

衣康酸生物学功能的研究进展

朱 鑫

(沈阳农业大学畜牧兽医学院,沈阳 110866)

摘要: 衣康酸是聚合物产业的基础化工产品之一,通过微生物发酵方式实现可再生原材料的生产。哺乳动物体内的衣康酸生物合成途径直到最近才被揭示出来,即三羧酸(TCA)循环中间产物顺乌头酸在顺乌头酸脱羧酶(CAD)/免疫响应基因1蛋白(IRG1)作用下生成衣康酸。生成的衣康酸具有抑制磷酸果糖激酶2(PFK2)和琥珀酸脱氢酶(SDH)活性的作用。此外,衣康酸也具有抗菌、抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗病毒、营养代谢调控等生物学功能。因此,本文主要就衣康酸的生物学功能最新进展进行综述。

关键词: 衣康酸;免疫调节;营养调控;肿瘤;氧化应激;抗菌活性

中图分类号: S816.7

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2020)03-0998-05

衣康酸是一种有机不饱和二羧酸,是线粒体三羧酸(TCA)循环产生的重要代谢产物。1836年,瑞士化学家 Samuel Baup 首次在柠檬酸蒸馏产品中发现了衣康酸。1840年,衣康酸首次经化学合成途径由顺乌头酸脱羧反应获得。一直以来,衣康酸因其亚甲基中的双键特征在聚合物合成方面有着广泛的应用^[1]。目前,衣康酸的生产主要是通过微生物合成途径实现的,可以生产衣康酸的微生物主要包括丝状真菌、酵母、担子真菌、细菌等^[2]。同时,我国是世界上最大的衣康酸生产国^[3]。

直到2011年,在哺乳动物免疫细胞中才首次发现了衣康酸的生物合成^[4]。2013年,哺乳动物衣康酸的生物合成途径才首次被揭示出来。在巨噬细胞中,衣康酸是在免疫响应基因1(immuneresponsive gene 1, IRG1)编码的免疫响应基因1蛋白(immuneresponsive gene 1 protein, IRG1)催化下,TCA循环中间产物顺乌头酸经脱羧反应获得^[5]。生成的衣康酸具有抑制磷酸果糖激酶2(PFK2)和琥珀酸脱氢酶(SDH)活性的功能。自此,衣康酸的生物学功能逐渐被揭示出来,并引起

了研究人员的广泛兴趣。因此,本文主要就最新发现的衣康酸的生物学功能进行综述。

1 衣康酸的抗菌功能

衣康酸是通过抑制细菌异柠檬酸裂解酶(ICL)活性发挥抗菌作用的。ICL是乙醛酸循环中的关键酶,且乙醛酸循环不存在于动物体内,但却是细菌生存的关键^[6-7]。当处于慢性感染状态时,细菌营养代谢发生明显改变,即优先利用脂肪酸 β -氧化产生的碳源^[7]。同时,细菌糖酵解效应降低,乙醛酸循环效应提升,以维持TCA循环和通过糖异生途径吸收碳源^[8]。某些病原菌(如肺结核分枝杆菌、肠道沙门氏菌)在动物体内存活的关键正是由于ICL的作用,而且ICL只存在于原核生物、低等真核生物和植物中,因此ICL是研发抗菌药物的一个理想靶点^[9]。

此外,ICL具有甲基异柠檬酸裂解酶(MCL)活性^[10]。MCL是细菌解毒宿主巨噬细胞胆固醇脂肪酸 β -氧化产生的丙酰辅酶A(CoA)的关键酶^[11],衣康酸抑制ICL活性能够对细菌产生额外的毒性效应,提高抗菌效果。另外,Michelucci

收稿日期:2019-08-26

基金项目:辽宁省科技厅项目(201601113);沈阳农业大学博士科研启动基金项目(880416011)

作者简介:朱鑫(1985—),男,辽宁凤城人,博士,从事营养免疫与饲料资源开发利用研究。E-mail: zhuxin@syau.edu.cn

等^[5]研究表明,衣康酸与丙酸连用,具有协同抑菌活性。衣康酸的种属靶向性和毒性增强效应使其在生物医药等领域具有非常广阔的应用前景,同时,衣康酸是哺乳动物细胞自身生成的,具有无残留、无污染等特点,在食品、饲料等领域也具有巨大的应用潜力。然而,衣康酸与其他有机酸之间是否具有协同或拮抗效应值得进一步研究。

