

## 几种常见黄酮靶向 FTO 蛋白对 RNA m6A 甲基化修饰的影响

甘婷, 李文文, 李男, 邓泽元, 郑溜丰\*  
(南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室 南昌 330047)

**摘要** RNA m6A 甲基化异常升高是诸多代谢性疾病发生、发展的重要诱因,而黄酮类化合物具有预防代谢性疾病的功效,然而,其作用机制尚未清楚。本研究通过非标记的生物分子互作技术探究 3 种常见黄酮类化合物(姜黄素、漆黄素、高良姜素)与去甲基化酶 FTO 的相互作用,并采用分子对接技术揭示其中的作用机理。利用体外细胞低水平炎症模型,探究黄酮与 FTO 的相互作用对 RNA m6A 甲基化水平的影响。结果表明,姜黄素、漆黄素、高良姜素均能显著猝灭 FTO 蛋白的荧光,并增加 FTO 的耐蛋白酶水解性和热稳定性,提示这 3 种黄酮均能与 FTO 直接结合。分子对接结果显示这 3 种黄酮类化合物均结合在 FTO 蛋白的催化活性空腔中,其中,关键的氨基酸结合位点包括:Arg96、His231、His232、Asp233、His307、Arg322,从而潜在激活 FTO 去甲基化活性。此外,体外低水平炎症导致细胞内 RNA m6A 甲基化水平的升高,而姜黄素、漆黄素、高良姜素与 FTO 的直接结合可抑制炎症诱导的 RNA m6A 甲基化增加,其中以姜黄素的作用最明显。本研究结果为 FTO 作为黄酮类化合物预防代谢性疾病的作用新靶点提供理论依据。

**关键词** 黄酮类化合物; FTO 蛋白; m6A 甲基化修饰; 代谢性疾病; 炎症

**文章编号** 1009-7848(2023)07-0007-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.07.002

慢性代谢性疾病严重危害现代人类健康,特别是肥胖和糖尿病的发病率急剧增加<sup>[1]</sup>。据世界卫生组织估计,全球有超过 10 亿人肥胖及 5 亿人患糖尿病。肥胖和胰岛素作用异常与一系列健康问题相关,包括 2 型糖尿病、脂肪肝、肝胆和胆囊疾病、心血管病理、神经退行性疾病、哮喘和各种癌症的风险也显著增加<sup>[2]</sup>。虽然其发病机制复杂,但是炎症被认为是包括肥胖和糖尿病在内的多种慢性代谢性疾病发生的典型特征之一<sup>[3]</sup>。通过靶向抑制炎症,是缓解这些代谢性疾病发生、发展的有效解决方案<sup>[4-6]</sup>。除了 NF- $\kappa$ B 这条经典的炎症信号通路之外<sup>[5]</sup>,最新的研究表明,表观遗传修饰与炎症反应有关,其修饰的异常是多种慢性病发生的重要诱因<sup>[7]</sup>。

N6-甲基腺苷(m6A)是 RNA 分子最常见和最丰富的表观遗传修饰。m6A 修饰受酶催化的动态调节,由甲基转移酶复合物(包括 WTAP、METTL3 和 METTL14)催化生成,并可在去甲基化酶 FTO 和 ALKBH5 的作用下被“擦除”<sup>[8]</sup>。研究表明,

m6A 可调节葡萄糖/脂质代谢和免疫/炎症反应,其异常升高是肥胖、2 型糖尿病和心血管疾病等代谢性疾病发生、发展的重要诱因<sup>[9]</sup>。为此,通过激活去甲基化酶活性来“擦除”m6A,降低其水平,可能是预防多种代谢性疾病的新策略<sup>[10]</sup>。与脂肪含量和肥胖相关的蛋白 FTO 是关键的去甲基化酶,该酶功能的紊乱会导致肥胖及癌症等多种疾病的发生,有望成为诸多慢性代谢性疾病预防的新靶点<sup>[11-17]</sup>。目前基于晶体结构的化合物设计等手段,合成了影响 FTO 活性的小分子,如 FB23-2<sup>[18-19]</sup>,而膳食中的活性成分是否会直接靶向 FTO 发挥功能效应尚未见报道。

植物化学物对代谢性疾病的预防作用在细胞培养、动物活体及人体临床试验中得到很好的证实<sup>[20]</sup>。同时从植物化学物库中也相继鉴定出一些新的抗炎活性天然产物<sup>[21-22]</sup>。目前,以天然产物作为先导化合物的起点已成为现代医学药物开发的重要研究领域,在批准上市的药物中有相当数量含有天然产物片段<sup>[23-24]</sup>。近年来,黄酮类化合物是被公认的具有有效生物活性的植物化合物,其功效包括抗氧化、抗炎、降胆固醇、降血压等<sup>[25-28]</sup>。从膳食中鉴定出的具有抗炎功效的黄酮类化合物包括:姜黄素、高良姜素及漆黄素等<sup>[29-35]</sup>。然而,这些黄酮类化合物是否靶向 FTO 并影响 RNA m6A 甲

收稿日期: 2022-07-29

基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目(82160614);江西省自然科学基金项目(20212BAB206090)

第一作者: 甘婷,女,硕士生

通信作者: 郑溜丰 E-mail: zhenglf2018@ncu.edu.cn

基化修饰需要进一步研究。

本研究利用药物亲和反应目标荧光猝灭分析(MARFQ)、细胞热位移(CETSA)、药物亲和反应靶向稳定性分析(DARTS)等非标记的生物分子互作技术<sup>[36]</sup>,研究3种常见的黄酮类化合物(姜黄素、高良姜素及漆黄素)与FTO蛋白的相互作用,并采用计算机分子对接技术揭示其机理,明确其中的氨基酸结合位点。在体外低水平细胞炎症模型下,探究这种相互作用对RNA m6A甲基化修饰的影响,以期黄酮类化合物预防代谢性疾病的作用靶点提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

高良姜素、漆黄素和姜黄素标准品( $\geq 98\%$ ),北京索莱宝科技有限公司;FTO蛋白,武汉三鹰生物技术有限公司;链霉蛋白酶E(7 000 U/g),北京索莱宝科技有限公司;人脐静脉内皮细胞,武汉普诺赛生命科技有限公司;炎症细胞因子IL-17、肿瘤坏死因子TNF $\alpha$ ,美国PeproTech公司;BCA试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;细胞总RNA提取试剂盒、RT-PCR试剂盒、qPCR试剂盒,日本Takara公司;FTO抗体,上海艾博抗贸易有限公司。

