

20-羟基蜕皮激素对高糖诱导HepG2细胞氧化损伤的作用及机制研究

王梦媛, 刘咸筠, 孟祥龙, 李皓, 李占东, 殷玉和

Role and Mechanism of 20-Hydroxyecdysone in Oxidative Damage of HepG2 Cells Induced by High Glucose

WANG Mengyuan, LIU Xianjun, MENG Xianglong, LI Hao, LI Zhandong, and YIN Yuhe

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023120297>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

异鼠李素调控AKT-FOXO1通路改善胰岛素抵抗HepG2细胞糖代谢作用机制

The Mechanism of Isorhamnetin Regulating AKT-FOXO1 Pathways on Improve the Insulin Resistance Model of HepG2 Cells

食品工业科技. 2020, 41(23): 320-324 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020020179>

芦荟多糖对D-半乳糖致HepG2细胞氧化损伤的保护作用

Protective Effect of Aloe Polysaccharide on Oxidative Stress Injury of HepG2 Cells Induced by D-galactose

食品工业科技. 2023, 44(1): 405-412 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022040037>

山药总蛋白对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞氧化应激的保护作用及机制研究

Protective Effect and Mechanism of Chinese Yam Total Protein on High D-Glucose Induced Oxidative Stress in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

食品工业科技. 2024, 45(11): 307-315 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023060254>

刺五加多糖调控PI3K/Akt/mTOR通路改善大鼠抑郁行为的作用

Ameliorative Effect of *Acanathopanax senticosus* Polysaccharides on Depressive Behavior in Rats by Regulating PI3K/Akt/mTOR Pathway

食品工业科技. 2022, 43(11): 369-375 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021090141>

莲壳多酚对T-BHP致HepG2氧化应激损伤的保护作用

Protective Effects of Polyphenol of Lotus Seed Epicarp on Oxidative Stress Damage Induced by T-BHP

食品工业科技. 2023, 44(12): 397-404 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022070173>

基于PI3K/AKT1通路探讨山西老陈醋对高脂饮食诱导大鼠抗氧化作用机制

Explore the Mechanism of Shanxi Aged Vinegar on High-fat Diet-Induced Antioxidant in Rats Based on PI3K/AKT1 Pathway

食品工业科技. 2023, 44(20): 398-406 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022110310>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

王梦媛, 刘咸筠, 孟祥龙, 等. 20-羟基蜕皮激素对高糖诱导 HepG2 细胞氧化损伤的作用及机制研究 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(20): 369–377. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120297

WANG Mengyuan, LIU Xianjun, MENG Xianglong, et al. Role and Mechanism of 20-Hydroxyecdysone in Oxidative Damage of HepG2 Cells Induced by High Glucose[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(20): 369–377. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120297

· 营养与保健 ·

20-羟基蜕皮激素对高糖诱导 HepG2 细胞氧化损伤的作用及机制研究

王梦媛¹, 刘咸筠², 孟祥龙³, 李 皓², 李占东², 殷玉和^{1,*}

(1. 长春工业大学化学与生命科学学院, 吉林长春 130012;

2. 吉林工程技术师范学院生物与食品工程学院, 吉林长春 130052;

3. 吉林大学第一医院烧伤及皮肤创面修复外科, 吉林长春 130021)

摘要:目的: 探究 20-羟基蜕皮激素 (20-Hydroxyecdysone, 20-HE) 对高糖诱导 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用及相关分子机制。方法: 利用高糖 (50 mmol/L 葡萄糖) 建立 HepG2 细胞氧化损伤模型, 分别采用 CCK-8 法、caspase-3 活性检测实验、荧光探针法和比色法检测细胞的活力、凋亡、活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS)、超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 和丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 的水平。基于生物信息学分析的方法对参与 20-HE 调控作用的相关信号通路进行预测, 采用 Western blot 检测 Akt 蛋白的磷酸化水平, 评价 PI3K/Akt 信号通路的激活水平, 利用 PI3K/Akt 信号通路的抑制剂 (LY294002) 验证其是否参与 20-HE 发挥的调控作用。结果: 20-HE 的浓度低于 20 μ mol/L 对 HepG2 细胞没有显著毒性作用; 20-HE 可以显著提高损伤细胞的活力 ($P<0.05$), 显著抑制损伤细胞的凋亡 ($P<0.05$), 显著下调损伤细胞的 ROS 水平 ($P<0.05$), 显著提高 SOD 和 CAT 的水平 ($P<0.05$), 显著下调 MDA 水平 ($P<0.05$); PI3K/Akt 信号通路是 20-HE 发挥调控作用的潜在下游机制; 20-HE 可以显著上调损伤细胞中 PI3K/Akt 信号通路的水平 ($P<0.05$); LY294002 可以逆转 20-HE 对损伤细胞发挥的保护作用。结论: 20-HE 通过激活 PI3K/Akt 信号通路发挥对高糖诱导 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用。

关键词: 20-羟基蜕皮激素, 高糖, HepG2 细胞, 氧化应激, PI3K/Akt 信号通路

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)20-0369-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120297



本文网刊:

Role and Mechanism of 20-Hydroxyecdysone in Oxidative Damage of HepG2 Cells Induced by High Glucose

WANG Mengyuan¹, LIU Xianjun², MENG Xianglong³, LI Hao², LI Zhandong², YIN Yuhe^{1,*}

(1. College of Chemistry and Life Science, Changchun University of Technology, Changchun 130012, China;

2. College of Biological and Food Engineering, Jilin Engineering Normal University, Changchun 130052, China;

3. Department of Burns Surgery, The First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: Objective: To explore the protective effects of 20-Hydroxyecdysone (20-HE) on high glucose induced HepG2 cells and its related molecular mechanism. Methods: In this study, high glucose (50 mmol/L glucose) was used to establish the oxidative damage model in HepG2 cells. The CCK-8 assay, caspase-3 assay, fluorescent probe method, and colorimetric method were used to assess the levels of cell viability, apoptosis, oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and malondialdehyde (MDA), respectively. The signaling pathways involved in the regulation of 20-HE

收稿日期: 2023-12-27

基金项目: 吉林省科技发展规划项目 (20210202059NC, 20220202076NC, 20220202088NC)。

作者简介: 王梦媛 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物制药, E-mail: 2202108090@stu.ccut.edu.cn。

* 通信作者: 殷玉和 (1972-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 生物制药, E-mail: yinyuhe@ccut.edu.cn。

were predicted using bioinformatics analysis. The phosphorylation level of Akt protein was detected by Western blot to evaluate the activation level of the PI3K/Akt signaling pathway. The involvement of the PI3K/Akt signaling pathway in the regulatory effects of 20-HE was verified using the inhibitor LY294002. Results: Treatment with 20-HE had no significant toxic effect on HepG2 cells at concentrations lower than 20 $\mu\text{mol/L}$. In the injured cells, 20-HE could significantly improve the viability ($P<0.05$), inhibit the apoptosis ($P<0.05$), down-regulate the level of ROS, improve the levels of SOD and CAT ($P<0.05$), and down-regulate the level of MDA ($P<0.05$). PI3K/Akt signaling pathway was the potential downstream mechanism of regulatory effects exerted by 20-HE. 20-HE could significantly up-regulate the level of PI3K/Akt signaling pathway in the injured cells ($P<0.05$). LY294002 could reverse the protective effects exerted by 20-HE on the injured cells. Conclusion: 20-HE exerted protective effects on high glucose induced oxidative damage in HepG2 cells by activating the PI3K/Akt signaling pathway.

