

呕吐毒素致HK2细胞氧化应激的作用机制

焦禄, 张百刚*, 李苏冰, 李阳, 付炳钢

(兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃兰州 730050)

摘要: 该文探究了呕吐毒素 (Deoxynivalenol, DON) 对人肾小管上皮细胞 (Humankideny-2, HK2) 氧化应激的作用机制。通过 MTT 法测定 DON 的细胞毒性, Western blotting 检测细胞凋亡蛋白 Bax、Bcl-2、Caspase-2、Caspase-3、Caspase-6、Caspase-8 和 Caspase-9 的表达水平。利用转录组测序技术 (RNA-seq) 研究了 DON 染毒 24 h 诱导的 HK2 细胞基因组表达情况, 并进行差异表达基因 GO 与 KEGG 富集分析。结果表明, DON 使 HK2 细胞 LDH、MDA 和 ROS 水平上升, SOD 和 GSH 等抗氧化指标下降; IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 等炎症指标升高。Bax 和 Caspase 蛋白表达上调, Bcl-2 蛋白表达下调。转录组测序表明, 40 μ mol/L DON 诱导的差异表达基因共有 5 962 个, 其中上调表达的基因有 2 813 个, 下调表达的基因有 3 149 个。综上所述, 蛋白水平与基因谱表达趋势一致, DON 对 HK2 细胞具有毒性作用, 诱导 HK2 细胞氧化应激, 通过 Caspase、MAPK 和 PI3K-Akt 等信号通路影响肾功能与代谢, 为 DON 肾毒性作用和相关机制的调控提供理论依据。

关键词: 呕吐毒素; 氧化胁迫; 炎症反应; 细胞凋亡; 差异基因分析

文章编号: 1673-9078(2025)01-8-16

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.1.1181

Mechanism for Vomitoxin-induced Oxidative Stress in HK2 Cells

JIAO Lu, ZHANG Baigang*, LI Subing, LI Yang, FU Binggang

(School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

Abstract: The mechanism of action of deoxynivalenol (DON) on oxidative stress in human renal tubular epithelial cells (Human Kidney-2, HK2) was explored in this article. DON cytotoxicity was assessed using the MTT assay, and the expression levels of apoptosis-regulating proteins-including Bax, Bcl-2, Caspase-2, Caspase-3, Caspase-6, Caspase-8, and Caspase-9-was measured by Western blotting. Transcriptome sequencing (RNA-seq) analyzed the genome-wide expression profile of HK2 cells following 24-hour DON exposure. DON exposure elevated LDH, MDA, and ROS levels in HK2 cells, while reducing antioxidant indicators such as SOD and GSH and increasing inflammatory markers IL-6, IL-1 β , and TNF- α . Bax and caspase protein expressions were upregulated, while Bcl-2 protein expression was downregulated. Transcriptome analysis identified 5 962 differentially expressed genes after exposure to 40 μ mol/L DON, with 2 813 upregulated and 3 149 downregulated. Protein levels aligned with gene expression profiles. DON induces oxidative stress and nephrotoxicity in HK2 cells, affecting renal function and metabolism through signaling pathways, including Caspase, MAPK, and PI3K-Akt. These findings offer a theoretical basis for the regulation of DON-induced nephrotoxicity.

Key words: vomitoxin; oxidative stress; inflammatory reactions; apoptosis; differential gene analysis

引文格式:

焦禄,张百刚,李苏冰,等.呕吐毒素致HK2细胞氧化应激的作用机制[J].现代食品科技,2025,41(1):8-16.

JIAO Lu, ZHANG Baigang, LI Subing, et al. Mechanism for vomitoxin-induced oxidative stress in HK2 cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(1): 8-16.

