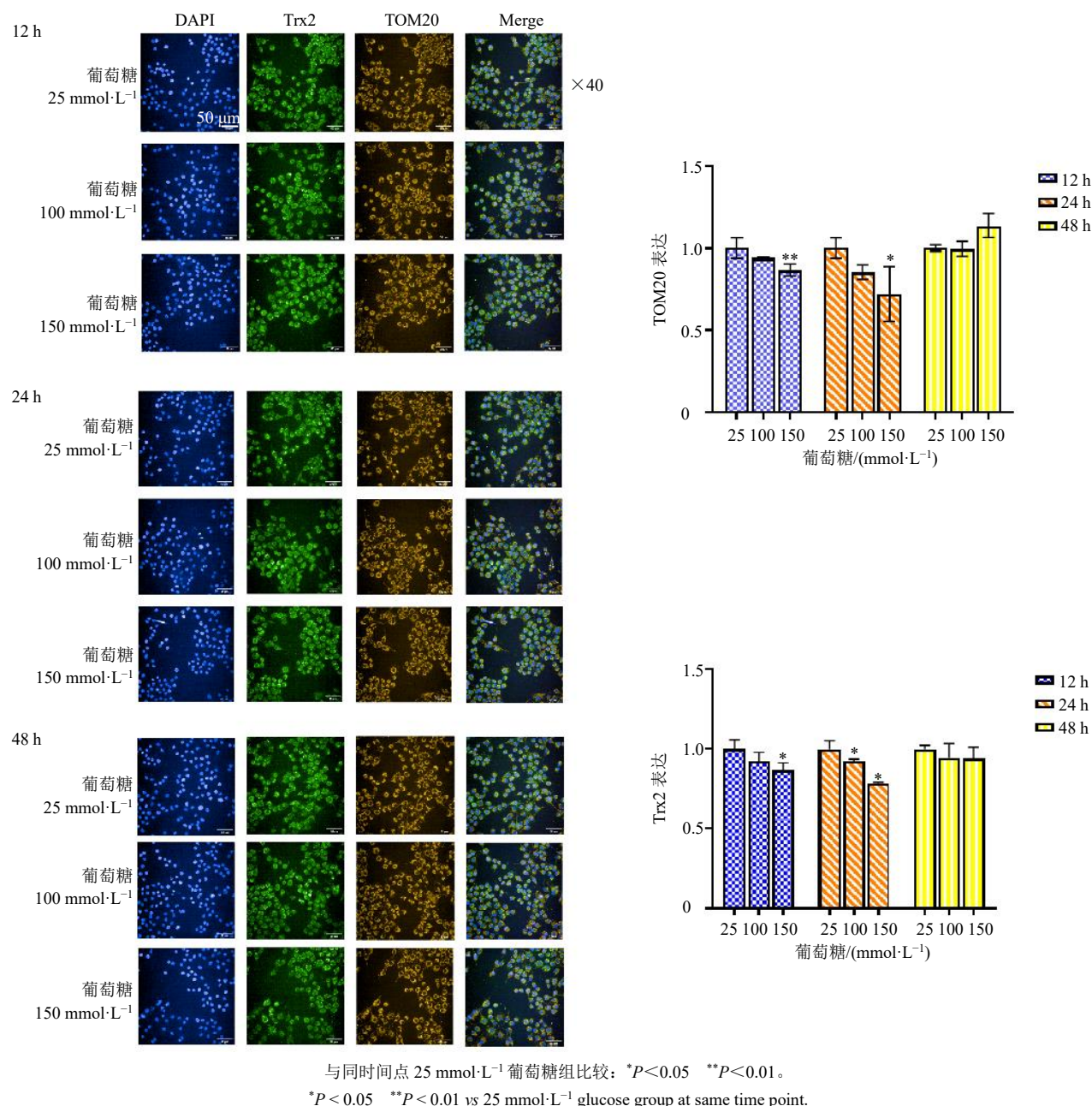


图 1 高糖环境对 RSC96 细胞中 TOM20 和 Trx2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Fig. 1 Effect of high glucose environment on TOM20 and Trx2 protein expressions in RSC96 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