Key words: 20-hydroxyecdysone; high glucose; HepG2 cells; oxidative stress; PI3K/Akt signaling pathway

全球范围内糖尿病的发病率正在逐年递增,而我国已经成为糖尿病患者数量最多的国家。糖尿病及其并发症不仅严重影响了患者的身心健康,也给家庭及社会带来巨大的经济负担^[1]。肝脏作为人体的代谢中心是高血糖累积的主要器官之一。高血糖导致的肝损伤会进一步发展为一系列的肝脏病变,包括非酒精性脂肪性肝炎、肝纤维化、肝硬化和肝衰竭^[2]。目前对于糖尿病肝损伤仍缺乏令人满意的治疗手段。研究表明这种肝损伤的发病机制与高糖引发的肝细胞氧化损伤密切相关^[3]。高糖可以引起肝细胞中活性氧(Reactive Oxygen Specie, ROS)水平的持续升高,进而导致氧化应激相关因子包括超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)和丙二醛(Malondialdehyde, MDA)的失调,使肝细胞发生持续的氧化应激。氧化损伤会抑制肝细胞的活力并促进细胞凋亡。近年来,天然产物对氧化损伤的保护作用逐渐受到研究者的重视^[4]。

20-羟基蜕皮激素(20-Hydroxyecdysone, 20-HE; 分子式: $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_7$)是一种自然界中广泛存在的天然类固醇。20-HE 是功能性食品藜麦的主要活性成分之一^[5]。动物实验结果表明,在饮食中添加 20-HE 可以有效降低肥胖小鼠的体重、体脂和血糖,并改善胰岛素抵抗^[6]。此外,既往的研究还发现 20-HE 具有抗氧化和抗肿瘤等多种生物学活性^[7-8]。这其中 20-HE 的抗氧化作用受到研究者的广泛关注^[9]。但目前 20-HE 在高糖诱导的肝细胞氧化损伤中的作用及机制并不清楚。

PI3K/Akt 信号通路在细胞的增殖、凋亡和氧化应激等多种生物学过程中发挥重要调控作用^[10]。在细胞的氧化应激中,PI3K/Akt 信号通路的抑制与氧化应激的发生和发展密切相关^[11]。Akt 蛋白是该信号通路的核心分子,其磷酸化后被激活,磷酸化的 Akt 通过进一步激发通路下游效应分子从而发挥多种调控功能。Akt 蛋白的磷酸化水平反映了 PI3K/Akt 信号通路的激活水平^[12]。在高糖导致的肝细胞损伤中,目前尚无关于 20-HE 和 PI3K/Akt 信号通路之间关系的研究报道。

基于上述问题,本研究首先对 20-HE 在高糖诱

导 HepG2 细胞氧化损伤模型中的作用进行验证。在此基础上,通过生物信息学分析的方法对 20-HE 发挥调控作用的相关信号通路进行预测。最后通过实验验证 PI3K/Akt 信号通路是否参与了 20-HE 对损伤细胞的保护作用。这一研究不仅为 20-HE 在防治糖尿病肝损伤中的应用提供了理论依据,而且在分子水平阐释了 20-HE 对氧化损伤细胞发挥保护作用的关键机制。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

20-HE 纯度: 98%, 上海源叶生物科技有限公司; 人肝癌细胞 HepG2 细胞系 北京北纳生物公司; DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、胰酶、磷酸盐缓冲溶液(PBS)、双抗(青链霉素混合液) Thermo Fisher 公司; LY294002 (PI3K/Akt 信号通路的抑制剂用于机制验证实验) 纯度: 99.92%, MedChem-Express 公司; 细胞裂解液 生工生物工程股份有限公司; EnzChek[®]Caspase 3 活性/凋亡检测试剂盒、牛血清白蛋白(BSA)、ECL 显色试剂盒 Thermo Fisher 公司; CCK-8 试剂、ROS、SOD、CAT、MDA 检测试剂盒、BCA 法蛋白浓度测定试剂盒 碧云天公司; SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒 翌圣生物科技公司; PVDF 膜 默克公司; 磷酸化 Akt(p-Akt)一抗、总 Akt(t-Akt)一抗 江苏亲科公司; β -actin 一抗、二抗 Proteintech 公司。

BBD6220 型 CO_2 培养箱、Varioskan LUX 型酶标仪 Thermo Fisher 公司; KETA ML 型显影仪 威泰克公司。

1.2 实验方法

1.2.1 高糖诱导的细胞氧化损伤模型建立、分组及给药 HepG2 细胞在含 10% FBS 和 1% 双抗的 DMEM 培养基中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 浓度 CO_2 培养箱中进行培养,当细胞融合度达到 80%~90% 时,用胰酶进行消化,1:3 进行传代。

参考 Subramaniyan 等^[13]的研究方法建立高糖诱导的 HepG2 细胞氧化损伤模型。正常对照组用含 5.5 mmol/L 葡萄糖的培养基进行培养,模型组用含 50 mmol/L 浓度葡萄糖的培养基进行培养,给药

组根据浓度梯度分为 3 组, 分别加入终浓度为 5、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 20-HE。在机制验证实验中, 20-HE 给药终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$, LY294002 的给药终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。培养 24 h 后收集细胞进行后续实验。

1.2.2 细胞活力检测 采用 CCK-8 法检测细胞活力。将准备好的 HepG2 细胞接种于 96 孔板 (4×10^4 /孔), 待细胞贴壁后根据分组更换含有特定成分的培养基, 开始计时, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 浓度 CO_2 培养箱中培养 24 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 2 h, 用酶标仪于 450 nm 波长下检测吸光度, 并计算细胞存活率以评价细胞活力, 计算公式如下:

$$\text{细胞存活率(\%)} = \frac{\text{吸光度(实验)} - \text{吸光度(空白)}}{\text{吸光度(对照)} - \text{吸光度(空白)}} \times 100$$

1.2.3 细胞凋亡检测 采用 caspase-3 活性检测实验检测细胞凋亡, 根据试剂盒说明书进行操作, 收集待测细胞, PBS 洗涤后加入相应体积的裂解液, 收集上清液体, 加入试剂盒检测液, 用酶标仪于 342 nm/441 nm(激发波长/发射波长)条件下检测荧光值, 根据荧光数值计算 cleaved-caspase-3 活性以评价细胞凋亡水平, 计算公式如下:

$$\text{cleaved-caspase-3活性} = \frac{\text{荧光值(实验)} - \text{荧光值(空白)}}{\text{荧光值(对照)} - \text{荧光值(空白)}}$$

1.2.4 氧化应激相关因子检测 采用荧光探针法检测细胞的 ROS 水平, 根据试剂盒说明书, 首先配制稀释的 DCFH-DA 试剂 (1:2000)。收集待测细胞, 进行细胞计数, 调整各样本细胞密度至一致。各样本取等量细胞用准备好的 DCFH-DA 试剂混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 20 min, 期间每 5 min 重新混匀样本。孵育结束后用无血清培养液洗涤样本细胞, 用酶标仪于 488 nm/525 nm(激发波长/发射波长)条件下检测荧光值, 并计算 ROS 水平, 计算公式如下:

$$\text{ROS水平} = \frac{\text{荧光值(实验)} - \text{荧光值(空白)}}{\text{荧光值(对照)} - \text{荧光值(空白)}}$$

