

纳米氧化铜(CuO NPs)对HepG2细胞糖代谢的影响

崔雯 薛永来* 吴梓瑜 高璐 周磊 何锦 杜道林

(江苏大学环境与安全工程学院, 镇江 212013)

摘要 纳米材料的广泛使用引起了人们对其潜在危害的担忧。为了探究纳米材料对糖代谢的影响, 该文选用人体肝癌细胞HepG2作为受试对象进行体外实验, 研究了纳米氧化铜(CuO NPs)对HepG2细胞糖代谢的影响。实验表明, CuO NPs暴露会抑制HepG2细胞活性, 降低细胞存活率, 而且会显著减少胞外葡萄糖的吸收以及HepG2细胞内糖原的含量。通过实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测了糖代谢相关过程中关键基因的表达情况。研究发现, 经CuO NPs暴露后, HepG2细胞中糖原合成的重要基因糖原磷酸化酶(PYGL)的表达出现了明显下调, 而糖原合酶2(gys2)的基因表达先上调后出现显著抑制。此外, 与葡萄糖转运、糖酵解、糖异生和TCA循环相关的基因在不同浓度CuO NPs暴露下也出现了不同程度的变化。综上所述, 经CuO NPs暴露后HepG2细胞存活率下降, 胞外葡萄糖的吸收减少, 糖原合成与分解受到影响, 且糖酵解和糖异生两个过程同时受到抑制, 高浓度时甚至会引起胞内的糖代谢紊乱。

关键词 纳米氧化铜; HepG2细胞; 糖代谢; 葡萄糖; 糖原

Effect of CuO NPs (CuO Nanoparticles) on Glucose Metabolism in HepG2

CUI Wen, XUE Yonglai*, WU Ziyu, GAO Lu, ZHOU Lei, HE Jin, DU Daolin

(School of Environmental and Safety Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract The widespread use of nanomaterials has raised concerns about their potential harm. In order to explore the effect of nanomaterials on glucose metabolism, this article selected human liver cancer cell HepG2 as the subject to conduct *in vitro* experiments to study the effect of CuO NPs (CuO nanoparticles) on glucose metabolism in HepG2 cells. Experiments had shown that CuO NPs exposure could inhibit HepG2 cell viability, reduce cell survival, and significantly reduce the absorption of extracellular glucose and the content of glycogen in HepG2 cells. The RT-qPCR (real-time quantitative PCR) was used to detect the expression of key genes in the process of glucose metabolism. It was found that after exposure to CuO NPs, the expression of *PYGL* (glycogen phosphorylase), an important gene for glycogen synthesis in HepG2 cells, was significantly down-regulated, while the expression of *gys2* (glycogen synthase 2) was first up-regulated and then significantly inhibited. In addition, genes related to glucose transport, glycolysis, gluconeogenesis, and TCA cycle also changed to varying degrees under exposure to different concentrations of CuO NPs. In summary, after exposure to CuO NPs, the survival rate of HepG2 cells decreases, the absorption of extracellular glucose reduces, glycogen synthesis and decomposition are affected, and the two processes of glycolysis and gluconeogenesis are inhibited at the same time. High concentrations can even cause intracellular disorders of glucose metabolism.

收稿日期: 2021-03-10

接受日期: 2021-05-25

国家自然科学基金(批准号: 31100379、31601380)和江苏大学高级人才基金(批准号: 10JGD056)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15952856992, E-mail: xueyonglai@sina.com

Received: March 10, 2021

Accepted: May 25, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31100379, 31601380) and Jiangsu University Senior Talent Fund (Grant No.10JGD056)

*Corresponding author. Tel: +86-15952856992, E-mail: xueyonglai@sina.com

Keywords CuO nanoparticles; HepG2 cells; glucose metabolism; glucose; glycogen

结构尺寸为纳米级(10^{-9} m)的超细材料被称为纳米材料, 研究应用中的纳米材料外观上呈微小固体粉末状, 尺寸常在1~100 nm之间^[1]。作为近年来新兴材料, 纳米材料在许多方面表现出其不同于传统材料的优越性, 具体表现在表面效应、小尺寸效应、量子隧道以及介电限域等方面, 这使其广泛应用于工业、农业、生物医药等领域^[2-5]。在食品行业, 纳米材料可用于食品包装^[6]、食品检测^[7]以及食品加工; 在医疗领域, 纳米材料可用于各医疗方案中疾病治疗, 如检测和治疗癌症^[8]、防止血栓的生成^[9]、治疗肥胖症^[10]等; 在航天领域, 纳米材料可制成纳米传感器提高系统性能; 在石油勘探开发领域, 纳米材料可制成泡沫稳定剂^[11]、纳米渗透膜^[12-13], 为石油勘探提供便利。近年来, 随着纳米材料在生命科学领域的使用越来越广泛, 人们对其生物安全性也越来越关注。现有研究表明, 纳米颗粒会影响细胞, 产生多种生物学效应, 如促进细胞凋亡、激活机体免疫应答反应和影响细胞能量代谢等^[14-18]。

纳米氧化铜(CuO nanoparticles, CuO NPs)是一种新型纳米材料, 应用广泛。其乃棕黑色粉末状, 不溶于水和乙醇, 溶于烯酸。与普通氧化铜相比, 其具有特殊的磁性、电学、化学、催化、光吸收等性质, 因此CuO NPs广泛应用于各领域。CuO NPs对外界环境变化十分敏感, 故常用来制作传感器^[19]; 光电领域中CuO NPs可用来制成半导体、超/热传导材料等^[20]。此外CuO NPs也是一种新型的抗菌剂, 可用于生物医药、纺织等领域。由于CuO NPs在生产生活中的广泛应用, 其不可避免地分散在空气、水、土壤中, 危害生态环境, 并可通过食物链食物网富集到生物体内, 危害其安全。现有研究表明, CuO NPs对微生物、植物、动物以及细胞均具有一定的毒性影响。FRENK等^[21]研究发现, CuO NPs显著降低了土壤中的微生物*Rhizobiales*和*Sphingobacteriaceae*的含量; TANG等^[22]发现, 浓度为10~20 mg/L的CuO NPs会严重损伤拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的根部, 抑制其生长; DE JONG等^[23]用不同浓度的CuO NPs注入大鼠体内, 发现CuO NPs引起了大鼠血液学参数变化以及肝脏损伤(炎症反应、溃疡以及退化); ASSADIAN等^[24]研究CuO NPs对人血淋巴细胞的细胞毒性时, 发现CuO NPs以浓度依赖性的方式降低了细胞活力。但目前

国内外对CuO NPs的研究主要停留在简单的致死效应、致畸效应、氧化应激效应和神经毒性^[25-29], 关于其对代谢过程的毒性研究较少, 故研究CuO NPs的代谢毒性及作用机理具有重要意义。

