

甜菜碱提高 LO2 细胞中抗氧化酶的表达水平

张猛猛, 辛璇, 赖富饶, 吴晖*

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 该研究探究了甜菜碱 (BET) 对人正常肝细胞 LO2 细胞中超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx)、过氧化氢酶 (CAT) mRNA 水平的影响及机制。使用实时荧光定量、蛋白质免疫印迹和酶联免疫吸附法检测细胞内抗氧化酶的 mRNA 水平, 以及 Nrf2-Keap1-ARE 通路的相关指标。经不同浓度的 BET 处理 12 h 后, LO2 细胞中 SOD、GPx 和 CAT 的 mRNA 水平显著提高, 最高分别提高了 1.08、0.51、0.88 倍 ($p < 0.05$); 经 250 $\mu\text{mol/L}$ BET 处理后, LO2 细胞核中可与 ARE 区域结合的 Nrf2 蛋白水平和细胞内总的 NRF2 蛋白水平分别显著提高了 1.21、0.80 倍 ($p < 0.05$); 经 Nrf2 蛋白抑制剂鸦胆子苦醇处理后, BET 对三种抗氧化酶 mRNA 水平的提高作用完全丧失; 进一步地分析表明, BET 并未显著提高 Nrf2 蛋白的 mRNA 和磷酸化水平, 但将 Keap1 的 mRNA 和蛋白质水分别降低了 38.21% 和 49.15% ($p < 0.05$)。这些结果表明, BET 可通过降低 Keap1 的水平激活 Nrf2-Keap1-ARE 通路, 进而提高抗氧化酶的 mRNA 水平。

关键词: 甜菜碱; 抗氧化酶; Nrf2-Keap1-ARE 通路

文章编号: 1673-9078(2022)02-28-35

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.2.0590

Betaine Increasing Expression Levels of Antioxidase in LO2 Cells

ZHANG Mengmeng, XIN Xuan, LAI Furao, WU Hui*

(College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The present study investigated the effect of betaine (BET) on the mRNA levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), catalase (CAT) in human normal hepatocyte LO2 cells and the mechanism. The mRNA levels of antioxidant enzymes and indicators involving Nrf2-Keap1-ARE pathway were detected by real-time fluorescence quantitative method, western blot and enzyme-linked immunosorbent assay. The mRNA levels of SOD, GPX and CAT in LO2 cells were significantly increased by 1.08, 0.51 and 0.88 times, respectively, after 12 h treatment with different concentrations of BET ($p < 0.05$). After 250 $\mu\text{mol/L}$ of BET treatment, the protein level of Nrf2, which can bind to the ARE region in the nucleus, and the total Nrf2 protein in cells were significantly increased by 1.21 and 0.80 fold, respectively ($p < 0.05$). After treatment with brucopicol, the effect of BET on the mRNA levels of three antioxidant enzymes was completely abolished. Further analysis showed that BET did not significantly increase the mRNA and phosphorylation levels of Nrf2, but decreased the mRNA and protein content of Keap1 by 38.21% and 49.15%, respectively ($p < 0.05$). These results indicate that BET activates the Nrf2-Keap1-ARE pathway by decreasing the level of Keap1, and thus enhances the expression of antioxidant enzymes.

Key words: betaine; antioxidantase; Nrf2-Keap1-ARE pathway

引文格式:

张猛猛,辛璇,赖富饶,等.甜菜碱提高 LO2 细胞中抗氧化酶的表达水平[J].现代食品科技,2022,38(2):28-35

ZHANG Mengmeng, XIN Xuan, LAI Furao, et al. Betaine increasing expression levels of antioxidantase in LO2 cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(2): 28-35

甜菜碱 (BET) 是一种广泛存在于动植物和微生物中的季胺碱类物质, 其可作为甲基供体参与蛋氨酸循环, 也可作为渗透调节剂调节细胞渗透压, 目前被

收稿日期: 2021-06-04

基金项目: 中国博士后科学基金项目 (2019M662931)

作者简介: 张猛猛 (1989-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 天然产物的开发与应用, E-mail: zhangmengmengscut@126.com

通讯作者: 吴晖 (1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物的开发与应用, E-mail: fehwa@scut.edu.cn

广泛应用于食品添加剂、制药、饲料、日化等领域。由于合成甜菜碱的能力有限, 人类需要通过食用富含甜菜碱的食物 (如谷物、菠菜等) 获取甜菜碱^[1]。一般来说日常饮食摄入的甜菜碱即可满足身体所需, 但有研究发现额外补充甜菜碱能够预防和辅助治疗多种疾病, 尤其是对由疾病、药物、酒精等多种因素引起的肝损伤有一定的保护作用^[2]。其中的机制主要和甜菜碱的抗氧化能力密切相关^[3,4]。与常见天然抗氧化剂不同的是, 甜菜碱并无直接自由基清除能力, 其

主要通过增强机体自身的抗氧化能力来发挥抗氧化功能^[5]。超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、过氧化氢酶(CAT)等组成的抗氧化酶系统是机体抗氧化防御体系的重要组成部分。已有很多文献报道甜菜碱能够提高机体内SOD、GPx、CAT等抗氧化酶的酶活和表达水平^[6,7],但其中的机制尚不清楚。事实上,甜菜碱因卓越的抗氧化能力,在水果保鲜、畜牧养殖等领域也展现出巨大的应用价值。随着甜菜碱的应用潜力和研究价值越来越被人们所关注,解析甜菜碱增强抗氧化酶表达的机制,不仅能够深化对甜菜碱保护肝脏等功能的认识,还能为甜菜碱进一步的研究与应用奠定理论基础。