采用比色法检测细胞的 SOD 水平, 根据试剂盒说明书, 将收集待测细胞用预冷后的 PBS 洗涤, 加入试剂盒裂解液 (SOD 样品制备液), 充分裂解细胞后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心取上清液作为待测样品, 检测蛋白浓度后用裂解液调整所有样品蛋白浓度至一致, 分别配制 WST-8/酶工作液和反应启动工作液, 待检测样品中依次加入以上液体混匀, 每个样品设置 3 个空白体系, 空白 1 含检测缓冲液和两种工作液, 空白 2 含检测缓冲液和 WST-8/酶工作液, 空白 3 含同组待测样品、检测缓冲液和 WST-8/酶工作液。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件孵育 30 min 后, 用酶标仪于 450 nm 波长下检测吸光度, 并计算 SOD 水平, 计算公式如下:

$$\text{SOD水平} = \frac{[A(\text{空白1}) - A(\text{空白2})] - [A(\text{实验}) - A(\text{空白3实验})]}{[A(\text{空白1}) - A(\text{空白2})] - [A(\text{对照}) - A(\text{空白3对照})]}$$

采用比色法检测细胞的 CAT 水平, 根据试剂盒说明书, 首先通过检测过氧化氢溶液 240 nm 波长下吸光度计算试剂盒中过氧化氢溶液的准确浓度, 配制 250 mmol/L 过氧化氢溶液和显色工作液。接下来将待检细胞用裂解液充分裂解后, 收取上清液, 检测蛋白浓度后用裂解液调整所有样品蛋白浓度至一致, 样品加入过氧化氢检测缓冲液, 混匀后先加入过氧化氢溶液, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 3 min, 加入反应终止液, 15 min 后待测样品加入显色工作液, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 用酶标仪于 520 nm 波长下检测吸光度, 并计算 CAT 水平, 计算公式如下:

$$\text{CAT水平} = \frac{A(\text{空白}) - A(\text{实验})}{A(\text{空白}) - A(\text{对照})}$$

采用比色法检测细胞的 MDA 水平, 根据试剂盒说明书, 首先配制 MDA 检测工作液。接下来将待检细胞用裂解液充分裂解后, 收取上清液, 检测蛋白浓度后用裂解液调整所有样品蛋白浓度至一致。待测样本加入检测工作液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 条件下加热 15 min, 冷却后离心取上清液, 用酶标仪于 532 nm 波长下检测吸光度, 并计算 MDA 水平, 计算公式如下:

$$\text{MDA水平} = \frac{A(\text{实验}) - A(\text{空白})}{A(\text{对照}) - A(\text{空白})}$$

1.2.5 生物信息学分析 通过 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 对 20-HE 潜在的靶蛋白进行预测, 选取 Probability 值 > 0 的基因进行分析^[14]。通过 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 获取肝损伤 (liver injury) 的疾病相关基因, 根据 Score 值选取排名前 1000 位的基因进行分析^[15]。两组基因取交集, 结果用 Venn 图展示 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)。KEGG 信号通路富集分析用 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 完成^[16]。利用 Cytoscape (3.9.1 版) 软件构建 20-HE-靶点-信号通路网络。氧化应激相关信号通路的富集分析结果用气泡图展示 (<https://www.bioinformatics.com.cn>)^[17]。20-HE 在 PI3K/Akt 信号通路中潜在的作用靶点用 KEGG 数据库中的信号通路图展示^[18]。

1.2.6 Western blot 检测 t-Akt、p-Akt 蛋白水平 采用 Western blot 检测 PI3K/Akt 信号通路标志蛋白的表达水平^[19]。收集待测细胞后用裂解液进行充分裂解, 用 BCA 法蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度。蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。电泳后通过湿转法将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上, 用 5% BSA 封闭液室温下孵育 1 h, 分别用相应一抗进行孵育, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 16 h, 洗膜后再孵育相应的二抗, 最后用 ECL 显色液于显影仪中曝光显影, 利用 ImageJ 软件 (1.53e 版) 进行灰度值计算。Akt 磷酸化水平用 p-Akt/t-Akt 的比值评价, β -actin 用于评价整体上样体系。

1.3 数据处理

利用 Prism 软件(8.0.1 版)统计分析模块对实验数据进行统计学分析,量化的实验数据用均数 \pm 标准差表示,数据正态性检验通过 Shapiro-Wilk 检验进行,多组数据的组间比较分析通过单因素方差分析(One-way ANOVA)进行, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 20-HE 对高糖诱导的 HepG2 细胞活力的影响

如图 1A 所示,当 20-HE 给药浓度在 10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 时,各组的细胞存活率没有显著变化($P>0.05$)。根据这一结果确定后续实验的 20-HE 给药浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 。如图 1B 所示,高糖显著降低了 HepG2 细胞的存活率($P<0.05$),适宜浓度的 20-HE 可以显著提高损伤细胞的存活率(10 $\mu\text{mol/L}$ 组, $P<0.05$; 20 $\mu\text{mol/L}$ 组, $P<0.05$),与 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组相比,20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组的 20-HE 提高细胞活力的作用更强($P<0.05$)。综合以上数据说明,20-HE 可以改善高糖诱导 HepG2 细胞的活力。

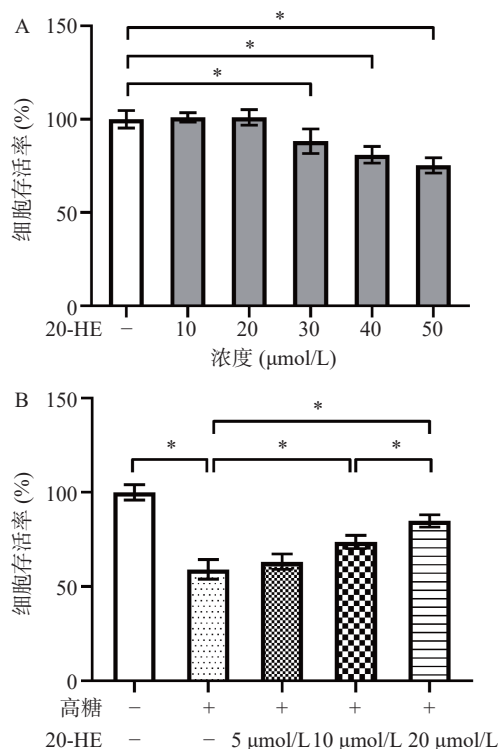


图 1 20-HE 对高糖诱导的 HepG2 细胞活力的影响

Fig.1 Effect of 20-HE on the viability of HepG2 cells induced by high glucose

注: A. 不同浓度 20-HE 对 HepG2 细胞的毒性; B. 20-HE 对高糖诱导 HepG2 细胞活力的影响; *表示两组间的数据差异显著, $P<0.05$; 图 2~图 3、图 5~图 6 同。

2.2 20-HE 对高糖诱导的 HepG2 细胞凋亡的影响

为验证 20-HE 对高糖诱导的 HepG2 细胞凋亡的作用,本研究通过 caspase-3 活性检测实验检测细胞的凋亡水平。如图 2 所示,高糖处理后, HepG2 细胞的凋亡水平显著上升($P<0.05$),适宜浓度的 20-