收稿日期: 2023-09-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31760495); 甘肃省自然科学基金项目 (18JR3RA136)

作者简介: 焦禄 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: lu1628921937@163.com

通讯作者: 张百刚 (1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: zhangbaigang@163.com

呕吐毒素 ($C_{15}H_{20}O_6$), 又名脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (Deoxynivalenol, DON), 它是由曲霉属和青霉属真菌的次级代谢物产生的真菌毒素, 常在污染的饲料、大麦和玉米中被发现^[1]。DON 是一种水溶性真菌毒素, 通过急性或亚急性作用对生物体的器官造成损伤。它不仅严重影响生物体的身体机能, 还可能导致致癌、致畸、致突变和降低免疫力等危害^[2]。此外, DON 的存在也给粮食与食品生产造成巨大的经济损失。许多动物实验模型表明, DON 具有肠毒性、肝毒性、胚胎毒性和免疫毒性等^[3], 然而, 对 DON 肾毒性作用机制的报道较少。肾脏是药物及其代谢产物最易受到毒性物质损伤的器官之一, 其在药物及其代谢产物的滤过、重吸收和排泄过程中均可能受到损伤^[4]。由于肾脏组织代谢率高、耗氧量大和酶活性活跃等特点, 导致大量药物及其代谢产物引起肾脏损伤^[5]。HK2 细胞来源于正常人肾脏的原发性近端肾小管细胞, 与原代培养的肾小管上皮细胞功能相似, 常应用于药物的体外肾毒性评估^[6]。Brezniceanu 等^[7]通过大鼠的肾切片评估了 HK2 细胞的凋亡及氧化应激损伤。先天免疫信号接头 STING 通过靶向 HK2 细胞从而限制肿瘤有氧糖酵解, 促进体内抗肿瘤免疫^[8]。此外, 在小鼠模型中, 氯化钴 ($CoCl_2$) 和血小板衍生生长因子 (PDGF) 可以诱导 HK2 细胞线粒体易位, 从而有效降低关节炎的严重程度^[9]。

为进一步探究 DON 对肾细胞氧化应激的作用机制与基因表达情况, 本文以 DON 诱导的 HK2 肾小管上皮细胞为模型, 通过毒性效应评价、细胞状态测定及蛋白水平表达等方面来研究 DON 的肾毒性机制。运用转录组测序技术 (RNA-seq) 探究 DON 对 HK2 细胞基因表达的影响。旨在探究 DON 诱导 HK2 细胞的氧化应激机制, 为科学评价 DON 的毒性及制定合理的安全限量提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

DON, 上海麦克林生化科技股份有限公司; HK2 细胞, 兰州大学医学院; DMEM 培养基、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 mg/mL 和胎牛血清 (FBS), 上海碧云天生物技术有限公司; 总 RNA Illumina 试剂盒和流式细胞术试剂, 购自碧迪医疗器械有限公司; Caspase、BAX 和 Bcl-2 等抗体, 武汉三鹰生物技术有限公司; MTT 细胞毒性检测试剂盒, 南京建成生物技术有限公司。LDH 试剂盒、MDA 试剂盒、

SOD 试剂盒、Western 及 IP 细胞裂解液, 上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

用含 10 wt.% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基 (青霉素、链霉素各 100 U/L) 将 HK2 细胞接种到培养箱中 ($37\text{ }^\circ\text{C}$, $\varphi=5\% \text{ CO}_2$)。以每毫升 1×10^6 cells 密度接种, 使细胞维持在对数生长期。待细胞融合度达到 80% 左右时, 以相同浓度进行传代培养。