能量代谢与物质代谢密不可分, 对维持生物体最基本的生命活动意义重大, 而糖代谢是其重要组成部分, 包括分解代谢和合成代谢。糖类在生物体内经各种酶的作用进行分解反应, 大量释放能量; 与此同时可以产生合成脂类、蛋白质、核酸等生物大分子的中间产物, 以此循环往复。现有研究表明, 细胞能量的产生、供应和利用之间的平衡在受到外界因素的干扰时会被打破, 会使得细胞正常的生命活动受到影响, 从而导致或者加剧疾病的发展^[30], 因此环境污染对机体能量代谢产生毒性作用将对机体健康产生深远的影响。

现有研究表明, 纳米材料会损伤模式生物的肝脏^[31], 诱导HepG2细胞凋亡^[32-33], 那纳米材料是否会对细胞糖代谢造成影响值得我们探究。因此为了探索这一课题, 本实验选择HepG2细胞作为实验模型进行体外实验, 因为正常肝脏细胞来源较肝脏肿瘤细胞困难, 且体外培养肝脏肿瘤细胞易失去代谢酶活性。而HepG2保留了肝细胞的许多特性, 具有完整的人类代谢活化I、II相酶, 能模拟体内代谢环境, 且酶活性较稳定, 使测试结果更准确, 重复性高^[34-35], 以便进一步明确纳米材料存在的生物毒性, 阐释CuO NPs对细胞糖代谢的影响机制。

1 材料与方法

1.1 化学药品和试剂

纳米氧化铜(CuO NPs)购于美国Sigma-Aldrich公司, 纯度>99%, 平均粒径<50 nm。实验前称取0.02 g CuO NPs加入50 mL的培养基并做超声处理30~60 min配置成母液, 根据实验要求将母液稀释成所需的浓度用于后续暴露实验。

高糖培养基(DMEM)购于上海赛默飞世尔科技公司。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购于浙江天杭生物科技股份有限公司。*L*-谷氨酰胺、青霉素-链霉素、二甲基亚砷(DMSO)、MTT细胞增殖及细胞毒性试剂盒、总RNA提取Trizol试剂和cDNA第一链式合成试剂盒均购于上海碧云天生物有限公司。

葡萄糖测定试剂盒、糖原测定试剂盒、总蛋白测定试剂盒、磷酸果糖激酶(phosphofructokinase, PFK)以及丙酮酸羧化酶(pyruvate carboxylase, PC)活性测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所。SYBR绿色荧光染料和八联管购于南京润亚生物科技发展有限公司。其余所需化学试剂均购于北京国药集团化学试剂有限公司或北京索莱宝科技有限公司。

1.2 细胞培养

人体肝癌细胞HepG2细胞由江苏大学环境与安全工程学院生态研究提供。细胞培养时培养基的组成: 1%青霉素-链霉素($100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$)、1% L-谷氨酰胺、10% FBS和88% DMEM培养基。刚复苏的细胞选用20% FBS的细胞培养基, 更利于培养。在细胞培养过程中需要在培养基中营养耗尽(即细胞瓶中的培养基颜色变成淡黄色)之前换液, 刚复苏的细胞可根据实际情况换液, 通常每24 h需要换液1次。暴露期间用0.2% BSA代替FBS, 排除FBS中葡萄糖对实验结果的影响。培养过程中所需耗材均经高温灭菌过。

1.3 实验方案

本实验包括两个部分: (1) 进行预实验选择合适的暴露浓度。设1个空白组、1个纯培养基组、7个CuO NPs处理组(CuO NPs浓度分别为0.5、1、2、4、8、16、32 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。将对数生长期的细胞均匀铺入96孔板中, 使每孔细胞量保持在 1×10^4 个, 培养24 h以便细胞贴壁, 吸出培养基, 用PBS缓冲液清洗3次, 加入含牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)和不同浓度CuO NPs的培养基暴露24 h, 测定细胞活性和培养基中消耗的葡萄糖, 选定合适的暴露浓度; (2) 正式实验在选定浓度下研究CuO NPs对细胞糖代谢的影响。经过预实验选定浓度(0.5、1、2、4、8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)后, 按一定比例扩大实验样本将细胞铺入6孔板(每孔细胞量为 2×10^5 个)进行暴露以便进行后续实验。

1.4 细胞存活率的测定

本实验采用MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒检测暴露后的细胞存活率, 根据MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒说明书实验步骤如下: 设1个空白组、1个纯培养基组、7个CuO NPs处理组(CuO NPs浓度分别为0.5、1、2、4、8、16、32 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。将对数生长期的细胞均匀铺于96孔板中培养24 h使细胞贴壁, 后清洗3次, 加入含BSA和不同浓度CuO NPs的培养基暴露24 h。暴露结束后吸出培养液(用于测定培养基内葡萄糖的消耗), 用PBS缓冲液清洗

3次, 按照试剂盒说明书加入100 μL 含BSA的培养基和10 μL 的MTT溶液, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内继续孵育4 h, 加入100 μL 甲瓚(formazan)溶解液并适当混匀, 需注意避免产生泡沫, 再继续孵育4 h直至formazan全部溶解, 置于酶标仪内在570 nm波长处测定其吸光度(D)值, 计算暴露后的细胞存活率。细胞存活率=(处理组孔 D 值/对照组孔 D 值) $\times 100\%$ 。此外在倒置显微镜下拍摄暴露后的细胞。

1.5 胞外葡萄糖消耗量的测定

取1.4中的培养液至1.5 mL离心管中, 离心($1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、5 min), 然后将上清液移至另一新的离心管(防止细胞残留对实验造成影响), 用超纯水将其稀释10倍, 最后采用葡萄糖检测试剂盒进行检测。计算公式: 培养基内葡萄糖消耗含量($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)=纯培养基组葡萄糖含量($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)-处理组葡萄糖含量($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

1.6 糖原含量的测定

保持HepG2细胞浓度不变, 扩大实验样本至6孔板中培养24 h, 之后将其暴露于CuO NPs溶液中培养24 h, 加入适量胰酶消化液, 使细胞消化并移入离心管进行离心, 吸除上清液加入1 mL PBS缓冲液重悬再次离心($1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、5 min), 再次吸去上清液加入300 μL PBS缓冲液混匀进行匀浆, 冰水浴条件下超声破碎(功率为300 W, 3~5 s/次, 间隔10 s, 重复8~10次)。破碎后的样品采用糖原(glycogen)测定试剂盒进行检测。另取部分样本检测总蛋白含量, 将糖原数据标准化至蛋白。