3.2 TOM20 调节 RSC96 细胞的 Trx2 线粒体输入及芍药苷的调节作用

为进一步确定 Trx2 的线粒体输入机制是否与 TOM20 有关以及芍药苷是否通过上调 TOM20 蛋白的表达来促进 Trx2 的线粒体输入, 采用 TOM20 siRNA 降低 TOM20 的表达, 并观察 Trx2 的表达。如图 2 所示, 与对照组比较, TOM20 siRNA 组 TOM20 和 Trx2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、

0.01)。而与 TOM20 siRNA 组比较, 芍药苷干预 24、48 h 后, Trx2 和 TOM20 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。表明 Trx2 的线粒体输入可能与 TOM20 蛋白有关, 且芍药苷能通过上调 TOM20 蛋白的表达量来促进 TOM20 蛋白的线粒体输入。

3.3 芍药苷对高糖环境下 RSC96 细胞中 TOM20 和 Trx2 表达的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, 高糖组 TOM20 和

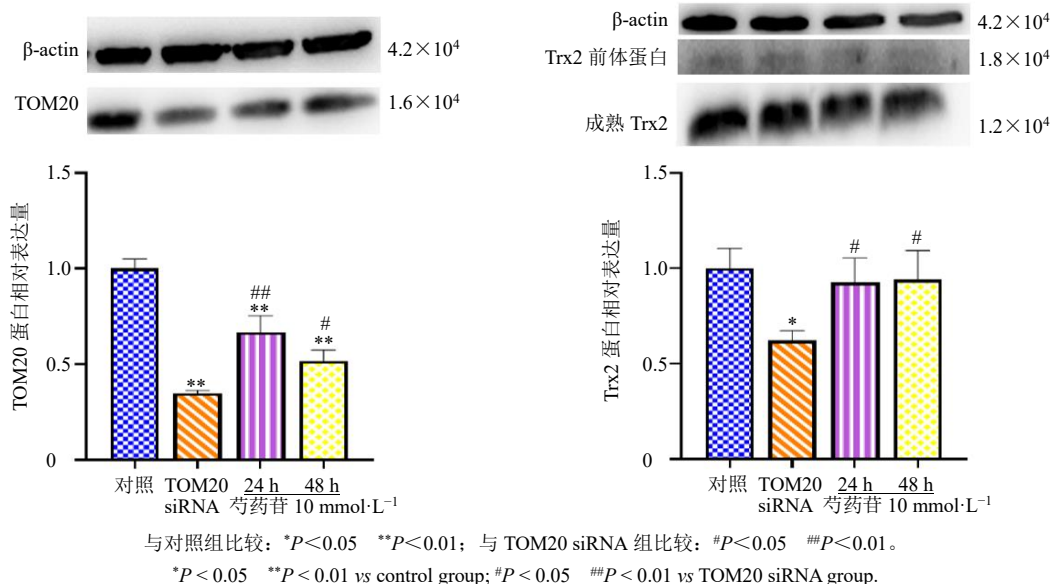


图 2 TOM20 siRNA 及芍药苷对 RSC96 细胞中 TOM20 及 Trx2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of TOM20 siRNA and paeoniflorin on TOM20 and Trx2 protein expressions in RSC96 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