细胞抵御氧化应激的主要通路是转录因子NF-E2相关因子2(Nrf2)-Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Keap1)-抗氧化反应元件(ARE)通路。该通路能够调控抗氧化酶系及II相解毒酶的表达,以清除过多的活性氧(ROS)造成的氧化应激。近些年来,该通路还被发现可作为药物靶点,应用于由氧化应激诱导产生的疾病的预防和治疗中^[8]。笔者在前期的研究中发现,甜菜碱能够提高处于正常状态下的人体肝细胞LO2细胞中SOD、CAT等抗氧化酶的酶活^[7],但还不清楚Nrf2-Keap1-ARE通路在其中的作用。本研究拟通过探究甜菜碱对LO2细胞抗氧化酶表达水平的影响,及该影响与Nrf2-Keap1-ARE通路的关系,来揭示甜菜碱提高抗氧化酶表达水平的机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甜菜碱(98%纯度)购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒、CCK-8试剂购自南京建成生物工程研究所;细胞核蛋白质提取试剂盒、UNIQ-10柱式总RNA抽提试剂盒、AMV第一链cDNA合成试剂盒、2×SG Fast qPCR Master Mix试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;人转录因子NF-E2相关因子2(Nrf2)ELISA试剂盒购自Thermo Fisher公司;Nrf2、pNrf2、Keap1以及β-actin等蛋白的抗体购自Abcam公司;PD98059、LY294002、SP600125、SB203580、GF109203X、Compound C购自MCE(MedChemExpress)公司;LO2细胞系,本实验室保存;DMEM培养基、胰酶购自GIBCO公司;胎牛血清购自Hyclone公司。

1.2 主要仪器设备

ABI 7500 实时荧光定量PCR仪,美国Applied

Biosystems公司;Infinite M1000 Pro酶标仪,瑞士Tecan公司。

1.3 试验方法

1.3.1 细胞毒性

取对数生长期的LO2细胞,以 1×10^4 cells/孔的数量接种于96孔板,用DMEM培养液(1%双抗、10%胎牛血清)在5% CO₂, 37 °C条件的培养箱中培养24 h。去除上清液,加入100 μL含不同浓度甜菜碱的新鲜培养液(62.5、125、250、500、1000 μmol/L),以正常培养液作为阴性对照。12 h后弃去含药培养液,加入100 μL含10% CCK8试剂的培养液,继续培养1 h后于450 nm处测每孔的吸光值。细胞存活率按以下公式计算:

$$\text{细胞存活率}/\% = \text{As}/\text{Ac} \times 100\%$$

式中:

As——样品的吸光值;

Ac——阴性对照的吸光值。

1.3.2 实时荧光定量PCR(QPCR)

表1 所用引物序列

Table 1 The primer sequence

项目	引物序列
SOD	Forward: 5'-GGCAAAGGTGGAAATGAAGA-3'
	Reverse: 5'-GGGCCTCAGACTACATCCAA-3'
CAT	Forward: 5'-CGTGCTGAATG AGGAACAGA-3'
	Reverse: 5'-AGTCAGGGTGGGA CCTCAGTG-3'
GPx	Forward: 5'-ACGATGTTGCCT GGAAC TTT-3'
	Reverse: 5'-GATGTCAGGCTCGA TGTC AA-3'
Nrf2	Forward: 5'-ACCTCCCTGTTGTTGATCC-3'
	Reverse: 5'-CACTTTATCTTACCCCTCCT-3'
Keap1	Forward: 5'-TGCTCAACCGCTTGCTGTATGC-3'
	Reverse: 5'-TCATC CGCCACTCATTCTCTCC-3'
β-actin	Forward: 5'-TGGCACC CAGCACAATGAAG-3'
	Reverse: 5'-GACTCGTC ATACTCCTGCTTGC-3'

将LO2细胞配成浓度为 1×10^5 cells/mL的细胞悬液后接种于6孔板,每孔3 mL。培养24 h后吸去培养基,分别加入不同浓度的甜菜碱(62.5、125、250、500、1000 μmol/L)。12 h后,收集并裂解细胞,使用UNIQ-10柱式总RNA抽提试剂盒提取LO2细胞总RNA,使用AMV第一链cDNA合成试剂盒将RNA反转录成cDNA,使用2×SG Fast qPCR Master Mix试剂盒进行PCR扩增。以β-actin为内参,结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。SOD、CAT、GPx、Nrf2、Keap1、β-actin等的引物序列见表1。

1.3.3 甜菜碱对Nrf2-Keap1-ARE通路中相关

蛋白水平的影响

将 LO2 细胞配成浓度为 1×10^5 cells/mL 的细胞悬液后接种于 10 cm 培养皿, 每皿 10 mL。培养 24 h 后吸去培养基, 加入 250 $\mu\text{mol/L}$ 甜菜碱处理 12 h。然后收集细胞, 每 20 μL 细胞沉淀加入 200 μL 浆蛋白抽提试剂, 冰浴孵育 10 min, 然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 12000 r/min 离心 10 min, 上清液为细胞浆蛋白, 沉淀为细胞核。收集细胞核沉淀, 加入 50 μL 核蛋白抽提试剂, 冰浴 10 min, 然后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 12000 r/min 离心 10 min, 所得上清液即为细胞核蛋白。用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定细胞核蛋白中蛋白质含量, 然后利用 Nrf2 ELISA 试剂盒检测细胞核提取物中可与 ARE 位点结合的 Nrf2 蛋白的含量。

细胞核内 Nrf2 的相对水平 = $C_{\text{样品}}/C_{\text{对照}}$

式中:

$C_{\text{样品}}$ ——甜菜碱处理组细胞核内的 Nrf2 蛋白含量, pg/mg 蛋白;

$C_{\text{对照}}$ ——对照组细胞核内的 Nrf2 蛋白含量, pg/mg 蛋白。

按上述条件处理细胞, 使用 NP40 裂解细胞, 然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 12000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定细胞裂解液中蛋白质含量。利用 SDS-PAGE 分离细胞裂解液中的蛋白, 再将蛋白转移到 PVDF 膜上。将膜与 Nrf2、pNrf2、Keap1 以及 β -actin 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 再与二抗室温孵育 1 h。最后利用特超敏 ECL 化学发光试剂检测蛋白条带, 利用 Image J 软件检测蛋白条带灰度值。