2 衣康酸是新的抗肿瘤靶点

与正常机体细胞相比,肿瘤细胞消耗大量的葡萄糖,释放糖酵解代谢产物,具有较高的糖酵解速率^[12]。肿瘤细胞与 T 细胞竞争葡萄糖等养分,而且其代谢产物(如乳酸),参与巨噬细胞极化作用,提升血管内皮生长因子含量和精氨酸酶活性,促使机体巨噬细胞向肿瘤细胞方向转变^[13-14]。这种极化作用通过改变葡萄糖代谢的关键信号,促使细胞发生代谢重组。激活的巨噬细胞一般是通过蛋白激酶 B (AKT)/雷帕霉素靶蛋白(mTOR)/低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 途径提升糖酵解途径,但是相对地,肿瘤细胞往往是通过氧化磷酸化(OXPHOS)途径改变细胞代谢^[15]。因此,关键细胞代谢产物对肿瘤细胞的形成和发育具有重要的作用。Weiss 等^[15]研究表明,患肿瘤小鼠的巨噬细胞中衣康酸水平显著提升,在肿瘤形成过程中起着重要的作用,同时利用慢病毒短发夹 RNA (shRNA) 技术阻止肿瘤细胞衣康酸的生成,结果证实衣康酸是通过 OXPHOS 途径产生的活性氧(ROS)促进肿瘤生长,同时伴随着 ROS 激活肿瘤细胞丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路。因此,以衣康酸和 ROS 为靶点的细胞代谢基础的抗肿瘤治疗手段具有广泛的应用前景。

3 衣康酸的抗炎功能

衣康酸是机体内源免疫系统重要的效应器分子。机体受到应激时,免疫细胞(如巨噬细胞)会合成并分泌衣康酸。合成的衣康酸通过抑制促炎症细胞因子的产生发挥抗炎作用,保护细胞抵抗过氧化氢(H₂O₂)的氧化发挥抗氧化功能^[16-20]。体内试验结果表明,衣康酸还能够减轻败血症等疾病的症状^[18-19]。

最近研究表明,衣康酸是通过激活细胞核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 发挥抗炎功能的^[18]。Nrf2 是细胞应对氧化和亲电子应激时的调控细胞

保护反应的主要转录因子。在正常条件下,Keap1 样 ECH 相关蛋白 1 (KEAP1) 与胞质中的 Nrf2 结合,通过蛋白酶体系统促进 Nrf2 蛋白降解。一旦受到氧化和亲电子应激,KEAP1 蛋白的半胱氨酸(Cys)残基发生改变,促使 Nrf2 转入到细胞核中,启动多种氧化还原和脱毒基因转录。衣康酸能够对 KEAP1 中 Cys 残基进行烷基化,阻止 KEAP1 与 Nrf2 之间的相互作用,从而促使 Nrf2 转入到细胞核中。衣康酸减少了脂多糖(LPS)刺激的巨噬细胞促炎症因子和反应 ROS 的生成,发挥抗炎作用,提高败血症小鼠的早期存活率^[18]。

衣康酸除了通过 KEAP1-Nrf2 途径发挥抗炎功能外,还可以通过核因子 κ B 抑制因子 ζ (I κ B ζ)—激活转录因子 3 (ATF3) 途径发挥抗炎功能^[19]。免疫细胞经 Toll 样受体(TLR)激活后,启动主要的和次级的转录反应,诱导多种细胞因子表达。调控次级转录反应的重要调节蛋白就是 I κ B ζ 。衣康酸能够完全抑制 I κ B ζ 蛋白的诱导及其靶基因表达,但不会影响核因子- κ B (NF- κ B) 途径信号通路,表明衣康酸抑制 I κ B ζ 蛋白的作用发生于转录后水平。衣康酸处理巨噬细胞后,ATF3 蛋白表达升高,而且这种调控作用是不依赖于 Nrf2 途径的。当缺失 ATF3 时,衣康酸不能抑制 I κ B ζ 蛋白的表达^[19]。由此可见,衣康酸不仅是细胞发生炎症反应的代谢产物,而且具有炎症调节的功能。未来的研究可能需要进一步明确衣康酸的调节信号通路,以及受控调节因子,以期在炎症性疾病的治疗和诊断中得到应用和发展。

4 衣康酸的抗氧化功能

氧化应激是机体遭受各种有害刺激时,体内产生大量的 ROS,引起氧化-抗氧化平衡失调,从而导致细胞和组织的生理病理反应。ROS 包括分子氧及各种细胞氧化代谢产物,如超氧阴离子、羟自由基、H₂O₂、过氧亚硝基等^[16]。虽然低水平的 ROS 可以激活代谢信号和增强细胞的存活和增殖,然而高水平的 ROS 诱导蛋白质、脂质、DNA 等发生氧化损伤,最终导致细胞凋亡和死亡^[16,20]。