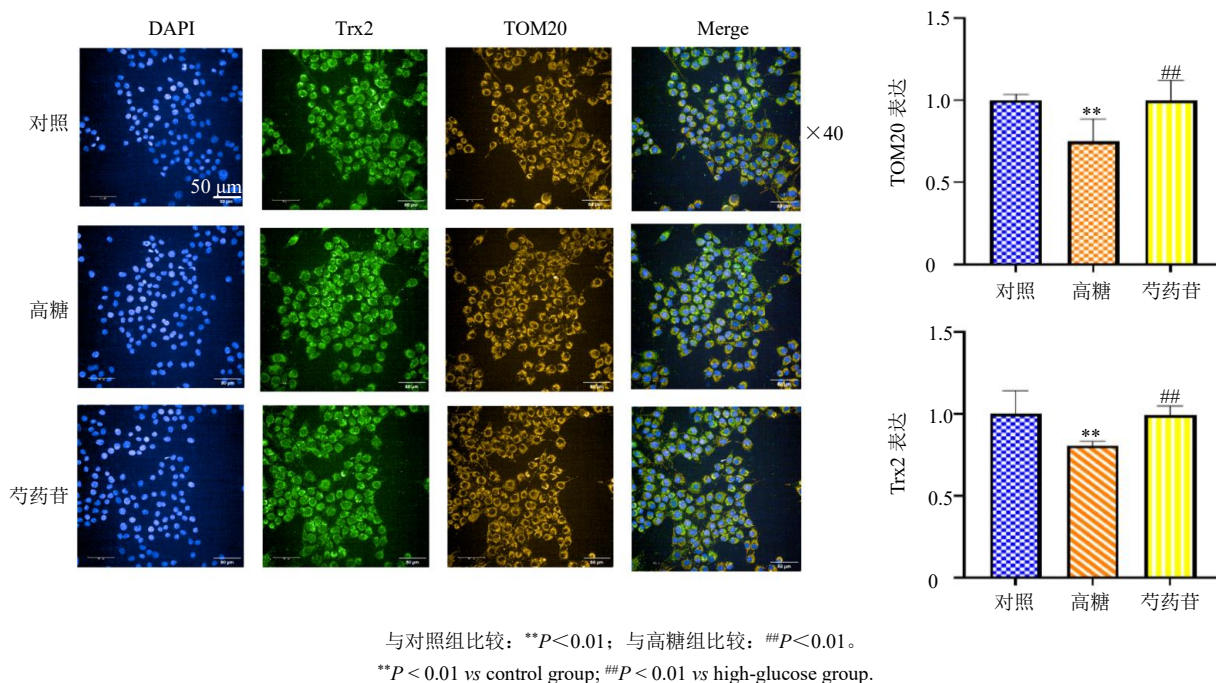


图 3 芍药苷对高糖环境下 RSC96 细胞中 TOM20 和 Trx2 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 3 Effect of paeoniflorin on TOM20 and Trx2 expressions in RSC96 cells under high glucose environment ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Trx2 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.01$); 与高糖组比较, 芍药苷组 TOM20 和 Trx2 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.01$)。表明芍药苷能够促进高糖环境下 RSC96 细胞中 TOM20 蛋白的表达, 从而增加 Trx2 线粒体蛋白输入。

3.4 白芍总苷对 DPN 大鼠坐骨神经中 TOM20 和 Trx2 表达的影响

为验证芍药苷增加 DPN 大鼠坐骨神经中 Trx2

的线粒体运输是否通过调控 TOM20 蛋白的表达, 选取 DPN 大鼠坐骨神经进行免疫荧光三标法, 其中 S-100 β 蛋白作为 SCs 标记物。如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组 TOM20 及 Trx2 蛋白表达均显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 白芍总苷组 TOM20 及 Trx2 蛋白表达均显著升高 ($P<0.01$)。表明白芍总苷能够促进 DPN 大鼠坐骨神经 TOM20 蛋白的表达, 从而增加 Trx2 的线粒体运输。