### 1.2 仪器与设备

JY-86-2-50型-80℃冰箱、Neofuge 15R型台式高速冷冻离心机,香港力康发展有限公司;Agilent 6430 QQQ三重串联四极杆质谱仪,安捷伦科技有限公司;AR1140电子分析天平,奥豪斯仪器有限公司;TC512型梯度PCR仪,英国TECHNE公司;CFX96 Touch型荧光定量PCR仪、DYCP-31DN型电泳仪,美国伯乐公司;EXL800全自动酶标仪,美国Biotek Instruments有限公司;F-4600型荧光分光光度计,日立高新技术公司。

### 1.3 方法

1.3.1 药物亲和反应目标荧光猝灭分析 高良姜素、漆黄素和姜黄素用二甲亚砜(DMSO)配制成50 mmol/L的储备液,置于4℃冰箱密封、避光保存,在试验过程中根据需求稀释成相应浓度。FTO蛋白保存于-80℃冰箱内,试验时用PBS缓冲液

将FTO配成浓度为 $1.43 \times 10^{-5}$  mol/L的溶液备用。所用缓冲溶液为含0.1%NaCl的PBS缓冲液(0.1 mol/L)。

向1 cm的石英比色皿中依次加入300  $\mu$ L的PBS缓冲溶液和20  $\mu$ L的FTO蛋白稀释液,加水至2 mL,再向溶液中依次等体积加20  $\mu$ L黄酮储备液。扫描前均充分混合并在37℃恒温水浴锅中放置10 min,以保证体系反应达到平衡。激发波长为275 nm,扫描范围为280~450 nm,激发和发射的狭缝宽度均为10 nm。

1.3.2 细胞热位移分析 细胞接种在15 cm直径的大皿中,用50  $\mu$ mol/L的高良姜素、姜黄素和漆黄素分别处理12 h。用PBS清洗2次,再用消化液消化细胞(2 mL),倒掉消化液,加入10 mL培养基将细胞吹下来,收集细胞,1 200 r/min离心5 min,倒掉培养基,加入含有1%蛋白酶抑制剂的800  $\mu$ L的PBS重悬细胞。将细胞等量分装在200  $\mu$ L PCR管中,每管100  $\mu$ L,然后在PCR仪中以不同温度(37,47,52,57,62,67,72,77℃)加热5 min,室温冷却3 min。再将细胞裂解液转移到1.5 mL EP管中,在液氮和室温反复冻融裂解细胞,每次10 min,12 000 r/min离心15 min提取蛋白,用BCA试剂盒测定蛋白质浓度,然后用抗FTO抗体进行免疫印迹。免疫印迹的条带强度被量化并随温度绘制(每组初始值设为100%)。

### 1.3.3 药物亲和反应靶向稳定性分析

1) 细胞收集和裂解 将培养好的细胞用预冷PBS清洗2~3次,然后加入预冷的M-PER裂解缓冲液,要尽量避免使用含有强变性剂的放射免疫沉淀试验(Radio immunoprecipitation assay, RIPA)裂解液。同时,反应中最好含有合适的蛋白酶抑制剂,防止细胞裂解液自身降解。用细胞刮铲将细胞轻轻刮下,置于预冷的离心管内,上下颠倒几次,混匀后于冰上静置裂解10 min。

2) 制备细胞裂解液 将预冷的细胞液于12 000 r/min,4℃高速离心15 min,将上清液转移至新的离心管中,用BCA蛋白定量法测定蛋白浓度。然后用预冷的肌钙蛋白C(Troponin C, TNC)缓冲液稀释蛋白,调节质量浓度至约2 g/L。

3) 化合物与裂解液孵育结合 每管200  $\mu$ g蛋白,两个对照管中加入等体积的TNC缓冲液,

药品管中加入不同浓度的黄酮(50,200,500  $\mu\text{mol/L}$ ,TNC 缓冲液稀释),混匀后于室温孵育 1 h。

4) 蛋白酶解 预先配好蛋白酶储存液(10 g/L),临用前用 TNC 缓冲液稀释至适当浓度(根据蛋白酶与裂解液中总蛋白质的比例为 1:1 500 进行稀释)。按比例加入蛋白酶,室温孵育 30 min(对照组不加蛋白酶)。30 min 后加入十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate,SDS)上样缓冲液终止反应,将反应管置于沸水中煮 10 min 使蛋白变性。

5) 结合蛋白的鉴定 需依据试验要求采用 Western Blot 蛋白质印迹等多种方法检测并鉴定结合蛋白。GAPDH 作为阴性对照。

1.3.4 FTO 与黄酮的分子对接 从 PDB 蛋白数据库中下载人源 FTO 蛋白的三维结构,PDB ID 为 3LFM,去除蛋白模型中的固有小分子及水分,添加极性氢。高良姜素、漆黄素及姜黄素的结构则从小分子结构数据库 ChemSpider 中下载。采用分子对接软件 AutoDockTools 对 FTO 与 CLB 进行对接,使用 Flexible Docking 模块,计算结合的对接能及作用三维模型。基于此模型,通过 Protein-Ligand Interaction Profiler 工具描绘黄酮与 FTO 的作用方式及作用位点<sup>[37]</sup>。

1.3.5 细胞内 m6A 水平分析 按照操作说明书介绍使用通用 RNA 提取试剂盒从细胞中分离总 RNA。用 S1 核酸酶(2 U)在含有 2.5  $\mu\text{L}$  S1 核酸酶缓冲液(10 $\times$ )的 25  $\mu\text{L}$  反应体系中酶切 5~10  $\mu\text{g}$  mRNA,37  $^{\circ}\text{C}$  反应 2 h,然后加入 4  $\mu\text{L}$  碱性磷酸酶缓冲液(10 $\times$ )和碱性磷酸酶(0.5 U),37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h。最后将样品稀释至总体积为 1 mL,0.22  $\mu\text{m}$  孔径过膜。采用 Agilent 6430 QQQ 三重串联四极杆质谱仪检测 RNA 中 m6A 的总量。根据测定浓度计算 m6A 与腺嘌呤(Adenine,A)的比值。