HE 可以显著抑制损伤细胞的凋亡水平(10 $\mu\text{mol/L}$ 组, $P<0.05$; 20 $\mu\text{mol/L}$ 组, $P<0.05$),与 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组相比,20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 20-HE 作用更强($P<0.05$)。这些数据说明,20-HE 可以抑制高糖诱导 HepG2 细胞的凋亡。

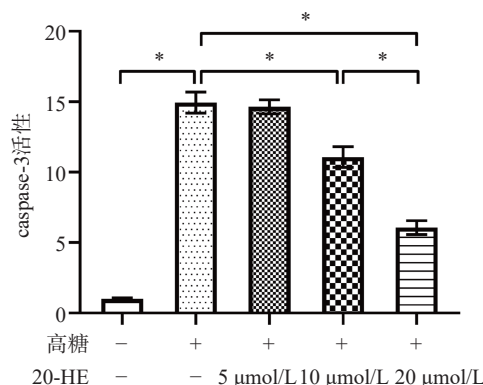


图 2 20-HE 对高糖诱导的 HepG2 细胞凋亡的影响

Fig.2 Effect of 20-HE on the apoptosis of HepG2 cells induced by high glucose

2.3 20-HE 对高糖诱导 HepG2 细胞中氧化应激因子水平的影响

为验证 20-HE 对损伤细胞中 ROS 水平的影响,本研究通过荧光探针法检测细胞中 ROS 水平。如图 3A 所示,高糖处理显著提高了 HepG2 细胞的 ROS 水平($P<0.05$),适宜浓度的 20-HE 可以显著降低损伤细胞的 ROS 水平(10 $\mu\text{mol/L}$ 组, $P<0.05$; 20 $\mu\text{mol/L}$ 组, $P<0.05$),20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 20-HE 作用更强(10 $\mu\text{mol/L}$ 组 vs. 20 $\mu\text{mol/L}$ 组, $P<0.05$)。此外,本研究还通过比色法对细胞中 SOD、CAT 和 MDA 的水平进行检测。如图 3B 所示,高糖处理显著抑制了 HepG2 细胞的 SOD 水平($P<0.05$),适宜浓度的 20-HE 可以显著提高损伤细胞中的 SOD 水平(10 $\mu\text{mol/L}$ 组, $P<0.05$; 20 $\mu\text{mol/L}$ 组, $P<0.05$),20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 20-HE 作用更强(10 $\mu\text{mol/L}$ 组 vs. 20 $\mu\text{mol/L}$ 组, $P<0.05$)。与 SOD 的结果趋势相似,适宜浓度的 20-HE 可以显著提高损伤细胞中被抑制的 CAT 水平(图 3C, 20 $\mu\text{mol/L}$ 组, $P<0.05$)。MDA 的检测结果显示,高糖处理显著提高了 HepG2 细胞的 MDA 水平($P<0.05$),适宜浓度的 20-HE 可以显著抑制损伤细胞的 MDA 水平(图 3D, 10 $\mu\text{mol/L}$ 组, $P<0.05$; 20 $\mu\text{mol/L}$ 组, $P<0.05$)。综合以上数据说明,20-HE 可以抑制高糖诱导 HepG2 细胞的氧化应激。基于以上关于细胞活力、凋亡和氧化应激因子水平的检测结果,选择 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 20-HE 进行后续机制验证实验。

2.4 预测参与 20-HE 介导的调控作用的潜在信号通路

本研究基于生物信息学分析的方法对参与 20-HE 介导的调控作用的潜在信号通路进行预测。首先,通过 SwissTargetPrediction 数据库基于 20-HE 的分子结构对潜在作用靶蛋白进行预测,同时在

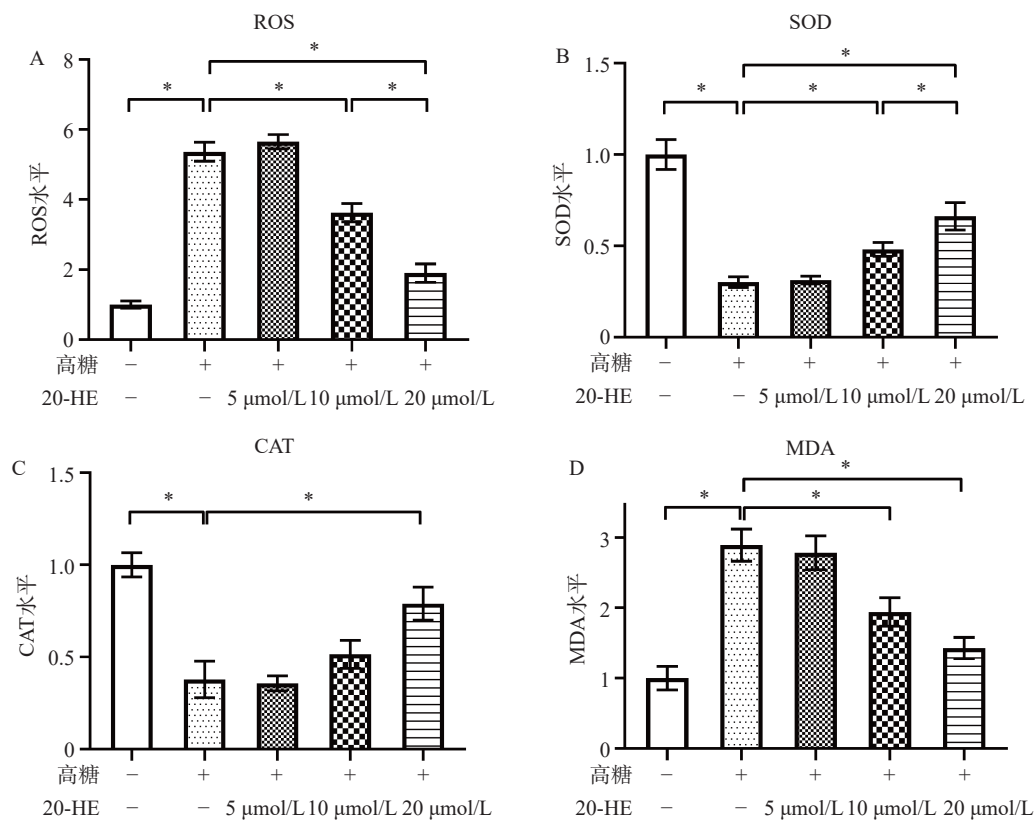
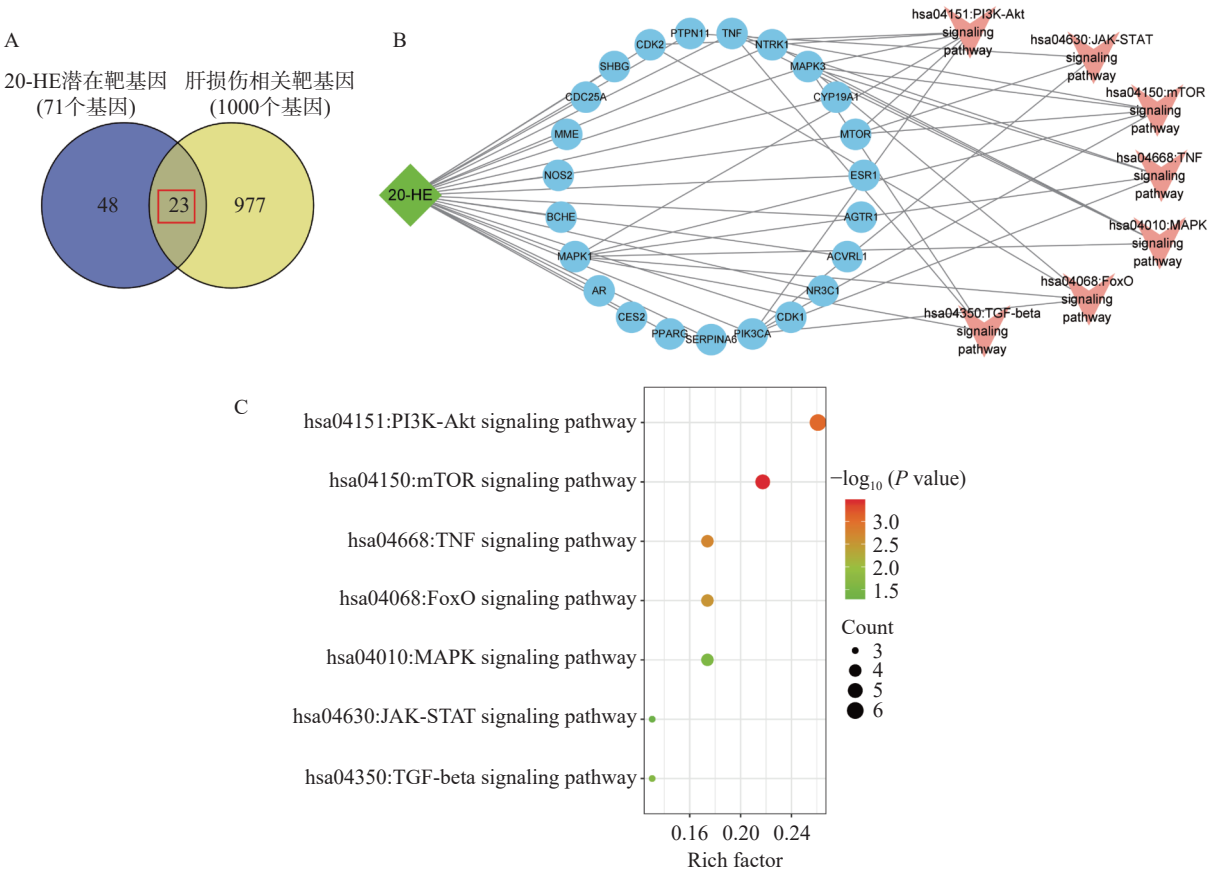