1.7 总蛋白含量测定

取1.6中超声破碎后的细胞悬液按照总蛋白检测试剂盒说明书检测总蛋白含量。

1.8 PFK和PC活性测定

按照1.6进行暴露实验并收集细胞至离心管中, 离心后弃上清加入适量提取剂, 超声波破碎细胞(冰浴, 功率20%或200 W, 超声3 s, 间隔10 s, 重复30次), 超声结束后进行离心($8\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、10 min、4 $^{\circ}\text{C}$), 取上清, 用酶活性测定试剂盒进行测定。

1.9 RT-qPCR

本实验采用Trizol试剂法来提取经CuO NPs暴露的HepG2细胞RNA用于后续实验。用超微量紫外分光光度计和琼脂糖电泳来确定提取出来的RNA是否受到蛋白和DNA的污染。确定未受到污染之后用碧云天的BeyoRT™ II cDNA第一链合成试剂盒

表1 聚合酶链式反应引物序列

Table 1 The primer sequence of polymerase chain reaction

基因名称 Gene name	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
<i>GLUT1</i>	5'-ACT GTG CTC CTG GTT CTG-3'	5'-TCC TCG GGT GTC TTG TC-3'
<i>PKM</i>	5'-ACT GGC ATC ATC TGT ACC ATT G-3'	5'-AGC CAC ATT CAT TCC AGA CTT A-3'
<i>PFKL</i>	5'-TTT CGA TGC CAC CAA TAC TAC T-3'	5'-GAC TCG ATG AAA AAC GCC TTAA A-3'
<i>g6pc</i>	5'-TGT CAT TTT GTG GTT GGG ATT C-3'	5'-CAG CAA CAA CTT GAT GAG GAA A-3'
<i>gsk3β</i>	5'-AGG AGA ACC CAA TGT TTC GTA T-3'	5'-ATC CCC TGG AAA TAT TGG TTG T-3'
<i>gys2</i>	5'-GCT ACA CTA CTT GGG AGG TAT C-3'	5'-TGC TGT TAT TTC AGA AAC CGT G-3'
<i>PYGL</i>	5'-CCT GAG CTG ATG AGG ATT TTT G-3'	5'-ATG ATT TCC AAA TGT CGA GGG A-3'
<i>IDH2</i>	5'-GTG GAG ACG GTG GAGAGT GGA G-3'	5'-GGT GTT CAG GAA GTG CTC GTT CAG-3'
<i>PDK1</i>	5'-TCA CCA GGA CAG CCA ATA-3'	5'-CCC GAG GTC TCA ACA CG-3'
<i>β-actin</i>	5'-CCT GGC ACC CAG CAC AAT-3'	5'-GGG CCG GAC TCG TCA TAC-3'

表2 各引物标准曲线的 R^2 、扩增效率以及退火温度Table 2 R^2 , amplification efficiency and annealing temperature of standard curve of each primer

基因名称 Gene name	相关系数 R^2	扩增效率/% Amplification efficiency /%	退火温度/ $^{\circ}$ C Annealing temperature / $^{\circ}$ C
<i>GLUT1</i>	0.998 3	110.68	55.0
<i>PKM</i>	0.998 5	104.50	53.0
<i>PFKL</i>	0.986 0	101.56	53.0
<i>g6pc</i>	0.999 9	112.71	58.0
<i>gsk3β</i>	0.999 9	99.54	56.0
<i>gys2</i>	0.997 4	98.91	54.0
<i>PYGL</i>	0.986 9	108.13	57.0
<i>IDH2</i>	0.990 1	90.55	53.5
<i>PDK1</i>	0.998 4	90.37	53.5
<i>β-actin</i>	0.999 2	92.90	55.0

(RNase H)进行反转录。转录完成后进行RT-qPCR实验,将SYBR Green I(BIO-RAD)用作DNA结合染料,并将 β -肌动蛋白(β -actin)用作内参基因。使用Primer 5设计引物,引物设计完成后对其扩增效率进行验证以确保实验的可靠性。扩增程序为:95 $^{\circ}$ C预变性30 s,95 $^{\circ}$ C变性5 s,退火温度下退火10 s,40个循环,结束后分析数据绘制熔解曲线。本文所用聚合酶链式反应引物序列和 R^2 分别如表1和表2所示。

1.10 数据分析

通过单因素ANOVA处理实验数据,分析对照组和CuO NPs处理组间的关系,结果均以平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)值表示,并使用IBM SPSS Statistic 19(IBM Corp., 纽约, 美国)对实验数据进行多重比较检验,其中RT-qPCR数据先经 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行标准化处理后再进行显著性差异分析。在 $P<0.05$ 水平下对所有数据进行统计学差异分析。

2 结果

2.1 CuO NPs对HepG2细胞存活率和培养基内葡萄糖消耗的影响

经过不同浓度的CuO NPs暴露24 h后,细胞存活率如图1所示。实验结果显示,随着CuO NPs浓度的升高,细胞存活率具有下降趋势,与对照组细胞存活率相比,0.5、1、2、4、8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组细胞存活率下降,而16和32 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的处理组细胞存活率极显著下降,存活率均低于50%。图2中倒置显微镜下HepG2细胞数量同样也是逐渐减少的。

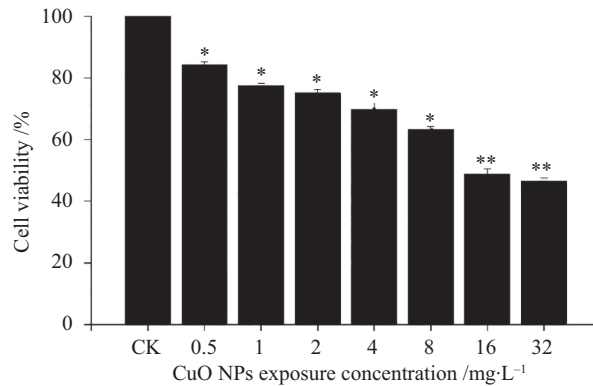
经CuO NPs暴露24 h后各处理组培养基内的葡萄糖消耗量如图3所示。CuO NPs处理组的葡萄糖消耗量与对照组相比有显著变化,处理组培养基内葡萄糖消耗量随着CuO NPs浓度的升高而下降,各处理组的葡萄糖消耗量分别为5.37、4.69、4.00、3.79、3.51、2.96、2.76 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本实验旨在研究非半

数致死浓度下的CuO NPs对HepG2细胞糖代谢的影响,故选取0.5、1、2、4、8 mg·L⁻¹作为正式实验的暴露浓度。

2.2 CuO NPs对HepG2细胞糖原的影响

为了探究不同浓度的CuO NPs对HepG2细胞糖代谢的影响,本实验测定了不同浓度CuO NPs暴露后HepG2细胞内糖原的含量。糖原含量是糖代谢过程中重要的生化指标,在糖代谢中肝脏通过糖原合