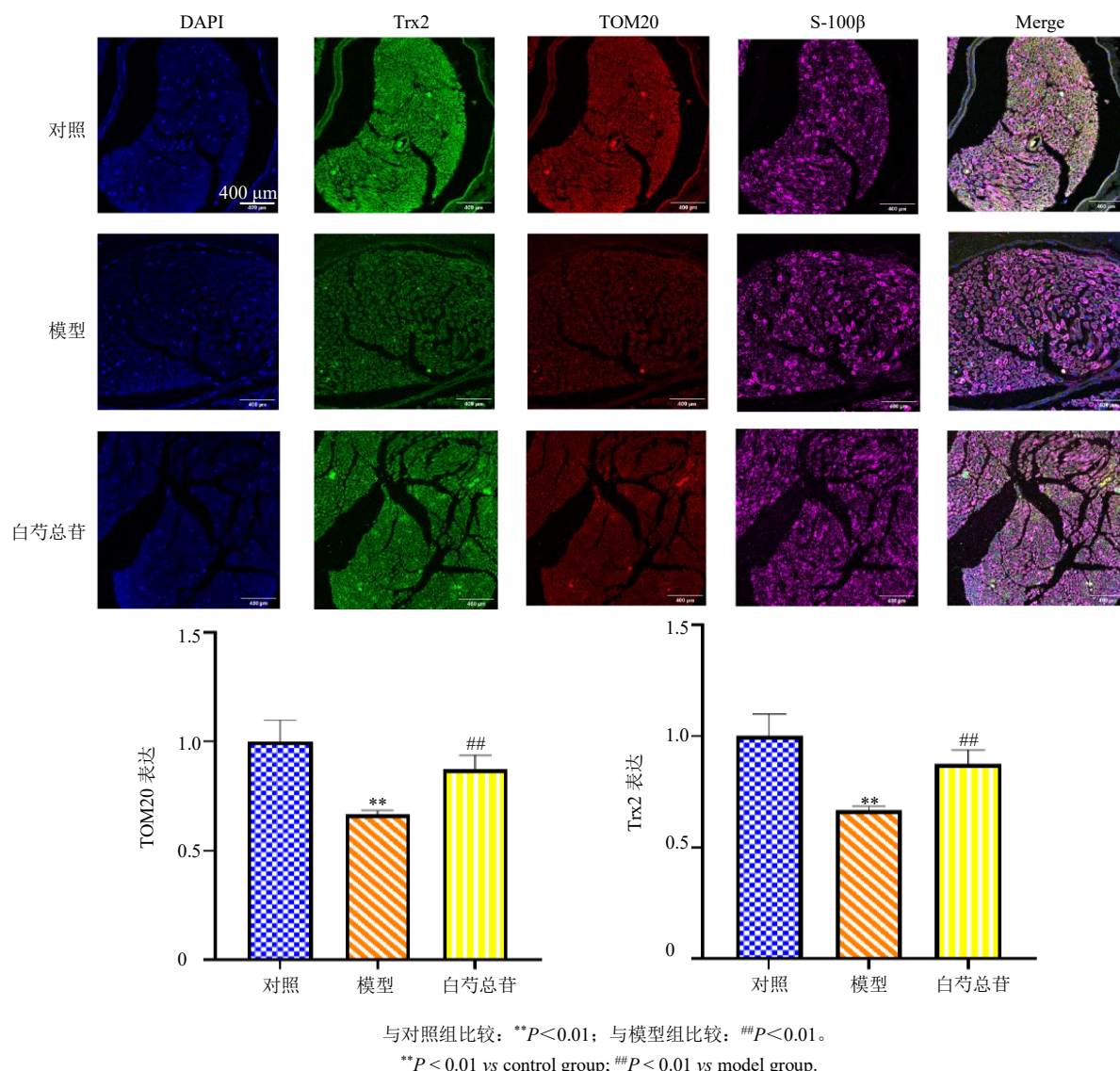


图 4 白芍总苷对 DPN 大鼠坐骨神经中 TOM20 和 Trx2 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 4 Effect of total glycosides of peony on TOM20 and Trx2 expressions in sciatic nerve of DPN rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

4 讨论

高糖环境诱导的线粒体氧化应激, 被认为是导致 SCs 凋亡, 坐骨神经脱髓鞘, 最终引发 DPN 的主要发病机制之一。本研究结果表明, 芍药苷具有通过上调 SCs 以及大鼠坐骨神经中 TOM20 蛋白的

表达, 促进 Trx2 的线粒体输入从而降低氧化应激, 干预 DPN 的潜在价值。

在阐明了芍药苷能够通过上调 TOM20 蛋白的表达来促进 Trx2 的线粒体输入后, 进一步对 TOM20 依赖的线粒体输入途径或其影响线粒体功能的作用

机制进行分析。研究发现,糖尿病小鼠在乙醛脱氢酶 2 (aldehyde dehydrogenase-2, *ALDH2*) 基因在过表达和敲减的情况下会影响 TOM20 蛋白的表达量,但对于正常小鼠则没有影响^[20]; Zhu 等^[21]通过建立脓毒症小鼠模型,利用免疫荧光法检测细胞中 TOM20 蛋白的含量,发现在蛋白激酶 Ca (protein kinase Ca type, *PRKCA*) 过表达的情况下能够促进脓毒症患者的线粒体自噬,主要表现为 TOM20 蛋白与微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein light chain3, *LC3*) 蛋白的共定位以及表达量增加; You 等^[22]利用香烟提取物处理 BEAS-2B 细胞,发现泛素特异性蛋白水解酶 19 (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 19, *USP19*) 敲低的细胞中 TOM20 蛋白表达升高,从而降低了 *FUNDC1* 和 *LC3-II/I* 的表达,提高了细胞存活率。