1.2.2 DON对HK2细胞增殖的影响

当细胞均处于对数生长期且生长良好时, 进行药物处理, 先将 DON 溶于 DMSO 配成 100 mmol/L 的原液, 再用无血清培养基稀释至不同浓度, DON 处理 HK2 细胞 24 h 后进行实验^[10]。采用 MTT 法评估 DON 的细胞活力和细胞毒性, 将 HK2 细胞按每孔 4 000 个细胞接种于 96 孔板中, 在培养箱中孵育过夜。加入不同浓度 DON (0、5、10、15、25、30、35、40、50、60、70、80、100 $\mu\text{mol/L}$) 处理 HK2 细胞 24 h, 每孔加入 50 μL MTT 工作液 (MTT 终质量浓度 0.5 mg/mL)。37 $^\circ\text{C}$ 孵育 4 h 后, 吸出上清液, 加入 150 μL 二甲基亚砜 (DMSO), 将孔板在恒温振荡器 (150 r/min, 37 $^\circ\text{C}$) 中孵育 15 min。使用酶标仪在 562 nm 处测量吸光度^[11]。每实验平行 3 次。

细胞存活率计算公式为:

$$Y = \frac{A_1}{A_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

Y ——细胞存活率, %;

A_1 ——处理组上清液在 562 nm 处的吸光度;

A_2 ——对照组上清液在 562 nm 处的吸光度。

1.2.3 DON对HK2细胞膜的影响

取对数生长期的 HK2 细胞, 按每孔 1 mL 接种至 6 孔板中, 分别加入不同浓度 DON (0、15、40 和 80 $\mu\text{mol/L}$) 培养 24 h, 胰酶消化收集细胞后, 重悬细胞, 用 0.4 wt.% 的台盼蓝染色 3 min, 于倒置显微镜下观察细胞^[12], 每组实验平行三次。

1.2.4 DON对HK2细胞氧化还原系统的影响

取对数生长期 HK2 细胞接种于 96 孔板中 (每孔 5 000 个), 在培养箱 ($37\text{ }^\circ\text{C}$, $\varphi=5\% \text{ CO}_2$) 中孵育过夜。将 HK2 细胞暴露于不同浓度 DON (0、15、30、40、60、80 $\mu\text{mol/L}$) 24 h, 胰酶消化后收集细胞, 再用 PBS 洗涤 1 遍后 1 000 r/min 离心 5 min,

向细胞沉淀中加入适量 SOD 样品制备液重悬细胞, 离心 10 min (12 000 g, 4 °C) 后取上清作为待测样品。37 °C 孵育 30 min 后于 450 nm 处测定吸光度, 每组各设 6 个复孔, 实验平行 3 次。根据谷胱甘肽试剂盒测定 GSH 水平, 根据丙二醛试剂盒测定 MDA^[13], 每组实验平行三次。

1.2.5 DON对细胞活性氧(ROS)的影响

取对数生长期 HK2 细胞接种于 12 孔板中, 以每毫升 2×10^4 cells 密度播种, 药物处理后, 按照无血清培养液: DCFH-DA (1 000:1) 配制检测液, 每孔 1 mL 检测液, 在 37 °C 下避光孵育 40 min。探针装入后, 样品用冷 PBS 洗涤两次。在激发波长为 500 nm, 发射波长为 525 nm 时, 采用 BD FACSCalibur 细胞分选系统测定各组细胞的活性氧水平^[14]。每组实验平行三次。

1.2.6 DON对HK2细胞炎症水平的影响

待细胞生长至对数生长期时, 经药物处理后收集细胞, 每管细胞中加入 100 μ L 裂解液, 冰浴中充分裂解 5 min。冷却后, 在 4 °C, 10 000 g 条件下离心 10 min, 每孔加入 200 μ L 的上清液于 96 孔板中, 在 532 nm 处测吸光度, 测定 IL-1 β 炎症水平。后续炎症指标在细胞培养和处理后, 收集上清液, 在 4 °C, 10 000 g 条件下离心 10 min 用于实验, 按照相应试剂盒的操作分别检测 IL-6 和 TNF- α 的水平^[15]。