图 3 20-HE 对高糖诱导 HepG2 细胞中氧化应激因子水平的影响

Fig.3 Effect of 20-HE on the levels of oxidative stress factors of HepG2 cells induced by high glucose
注: A 为通过荧光探针法检测细胞中的 ROS 水平; B~D 分别为通过比色法检测细胞中的 SOD、CAT 和 MDA 水平。

GeneCards 数据库中获取肝损伤相关基因, 将两组基因取交集, 共筛选得到 23 个 20-HE 在肝损伤中的潜在作用靶点(图 4A)。接下来通过 DAVID 数据库对得到的基因进行信号通路相关的 KEGG 富集分析



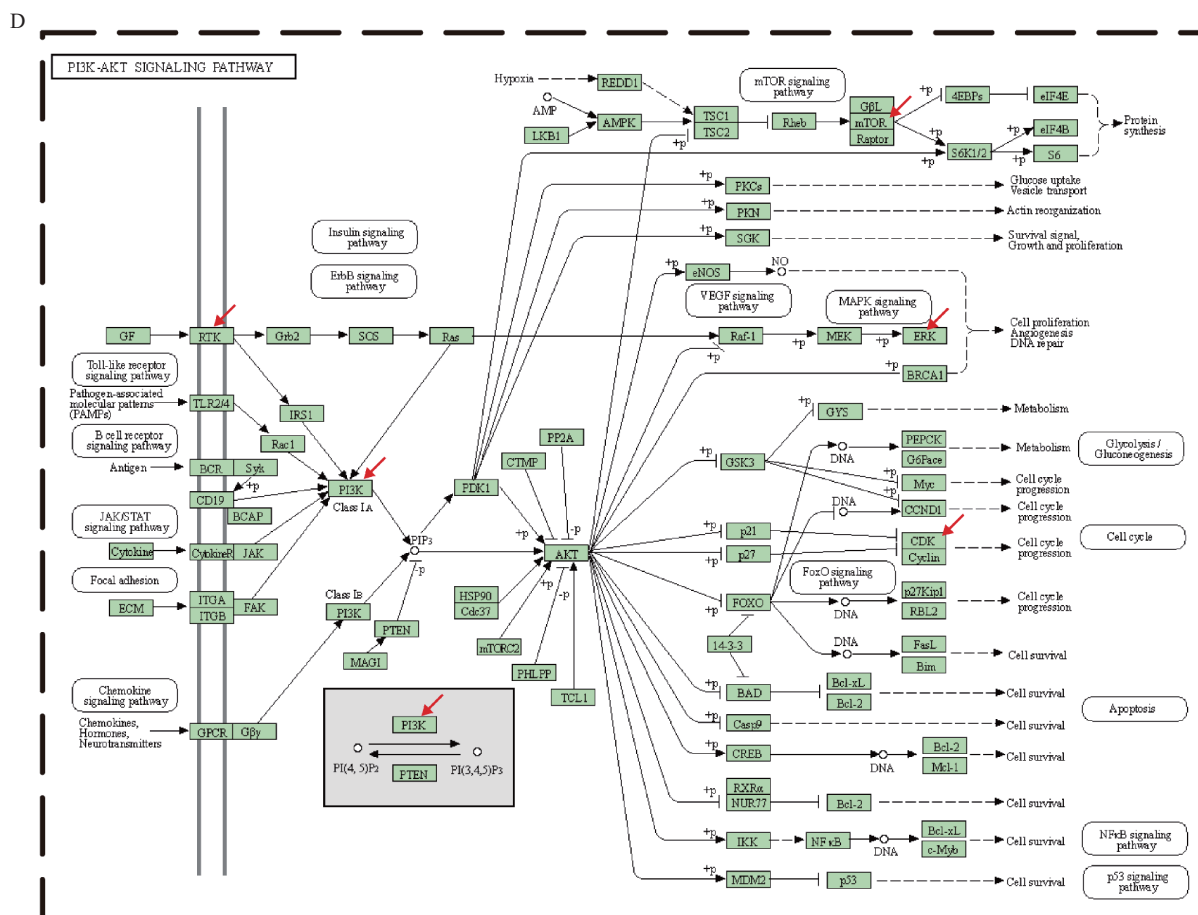


图4 预测参与20-HE介导的调控作用的潜在信号通路

Fig.4 Prediction of the potential signaling pathway involved in 20-HE mediated regulatory effects

注: A. 20-HE 对肝损伤的潜在作用靶基因的 Venn 图; B. 20-HE-靶点-信号通路网络图; C. 氧化应激相关信号通路的 KEGG 富集分析结果; D. 20-HE 在 PI3K/Akt 信号通路中的潜在作用靶点(红色箭头)。