色谱条件:液相色谱柱型号为 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18(4.6 mm $\times$ 250 mm,5  $\mu\text{m}$ ),流动相 A 液为甲醇,B 液为 0.1%甲酸水溶液,梯度洗脱条件为 0~2.5 min,4%A;2.5~2.7 min,4%~31%A;2.7~6 min,31%A;6~6.2 min,31%~95%A;6.2~9.3 min,95%A;9.3~9.6 min,95%~4%A;9.6~14.5 min,4%A。流速 0.4 mL/min,色谱柱温度 40  $^{\circ}\text{C}$ ,进样量 10  $\mu\text{L}$ 。

质谱鉴定:酶解后的 RNA 片段经色谱分离后用 Agilent 6430 QQQ 三重串联四极杆质谱仪进行质谱分析。检测方式:正离子+MRM 模式;离子源:电喷雾离子化源(ESI)。A 的定量条件为:母离子 268.1  $m/z$ ,子离子 136.1  $m/z$ ,裂解电压 30 V,碰撞能 9 eV;进样量 10  $\mu\text{L}$ 。m6A 的定量条件为:母离子 282.1  $m/z$ ,子离子 150.1  $m/z$ ,裂解电压 70 V,碰撞能 23 eV;进样量 10  $\mu\text{L}$ 。定量使用由纯 A 和 m6A 标准(A 为 50~2 000 nmol/L,m6A 为 0.1~10 nmol/L)生成的标准曲线,并在同一批样品中进行 3 次试验。根据计算的浓度,确定 m6A 与 A 的比值。

#### 1.4 统计分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析,统计学处理结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,组间比较采用独立- $T$  检验, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果与分析

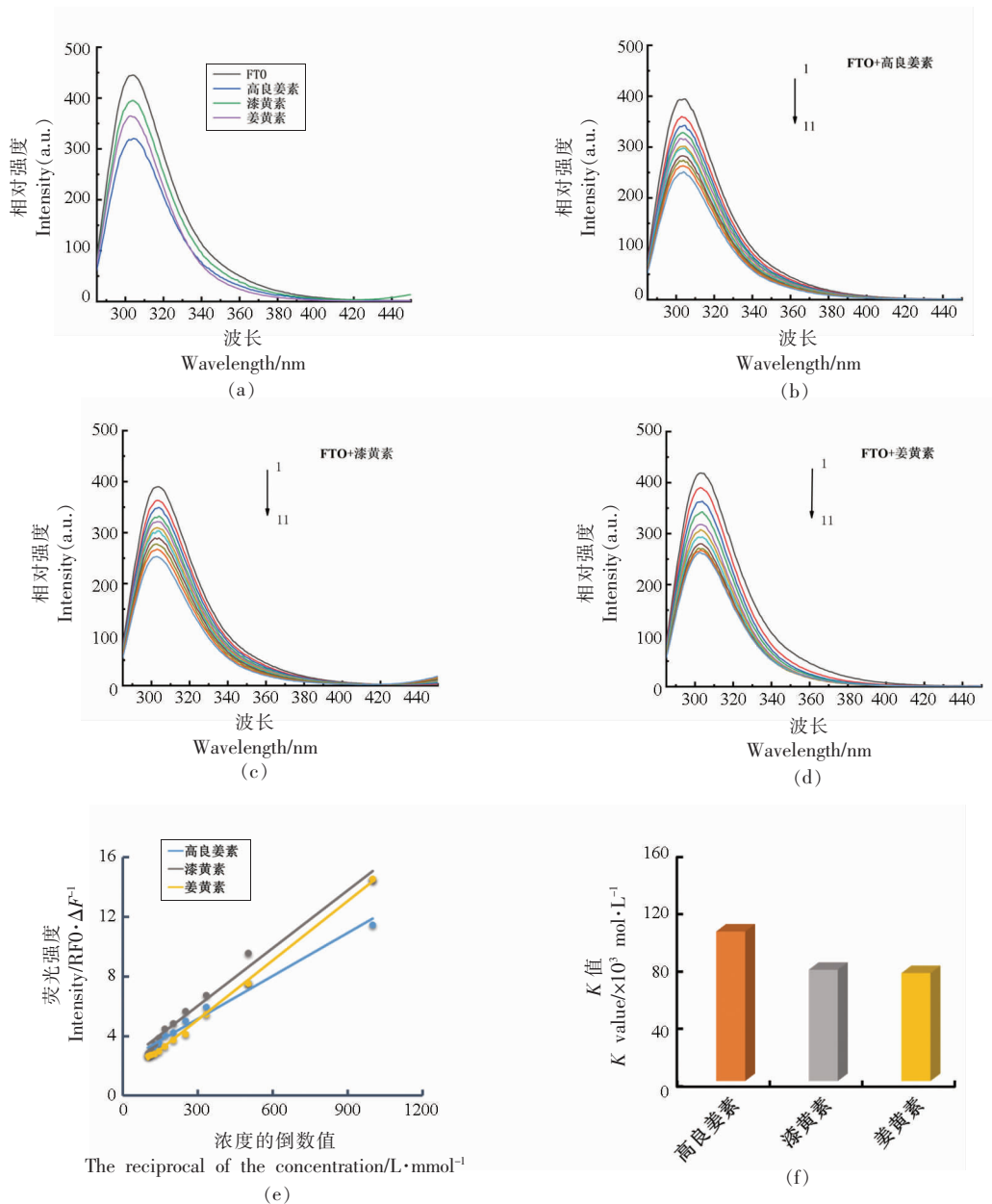
### 2.1 药物亲和反应目标荧光猝灭分析

由于 m6A 的丰度和 FTO 与代谢疾病的高度相关性,推测 FTO 是将黄酮类化合物与 RNA 修饰联系起来的一个强有力的靶点。考虑到黄酮类化合物可能需要高结合能力来直接调控 FTO 活性,首先通过黄酮类化合物亲和响应目标荧光猝灭(MARFQ)分析评估了黄酮类化合物与 FTO 蛋白的结合能力。MARTFQ 检测是基于配体诱导的靶色氨酸含蛋白(如 FTO)的内在荧光猝灭<sup>[36]</sup>,通过测定蛋白质以及反应体系的荧光强度,从而研究蛋白质构象、氨基酸微环境等的变化。以荧光峰的位置及其对应的波长作定性分析,以荧光强度与浓度的线性关系作定量分析。首先得到蛋白质的内源荧光光谱,在蛋白质溶液中依次加入一定体积的小分子,若此时得到的的荧光强度降低,说明小分子对蛋白质的荧光具有猝灭作用。如图 1a 所示,黄酮类化合物以 70:1(黄酮类化合物:FTO)的摩尔比猝灭 FTO 的荧光,具有明显的抑制 FTO 发射荧光的能力,且高良姜素的猝灭作用最强,其次是姜黄素。如图 1b~1d 所示,随着黄酮类化合物浓度的升高,FTO 固有荧光强度降低,且最大荧光发射波长出现偏移,表明黄酮类化合物与 FTO 发生了结合。这与前人报道的小分子与 FTO 结合后