体内存在多种氧化-抗氧化信号通路,目前研究发现,衣康酸的抗氧化功能主要是通过 Keap1-Nrf2-ARE (抗氧化反应序列元件) 通路完成的。衣康酸促使 Nrf2 与 Keap1 解离而激活,激活后的 Nrf2 进入到细胞核,与 ARE 结合,促进血红

素氧化酶-1(*HO-1*)、*NAD(P)H*:醌氧化还原酶 1(*NQO1*)、 γ -谷酰基半胱氨酸连接酶催化亚基(*GCLC*)等基因的表达,提高机体的抗氧化能力^[16,18,20]。衣康酸的这种抗氧化能力可能在医药开发、食品和饲料加工与储藏等方面具有一定的应用价值。

5 衣康酸的抗病毒功能

目前研究表明,衣康酸不是直接发挥抗病毒功能的,而是通过细胞代谢重组的方式间接完成的。细胞病毒识别受体主要包括 DNA 感受器环磷酸鸟苷-腺苷酸合成酶(*cGAS*)和 RNA 感受器视黄酸诱导基因-1(*RIG-I*)和黑色素瘤分化基因-5(*MDA-5*)^[21-22]。*cGAS*通过转接蛋白干扰素基因刺激因子(*STING*)发挥信号转导作用,促进干扰素 α/β (*IFN* α/β)等抗病毒细胞因子的产生,发挥抗病毒作用^[23]。适量的 *IFN* α/β 有助于保护细胞抵抗病毒感染,但是过量的 *IFN* α/β 导致细胞发生病理变化。*Olagnier* 等^[24]发现,衣康酸诱导细胞发生代谢重组,激活 *Nrf2*,激活的 *Nrf2* 通过抑制转接蛋白 *STING* 的表达,使得病毒胞质传感路径受到抑制,减少了 *IFN* α/β 的释放,从而达到抗病毒的作用。

除了 *Nrf2* 途径,衣康酸还可以通过抑制琥珀酸脱氢酶(*SDH*)发挥抗病毒功能。一般情况下,病毒侵袭细胞后,细胞通过受体相互作用蛋白激酶(*RIPK*)途径启动程序性细胞坏死性凋亡。*Daniels* 等^[25]发现,激活 *RIPK* 能够上调 *IRG1* 基因表达和促进衣康酸的生成,且生成的衣康酸抑制 *SDH* 活性,改变细胞代谢,抑制病毒复制,从而达到抗病毒的作用。因此,提高 *IRG1* 蛋白表达和衣康酸生成代表了一种新型的抗病毒策略。

最近, *Sethy* 等^[26]通过细胞筛选试验,从 20 000 个化合物中筛选出了 1 个具有抗流感 A 病毒活性的衣康酸衍生物。基于此化合物的结构和特性,研究人员设计并合成了一系列衣康酸衍生物,筛选出其中一个化合物的抗流感 A 病毒活性为半最大效应浓度(EC_{50}) = 0.14 $\mu\text{mol/L}$,其细胞选择指数大于 785,通过抑制病毒复制发挥作用。衣康酸的间接抗病毒功能在开发疫苗佐剂、抗病毒药物等方面具有潜在的应用前景。

6 衣康酸的营养代谢调控功能

作为 TCA 循环的代谢产物,衣康酸在营养代谢调控方面起着重要的作用。在糖酵解过程中,6-磷酸果糖在磷酸果糖激酶 1(*PFK1*)作用下转变成 1,6-二磷酸果糖,且这一过程是不可逆的,是糖酵解过程中的限速步骤。而 *PFK2* 也可催化 6-磷酸果糖,但其产物是 2,6-二磷酸果糖。2,6-二磷酸果糖通过别构效应激活 *PFK1*,进而使糖酵解过程继续进行。在体内,2,6-二磷酸果糖是最强的 *PFK1* 激活剂,其效率远超过腺苷三磷酸(*ATP*)。因此,调控 *PFK2* 活性可以实现调控糖酵解途径的目的。研究表明,衣康酸具有抑制 *PFK2* 活性的作用。这种抑制作用的结果是,减少 2,6-二磷酸果糖生成,降低 *PFK1* 活性,进而干扰糖酵解途径,导致终产物丙酮酸减少^[12]。丙酮酸进入 TCA 循环是机体能量代谢的关键。在免疫应激状态下,衣康酸的这种抑制作用类似一种“阀门”,从源头上减少了能量物质的供给,有利于减少能量消耗,甚至降低脂肪酸合成,有利于蛋白质沉积。之前的研究结果已表明,在小鼠饲料中添加衣康酸,可以抑制葡萄糖转变成脂肪,减少内脏脂肪沉积,维持体蛋白质平衡^[27]。