析, 筛选氧化应激相关信号通路构建 20-HE-靶点-信号通路网络。如图 4B 所示, 网络中共有 31 个节点, 52 条边, 线条越多的节点代表与 20-HE 对肝损伤氧化应激的作用关联性越强; 其中关联性强的靶点包括 MAPK1、MAPK3、PIK3CA 等, 信号通路包括 PI3K/Akt 和 mTOR 信号通路等。如图 4C 所示, 根据 Rich factor 值对相关富集的信号通路进行排序, PI3K/Akt 信号通路的富集程度最高。该信号通路中

的 RTK 和 PI3K 等关键蛋白可能是 20-HE 的作用靶点(图 4D)。综合以上数据说明, PI3K/Akt 信号通路可能参与了 20-HE 发挥的对损伤细胞的保护作用。

2.5 20-HE 对高糖诱导 HepG2 细胞中 PI3K/Akt 信号通路的作用

为验证 20-HE 对损伤细胞中 PI3K/Akt 信号通路的影响, 本研究通过 Western blot(图 5A)检测 t-Akt 和 p-Akt 的表达水平, 以 p-Akt/t-Akt 的比值作

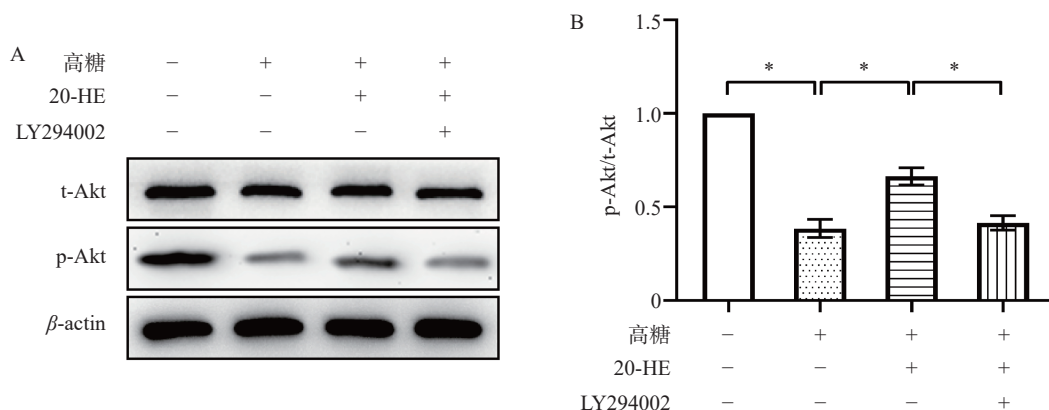


图5 20-HE 对高糖诱导 HepG2 细胞中 PI3K/Akt 信号通路的作用

Fig.5 Effect of 20-HE on the PI3K/Akt signaling pathway of HepG2 cells induced by high glucose

注: A. 通过 Western blot 检测 PI3K/Akt 信号通路相关标志蛋白表达结果; B. 对 p-Akt/t-Akt 的值的比较分析。

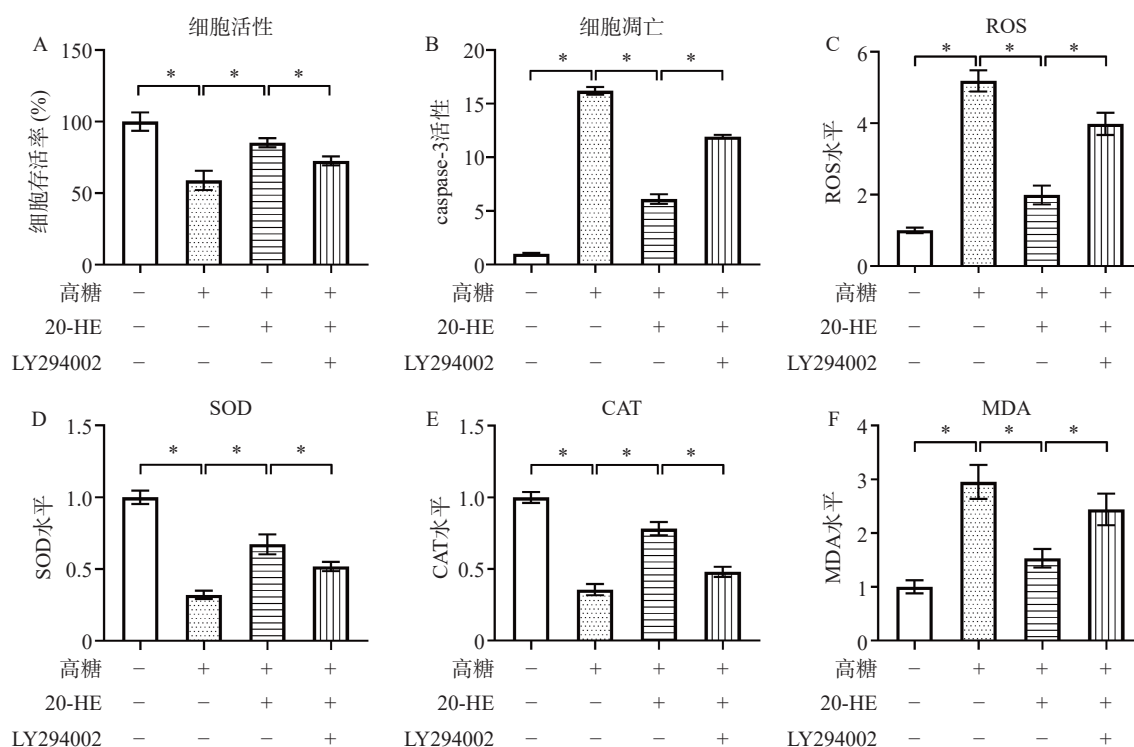


图 6 20-HE 通过激活 PI3K/Akt 信号通路对高糖诱导 HepG2 细胞发挥保护作用

Fig.6 20-HE exerts protective effects on HepG2 cells induced by high glucose by activating the PI3K/Akt signaling pathway

注: A. 细胞活力检测; B. 细胞凋亡检测; C. ROS 水平检测; D. SOD 水平检测; E. CAT 水平检测; F. MDA 水平检测。

为评价 PI3K/Akt 信号通路激活水平的指标。如图 5B 所示, 高糖处理显著下调了 HepG2 细胞中 p-Akt/t-Akt 的比值 ($P < 0.05$), 20-HE 可以显著上调损伤细胞中 p-Akt/t-Akt 的比值 ($P < 0.05$)。这些数据说明, 20-HE 可以激活损伤细胞中被抑制的 PI3K/Akt 信号通路。接下来, 本研究利用 PI3K/Akt 信号通路抑制剂 (LY294002) 进一步验证该信号通路是否参与了 20-HE 介导的调控作用。如图 5B 所示, LY294002 可以显著抑制 PI3K/Akt 信号通路的水平 ($P < 0.05$), 逆转 20-HE 对损伤细胞中该信号通路的激活。