蛋白质相对水平 = $G_{\text{样品}}/G_{\text{对照}}$

式中:

$G_{\text{样品}}$ ——甜菜碱处理组细胞内的 Nrf2 与 β -actin 蛋白条带灰度值之比;

$C_{\text{对照}}$ ——对照组细胞内的 Nrf2 与 β -actin 蛋白条带灰度值之比。

1.3.4 激酶抑制剂对甜菜碱提高抗氧化酶 mRNA 水平的影响

分别往铺有细胞的 6 cm 培养皿加入 250 $\mu\text{mol/L}$ 的甜菜碱和不同激酶抑制剂 (1 $\mu\text{mol/L}$ PD98059、1 $\mu\text{mol/L}$ LY294002、1 $\mu\text{mol/L}$ SP600125、1 $\mu\text{mol/L}$ SB203580、2.5 $\mu\text{mol/L}$ GF109203X、1 $\mu\text{mol/L}$ Compound C), 以不加抑制剂的甜菜碱处理组为对照, 处理 12 h 后收集细胞, 提取 RNA, 检测 Nrf2、Keap1 和三种抗氧化酶的 mRNA 水平。

1.4 数据处理

结果采用平均值 \pm 标准偏差 (SD) 表示, 使用 SPSS 21.0 软件对数据进行单因素方差分析 (ANOVA)

并进行多组之间均数的差异性检验, $p < 0.05$ 时认为有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 甜菜碱对 LO2 细胞中抗氧化酶表达的影响

如图 1 所示, 在 250~1000 $\mu\text{mol/L}$ 甜菜碱处理 12 h 后, 细胞内的 SOD、GPx 和 CAT 等抗氧化酶的 mRNA 水平显著高于对照组 ($p < 0.05$), 最高分别提高了 1.08、0.51、0.88 倍。这与 Yu 等人^[9]在羊羔体内、Elsheikh 等人^[10]在小鼠体内的研究结果接近, 但显著低于 Cai 等人^[6]在湖羊体内的检测结果。这一结果的差异可能在于不同的研究所使用的模型、检测的组织部位、甜菜碱所用剂量和处理时间不同。此外, 在 250~1000 $\mu\text{mol/L}$ 的剂量内, SOD、GPx 和 CAT 的 mRNA 水平并没有随着浓度的增加而提高, 这表明甜菜碱对 LO2 细胞内抗氧化酶表达的提高作用是有限的。

需要指出的是, 当细胞或组织处于氧化应激状态时, 甜菜碱能否通过提高抗氧化酶的表达来发挥抗氧化功能还存在着一定的争议。其原因是有的研究发现甜菜碱能够提高抗氧化酶的表达, 但也有研究表明甜菜碱对抗氧化酶的表达无显著影响, 甚至有抑制作用^[5]。有研究认为这一现象是甜菜碱通过非酶抗氧化物质调节细胞氧化应激状态的结果: 当细胞处于轻度氧化应激状态时, 细胞会通过提高抗氧化酶的表达来抵抗氧化应激, 而甜菜碱可以通过非酶抗氧化物质抑制氧化应激, 从而降低细胞对氧化应激的应答, 也就是抗氧化酶表达的提高, 这时甜菜碱对抗氧化酶的表达表现出抑制作用; 当细胞处于过度氧化应激状态时, 细胞会启动凋亡程序, 关闭抗氧化酶基因的表达, 而甜菜碱通过非酶抗氧化物质缓和氧化应激, 阻止过度氧化应激诱导的凋亡程序, 从而解除凋亡程序对抗氧化酶表达的抑制, 这时甜菜碱对抗氧化酶的表达表现出提高作用^[5]。也就是说这些研究认为甜菜碱主要是通过非酶抗氧化系统发挥抗氧化功能, 其可能对抗氧化酶的表达并无直接的促进作用^[5,11]。这些之前的研究在探究甜菜碱的抗氧化作用时, 一般会使用 H_2O_2 、对乙酰氨基酚等物质诱导细胞或组织进入氧化应激状态。此时抗氧化酶水平的变化是甜菜碱和这些物质综合作用的结果, 并不仅仅是甜菜碱本身对抗氧化酶表达的作用。本研究是以处于正常生理状态的 LO2 细胞为模型, 本研究的结果表明甜菜碱是能够直接刺激细胞提高抗氧化酶的表达水平的。因此, 本研究认为, 对于处于氧化应激状态的细胞或组织, 甜菜碱也可能通过提高抗氧化酶的表达来发挥抗氧化作用, 只是最