改变了 FTO 蛋白质残基周围的微环境结果一致<sup>[38-39]</sup>。

为了进一步估计黄酮类化合物与 FTO 的结合常数( $K$  值),在一系列黄酮类化合物稀释中进行了 MARTFQ 测定,以构建修正的 Stern Volmer

曲线。如图 1e 和 1f 所示,根据 Stern Volmer 方程得出的  $K$  值表明,高良姜素的  $K$  值高于漆黄素和姜黄素,且这 3 种黄酮类化合物的  $K$  值高于已知的 FTO 激动剂 NADPH<sup>[36]</sup>。



注:(a)黄酮类化合物分别与 FTO 混合对 FTO 荧光光谱的影响,FTO 浓度为  $1.43 \times 10^{-7}$  mol/L,黄酮类化合物浓度为  $10 \times 10^{-6}$  mol/L。(b)~(f)为不同浓度黄酮类化合物对 FTO 荧光光谱的影响。FTO 浓度为  $1.43 \times 10^{-7}$  mol/L,从 1~11 黄酮类化合物的浓度分别为  $0, 1.0 \times 10^{-6}, 2.0 \times 10^{-6}, 3.0 \times 10^{-6}, 4.0 \times 10^{-6}, 5.0 \times 10^{-6}, 6.0 \times 10^{-6}, 7.0 \times 10^{-6}, 8.0 \times 10^{-6}, 9.0 \times 10^{-6}, 10.0 \times 10^{-6}$  mol/L。

图 1 3 种黄酮类化合物对 FTO 荧光光谱的影响 ( $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7.4$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$ )

Fig.1 Effect of three flavonoids on FTO fluorescence spectra ( $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7.4$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$ )

## 2.2 药物亲和性响应目标稳定性分析和细胞热位移分析

为进一步评估黄酮类化合物结合 FTO 的能力,进行了药物亲和性响应目标稳定性(DARTS)试验和细胞热转移试验(CETSA)。DARTS 检测是基于配体结合于靶蛋白后可提高其耐蛋白酶的水解能力<sup>[40]</sup>,是一种可以快速和直接识别小分子药物潜在靶点蛋白的技术,即靶蛋白与药物结合后,保护靶蛋白不被蛋白酶水解,进而维护靶蛋白的活性和功能。在高良姜素、漆黄素或姜黄素存在的情况下,用链霉蛋白酶 E 体外消化细胞裂解物。如图 2a~2c 所示,高良姜素、漆黄素和姜黄素均能显著降低 FTO 的蛋白酶敏感性,说明 3 种黄酮类化合物直接结合 FTO,使 FTO 的耐酶解性增加。然后进行 CETSA 评估 3 种黄酮类化合物结合细胞内 FTO 的能力。CETSA 是基于配体结合于靶蛋白后可增强其热稳定性,是检测小分子与蛋白质结合的新技术<sup>[41]</sup>。这项技术是根据热展开蛋白在细胞中迅速沉淀后通过监测热变后剩余的可溶性蛋白来测量融化曲线的。这与使用纯化蛋白的经典热转移试验类似,配体结合通常会导致蛋白稳定和熔融温度的正向转移。免疫印迹的条带强度被量化,并绘制出与温度的关系图。结果如图 3 所示,CETSA 也表明 3 种黄酮类化合物显著增强了 FTO 的热稳定性,与 MARFQ 和 DARTS 的分析结果一致,进一步在体外及细胞水平证实了高良姜素、漆黄素和姜黄素与 FTO 的直接结合。

## 2.3 计算机分子对接

蛋白质分子与药物小分子主要通过疏水作用、静电作用、氢键和范德华力等非共价作用相结合。蛋白质的结构比较复杂,在与药物小分子作用过程中,易受体系中溶剂分子或其它共存离子的影响,因此其作用过程可能不是只存在一种作用力,而是几种作用力共同作用。3 种黄酮类化合物的分子对接结果如表 1 所示,3 种黄酮类化合物均与 FTO 结合(对接能均小于 $-7$  kcal/mol),且疏水性氨基酸残基(Leu, Tyr, Met, Pro)与高良姜素、漆黄素和姜黄素接近,表明疏水相互作用是黄酮与 FTO 结合的关键驱动力。图 4~6 分别显示了高良姜素、漆黄素和姜黄素结合 FTO 蛋白的

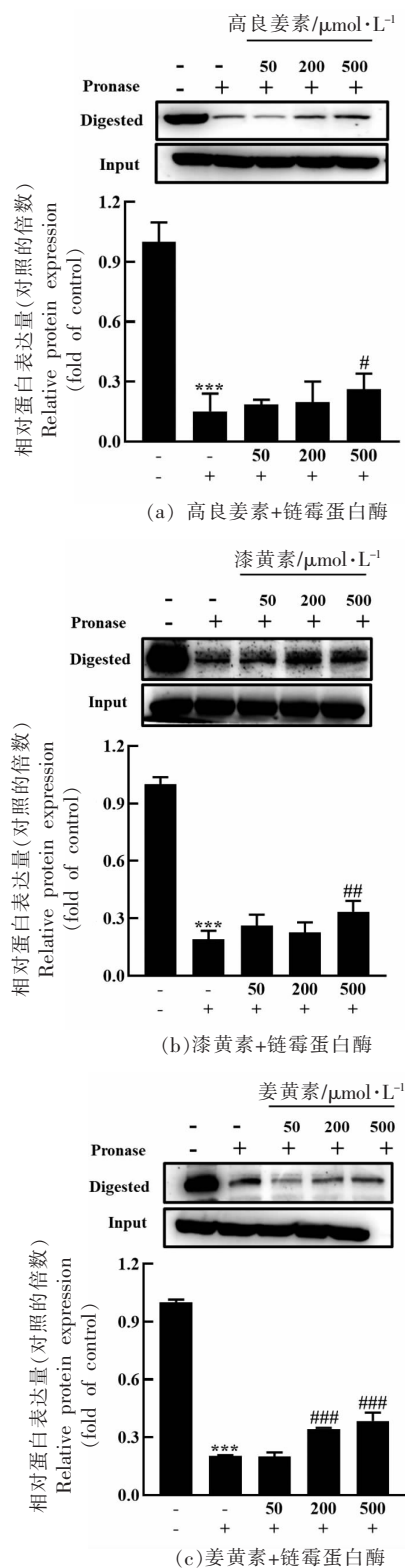


图 2 3 种黄酮类化合物与 FTO 结合的药物亲和性响应目标稳定性分析

Fig.2 Drug affinity response target stability analysis for the interactions of the three flavonoids with FTO