根据前期 SCs 线粒体蛋白质组学的结果,已鉴定 SCs 线粒体蛋白 1 072 个,其中高糖环境诱导的差异蛋白 392 个,包括 348 个蛋白的表达显著上调,44 个蛋白的表达显著降低。在课题组前期组学结果中,也观测了 *USP19*、*ALDH2*、*PRKCA* 蛋白的表达发生了显著性变化。而对于芍药苷是否通过调控这几种蛋白的表达来影响 TOM20 蛋白尚未可知,是可以进一步探索的问题。同时,在查阅文献以及 STRING 数据库时发现线粒体动力相关蛋白 1 (dynammin-related protein 1, *Drp1*)^[23]、*FUNDC1*^[24]、*NR1D1*^[25]、*PINK1*^[26]等蛋白也能够一定程度上调控 TOM20 蛋白的表达,但比较遗憾的是课题组前期组学数据中尚未观测到以上几种蛋白或是并未出现显著性差异。究其原因可能是 SCs 线粒体提取与鉴定、线粒体蛋白定位等的复杂性。

TOM20 除了作为线粒体输入蛋白,还主要作为检测线粒体自噬以及细胞衰老的标志物。Li 等^[27]通过 *LC3-II/I* 和 *p62* 在 TOM20 和 *LAMP1* 之间的表达和共定位,证实了线粒体去乙酰化酶 sirtuin 3 (*SIRT3*) 显著调节肝纤维化中的线粒体自噬。Vicarelli 等^[28]证实了线粒体外膜通透性增加是细胞衰老的重要特征,而在辐射诱导的衰老细胞以及复制性衰老细胞中,细胞色素 C 与 TOM20 蛋白的共定位减少。大量研究表明,线粒体可以通过自噬来消融受损的线粒体,以起到抑制线粒体 ROS 氧化应激的作用^[29]。本研究发现,高糖环境下 TOM20 蛋白的表达显著降低,故而认为 SCs 在高糖环境下氧化应激可能也与线粒体自噬减弱有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ogurtsova K, Guariguata L, Barengo N C, *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global estimates of undiagnosed diabetes in adults for 2021 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 183: 109118.
- [2] Tesfaye S, Sloan G, Petrie J, *et al.* Comparison of amitriptyline supplemented with pregabalin, pregabalin supplemented with amitriptyline, and duloxetine supplemented with pregabalin for the treatment of diabetic peripheral neuropathic pain (OPTION-DM): A multicentre, double-blind, randomised crossover trial [J]. *Lancet*, 2022, 400(10353): 680-690.
- [3] 甘兆义, 李春妮, 韦雄丽, 等. 糖尿病周围神经病变的早期诊断及治疗进展 [J]. 中国卫生标准管理, 2023, 14(11): 194-198.
- [4] Eid S A, Rumora A E, Beirowski B, *et al.* New perspectives in diabetic neuropathy [J]. *Neuron*, 2023, 111(17): 2623-2641.
- [5] Morgenstern J, Groener J B, Jende J M E, *et al.* Neuron-specific biomarkers predict hypo- and hyperalgesia in individuals with diabetic peripheral neuropathy [J]. *Diabetologia*, 2021, 64(12): 2843-2855.
- [6] Eftekharpour E, Fernyhough P. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction associated with peripheral neuropathy in type 1 diabetes [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2022, 37(7/8/9): 578-596.
- [7] Gonçalves N P, Vægter C B, Andersen H, *et al.* Schwann cell interactions with axons and microvessels in diabetic neuropathy [J]. *Nat Rev Neurol*, 2017, 13(3): 135-147.
- [8] Schäfer J A, Bozkurt S, Michaelis J B, *et al.* Global mitochondrial protein import proteomics reveal distinct regulation by translation and translocation machinery [J]. *Mol Cell*, 2022, 82(2): 435-446.
- [9] Song J Y, Herrmann J M, Becker T. Quality control of the mitochondrial proteome [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(1): 54-70.
- [10] Fatima N U, Ananthanarayanan V. Mitochondrial movers and shapers: Recent insights into regulators of fission, fusion and transport [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2023, 80: 102150.
- [11] Chasapis C T, Makridakis M, Damdimopoulos A E, *et al.* Implications of the mitochondrial interactome of mammalian thioredoxin 2 for normal cellular function and disease [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 137: 59-73.
- [12] Chen C F, Wang K, Zhang H F, *et al.* A unique SUMO-interacting motif of Trx2 is critical for its mitochondrial presequence processing and anti-oxidant activity [J]. *Front*