成、糖原分解及糖异生(gluconeogenesis)作用来维持血糖浓度的稳定,故测定HepG2细胞内糖原的含量能够了解经过CuO NPs暴露后细胞内糖代谢是否发生变化。如图4所示,暴露于不同浓度的CuO NPs 24 h,与对照组相比,HepG2细胞内的糖原均显著下降,并且具有浓度依赖性,随着CuO NPs浓度的升高,糖原含量逐渐下降,各处理组中糖原含量分别为0.52、0.41、0.35、0.30、0.22、0.15 mg·mgprot⁻¹。

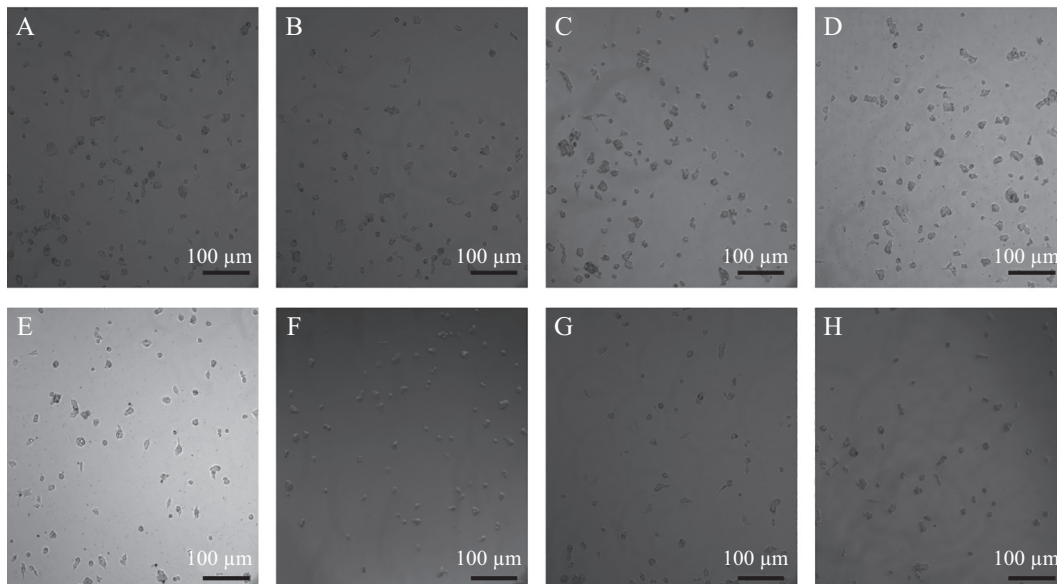


不同浓度CuO NPs暴露HepG2细胞24 h后用MTT法检测细胞活性, $n=6$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与CK组相比。

Different concentrations of CuO NPs were exposed to HepG2 cells for 24 h and the cell viability was detected by MTT method, $n=6$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with CK group.

图1 CuO NPs暴露后HepG2细胞的存活率

Fig. 1 Survival rate of HepG2 cells after exposure to CuO NPs



不同浓度CuO NPs暴露HepG2细胞24 h后置于倒置显微镜下拍摄细胞。A: CK; B: 0.5 mg·L⁻¹ CuO NPs; C: 1 mg·L⁻¹ CuO NPs; D: 2 mg·L⁻¹ CuO NPs; E: 4 mg·L⁻¹ CuO NPs; F: 8 mg·L⁻¹ CuO NPs; G: 16 mg·L⁻¹ CuO NPs; H: 32 mg·L⁻¹ CuO NPs。

HepG2 cells were exposed to different concentrations of CuO NPs for 24 h and photographed under an inverted microscope. A: CK; B: 0.5 mg·L⁻¹ CuO NPs; C: 1 mg·L⁻¹ CuO NPs; D: 2 mg·L⁻¹ CuO NPs; E: 4 mg·L⁻¹ CuO NPs; F: 8 mg·L⁻¹ CuO NPs; G: 16 mg·L⁻¹ CuO NPs; H: 32 mg·L⁻¹ CuO NPs.

图2 倒置显微镜下的HepG2细胞

Fig. 2 HepG2 cells under an inverted microscope

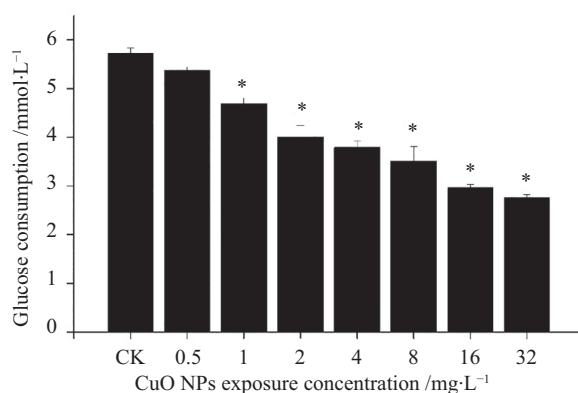
2.3 CuO NPs对HepG2细胞PFK和PC活性的影响

经CuO NPs暴露24 h后HepG2细胞PFK和PC活性如图5所示。PFK和PEPC分别是糖酵解(glycolysis)和糖异生过程中的关键调节酶。与对照组相比, 4 mg·L⁻¹ CuO NPs处理组中PC活性显著上升, 每10⁴个细胞活性达到0.109 U, 其余处理组中活性下降; 而各处理组中PFK的活性则显著下降, 分别为0.140、0.081、0.164、0.177、0.092 U·mg⁻¹。

2.4 CuO NPs对HepG2细胞糖代谢相关基因表达情况的影响

为了进一步验证上述实验结果, 本实验研究了糖代谢中重要过程的相关酶基因的表达情况。实

验结果(图6)显示, 葡萄糖转运体(glucose transporter, *GLUT1*)在0.5、1、2 mg·L⁻¹处理组暴露后表达下调, 分别约为对照组的0.75、0.48、0.65倍, 但是在4 mg·L⁻¹和8 mg·L⁻¹时表达却上升了, 达到对照组的1.43和1.72倍; 糖酵解过程中关键酶PKM和磷酸果糖激酶-2(phosphofructokinase-2, *PFK2*)具有类似的表达情况, 与对照组相比, 暴露后基因的表达均下调或显著下调, 并且随着浓度的增加表达上升, 但*PFK2*在8 mg·L⁻¹时显著上升, 约为对照组的1.91倍; 与糖酵解相对应的糖异生途径的相关基因葡萄糖6磷酸酶(glucose 6 phosphatase, *g6pc*)的表达显著下降, 0.5、1、2、8 mg·L⁻¹处理组分别约为对照组的0.44、0.15、