终的抗氧化酶水平是多种因素综合作用的结果。

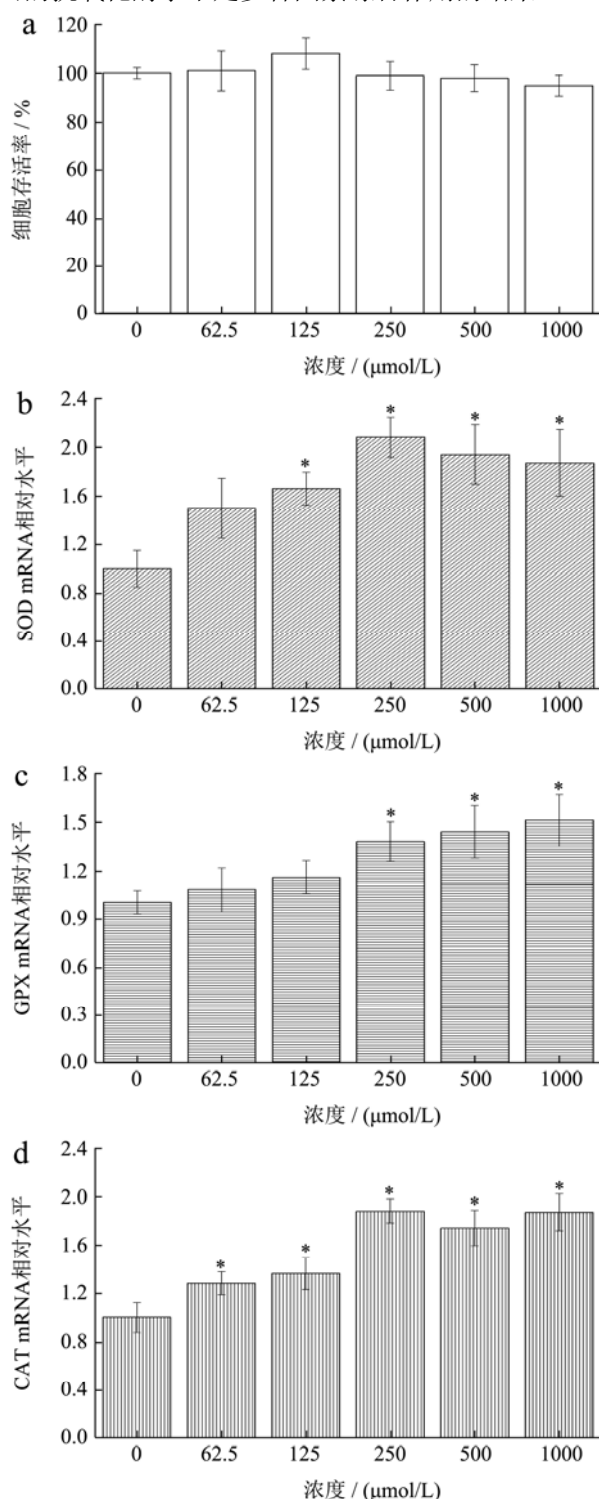


图1 甜菜碱对LO2细胞存活率(a)及SOD(b)、GPx(c)和CAT(d)等抗氧化酶mRNA水平的影响

Fig.1 Effect of betaine on the cell viability of LO2 cells (a), and the mRNA level of SOD (b), GPx (c) and CAT (d)

注: *表示与对照组(甜菜碱浓度为0的处理组)相比 $p < 0.05$ 。图2、4同。

2.2 甜菜碱对LO2细胞中Nrf2-Keap1-ARE通

路的影响

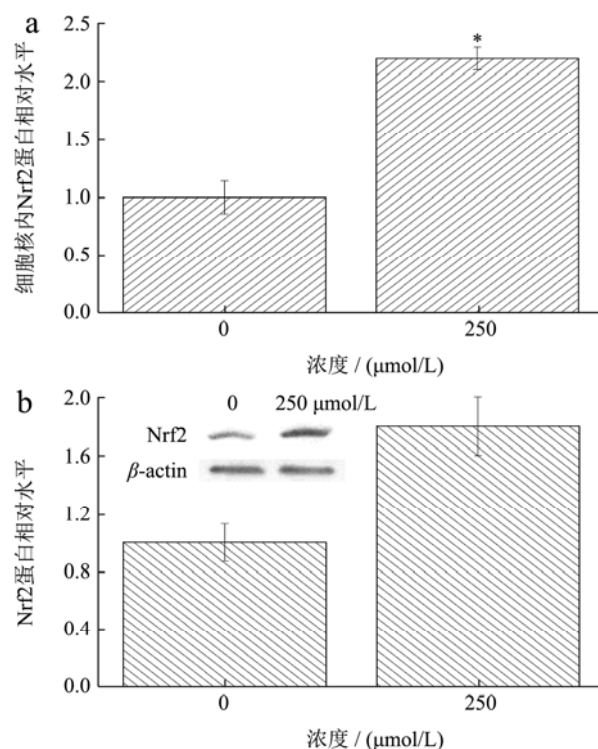


图2 甜菜碱对LO2细胞细胞核内Nrf2蛋白水平(a)和细胞内总Nrf2蛋白水平的影响(b)

Fig.2 Effect of betaine on Nrf2 protein level in LO2 cell nucleus (a) and total Nrf2 protein level in LO2 cells (b)

细胞调控抗氧化酶表达的主要通路是Nrf2-Keap1-ARE通路。在正常生理情况下,Nrf2与胞质内Keap1蛋白耦联,并锚定于胞质,使其活性处于相对抑制状态,并且Keap1与Nrf2的耦联能促进Nrf2的泛素化降解,从而使细胞内的Nrf2维持在较低水平;当Nrf2从Nrf2-Keap1复合物中脱离,即Nrf2-Keap1-ARE通路被激活时,Nrf2蛋白的泛素化降解被抑制,Nrf2蛋白水平会升高,并由细胞质转移至细胞核,再与ARE结合,从而启动解毒酶和抗氧化酶等基因的表达^[12]。因此细胞核内能与ARE结合的Nrf2蛋白水平可以用来表征Nrf2-Keap1-ARE通路是否被激活。为了探究甜菜碱对Nrf2-Keap1-ARE通路的影响,本研究提取了经甜菜碱处理的LO2细胞的细胞核,利用包被有ARE结合位点的ELISA试剂盒检测细胞核内Nrf2蛋白的水平。结果如图2a所示,甜菜碱处理组内能与ARE区域结合的Nrf2的蛋白质水平相比于对照组提高了1.21倍($p < 0.05$),这表明甜菜碱能激活Nrf2-Keap1-ARE通路。为进一步验证甜菜碱对Nrf2-Keap1-ARE通路的激活,本研究还探究了细胞内总Nrf2蛋白的水平。结果如图2b所示。经甜菜碱处理的LO2细胞内,Nrf2蛋白质水平显著