除了影响糖酵解途径,衣康酸还通过影响 TCA 循环过程中关键酶活性发挥能量代谢调控作用。*Thekla* 等^[28]研究表明,衣康酸可以抑制 TCA 循环中 *SDH* 的活性,导致琥珀酸累积,无法进入 TCA 循环的下游途径进行代谢和产生能量,从而减少能量消耗和脂肪合成。研究发现,细胞内琥珀酸累积可激活 *HIF-1 α* 。当机体受到应激时(如 *LPS* 刺激),激活的免疫细胞(如巨噬细胞)代谢会偏向糖酵解途径,同时炎症部位氧水平显著降低,呈现出低氧状态,而 *HIF-1 α* 的激活正是这一过程的关键^[29]。*HIF-1 α* 能够诱导糖酵解途径关键酶和相关细胞因子表达,从而调控细胞能量代谢。如 *HIF-1 α* 的激活可以提高葡萄糖转运载体 1(*GLUT1*)、*GLUT3*、*PFK1*、*PFK2* 的表达,同时伴随着 *IL-1 β* 、*ROS* 等细胞因子的生成^[30]。

目前,衣康酸的研究集中在小鼠、免疫细胞等方面,在畜禽上的研究还未见报道。衣康酸调控 *PFK2* 和 *SDH* 的功能在机体糖代谢、脂肪合成、蛋白质沉积等方面可能起着重要的作用。在机体发生应激情况下,衣康酸不仅发挥免疫调节作用,而

且在调控营养物质代谢方面也起着重要的作用,具有开发成营养调控剂的潜力。

7 小结与展望

随着哺乳动物体内合成途径被揭示出来,衣康酸的多生物学功能特性逐渐引起了人们的兴趣。机体受到病原侵袭或应激时,细胞合成并分泌的衣康酸在免疫调节、抗氧化、抗菌、抗病毒等方面发挥着重要的作用,有望在生物医药、生物材料、食品安全等方面得到广泛的应用。另外,通过抑制 PFK2 和 SDH 活性,衣康酸调控机体营养代谢功能的机制尚需进一步深入研究。在畜禽养殖方面,衣康酸是否能够提高畜禽抗应激能力和生产性能值得进一步研究,以期促进畜禽养殖业的健康发展。

参考文献:

- [1] CORDES T, MICHELUCCI A, HILLER K. Itaconic acid: the surprising role of an industrial compound as a mammalian antimicrobial metabolite [J]. *Annual Review of Nutrition*, 2015, 35: 451-473.
- [2] KUENZ A, KRULL S. Biotechnological production of itaconic acid-things you have to know [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102 (9): 3901-3914.
- [3] DA CRUZ J C, DE CASTRO A M, SÉRVULO E F C. World market and biotechnological production of itaconic acid [J]. *3 Biotech*, 2018, 8: 138.
- [4] STRELKO C L, LU W Y, DUFORT F J, et al. Itaconic acid is a mammalian metabolite induced during macrophage activation [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133 (41): 16386-16389.
- [5] MICHELUCCI A, CORDES T, GHELFI J, et al. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110 (19): 7820-7825.
- [6] PATEL T R, MCFADDEN B A. *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*: inhibition of isocitrate lyase by itaconate [J]. *Experimental Parasitology*, 1978, 44 (2): 262-268.
- [7] HILLIER S, CHARNETZKY W T. Glyoxylate bypass enzymes in *Yersinia* species and multiple forms of isocitrate lyase in *Yersinia pestis* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1981, 145 (1): 452-458.
- [8] SHARMA V, SHARMA S, ZU BENTRUP K H, et al. Structure of isocitrate lyase, a persistence factor of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Nature Structural Biology*, 2000, 7 (8): 663-668.
- [9] RUSSELL D G. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001, 2 (8): 569-578.
- [10] MUNOZ-ELIAS E J, UPTON A M, CHERIAN J, et al. Role of the methylcitrate cycle in *Mycobacterium tuberculosis* metabolism, intracellular growth, and virulence [J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 60 (5): 1109-1122.
- [11] RUSSELL D G, VANDERVEN B C, LEE W, et al. *Mycobacterium tuberculosis* wears what it eats [J]. *Cell Host & Microbe*, 2010, 8 (1): 68-76.
- [12] RYAN D G, MURPHY M P, FREZZA C, et al. Coupling Krebs cycle metabolites to signalling in immunity and cancer [J]. *Nature Metabolism*, 2019, 1 (1): 16-33.
- [13] CHANG C H, QIU J, O' SULLIVAN D, et al. Metabolic competition in the tumor microenvironment is a driver of cancer progression [J]. *Cell*, 2015, 162 (6): 1229-1241.
- [14] COLEGIO O R, CHU N Q, SZABO A L, et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid [J]. *Nature*, 2014, 513 (7519): 559-563.
- [15] WEISS J M, DAVIES L C, KARWAN M, et al. Itaconic acid mediates crosstalk between macrophage metabolism and peritoneal tumors [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2018, 128 (9): 3794-3805.
- [16] LIU H, FENG Y, XU M, et al. Four-octyl itaconate activates Keap1-Nrf2 signaling to protect neuronal cells from hydrogen peroxide [J]. *Cell Communication and Signaling*, 2018, 16: 81.
- [17] TANG C, WANG X, XIE Y, et al. 4-octyl itaconate activates Nrf2 signaling to inhibit pro-inflammatory cytokine production in peripheral blood mononuclear cells of systemic lupus erythematosus patients [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 51 (2): 979-990.
- [18] 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.
- [19] BAMBOUSKOVA M, GORVEL L, LAMPROPOU-