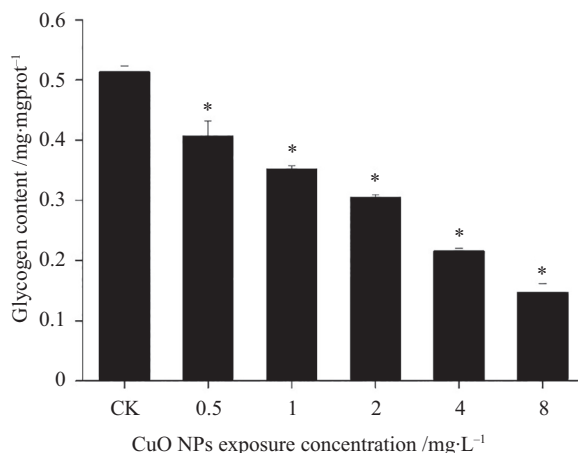


不同浓度CuO NPs暴露HepG2细胞24 h后测定培养基中的葡萄糖含量, 与CK组对照得出葡萄糖, $n=6$ 。* $P<0.05$, 与CK组相比。

Different concentrations of CuO NPs were exposed to HepG2 cells for 24 h, and the glucose content in the culture medium was measured, and the glucose was compared with the CK group, $n=6$. * $P<0.05$ compared with CK group.

图3 CuO NPs暴露后细胞培养基内葡萄糖的消耗量

Fig.3 Consumption of glucose in cell culture medium after exposure to CuO NPs

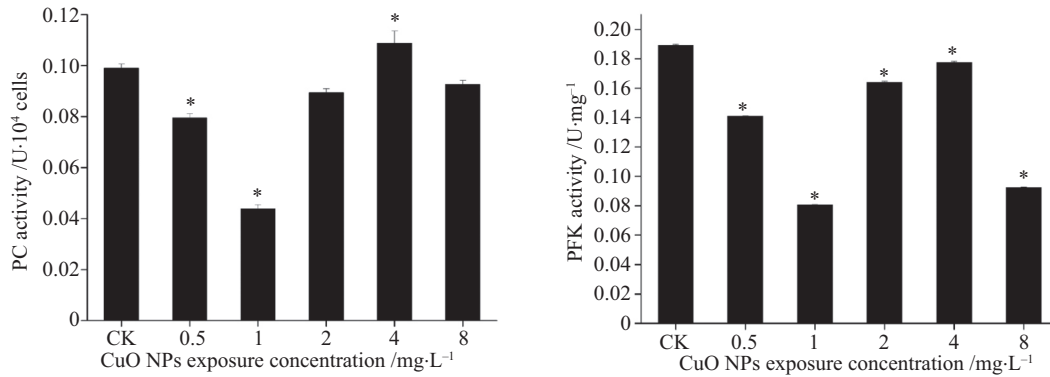


不同浓度CuO NPs暴露HepG2细胞24 h后测定细胞内的糖原含量, $n=3$ 。* $P<0.05$, 与CK组相比。

Different concentrations of CuO NPs were exposed to HepG 2 cells for 24 h and the glycogen content in the cells was measured, $n=3$. * $P<0.05$ compared with CK group.

图4 CuO NPs暴露后HepG2细胞内糖原含量

Fig.4 Glycogen content in HepG2 cells after exposure to CuO NPs

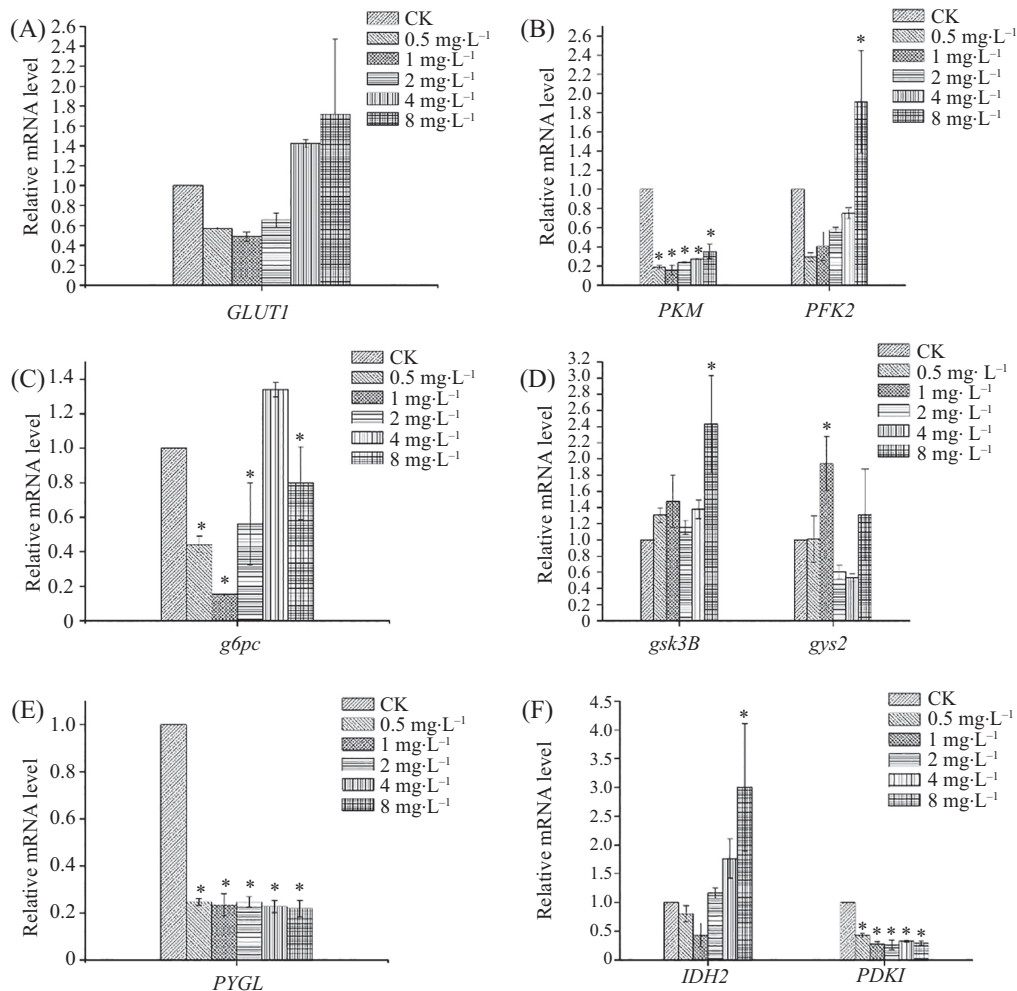


不同浓度CuO NPs暴露HepG2细胞24 h后用试剂盒测定PC和PFK的酶活性, $n=3$ 。* $P<0.05$, 与CK组相比。

Different concentrations of CuO NPs were exposed to HepG2 cells for 24 h, and the enzyme activity of PC and PFK was measured with the kit, $n=3$. * $P<0.05$ compared with CK group.