相对于对照组提高了 0.80 倍 ($p < 0.05$), 这进一步表明了甜菜碱对 Nrf2-Keap1-ARE 通路的激活作用。鸦胆子苦醇是一种源于苦木科植物鸦胆子种子喹诺酮。由于鸦胆子苦醇能够抑制 Nrf2 蛋白的表达, 并促进 Nrf2 蛋白的降解, 因此常作为 Nrf2 蛋白的抑制剂被用于研究 Nrf2-Keap1-ARE 通路^[13]。为了探究 Nrf2-Keap1-ARE 通路在甜菜碱提高抗氧化酶表达中的作用, 本研究探究了鸦胆子苦醇对甜菜碱提高抗氧化酶表达这一作用的影响。结果如图 3 所示, 1 $\mu\text{mol/L}$ 的鸦胆子苦醇能完全抑制 250 $\mu\text{mol/L}$ 甜菜碱对三种抗氧化酶表达的提高作用 ($p < 0.05$)。以上结果表明甜菜碱是通过激活 Nrf2-Keap1-ARE 通路提高抗氧化酶表达的。

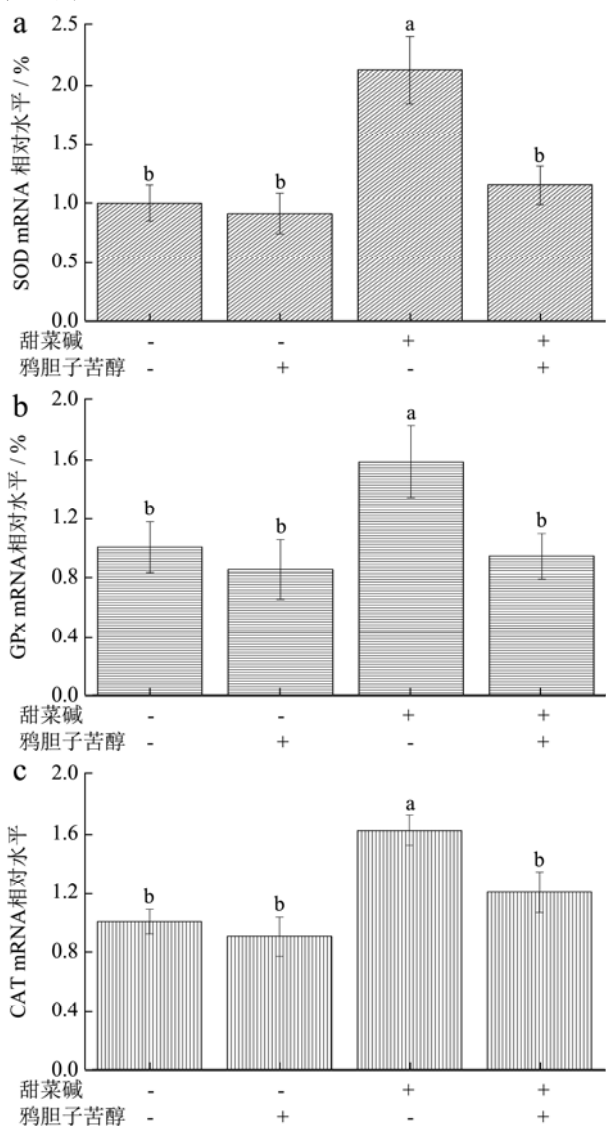


图 3 鸦胆子苦醇对甜菜碱提高 SOD (a)、GPx (b) 和 CAT (c) mRNA 水平的影响

Fig.3 Effect of brasatol on betaine increasing the mRNA levels of SOD (a), GPx (b) and CAT (c)

注: 不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。图 5 同。

一般来说, 天然产物激活 Nrf2-Keap1-ARE 通路主要有以下两种方式, 一是提高 Nrf2 蛋白的表达水平或降低 Keap1 蛋白的表达水平, Nrf2/Keap1 蛋白质水平的比值越高, 意味着与 Keap1 耦联的 Nrf2 越少, 处于活性状态下的 Nrf2 蛋白越多。二是通过提高 Nrf2 蛋白的磷酸化水平, 或促进 Keap1 半胱氨酸巯基的化学修饰, 促进 Nrf2 与 Keap1 解离^[8,14]。可与 Keap1 半胱氨酸上的巯基通过氧化或烷基化形成共价加合物的天然产物大多具有亲电性, 这类化合物主要包括具有氧化性的酚和醌类、迈克尔反应受体分子、异硫氰酸酯类、二硫醚和二烯丙基硫化物、含硒化合物等^[15]。而甜菜碱并不属于这几类物质, 也不具有亲电性。Nrf2 蛋白的磷酸化可由促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、蛋白激酶 C (PKC)、磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K)、细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 和腺苷酸激活蛋白激酶 (AMPK) 等激酶催化, 而且这些激酶所涉及的 MAPK/ERK、PI3K/Akt 等信号通路还能影响 Nrf2 和 Keap1 蛋白的表达^[16]。有文献报道甜菜碱也可以调节 PI3K、MAPK 等信号通路^[17,18]。因此, 甜菜碱提高 Nrf2 蛋白水平的机制可能有以下几种方式, 一是提高 Nrf2 蛋白的表达水平、二是降低 Keap1 蛋白的表达水平, 三是促进 Nrf2 蛋白的磷酸化。需要指出的是, 由于降低 Keap1 蛋白的表达水平和促进 Nrf2 蛋白的磷酸化可以通过抑制 Nrf2 蛋白的降解来提高细胞内 Nrf2 蛋白的水平^[12]。因此图 2 所展示的 Nrf2 蛋白水平的提高并不意味着 Nrf2 蛋白表达水平的提高。