- Physiol*, 2019, 10: 1089.
- [13] Murcha M W, Elhafez D, Millar A H, *et al.* The N-terminal extension of plant mitochondrial carrier proteins is removed by two-step processing: The first cleavage is by the mitochondrial processing peptidase [J]. *J Mol Biol*, 2004, 344(2): 443-454.
- [14] Murphy M P. Mitochondrial thiols in antioxidant protection and redox signaling: distinct roles for glutathionylation and other thiol modifications [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 16(6): 476-495.
- [15] 朱晏伯, 李潇, 朱笏悦, 等. 芍药苷对高糖环境下雪旺细胞线粒体动力学的影响 [J]. 中国糖尿病杂志, 2022, 30(3): 214-220.
- [16] Yang X W, Yao W J, Shi H T, *et al.* Paeoniflorin protects Schwann cells against high glucose induced oxidative injury by activating Nrf2/ARE pathway and inhibiting apoptosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 185: 361-369.
- [17] Yang X W, Li X, Zhu Y B, *et al.* Paeoniflorin upregulates mitochondrial thioredoxin of Schwann cells to improve diabetic peripheral neuropathy indicated by 4D label-free quantitative proteomics [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 4775645.
- [18] 陈佳, 李伟, 刘征, 等. 基于 GEO 数据库的 DPN 相关靶点挖掘及与芍药苷分子对接研究 [J]. 广东药科大学学报, 2020, 36(4): 514-518.
- [19] 张育贵, 张淑娟, 边甜甜, 等. 芍药苷药理作用研究新进展 [J]. 中草药, 2019, 50(15): 3735-3740.
- [20] Zhang Y M, Zou R J, Abudureyimu M, *et al.* Mitochondrial aldehyde dehydrogenase rescues against diabetic cardiomyopathy through GSK3 β -mediated preservation of mitochondrial integrity and parkin-mediated mitophagy [J]. *J Mol Cell Biol*, 2023: mjad056.
- [21] Zhu Q J, Wang J, Li Y, *et al.* PRKCA promotes mitophagy through the miR-15a-5p/PDK4 axis to relieve sepsis-induced acute lung injury [J]. *Infect Immun*, 2023, 91(1): e0046522.
- [22] You Y J, Wang H J, Wang Q, *et al.* Silencing USP19 alleviates cigarette smoke extract-induced mitochondrial dysfunction in BEAS-2B cells by targeting FUNDC1 [J]. *Open Med*, 2023, 18(1): 20230798.
- [23] Wu H X, Li G D, Chen W W, *et al.* Drp1 knockdown represses apoptosis of rat retinal endothelial cells by inhibiting mitophagy [J]. *Acta Histochem*, 2022, 124(1): 151837.
- [24] Peng H, Fu S Z, Wang S Y, *et al.* Ablation of FUNDC1-dependent mitophagy renders myocardium resistant to paraquat-induced ferroptosis and contractile dysfunction [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2022, 1868(9): 166448.
- [25] Yu B, Pan J B, Yu F Y. The combination of nuclear receptor NR1D1 and ULK1 promotes mitophagy in adipocytes to ameliorate obesity [J]. *Adipocyte*, 2022, 11(1): 202-212.
- [26] Roise D, Horvath S J, Tomich J M, *et al.* A chemically synthesized pre-sequence of an imported mitochondrial protein can form an amphiphilic helix and perturb natural and artificial phospholipid bilayers [J]. *EMBO J*, 1986, 5(6): 1327-1334.
- [27] Li R X, Wang Z C, Wang Y, *et al.* SIRT3 regulates mitophagy in liver fibrosis through deacetylation of PINK1/NIPSNAP1 [J]. *J Cell Physiol*, 2023, 238(9): 2090-2102.
- [28] Victorelli S, Salmonowicz H, Chapman J, *et al.* Apoptotic stress causes mtDNA release during senescence and drives the SASP [J]. *Nature*, 2023, 622(7983): 627-636.
- [29] Cai J, Guan H, Li D, *et al.* New insights into microalgal astaxanthin's effect on lambda-cyhalothrin-induced lymphocytes immunotoxicity in *Cyprinus carpio*: Involving miRNA-194-5p-FoxO1-mediated-mitophagy and pyroptosis [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2023, 141: 109046.

[责任编辑 李亚楠]