- LOU V, et al. Electrophilic properties of itaconate and derivatives regulate the I κ B ζ -ATF3 inflammatory axis [J]. *Nature*, 2018, 556(7702): 501–504.
- [20] TANG C, TAN S Y, ZHANG Y Q, et al. Activation of Keap1-Nrf2 signaling by 4-octyl itaconate protects human umbilical vein endothelial cells from high glucose [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 508(3): 921–927.
- [21] ABLASSER A, GOLDECK M, CAVLAR T, et al. cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING [J]. *Nature*, 2013, 498(7454): 380–384.
- [22] LOO Y M, FORMEK J, CROCHET N, et al. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity [J]. *Journal of Virology*, 2008, 82(1): 335–345.
- [23] BURDETTE D L, MONROE K M, SOTELO-TROHA K, et al. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP [J]. *Nature*, 2011, 478(7370): 515–518.
- [24] OLAGNIER D, BRANDTOFT A M, GUNDERSTOFTE C, et al. Nrf2 negatively regulates STING indicating a link between antiviral sensing and metabolic reprogramming [J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 3506.
- [25] DANIELS B P, KOFMAN S B, SMITH J R, et al. The Nucleotide sensor ZBP1 and kinase RIPK3 induce the enzyme IRG1 to promote an antiviral metabolic state in neurons [J]. *Immunity*, 2019, 50(1): 64–76.
- [26] SETHY B, HSIEH C F, LIN T J, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of itaconic acid derivatives as potential anti-influenza agents [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 62(5): 2390–2403.
- [27] BOOTH A N, TAYLOR J, WILSON R H, et al. The inhibitory effects of itaconic acid *in vitro* and *in vivo* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1952, 195(2): 697–702.
- [28] CORDES T, WALLACE M, MICHELUCCI A, et al. Immunoresponsive gene 1 and itaconate inhibit succinate dehydrogenase to modulate intracellular succinate levels [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(27): 14274–14284.
- [29] BALAMURUGAN K. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer [J]. *International Journal of Cancer*, 2016, 138(5): 1058–1066.
- [30] MINCHENKO O, OPENTANOVA I, CARO J. Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression *in vivo* [J]. *FEBS Letters*, 2003, 554(3): 264–270.

Recent Progress in Biological Functions of Itaconic Acid

ZHU Xin

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: Itaconic acid is one of the basic chemicals for the polymer industry, which can be produced using microbes on the basis of renewable raw materials. Until recently, itaconic acid biosynthesis has just been found in mammalian cells, in which itaconic acid is produced by the decarboxylation of cis-aconitic acid, a tricarboxylic acid (TCA) cycle intermediate, by cis-aconitic acid decarboxylase (CAD)/immune-responsive gene 1 protein (IRG1). Itaconic acid has inhibitory effects on phosphofructokinase 2 (PFK2) and succinate dehydrogenase (SDH). In addition, itaconic acid also plays important roles in anti-microbial, anti-cancer, anti-inflammatory, anti-oxidative, anti-viral and nutrition regulation activities, attracting more attention from researchers for its biological functions. The present review summarizes the research process of biological functions of itaconic acid. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(3): 998-1002]

Key words: itaconic acid; immunoregulation; nutrition regulation; tumour; oxidative stress; antibacterial activity