2.3 甜菜碱对激活 Nrf2-Keap1-ARE 通路的机制

为了探究甜菜碱激活 Nrf2-Keap1-ARE 通路的机制, 本研究探究了甜菜碱对 LO2 细胞内 Nrf2 和 Keap1 的 mRNA 水平的影响, 以及 Keap1 蛋白质水平和 Nrf2 蛋白磷酸化水平的影响。结果如图 4。从图 4 可知, 甜菜碱并未显著影响 Nrf2 的 mRNA 水平 ($p > 0.05$), 也就是说甜菜碱可能并不是通过提高 Nrf2 蛋白的表达水平激活 Nrf2-Keap1-ARE 通路的。之前也有研究表明甜菜碱不能影响小鼠肝脏中 Nrf2 蛋白的表达水平^[19]。还有, 经甜菜碱处理后, Nrf2 蛋白的磷酸化水平并未有明显增加, 这意味着甜菜碱可能也不是通过提高 Nrf2 蛋白的磷酸化水平激活 Nrf2-Keap1-ARE 通路。由图 4 可知, 经甜菜碱处理后, LO2 细胞内 Keap1 的 mRNA 和蛋白质水平分别下降了 38.21%和 49.15% ($p < 0.05$), 这表明甜菜碱可能是通过抑制 Keap1 的表达水平激活 Nrf2-Keap1-ARE 通路的。为探究甜菜碱提高 Keap1 表达水平的机制与 PI3K、MAPK 等激酶的关系, 本研究利

用 ERK 抑制剂 PD98059、PI3K/AKT 抑制剂 LY294002、JNK 抑制剂 SP600125、p38 MAPK 抑制剂 SB203580、PKC 抑制剂 GF109203X、AMPK 抑制剂 Compound C 等抑制剂抑制激酶活性，探究了在这些激酶活性被抑制的调节下，甜菜碱对抗氧化酶和 Keap1 mRNA 水平的影响。结果如图 5，这些抑制剂并未影响甜菜碱对 Keap1 和抗氧化酶 mRNA 水平的作用 ($p>0.05$)。这意味着甜菜碱并不是通过 PI3K、MAPK 等信号通路影响 Keap1 的水平。此外，这些激酶是细胞内蛋白质磷酸化的关键酶，这一结果也从侧面证实甜菜碱对 Nrf2-Keap1-ARE 通路的激活与 Nrf2 蛋白的磷酸化无关。

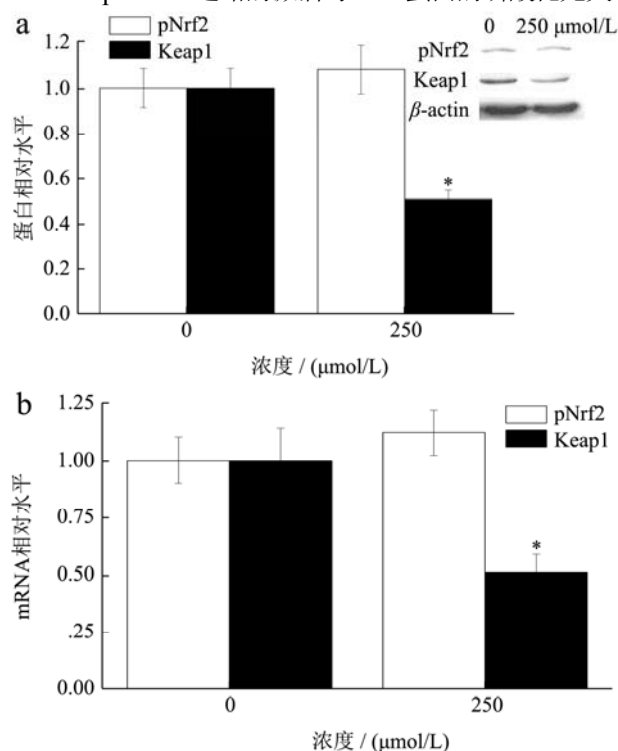
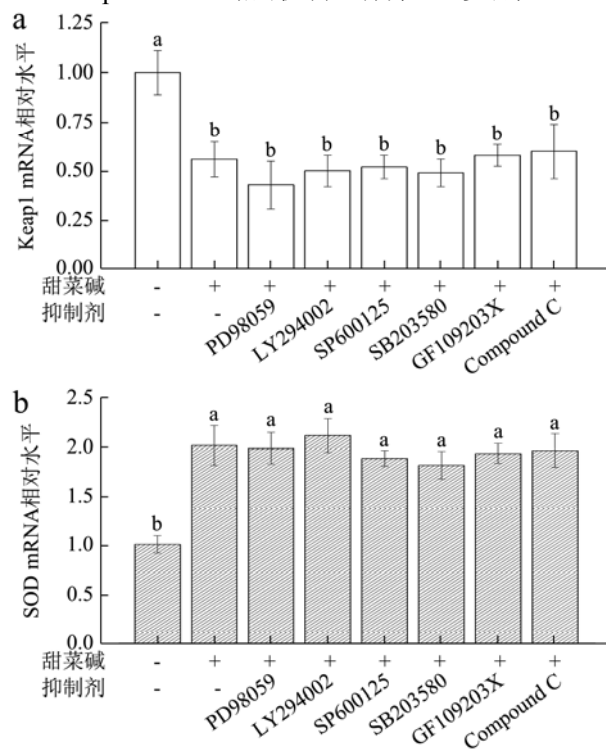


图4 甜菜碱对LO2细胞内Nrf2和Keap1蛋白水平和mRNA水平的影响

Fig.4 Effect of betaine on Nrf2 and Keap1 protein levels (a) and mRNA levels (b) in LO2 cells

以上结果虽然表明甜菜碱能够降低 Keap1 的表达水平，但其中的机制仍不清楚。甜菜碱是机体内一种重要的甲基供体，可显著影响 DNA、RNA 和蛋白质的甲基化修饰。甜菜碱的很多生理活性，如降脂、抗乙肝病毒等活性都与其甲基供体的角色密切相关^[20,21]。甜菜碱对机体非酶抗氧化系统的增强作用也与其作为甲基供体参与蛋氨酸循环有关^[5]。常见的甲基供体除甜菜碱外，还有胆碱、蛋氨酸、s-腺苷甲硫氨酸、叶酸等。而这些甲基供体也被报道过能够激活 Nrf2 通路，其中