图5 经CuO NPs暴露后PC和PFK的活性

Fig.5 The activity of PC and PFK after exposure to CuO NPs



用RT-qPCR实验检测经CuO NPs暴露24 h后HepG2细胞糖代谢相关途径的酶表达水平。A: 葡萄糖转运; B: 糖酵解; C: 糖异生; D: 糖原合成; E: 糖原分解; F: TCA循环; $n=3$; * $P<0.05$, 与CK组相比。

RT-qPCR was used to detect the expression levels of enzymes related to glucose metabolism in HepG2 cells after exposure to CuO NPs for 24 h. A: glucose transport; B: glycolysis; C: gluconeogenesis; D: glycogen synthesis; E: glycogen decomposition; F: TCA cycle; $n=3$; * $P<0.05$ compared with CK group.

图6 CuO NPs暴露后HepG2细胞糖代谢相关基因的表达情况

Fig.6 Expression of glucose metabolism-related genes in HepG2 cells after exposure to CuO NPs

0.56、0.80倍,而在4 mg·L⁻¹处理组表达上升,约为1.34倍;而柠檬酸循环中的关键酶*IDH2*也出现了变化,其在8 mg·L⁻¹时基因表达显著上调,与对照组相比上调了约3倍;与糖原合成相关基因糖原合成酶激酶3β(*glycogen synthase kinase 3β*, *gsk3β*)的表达出现了上升,其在8 mg·L⁻¹处理组表达显著上调,约为对照组的2.43倍;而与对照组相比,糖原合酶(*glycogen synthase*, *gys2*)的表达在1 mg·L⁻¹时显著上升,约为1.94倍,在2 mg·L⁻¹和4 mg·L⁻¹时表达下调,分别约为0.61和0.53倍;与糖原分解相关基因糖原磷酸化酶(*glycogen phosphorylase*, *PYGL*)的表达在各个处理组中均显著下调,均低于对照组的0.25倍。

3 讨论

CuO NPs由于特殊的物理化学性质而具有良好的性能,广泛应用于各个领域,从而对环境和生物体造成潜在的危害,引起研究者的广泛关注。根据本实验室近年来的研究发现,纳米粒子极易通过细胞膜进入细胞,损伤细胞,并对线粒体造成一定损伤。但非致死浓度下CuO NPs对细胞糖代谢的影响却少有人研究。为了探究这个课题,本研究以HepG2细胞作为受试生物,对暴露后细胞的存活率、培养基内葡萄糖的消耗量、糖原含量以及糖代谢相关基因的表达情况进行检测,以便探究其影响机制。

本实验初期发现,经CuO NPs暴露后会引起细胞凋亡(图1),与显微镜下观察到的HepG2细胞数量下降一致,这与之前的研究结果一致,WANG等^[36]研究CuO NPs和CuO BPs对A549细胞毒性的影响,实验结果发现CuO NPs同样会引起A549细胞凋亡,抑制细胞存活率。此外实验结果表明,经CuO NPs暴露后培养基内葡萄糖的消耗显著减少(图2),且经CuO NPs暴露后胞内糖原的含量也呈现出显著下调(图3),这两者的结果相一致。肝脏通过糖原分解与合成以及糖异生作用在葡萄糖稳态中发挥重要作用,将糖原分解提供给循环系统,并通过增加糖原合成以从循环中去除葡萄糖^[37]。换言之,糖原分解生成的葡萄糖量与从胞外吸收的葡萄糖量应是此消彼长的状态,通过这样的机制维持机体葡萄糖稳定。

为了更深入了解CuO NPs对HepG2细胞糖代谢影响的机制,实验采用RT-qPCR测定了糖代谢过程中关键基因的表达情况。葡萄糖转运蛋白是细胞转运葡萄糖的载体, GLUT1是其中发现的最早也是分

布最广的一类蛋白,主要负责调节葡萄糖的摄取,经研究表明其在肿瘤细胞中的表达远高于在普通细胞中的表达^[38],因此可作为肿瘤标志物,而HepG2细胞乃是人体肝癌细胞,故某种程度上可以用HepG2细胞中*GLUT1*的表达情况表征细胞对葡萄糖的吸收情况。结果显示暴露于0.5、1、2 mg·L⁻¹处理组的*GLUT1*表达出现了下调(图6A),与胞外葡萄糖消耗减少相对应。但是在4 mg·L⁻¹和8 mg·L⁻¹处理组*GLUT1*表达较对照组有所上升,推测是由于浓度过高毒性过强,为了维持葡萄糖稳定刺激了*GLUT1*的表达造成。该结果与前文中葡萄糖消耗下调相呼应,皆表明CuO NPs暴露会影响HepG2细胞对葡萄糖的吸收,从而影响细胞的糖代谢。

糖原是具有分支结构的葡萄糖多聚物,机体细胞能量供应不足时,肝糖原转化分解为葡萄糖,提供能量;当机体细胞能量供应充足时,葡萄糖合成糖原贮存于肝细胞及肌细胞浆中,消耗能量;糖原的分解和合成代谢是两条相反的途径,对于生物体调节自身血糖和糖代谢的意义重大^[39],*PYGL*和*gys2*分别是两条途径的限速酶。本实验测定了CuO NPs暴露后*PYGL*(图6E)和*gys2*(图6D)的表达,发现相较于对照组,各处理组中*PYGL*的表达显著下降,前人研究表明*PYGL*在分化差增值快的肝癌细胞表达下调^[40],这与本实验结果一致;而*gys2*在1 mg·L⁻¹ CuO NPs暴露时表达显著上调,猜测可能是因为暴露前期细胞来不及对毒性作出应对机制故而其表达上升,而在2 mg·L⁻¹ CuO NPs暴露和4 mg·L⁻¹ CuO NPs暴露时基因表达也下降,两者的表达情况表明糖原分解与合成的酶皆受到了抑制。这导致有关糖酵解的酶活性下降,肝脏对葡萄糖摄取减少,致使葡萄糖利用明显降低^[41]。*gsk3β*是糖原合成的另一关键基因,同时也是葡萄糖稳定的负调节剂,通过磷酸化糖原合成酶(*phosphorylated glycogen synthase*, *GS*)抑制其活性,降低肝糖原的合成,使体内血糖浓度升高。*gsk3β*基因表达上升(图6D)也从另一方面解释了胞内糖原减少的原因。