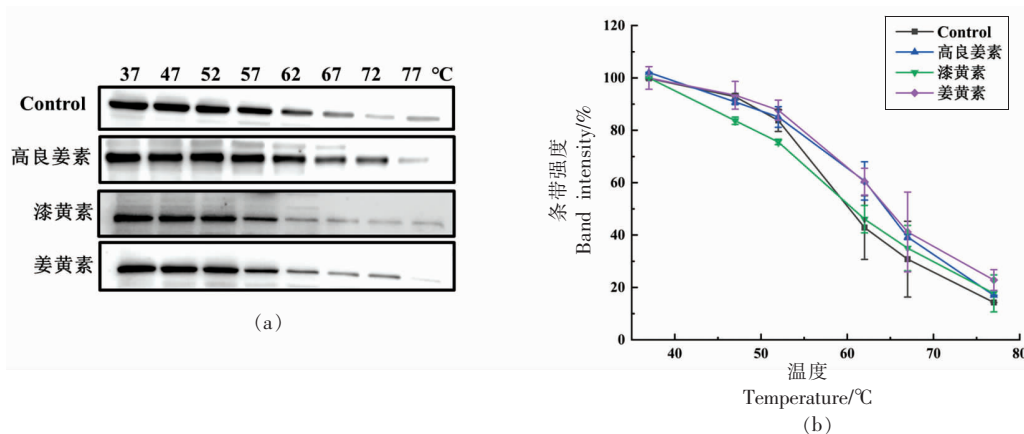


图3 3种黄酮类化合物与FTO结合的细胞热位移分析

Fig.3 Cellular thermal shift assays for the interactions of the three flavonoids with FTO

位置以及与蛋白相关的氨基酸残基。结果表明,3种黄酮类化合物均进入FTO的催化活性空腔,而不是底物结合空腔。除疏水相互作用之外,3种黄酮类化合物与部分残基之间还存在氢键和 $\pi$ -阳离子作用,说明3种黄酮类化合物与FTO的相互作用力有多种类型,结合牢固。此外,黄酮类化合

物与FTO结合的关键氨基酸位点包括:Arg96、His231、His232、Asp233、His307、Arg322,而这些氨基酸残基对于FTO发挥去甲基化酶活性至关重要<sup>[42]</sup>。故黄酮类化合物与FTO的结合很可能潜在影响其去甲基化酶活性,从而影响细胞内m6A水平。

表1 3种黄酮类化合物与FTO蛋白的对接结果

Table 1 The docking results of three flavonoids with FTO protein

化合物	对接能/ $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$	氨基酸残基
高良姜素	-7.52	His231*, His232*, Arg322*, Val64, Tyr106, Tyr108, Val228, Glu234
漆黄素	-7.12	Arg96*, Asp233*, His307*, Arg322*, Tyr106, Tyr108, Glu234, Tyr295, Thr320
姜黄素	-8.3	Arg96*, His231*, Asp233*, Arg322*, Pro93, Tyr106, Tyr108, Leu109, Lys216, Met226, Glu234

注:\*.表示FTO发挥催化活性的关键氨基酸位点。

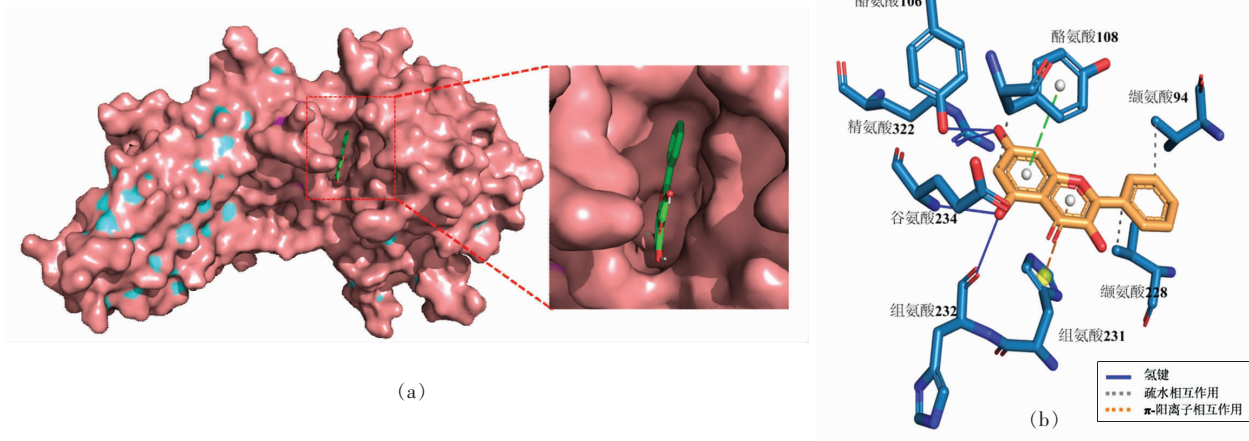


图4 高良姜素与FTO蛋白相互作用的三维模型(a)及作用方式与位点(b)

Fig.4 Three-dimensional model of interaction between galangin and FTO protein (a) and their interaction mode and site (b)