叶酸就是通过降低 Keap1 mRNA 水平激活 Nrf2 通路的^[22-25]。因此，甜菜碱激活 Nrf2-Keap1-ARE 通路的机制可能与其作为甲基供体的角色有关。DNA 启动子的甲基化修饰会显著抑制基因的转录和表达。已有研究报道，提高 Keap1 启动子甲基化水平，可以降低 Keap1 mRNA 的水平^[12]。而甜菜碱可显著影响 DNA 的甲基化修饰。已有研究报道甜菜碱能显著提高机体某些蛋白 DNA 启动子的甲基化水平^[26]。还有，Keap1 m6A RNA 甲基化水平也会影响其 Keap1 的蛋白质水平^[27]。而甜菜碱也报道过能够影响细胞内 RNA m6A 的甲基化水平^[28]。因此，甜菜碱抑制 Keap1 蛋白水平的机制，一方面可能涉及 Keap1 基因启动子的甲基化修饰，另一方面也可能与 Keap1 mRNA 的 m6A 甲基化有关。此外，有文献报道 Nrf2 蛋白第437位精氨酸的甲基化修饰能够增强其与 ARE 区域的结合能力^[29]。已有研究表明甜菜碱能够促进某些蛋白质（如信号传导及转录激活蛋白1）中精氨酸的甲基化修饰^[30]。这暗示着甜菜碱还可能通过 Nrf2 蛋白的甲基化来影响 Nrf2 与 ARE 的结合，进而影响 Nrf2-Keap1-ARE 通路。也就是说图2a 中的结果除了与进入细胞核内的 Nrf2 蛋白水平有关，还可能与 Nrf2 蛋白的甲基化有关。事实上，机体调节 Nrf2-Keap1-ARE 通路的机制多种多样，如 Nrf2 蛋白的乙酰化修饰、抑制 Keap1 mRNA 的翻译等^[12,31]。因此，甜菜碱激活 Nrf2-Keap1-ARE 通路的机制还有待进一步探究。



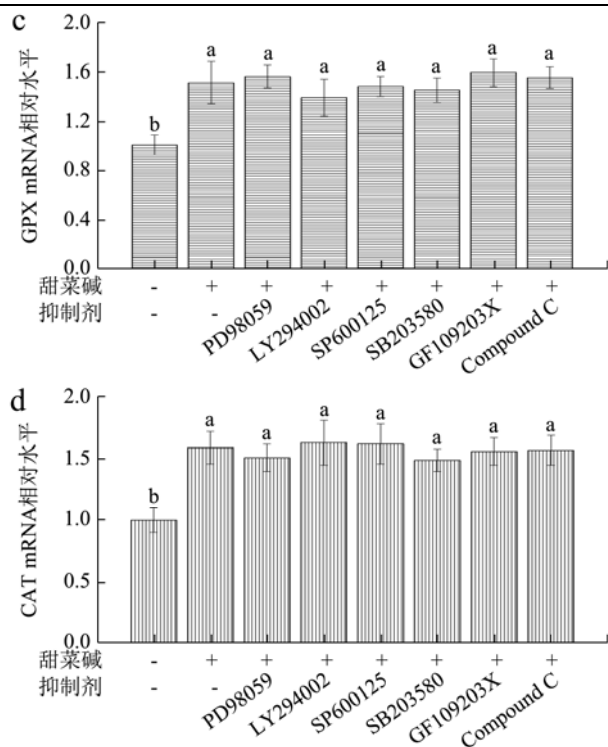


图5 激酶抑制剂对甜菜碱抑制 Keap1 (a), 提高 SOD (b)、GPx (c) 和 CAT (d) mRNA 水平的影响

Fig.5 Effect of brusatol on betaine decreasing the mRNA level of Keap1 (a), and increasing the mRNA levels of SOD (b), GPx (c) and CAT (d)

3 结论

本研究发现甜菜碱是通过激活 Nrf2-Keap1-ARE 通路提高 LO2 细胞内 SOD、GPx 和 CAT 等抗氧化酶的 mRNA 水平的, 而甜菜碱激活 Nrf2-Keap1-ARE 通路的机制与其降低 Keap1 的表达水平有关。本研究的结果将为解析甜菜碱的抗氧化机制提供一个新的视角。

参考文献

- [1] 谢海艳,吴艳平,廖顺平.甜菜碱对人体健康作用的研究进展[J].中国食物与营养,2011,17(2):72-74
- [2] XIE Haiyan, WU Yanping, LIAO Shunping. Research progress of betaine health role in human health [J]. Food and Nutrition in China, 2011, 17(2): 72-74
- [3] Day C R, Kempson S A. Betaine chemistry, roles, and potential use in liver disease [J]. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects, 2016, 1860(6): 1098-1106
- [4] Pourmehdi A, Sakhaei Z, Alirezai M, et al. Betaine effects against asthma-induced oxidative stress in the liver and kidney of mice [J]. Molecular Biology Reports, 2020, 47(8): 5729-5735