糖酵解几乎是所有生物体进行葡萄糖分解代谢所必须经过的共同途径,在酶的作用下可将葡萄糖降解为丙酮酸,因此不管是细胞本身经过糖原分解而来的葡萄糖还是从培养基中获取的葡萄糖均会进行糖酵解,而糖异生与糖酵解途径则相反,但又非糖酵解的简单逆转,机体可通过糖异生将非糖物质

转变为葡萄糖和糖原^[39]。PFK2是糖酵解途径的关键酶,其酶活性与对照组相比显著下降,本实验还检测了其RNA水平的表达情况(图6B),PFK2可以通过影响果糖-2,6-二磷酸(糖酵解的重要刺激剂)的生成水平实现对糖酵解通路的调节,其表达增多可促进细胞糖酵解,生成大量乳酸和ATP,以满足肿瘤细胞增殖对能量的快速需求^[42]。但结果表明PFK2的表达下调,糖酵解受到抑制,故抑制了细胞增殖,与细胞存活率下降一致;而高浓度(8 mg·L⁻¹) CuO NPs处理组其表达却显著上升,我们推测是由于浓度过高出现了代谢紊乱现象。g6pc是糖异生途径的关键酶,在酶的作用下生成果糖-6-磷酸,实验检测了其表达情况(图6C),结果表明其表达出现下调。此外糖异生途径中的限速酶PC活性变化趋势与其一致。由此可知,CuO NPs暴露会抑制HepG2细胞的糖酵解和糖异生过程。

柠檬酸循环(citric acid cycle)又被称为TCA循环,是糖、脂和氨基酸合成代谢与分解代谢的中心枢纽。葡萄糖通过糖酵解裂解生成丙酮酸,丙酮酸氧化生成乙酰辅酶A(CoA)后进入柠檬酸循环^[39]。丙酮酸的氧化脱羧反应是决定丙酮酸命运的关键步骤,所以本实验探究了催化该反应的丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, *PDK1*)的表达情况(图6F),发现CuO NPs暴露后其表达显著下调,其表达情况与前文PFK2的表达下调相一致。而TCA循环的关键酶异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, *IDH2*)的表达(图6F)未出现相同的变化趋势,其在最高暴露浓度时表达显著上升,我们猜测这可能是因为TCA循环受多个代谢反应影响造成,但可以确定高浓度的CuO NPs暴露会对TCA循环造成更显著的影响。

4 结论

综上所述,本研究结果表明经CuO NPs暴露后,HepG2细胞的糖代谢受到明显影响。葡萄糖转运的关键基因*GLUT1*表达下调,细胞的增殖能力下降并导致葡萄糖消耗减少;糖酵解过程中关键酶*PKM*和*PFK2*基因的表达均下调,但*PFK2*在高浓度(8 mg·L⁻¹) CuO NPs处理时显著上升;糖异生途径基因*g6pc*的表达显著下降;而柠檬酸循环的限速酶*IDH2*在高浓度(8 mg·L⁻¹) CuO NPs处理时基因表达显著上调;糖原合成相关基因*gsk3β*表达上升、*gys2*表达在低浓度

(1 mg·L⁻¹) CuO NPs处理时显著上升;糖原分解基因*PYGL*表达显著下调。总之CuO NPs暴露抑制HepG2细胞对胞外葡萄糖的吸收,干扰胞内糖原的合成与分解,抑制糖酵解和糖异生,CuO NPs高浓度时甚至会引起胞内的糖代谢紊乱。

参考文献 (References)

- [1] 杨玉芬,陈清如. 纳米材料的基本特征与纳米科技的发展[J]. 中国粉体技术(YANG Y F, CHEN Q R. The basic characteristics of nanomaterials and the development of nanotechnology [J]. China Powder Sci Tech), 2002, 8(3): 22-7.
- [2] LAUX P, TENTSCHERT J, RIEBELING C, et al. Nanomaterials: certain aspects of application, risk assessment and risk communication [J]. Arch Toxicol, 2018, 92(1): 121-41.
- [3] LOWRY G V, AVELLAN A, GILBERTSON L M. Opportunities and challenges for nanotechnology in the agri-tech revolution [J]. Nat Nanotechnology, 2019, 14(6): 517-22.
- [4] FRANCIS B, SUNTHARAVATHANAN M, BAHIJJA R A, et al. Application of nanotechnology for the development of microbicides [J]. Nanotechnology, 2017, 28(5): 052001.
- [5] CHATURVEDI V K, SINGH A, SINGH V K, et al. Cancer nanotechnology: a new revolution for cancer diagnosis and therapy [J]. Curr Drug Metab, 2019, 20(6): 416-29.
- [6] XIONG J Y, SHENG C H, WANG Q, et al. Toughened and water-resistant starch/TiO₂ bio-nanocomposites as an environment-friendly food packaging material [J]. Mater Res Express, 2019, 6(5): 1-11.
- [7] SONG J, WU F, WAN Y Q, et al. Colorimetric detection of melamine in pretreated milk using silver nanoparticles functionalized with sulfanilic acid [J]. Food Control, 2015, 50: 356-61.
- [8] LI X H, LIU B G, HUN X. Bimetallic nanomaterials as nanocatalysts and the carrier coupling chemiluminescence aptamer strategy for cancer cell detection [J]. Sens Actuators B Chem, 2018, 277: 510-6.
- [9] LU J, WEBSTER T J. Reduced immune cell responses on nano and submicron rough titanium [J]. Acta Biomater, 2015, 16: 223-31.
- [10] ROCCA A, MOSCATO S, RONCA F, et al. Pilot *in vivo* investigation of cerium oxide nanoparticles as a novel anti-obesity pharmaceutical formulation [J]. Nanomedicine, 2015, 11(7): 1725-34.
- [11] YU J J, KHALIL M, LIU N, et al. Effect of particle hydrophobicity on CO₂ foam generation and foam flow behavior in porous media [J]. Fuel, 2014, 126: 104-8.
- [12] LU Y W, CHEN T, CHEN X F, et al. Fabrication of TiO₂-doped ZrO₂ nanofiltration membranes by using a modified colloidal sol-gel process and its application in simulative radioactive effluent [J]. J Membr Sci, 2016, 514: 476-86.
- [13] SONG Z N, FATHIZADEH M, HUANG Y, et al. TiO₂ nanofiltration membranes prepared by molecular layer deposition for water purification [J]. J Membr Sci, 2016, 510: 72-8.
- [14] LIU Y, HARDIE J, ZHANG X, et al. Effects of engineered nanoparticles on the innate immune system [J]. Semin Immunol, 2017, 34: 25-32.
- [15] FARKA Z, JURIK T, KOVAR D, et al. Nanoparticle-based immunochemical biosensors and assays: recent advances and chal-