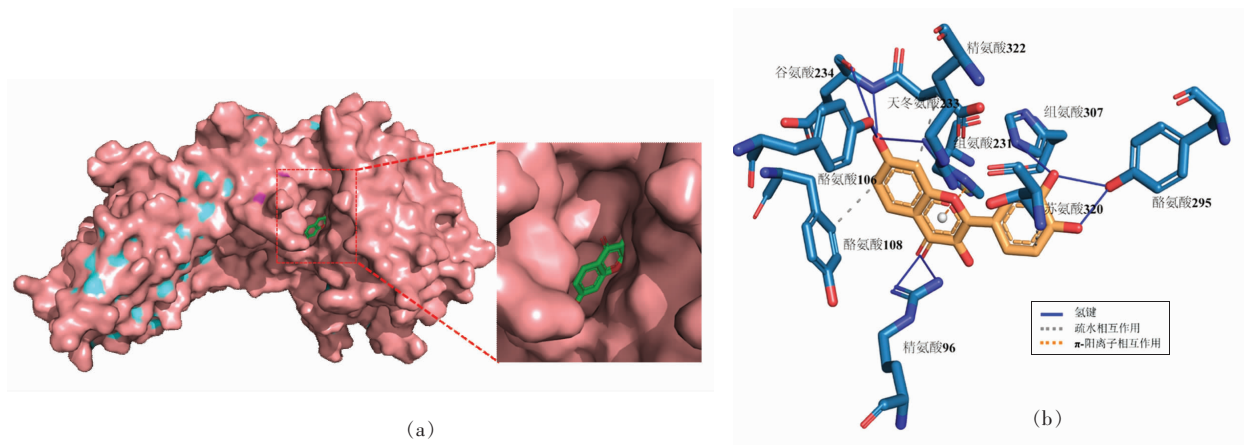


图 5 漆黄素与 FTO 蛋白相互作用的三维模型(a)及作用方式与位点(b)

Fig.5 Three-dimensional model of interaction between fisetin and FTO protein (a) and their interaction mode and site (b)

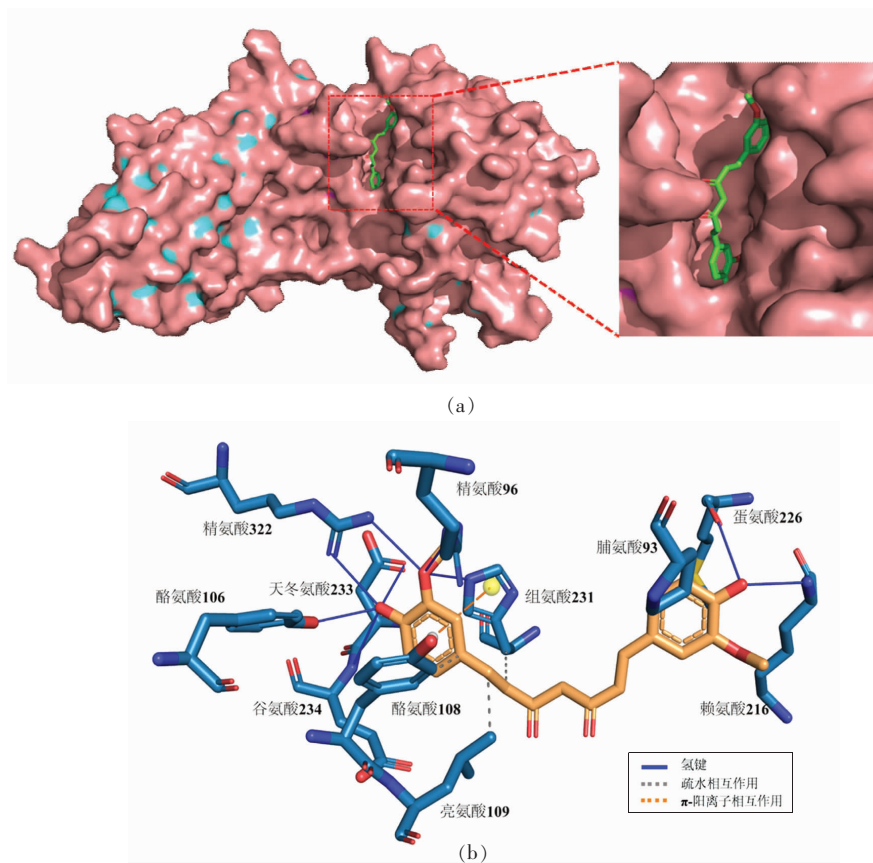


图 6 姜黄素与 FTO 蛋白相互作用的三维模型(a)及作用方式与位点(b)

Fig.6 Three-dimensional model of interaction between curcumin and FTO protein (a) and their interaction mode and site (b)

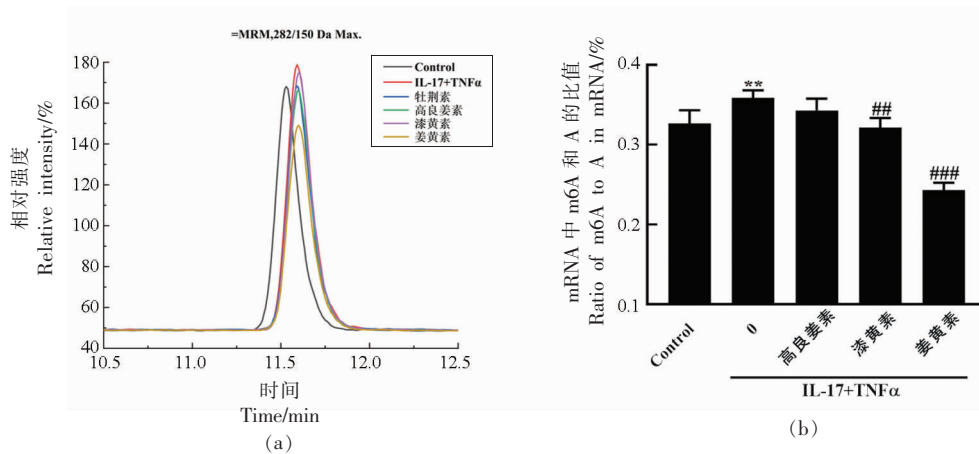
### 2.4 3种黄酮类化合物对细胞内 m6A 水平的影响

研究表明,m6A 水平的异常升高促进了细胞炎症反应并引发慢性代谢性疾病<sup>[43]</sup>。因此,为了确

定 3 种黄酮类化合物是否可以调节细胞中 FTO 介导的 m6A 去甲基化,评估了在低水平炎症模型下黄酮类化合物对细胞内 mRNA m6A 水平的影响。用高良姜素、漆黄素或姜黄素处理人脐静脉内

皮细胞,通过 Agilent 6430 QQQ 三重串联四极杆质谱仪,把 RNA 打碎成核苷和碱基,通过质谱谱图和峰强度计算出 m6A 和总 A 的比例,从而得知 m6A 的整体水平。图 7a 为 3 种黄酮类化合物处理细胞后的 m6A 质谱谱图,结果显示姜黄素的峰面

积最小,m6A 水平最低。如图 7b 所示,在 IL-17 和 TNF $\alpha$  联合诱导的低水平炎症模型下,细胞内 mRNA m6A 水平显著升高,而 3 种黄酮类化合物均能降低 mRNA m6A 的水平,其中姜黄素对 m6A 水平的降低作用最为显著。