- [5] 刘秋月,黄文杰,王芬,等.甜菜碱药理活性及其机制研究进展[J].实用医药杂志,2016,33(4):371-374
- [6] LIU Qiuyue, HUANG Wenjie, WANG Fen, et al. Research progress on betaine's pharmacological activity and its mechanism [J]. Practical Journal of Medicine & Pharmacy, 2016, 33(4): 371-374
- [7] Zhang M, Zhang H, Li H, et al. Antioxidant mechanism of betaine without free radicals scavenging ability [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2016, 64(42): 7921-7930
- [8] Cai Y, Wang Z, Deng M, et al. Effects of dietary betaine supplementation on biochemical parameters of blood and testicular oxidative stress in Hu sheep [J]. Theriogenology, 2021, 164: 65-73
- [9] 张虹,张猛猛,赖富饶,等.甜菜碱保护细胞免受 AAPH 损伤的研究[J].现代食品科技,2016,32(6):18-23
- [10] ZHANG Hong, ZHANG Mengmeng, LAI Furao, et al. Protective effects of betaine on 2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidative stress in cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(6): 18-23
- [11] 熊款款,谭磊,王爱兵,等.Keap1-Nrf2/ARE 信号通路抗氧化机制及抗氧化剂的研究进展[J].动物医学进展,2021,42(4): 89-94
- [12] XIONG Kuankuan, TIAN Lei, WANG Aibing, et al. Progress on anti-oxidation mechanisms and antioxidant of the Keap1-Nrf2/ARE signaling pathway [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2021, 42(4): 89-94
- [13] Yu L, Jin Y, Cui H, et al. Effects of dietary rumen-protected betaine supplementation on the antioxidant status of lambs [J]. Livestock Science, 2020, 237: 104026
- [14] Elsheikh N A H, Omer N A, Wang Y, et al. Protective effect of betaine against lead-induced testicular toxicity in male mice [J]. Andrologia, 2020, 52(7): e13600
- [15] Khodayar M J, Kalantari H, Khorsandi L, et al. Upregulation of Nrf2-related cytoprotective genes expression by acetaminophen-induced acute hepatotoxicity in mice and the protective role of betaine [J]. Human & Experimental Toxicology, 2020, 39(7): 948-959
- [16] Baird L, M Yamamoto. The molecular mechanisms regulating the KEAP1-NRF2 pathway [J]. Molecular and Cellular Biology, 2020, 40(13): e00099-20
- [17] Zhou X R, Ru X C, Xiao C, et al. Sestrin2 is involved in Nrf2-regulated antioxidative signaling pathway in luteolin-induced prevention of the diabetic rat heart from ischemia/reperfusion injury [J]. Food & Function, 2021, 12(8): 3562-3571

- [14] Zhao F, Ci X, Man X, et al. Food-derived pharmacological modulators of the Nrf2/ARE pathway: their role in the treatment of diseases [J]. *Molecules*, 2021, 26(4): 1016
- [15] 姚娟,吴平安,李芸,等.Keap1-Nrf2-ARE 信号通路及其激活剂的研究进展[J].*中国药理学通报*,2019,35(10):1342-1346
- YAO Juan, WU Pingan, LI Yun, et al. Research progress of small molecule activators in Keap1-Nrf2- ARE signaling pathway [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2019, 35(10): 1342-1346
- [16] Hseu Y C, Chang C T, Gowrisankar Y V, et al. Zerumbone exhibits antiphotaging and dermatoprotective properties in ultraviolet A- irradiated human skin fibroblast cells via the activation of Nrf2/ARE defensive pathway [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 2019: 4098674
- [17] Huang B, Hu X, Hu J, et al. Betaine alleviates cognitive deficits in diabetic rats via PI3K/Akt signaling pathway regulation [J]. *Dementia and Deriatric Cognitive Disorders*, 2020, 49(3): 270-278
- [18] Jiang Y P, Yang J M, Ye R J, et al. Protective effects of betaine on diabetic induced disruption of the male mice blood-testis barrier by regulating oxidative stress-mediated p38 MAPK pathways [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 120: 109474
- [19] Khodayar M J, Kalantari H, Khorsandi L, et al. Upregulation of Nrf2-related cytoprotective genes expression by acetaminophen-induced acute hepatotoxicity in mice and the protective role of betaine [J]. *Human & Experimental Toxicology*, 2020, 39(7): 948-959
- [20] Zhang M, Wu X, Lai F, et al. Betaine inhibits hepatitis B virus with an advantage of decreasing resistance to lamivudine and interferon alpha [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(20): 4068-4077
- [21] Wang L J, Zhang H W, Zhou J Y, et al. Betaine attenuates hepatic steatosis by reducing methylation of the MTTP promoter and elevating genomic methylation in mice fed a high-fat diet [J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2014, 25(3): 329-336
- [22] He X, Deng J, Yu X J, et al. Activation of M3AChR (type 3 muscarinic acetylcholine receptor) and Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) signaling by choline alleviates vascular smooth muscle cell phenotypic switching and vascular remodeling [J]. *Arteriosclerosis*, 2020, 40(11): 2649-2664
- [23] Kilanczyk E, Banales J M, Wunsch E, et al. S-adenosyl-L-methionine (SAME) halts the autoimmune response in patients with primary biliary cholangitis (PBC) via antioxidant and S-glutathionylation processes in cholangiocytes [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2020, 1866(11): 165895
- [24] Wang Z, Liang M, Li H, et al. L-methionine activates Nrf2-ARE pathway to induce endogenous antioxidant activity for depressing ROS-derived oxidative stress in growing rats [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(10): 4849-4862
- [25] Shi L, Zhou X Q, Jiang W D, et al. The effect of dietary folic acid on flesh quality and muscle antioxidant status referring to Nrf2 signalling pathway in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2020, 26(3): 631-645
- [26] Zhao N, Yang S, Feng Y, et al. Enhanced hepatic cholesterol accumulation induced by maternal betaine exposure is associated with hypermethylation of CYP7A1 gene promoter [J]. *Endocrine*, 2019, 64(3): 544-551
- [27] Arumugam T, Ghazi T, Chaturgoon A A. Fumonisin B 1 alters global m6A RNA methylation and epigenetically regulates Keap1-Nrf2 signaling in human hepatoma (HepG2) cells[J]. *Archives of Toxicology*, 2021, 95(4): 1367-1378
- [28] Hao J, Hu H, Jiang Z, et al. MicroRNA-670 modulates Igf2bp1 expression to regulate RNA methylation in parthenogenetic mouse embryonic development [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 4782
- [29] Liu X, Li H, Liu L, et al. Methylation of arginine by PRMT1 regulates Nrf2 transcriptional activity during the antioxidative response [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2016, 1863(8): 2093-2103
- [30] Ganesan M, Tikhanovich I, Vangimalla S S, et al. Demethylase JMJD6 as a new regulator of interferon signaling: effects of HCV and ethanol metabolism [J]. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2018, 5(2): 101-112
- [31] Seo H Y, Lee S H, Lee J H, et al. Kahweol activates the Nrf2/HO-1 pathway by decreasing Keap1 expression independently of p62 and autophagy pathways [J]. *Plos One*, 2020, 15(10): e0240478