- lenges [J]. Chem Rev, 2017, 117(15): 9973-10042.
- [16] SHI Y, PILOZZI A R, HUANG X D. Exposure of CuO nanoparticles contributes to cellular apoptosis, redox stress, and Alzheimer's β amyloidosis [J]. Int J Environ Res Public Health, 2020, 17(3): 1005.
- [17] SHIRI M, MONA N N, BAEERI M, et al. Blockage of both the extrinsic and intrinsic pathways of diazinon-induced apoptosis in PaTu cells by magnesium oxide and selenium nanoparticles [J]. Int J Nanomedicine, 2016, 11: 6239-50.
- [18] CHEN N, WANG H, HUANG Q, et al. Long-term effects of nanoparticles on nutrition and metabolism [J]. Small, 2014, 10(18): 3603-11.
- [19] GOU X L, WANG G X, YANG J, et al. Chemical synthesis, characterization and gas sensing performance of copperoxide nanoribbons [J]. J Mater Chem, 2008, 18(9): 965-9.
- [20] BOCHENKOV V E, SERGEEV G B. Adsorption, catalysis, and reactions on the surfaces of metal nano-oxides [J]. Catal Ind, 2010, 2(1): 1-10.
- [21] FRENK S, TAL B M, DROR I, et al. Effect of metal oxide nanoparticles on microbial community structure and function in two different soil types [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e84441.
- [22] TANG Y L, HE R, ZHAO J, et al. Oxidative stress-induced toxicity of CuO nanoparticles and related toxicogenomic responses in *Arabidopsis thaliana* [J]. Environ Pollut, 2016, 212: 605-14.
- [23] DE JONG W H, RIJK E D, BONETTO A, et al. Toxicity of copper oxide and basic copper carbonate nanoparticles after short-term oral exposure in rats [J]. Nanotoxicology, 2019, 13(1): 50-72.
- [24] ASSADIAN E, ZAREI M H, GILANI A G, et al. Toxicity of copper oxide (CuO) nanoparticles on human blood lymphocytes [J]. Biol Trace Elem Res, 2018, 184(2): 350-7.
- [25] AKHTAR M J, AHAMED M, FAREED M, et al. Protective effect of sulphoraphane against oxidative stress mediated toxicity induced by CuO nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts BALB 3T3 [J]. J.Toxicol Sci, 2012, 37(1): 139-48.
- [26] MAISANO M, CAPPELLO T, CATANESE E, et al. Developmental abnormalities and neurotoxicological effects of CuO NPs on the black sea urchin *Arbacia lixula* by embryotoxicity assay [J]. Mar Environ Res, 2015, 111: 121-7.
- [27] SIDDIQUI M A, ALHADLAQ H A, AHMAD J, et al. Copper oxide nanoparticles induced mitochondria mediated apoptosis in human hepatocarcinoma cells [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e69534.
- [28] NAIR P M G, CHUNG I M. Impact of copper oxide nanoparticles exposure on *Arabidopsis thaliana* growth, root system development, root lignification, and molecular level changes [J]. Environ Sci Pollut Res, 2014, 21(22): 12709-22.
- [29] XU J, ZHANG Q P, LI X, et al. The effects of copper oxide nanoparticles on dorsoventral patterning, convergent extension, and neural and cardiac development of zebrafish [J]. Aquat Toxicol, 2017, 188: 130-7.
- [30] 张宝月, 刘艾林, 杜冠华. 能量代谢紊乱对疾病的影响及其潜在药物靶点[J]. 药理学报(ZHANG B Y, LIU A L, DU G H. The impact of energy metabolism disorder on disease and its potential drug targets [J]. Acta Pharm Sin), 2019, 54(8): 1372-81.
- [31] LEI R H, WU C Q, YANG B H, et al. Integrated metabolomic analysis of the nano-sized copper particle-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats: a rapid *in vivo* screening method for nanotoxicity [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2008, 232(2): 292-301.
- [32] SHARMA V, ANDESON D, DHAWAN A. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2) [J]. Apoptosis, 2012, 17(8): 852-70.
- [33] AHMAD J, AHMAD M, AKHTAR M J, et al. Apoptosis induction by silica nanoparticles mediated through reactive oxygen species in human liver cell line HepG2 [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2012, 259(2): 160-8.
- [34] 向明灯, 于云江, 李琴, 等. 四溴双酚A对HepG2细胞的毒性作用及其剂量-反应关系评估[J]. 环境卫生学杂志(XIANG M D, YU Y J, LI Q, et al. Toxic effect of tetrabromobisphenol A on HepG2 cells and evaluation of its dose-response relationship [J]. J Environ Hyg), 2013, 3(6): 481-5.
- [35] GERETS H H J, TILMANT K, GERIN B, et al. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins [J]. Cell Biol Toxicol, 2012, 28: 69-87.
- [36] WANG Z Y, LI N, ZHAO J, et al. CuO nanoparticle interaction with human epithelial cells: cellular uptake, location, export, and genotoxicity [J]. Chem Res Toxicol, 2012, 25(7): 1512-21.
- [37] YAN F J, ZHANG J, ZHANG L X, et al. Mulberry anthocyanin extract regulates glucose metabolism by promotion of glycogen synthesis and reduction of gluconeogenesis in human HepG2 cells [J]. Food Funct, 2016, 7(1): 425-33.
- [38] TAKANAGA H, CHAUDHURI B, FROMMER W B. GLUT1 and GLUT9 as major contributors to glucose influx in HepG2 cells identified by a high sensitivity intramolecular FRET glucose sensor [J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1778(4): 1091-9.
- [39] 黄熙泰, 于自然, 李翠凤. 现代生物化学[M].2版. 北京: 化学工业出版社(HUANG X T, YU Z R, LI C F. Modern Biochemistry 2nd edition [M]. Chemical Industry Press), 2005: 311-38.
- [40] 王秋红, 杨欣, 李雪磊, 等. 基于蛋白质组学的附子、干姜和花椒的性味研究[J]. 世界中医药(WANG Q H, YANG X, LI X L, et al. Research on the nature and flavor of aconite, dried ginger and zanthoxylum bungeanum based on proteomics [J]. World Chinese Medicine), 2015, 10(12): 1824-36.
- [41] 朱述钧, 孙文, 薛文达. 肝纤维化过程中基因表达变化的研究进展[J]. 江苏大学学报(医学版)(ZHU S J, SUN W, XUE W D. Research progress of gene expression changes during liver fibrosis [J]. Journal of Jiangsu University, Medicine Edition), 2010, 20(1): 86-90,92.
- [42] JIANG P, DU W J, WANG X W, et al. p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase [J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(3): 310-6.