注:与对照组比较,\*\*.  $P < 0.01$ ;与模型组比较,##.  $P < 0.01$ ,###.  $P < 0.001$ 。

图 7 3 种黄酮类化合物处理后细胞内 m6A 的质谱图(a)和 m6A/A 的比值(b)

Fig.7 Mass spectrogram (a) and m6A/A ratio (b) of m6A in cells treated with the three flavonoids

### 3 结论

姜黄素、漆黄素、高良姜素均能与 FTO 蛋白结合,且提高了蛋白耐酶解能力及热稳定性;这 3 种黄酮类化合物均结合在 FTO 蛋白的催化活性空腔,重要的氨基酸结合位点包括:Arg96、His231、His232、Asp233、His307、Arg322,从而通过潜在活化 FTO 活性来降低细胞内的 RNA m6A 甲基化水平,其中姜黄素的作用效果最好。本研究结果为 FTO 作为黄酮类化合物预防代谢性疾病的作用靶点提供理论依据,并为以 FTO 为靶点寻找新的预防代谢性疾病的药物或膳食补充剂提供科学数据,而 FTO 下游具体的去甲基化靶 RNA 有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] HOSSAIN P, KAWAR B, EL N M. Obesity and diabetes in the developing world—a growing challenge[J]. The New England Journal of Medicine, 2007, 356(3): 213–215.
- [2] OGDEN C L, CARROLL M D, CURTIN L R, et

al. Prevalence of high body mass index in US children and adolescents, 2007–2008[J]. JAMA, 2010, 303(3): 242–249.

- [3] HOTAMISLIGIL G S. Inflammation and metabolic disorders[J]. Nature, 444(7121): 860–867.
- [4] LANCASTER G I, FEBBRAIO M A. The immunomodulating role of exercise in metabolic disease [J]. Trends in Immunology, 2014, 35(6): 262–269.
- [5] HAWIGER J, ZIENKIEWICZ J. Decoding inflammation, its causes, genomic responses, and emerging countermeasures [J]. Scandinavian Journal of Immunology, 2019, 90(6): e12812.
- [6] MEDZHITOV R, HORNG T. Transcriptional control of the inflammatory response[J]. Nature Reviews Immunology, 2009, 9(10): 692–703.
- [7] MEDZHITOV R. Origin and physiological roles of inflammation[J]. Nature, 2008, 454(7203): 428–435.
- [8] NEMAT KHANSARI Y S M M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer [J]. Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery, 2009, 3(1): 73–80.



- [9] VU L P, CHENG Y, KHARAS M G. The biology of m6A RNA methylation in normal and malignant hematopoiesis [J]. *Cancer Discovery*, 2018, 9 (1): 25–33.
- [10] PRIYADHARSINI V, ARUMUGAM P, SUBRAMANIAN R. Implications of m6A modification in autoimmune disorders [J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2019, 16(11): 1–2.
- [11] 王新霞, 朱琳娜, 陈菁青, 等. 脂肪细胞 mRNA m6A 甲基化水平调控及与脂肪沉积的关系: 第七届中国饲料营养学术研讨会论文集[C]. 北京: 中国农业大学出版社, 2014: 328.
- WANG X X, ZHU L N, CHEN J Q, et al. Regulation of mRNA m6A methylation level in adipocytes and its relationship with fat deposition: Proceedings of the 7<sup>th</sup> China Symposium on Feed Nutrition[C]. Beijing: China Agricultural University Press, 2014: 328.
- [12] CHURCH C, MOIR L, MCMURRAY F, et al. Overexpression of FTO leads to increased food intake and results in obesity [J]. *Nature Genetics*, 2010, 42(12): 1086–1092.
- [13] HUANG Y, SU R, SHENG Y, et al. Small-molecule targeting of oncogenic FTO demethylase in acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Cell*, 2019, 35 (4): 677–691.
- [14] CHURCH C, LEE S, BAGG E A L, et al. A mouse model for the metabolic effects of the human fat mass and obesity associated FTO gene [J]. *PLOS Genetics*, 2009, 5(8): e1000599.
- [15] SHEN X P, LING X, LU H, et al. Low expression of microRNA-1266 promotes colorectal cancer progression via targeting FTO [J]. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 2018, 22 (23): 8220–8226.
- [16] ZHOU S, BAI Z L, XIA D, et al. FTO regulates the chemo-radiotherapy resistance of cervical squamous cell carcinoma (CSCC) by targeting  $\beta$ -catenin through mRNA demethylation [J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2018, 57(5): 590–597.
- [17] LI J, ZHU L, SHI Y, et al. m6A Demethylase FTO promotes hepatocellular carcinoma tumorigenesis via mediating PKM2 demethylation [J]. *American Journal of Translational Research*, 2019, 11 (9): 6084–6092.
- [18] LI J, HAN Y, ZHANG H, et al. The m6A demethylase FTO promotes the growth of lung cancer cells by regulating the m6A level of USP7 mRNA [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 512(3): 479–485.
- [19] VAN DER WERF I, JAMIESON N. The Yin and Yang of RNA methylation: An imbalance of erasers enhances sensitivity to FTO demethylase small-molecule targeting in leukemia stem cells [J]. *Cancer Cell*, 2019, 35(4): 540–541.
- [20] 糜漫天, 易龙, 常微, 等. 表遗传调节方式在植物化学物预防慢性代谢性疾病中的作用[C]. 杭州: 中国营养学会全国营养科学大会暨国际 DRIs 研讨会, 2013: 46–47.
- MI M T, YI L, CHANG H, et al. The role of epigenetic regulation in the prevention of chronic metabolic diseases by phytochemicals [C]. Hangzhou: National Nutrition Science Conference of Chinese Nutrition Society and International DRIs Seminar, 2013: 46–47.
- [21] 付永平, 刘如明, 肖建辉. 植物源天然产物抗炎活性研究进展 [J]. *医药导报*, 2020, 39(5): 666–671.
- FU Y P, LIU R M, XIAO J H. Research progress on anti-inflammatory activity of natural products from plants [J]. *Medical Review*, 2020, 39(5): 666–671.
- [22] 郭雷, 龚邦强. 金叶子中抑制膜结合型 PGE2 合酶-1 表达活性物质的分离与鉴定 [J]. *天然产物研究与开发*, 2008(5): 839–841.
- GUO L, GONG B Q. Isolation and identification of active substances inhibiting the expression of membrane-bound PGE2 synthase-1 in gold leaf [J]. *Natural Products Research and Development*, 2008 (5): 839–841.
- [23] LI L, LEUNG P S. Use of herbal medicines and natural products: An alternative approach to overcoming the apoptotic resistance of pancreatic cancer [J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2014, 53: 224–236.
- [24] LIN L T, HSU W C, LIN C C. Antiviral natural products and herbal medicines [J]. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2014, 4 (1): 24–35.
- [25] SEELINGER G, MERFORT I, WÖLFLE U, et al. Anti-carcinogenic effects of the flavonoid luteolin [J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2019, 2008, 13 (10): 2628–2651.