2.6 PI3K/Akt 信号通路在 20-HE 对损伤细胞调控中的作用机制

在细胞活力方面, 如图 6A 所示, LY294002 可以显著逆转 20-HE 对损伤细胞活力的改善 ($P < 0.05$)。在细胞凋亡方面, 如图 6B 所示, LY294002 可以显著逆转 20-HE 对损伤细胞凋亡的抑制 ($P < 0.05$)。与这些结果趋势相似, 在氧化应激相关因子方面, LY294002 可以显著逆转 20-HE 对高糖诱导 HepG2 细胞中 ROS (图 6C, $P < 0.05$)、SOD (图 6D, $P < 0.05$)、CAT (图 6E, $P < 0.05$) 和 MDA (图 6F, $P < 0.05$) 水平的调控。综合以上数据说明, 20-HE 可以通过激活 PI3K/Akt 信号通路对高糖诱导的 HepG2 细胞氧化损伤发挥保护作用。

3 讨论

近年来, 越来越多天然活性成分的肝细胞损伤保护作用被不断发现^[20-21]。本研究以 20-HE 作为研

究对象, 利用高糖诱导建立 HepG2 细胞氧化损伤模型, 用 20-HE 对损伤细胞进行处理, 通过检测细胞活力、凋亡和氧化应激因子 (ROS、SOD、CAT 和 MDA) 水平验证 20-HE 对损伤细胞的保护作用。20-HE 对 HepG2 毒性作用的实验结果表明, 20-HE 的给药浓度超过 $30 \mu\text{mol/L}$ 会抑制 HepG2 细胞的活力。基于这一结果, 选择无细胞毒性浓度 (5 、 10 和 $20 \mu\text{mol/L}$) 进行后续实验的给药。建模的结果显示, 高浓度葡萄糖 (50 mmol/L) 显著抑制了 HepG2 细胞的活力、促进细胞的凋亡并促进氧化应激反应, 高糖诱导 HepG2 氧化损伤模型建立成功。Subramaniyan 等^[13]的研究中也发现 50 mmol/L 浓度的葡萄糖处理 24 h 可以导致 HepG2 细胞的存活率的显著下降, 同时高糖处理可以上调 ROS 和 MDA 的水平。但用于 HepG2 氧化损伤模型建立的高糖浓度仍存在争议, Ding 等^[22]在一项探究鞣花酸生物活性的研究中使用 30 mmol/L 浓度葡萄糖构建 HepG2 细胞氧化损伤模型, 同样得到氧化应激被显著促进的实验结果。推测这些差异可能由于所使用细胞状态的不同所导致, 状态良好的细胞对氧化应激的发生、发展以及导致的损伤都具有更强的抵抗能力, 因此在具体实验中研究者需要根据所使用细胞的状态和相关表型的检测结果调整高糖的浓度。

本研究结果表明, 20-HE 在 $5 \mu\text{mol/L}$ 浓度下对损伤细胞的活力、凋亡和氧化应激因子水平没有显著作用。当 20-HE 给药浓度提高至 $10 \mu\text{mol/L}$ 和 $20 \mu\text{mol/L}$, 其可以显著改善损伤细胞的活力、凋亡

和氧化应激因子水平。细胞活力、凋亡、ROS 和 SOD 水平检测实验结果表明, 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 20-HE 对损伤细胞的保护作用更强。而 CAT 水平检测结果表明, 只有 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 20-HE 表现出对 CAT 水平的显著改善作用。因此, 如何降低 20-HE 的有效作用浓度, 提高 HepG2 氧化损伤模型对 20-HE 的敏感性是未来研究的方向之一。既往的研究表明, 20-HE 具有抗氧化损伤作用。Li 等^[23] 在小麦幼苗氧化损伤模型中的研究结果表明, 20-HE 可以抑制氧化应激, 降低 MDA 水平, 提高 SOD 和 CAT 水平。而 Hu 等^[24] 在氧化氢诱导神经元损伤模型中的研究结果表明, 20-HE 可以抑制损伤神经元的氧化应激, 减少 ROS 和 MDA 的生成。本研究结果表明, 20-HE 对高糖诱导 HepG2 氧化损伤具有保护作用。这些研究结果提示 20-HE 可能具有广泛的抗氧化损伤作用。但一项关于家蚕化蛹过程的研究结果表明, 20-HE 会促进化蛹过程中超氧化物的产生, 抑制 SOD 的水平^[25]。分析原因, 可能在不同的物种或生物学过程中, 20-HE 对氧化应激的作用也有所不同。因此, 仍需要更广泛的研究验证 20-HE 对氧化应激的调控作用。

本研究在验证 20-HE 对高糖诱导 HepG2 细胞氧化损伤具有保护作用的基础上, 进一步通过生物信息学分析的方法对其下游的机制进行预测, 氧化应激相关信号通路的富集分析结果表明 PI3K/Akt 信号通路的富集程度最高, 实验结果也表明, 20-HE 可以激活损伤细胞中被抑制的 PI3K/Akt 信号通路。既往的一项研究结果也表明, 20-HE 可以激活胰岛 β 细胞的 PI3K/Akt 信号通路^[26]。因此, 推测 20-HE

可能对 PI3K/Akt 信号通路具有广泛的激活作用。PI3K/Akt 信号通路的抑制与氧化损伤的发生密切相关。Wang 等^[27] 的研究结果表明 PRUNE2 可以通过激活 PI3K/Akt 信号通路抑制缺滋养层细胞损伤模型中的氧化应激。另一项在大鼠脑损伤模型中的研究则表明重组人红细胞生成素可以通过激活 PI3K/Akt 信号通路增强神经细胞的抗氧化能力, 减少神经元的凋亡^[28]。本研究结果表明, 20-HE 通过激活 PI3K/Akt 信号通路发挥对高糖诱导 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用, 改善损伤细胞的活力、凋亡和氧化应激因子水平(图 7)。但 PI3K/Akt 信号通路是否广泛参与不同物种组织细胞的氧化应激反应仍有待实验验证。此外, 既往的研究证明 20-HE 对 mTOR^[29]、FoxO^[30] 和 MAPK^[31] 信号通路具有调控作用。本研究结果表明以上信号通路可能参与了 20-HE 对高糖诱导 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用, 但仍需进一步的实验验证。

4 结论

20-HE 通过激活 PI3K/Akt 信号通路, 在高糖环境中对 HepG2 细胞的氧化损伤起到了显著的保护作用。这些研究结果不仅为糖尿病引发的肝损伤的防治提供了新的思路, 还进一步拓展了对 20-HE 生物活性及其相关分子机制的理解。然而, 尽管课题组初步揭示了 20-HE 的保护机制, 但其在高糖诱导的 HepG2 细胞氧化损伤中的具体作用机制仍需深入研究。这将为全面理解 20-HE 的潜在治疗价值提供重要依据, 为推动相关临床应用的发展提供数据。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] LIU J L, LIU M, CHAI Z L, et al. Projected rapid growth in diabetes disease burden and economic burden in China: A spatio-temporal study from 2020 to 2030[J]. *The Lancet Regional Health-Western Pacific*, 2023, 33: 100700.
- [2] KUMAR S, DUAN Q H, WU R X, et al. Pathophysiological communication between hepatocytes and non-parenchymal cells in liver injury from NAFLD to liver fibrosis[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2021, 176: 113869.
- [3] EKTA, GUPTA M, KAUR A, et al. Pathobiological and molecular connections involved in the high fructose and high fat diet induced diabetes associated nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Inflammation Research*, 2020, 69(9): 851–867.
- [4] RAHAMAN M M, HOSSAIN R, HERRERA-BRAVO J, et al. Natural antioxidants from some fruits, seeds, foods, natural products, and associated health benefits: An update[J]. *Food Science & Nutrition*, 2023, 11(4): 1657–1670.
- [5] 胡一晨, 赵钢, 秦培友, 等. 藜麦活性成分研究进展[J]. *作物学报*, 2018, 44(11): 1579–1591. [HU Y C, ZHAO G, QIN P Y, et al. Research progress on bioactive components of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2018, 44(11): 1579–1591.]