- [26] NAVARRA M, FEMIA A P, ROMAGNOLI A, et al. A flavonoid-rich extract from bergamot juice prevents carcinogenesis in a genetic model of colorectal cancer, the Pirr rat (F344/NTac-Ap-cam1137)[J]. *European Journal of Nutrition*, 2020, 59(3): 885-894.
- [27] FENG R, ZHANG X, YIN J, et al. A comprehensive study of the metabolism of flavonoid oroxin B *in vivo* and *in vitro* by UHPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2021, 197: 1139055.
- [28] KOZŁOWSKA A, SZOSTAK WEGIEREK D. Flavonoids—food sources and health benefits [J]. *Roczniki Państwowego Zakadu Higieny*, 2014, 65(2): 79-85.
- [29] TEIXEIRA S, SIQUET C, ALVES C, et al. Structure-property studies on the antioxidant activity of flavonoids present in diet [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2005, 39(8): 1099-1108.
- [30] HUANG H, CHEN A Y, ROJANASAKUL Y, et al. Dietary compounds galangin and myricetin suppress ovarian cancer cell angiogenesis [J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 15: 464-475.
- [31] DEVADOSS D, RAMAR M, CHINNASAMY A. Galangin, a dietary flavonol inhibits tumor initiation during experimental pulmonary tumorigenesis by modulating xenobiotic enzymes and antioxidant status [J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2018, 41(3): 265-275.
- [32] SZLISZKA E, HELEWSKI K J, MIZGALA E, et al. The dietary flavonol fisetin enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in prostate cancer cells [J]. *International Journal of Oncology*, 2011, 39(4): 771-779.
- [33] HYTTI M, SZABÓ D, PIIPPO N, et al. Two dietary polyphenols, fisetin and luteolin, reduce inflammation but augment DNA damage-induced toxicity in human RPE cells [J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2017, 42: 37-42.
- [34] YKABC D, MIN L, GG E, et al. Effects of dietary curcumin inhibit deltamethrin-induced oxidative stress, inflammation and cell apoptosis in *Channa argus* via Nrf2 and NF- $\kappa$ B signaling pathways [J]. *Aquaculture*, 2021, 540: 736744.
- [35] KUNNUMAKKARA A B, BORDOLOI D, PADMAVATHI G, et al. Curcumin, the golden nutraceutical: Multitargeting for multiple chronic diseases [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2017, 174(11): 1325-1348.
- [36] WANG L, SONG C, WANG N, et al. NADP modulates RNA m6A methylation and adipogenesis via enhancing FTO activity [J]. *Nature Chemical Biology*, 2020, 16(12): 1394-1402.
- [37] ADASME M F, LINNEMANN K L, NAOMI B S, et al. PLIP 2021: Expanding the scope of the protein-ligand interaction profiler to DNA and RNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): W530-W534.
- [38] 杨玲玲. FTO蛋白与小分子药物及类似物相互作用的光谱法研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2016.
- YANG L L. Spectroscopic study on interaction of FTO protein with small molecule drugs and analogues [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2016.
- [39] 韩鑫鑫. 光谱法探究 FTO 蛋白与小分子结构类似物的相互作用[D]. 郑州: 郑州大学, 2019.
- HAN X X. Study on the interaction between FTO protein and small molecule structure analogues by spectroscopic method [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2019.
- [40] GERKEN T, GIRARD C A, TUNG Y C, et al. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase [J]. *Science*, 2007, 318(5855): 1469-1472.
- [41] LOMENICK B, JUNG G, WOHLSCHEGEL J A, et al. Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS) [J]. *Current Protocols in Chemical Biology*, 2011, 3(4): 163-180.
- [42] HAN Z, NIU T, CHANG J, et al. Crystal structure of the FTO protein reveals basis for its substrate specificity [J]. *Nature*, 2010, 464(7292): 1205.
- [43] CHIEN C S, LI J Y, CHIEN Y, et al. METTL3-dependent N6-methyladenosine RNA modification mediates the atherogenic inflammatory cascades in vascular endothelium [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2021, 118(7): e2025070118.

## Several Common Flavonoids Target FTO Protein to Affect RNA m6A Modification

Gan Ting, Li Wenwen, Li Nan, Deng Zeyuan, Zheng Liufeng\*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047)

**Abstract** Abnormal methylation of RNA m6A is an important cause of the occurrence and development of many metabolic diseases, and flavonoids have the effects of preventing metabolic diseases, but the mechanism of action is not clear. In this study, unlabeled biomolecular interaction techniques were performed to investigate the interactions between the three common flavonoids (curcumin, fisetin and galangin) and demethylase FTO, and molecular docking technique was further used to reveal the mechanism of the interactions. The effect of the interaction of flavonoids with FTO on RNA m6A demethylation was investigated using an *in vitro* cell model of low-grade inflammation. The results showed that curcumin, fisetin and galangin could significantly quench the fluorescence of FTO protein, and increased the resistance to protease hydrolysis and thermal stability of FTO, suggesting that all the three flavonoids can directly bind to FTO. Molecular docking results showed that these three flavonoids bound to the catalytic cavity of FTO protein, and the key amino acid binding sites included Arg96, His231, His232, Asp233, His307, and Arg322, thus potentially activating the demethylation activity of FTO. Furthermore, *in vitro* low-grade inflammation led to an increase in intracellular RNA m6A methylation, and the direct binding of curcumin, fisetin and galangin to FTO, inhibited the inflammation-induced increase in RNA m6A methylation, of which curcumin had the most obvious effect. The results of this study provide a theoretical basis for FTO as a novel target of flavonoids in the prevention of metabolic diseases.

**Keywords** flavonoids; FTO protein; m6A methylation modification; metabolic disease; inflammation