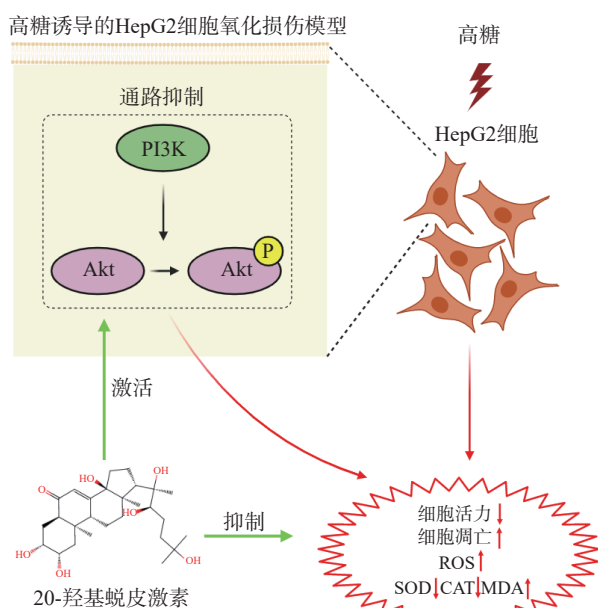


图 7 20-HE 通过调控 PI3K/Akt 信号通路对高糖诱导的 HepG2 细胞氧化损伤发挥保护作用

Fig.7 20-HE protects HepG2 cells from high glucose induced oxidative damage by regulating the PI3K/Akt signaling pathway

- [6] KIZELSZTEIN P, GOVORKO D, KOMARNYTSKY S, et al. 20-Hydroxyecdysone decreases weight and hyperglycemia in a diet-induced obesity mice model[J]. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2009, 296(3): E433-E439.
- [7] PLOTNIKOV M B, ZIBAREVA L N, VASIL'EV A S, et al. Antihyperglycaemic, haemorheological and antioxidant activities of *Lychnis chalcidonica* L. extract in a streptozotocin-induced rat model of diabetes mellitus[J]. *Journal of Complementary & Integrative Medicine*, 2019, 17(2): jcim-2017-0028.
- [8] SHUVALOV O, KIRDEEVA Y, FEFILOVA E, et al. 20-Hydroxyecdysone confers antioxidant and antineoplastic properties in human non-small cell lung cancer cells[J]. *Metabolites*, 2023, 13(5): 656.
- [9] SOUZA L, DA FONSECA S, FERRARI A, et al. β -ecdysone content and antioxidant capacity in different organs of Brazilian ginseng[J]. *Ciencia Rural*, 2021, 51(5): e20200618.
- [10] WANG J C, HU K L, CAI X Y, et al. Targeting PI3K/AKT signaling for treatment of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2022, 12(1): 18-32.
- [11] LIU S H, JIA Y B, MENG S R, et al. Mechanisms of and potential medications for oxidative stress in ovarian granulosa cells: A review[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(11): 9205.
- [12] RAI S N, DILNASHIN H, BIRLA H, et al. The role of PI3K/Akt and ERK in neurodegenerative disorders[J]. *Neurotoxicity Research*, 2019, 35(3): 775-795.
- [13] SUBRAMANIYAN S D, NATARAJAN A K. Citral, A monoterpene protect against high glucose induced oxidative injury in HepG2 cell *in vitro*-an experimental study[J]. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 2017, 11(8): BC10-BC15.
- [14] DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. Swiss target prediction: Updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [15] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses[J]. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2016, 54: 1-33.
- [16] SHERMAN B T, HAO M, QIU J, et al. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update)[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(W1): W216-W221.
- [17] TANG D D, CHEN M J, HUANG X H, et al. SRplot: A free online platform for data visualization and graphing[J]. *PloS one*, 2023, 18(11): e0294236.
- [18] KANEHISA M, SATO Y. KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences[J]. *Protein Science*, 2020, 29(1): 28-35.
- [19] LI S L, YI Z J, DENG M H, et al. TSLP protects against liver I/R injury via activation of the PI3K/Akt pathway[J]. *Jci Insight*, 2019, 4(22): e129013.
- [20] 赵悦竹, 金鑫, 张屿楠, 等. 芦荟多糖对 D-半乳糖致 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(1): 405-412.
- [21] 鲁亚君, 刘莹, 王益, 等. 莲壳多酚对 T-BHP 致 HepG2 氧化应激损伤的保护作用[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(12): 397-404.
- [22] LU Y J, LIU Y, WANG Y, et al. Protective effects of polyphenol of lotus seed epicarp on oxidative stress damage induced by T-BHP[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(12): 397-404.
- [23] DING X Q, JIAN T Y, WU Y X, et al. Ellagic acid ameliorates oxidative stress and insulin resistance in high glucose-treated HepG2 cells via miR-223/keap1-Nrf2 pathway[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 110: 85-94.
- [24] LI J T, HAN X P, TANG L, et al. 20-Hydroxyecdysone protects wheat seedlings from salt stress[J]. *Archives of Biological Sciences*, 2018, 70(2): 379-386.
- [25] HU J, LUO C X, CHU W H, et al. 20-Hydroxyecdysone protects against oxidative stress-induced neuronal injury by scavenging free radicals and modulating NF- κ B and JNK pathways[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e50764.
- [26] NOJIMA Y, BONO H, YOKOYAMA T, et al. Superoxide dismutase down-regulation and the oxidative stress is required to initiate pupation in *Bombyx mori*[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 14693.
- [27] HU J N, FENG Y, LI B L, et al. Identification of quality markers for *Cyanotis arachnoidea* and analysis of its physiological mechanism based on chemical pattern recognition, network pharmacology, and experimental validation[J]. *PeerJ*, 2023, 11: e15948.
- [28] WANG J, ZHAO Y P. Knockdown of PRUNE2 alleviates hypoxia-induced oxidative stress inhibits cell proliferation in trophoblast cells, and reverses LY294002-induced PI3K/AKT pathway inhibition[J]. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2023, 22(2): 305-311.
- [29] WANG H Q, CHEN M, ZHANG T, et al. Recombinant human erythropoietin upregulates PPAR γ through the PI3K/Akt pathway to protect neurons in rats subjected to oxidative stress[J]. *European Journal of Neuroscience*, 2022, 56(3): 4045-4059.
- [30] ROMANIUK-DRAPALA A, LISIAK N, TOTON E, et al. Proapoptotic and proautophagic activity of 20-hydroxyecdysone in breast cancer cells *in vitro*[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2021, 342: 109479.
- [31] CAI M J, ZHAO W L, JING Y P, et al. 20-hydroxyecdysone activates Forkhead box O to promote proteolysis during *Helicoverpa armigera* molting[J]. *Development*, 2016, 143(6): 1005-1015.
- [32] JIAN C X, LIU X F, HU J, et al. 20-hydroxyecdysone-induced bone morphogenetic protein-2-dependent osteogenic differentiation through the ERK pathway in human periodontal ligament stem cells[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2013, 698(1-3): 48-56.