1.2.7 DON对HK2细胞蛋白表达量的影响

取对数生长期细胞传代于细胞培养瓶中, 置培养箱 24 h 后, 用不同浓度 DON (0、15、30 和 40 μ mol/L) 处理细胞 24 h, 收集细胞, 16 000 g, 4 °C 离心 20 min, 取上清液待用。BCA 法测定蛋白浓度^[16], 按上清液: 蛋白缓冲液 Loading buffer (4:1) 混合。沸水浴加热 5 min, 冰水浴 1 min, 重复 3 次, -20 °C 保存。

SDS-PAGE 电泳: 配置 10 wt.% 分离胶, 待分离胶凝固 30 min 后倒入浓缩胶, 凝固 20 min 后插上梳子置于电泳槽中。根据蛋白浓度计算上样量, 加入样品后开始电泳, 对应电流一般为 20 mA, 待 maker 跑到分离胶后加大电流至 30 mA, 电泳完毕后转移至甲醇活化的 PVDF 膜上, 冰浴条件下 100 V 恒压转膜 60 min。转膜后室温封闭 1 h, 加入一抗后 4 °C 摇床过夜。TBST 洗膜 3 次, 用 TBST 按 1:10 000 比例稀释二抗, 室温孵育 1.5 h。使用 Bax、Bcl-2、Caspase-2、Caspase-3、Caspase-6、Caspase-8 和 Caspase-9 等抗体检测蛋白表达水平。由 ImageJ 软件

进行灰度分析, 将目的条带与内参条带的比值作为结果, 处理组样品与空白对照的比值表示蛋白水平。

1.2.8 DON对HK2细胞差异基因表达的影响

根据 Ultrapure RNA 试剂盒的说明书提取总 RNA^[17]。每瓶细胞样品中加入 1 mL 裂解液, 裂解 10 min 后收集细胞置于 -80 °C 冰箱。首先进行总 RNA 质量检测, 精确定量浓度和纯度, 再分选纯化 mRNA, 合成 cDNA 后对双链 cDNA 末端进行修复, 再用 PCR 扩增 cDNA 文库, 对文库进行质量检测后上机测序。测序分析主要包括差异基因分析、GO 富集和 KEGG 信号通路筛选。

1.2.9 数据分析

采用 Excel 2021 统计学软件进行数据处理。实验数据用平均值 \pm 标准差表示。采用 Graphpad prism 8.0.2 分析软件进行单因素方差分析, 并使用 Student's t-test 检验进行组间差异比较。 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P > 0.05$ 表示差异不显著。

2 结果与讨论

2.1 DON对HK2细胞增殖和细胞膜形态的影响

由图 1a 可见, 当 DON 作用于 HK2 细胞后, 细胞存活率显著下降。且随着浓度增大抑制作用增强, 说明 DON 对 HK2 细胞增殖具有抑制作用。由图 1b 可见, DON 对 HK2 细胞的 IC₅₀ 为 38.15 μ mol/L。MTT 实验证明, DON 与 HK2 细胞存活率之间存在明显的剂量-效应关系, 因此 DON 对细胞产生毒性作用, 使细胞存活率下降。Kang 等^[18]研究表明不同浓度 DON 对 IPEC-J2 猪小肠上皮细胞产生毒性作用。如图 1c、1d 所示, 对照组细胞形态无明显变化。当加入 40 μ mol/L DON 后, 细胞形态明显改变, 细胞膜破裂导致局部皱缩, 细胞被染成蓝色, 与对照组相比, 蓝色细胞数量增多 50%, 即细胞死亡数量增多。结果表明, 与对照组相比, 染毒组细胞膜结构被破坏, 引起细胞的死亡。因此, 后续实验以 40 μ mol/L 的 DON 作为细胞染毒剂量。台盼蓝实验表明, DON 影响 HK2 细胞膜形态, 由于 DON 破坏细胞膜, 进而使细胞功能紊乱, 破坏细胞稳态平衡^[19], 使胞内物质流出, 氧化产物累积, 导致细胞凋亡。内质网 (Endoplasmic Reticulum, ER) 作为细胞组成中的主要细胞器, 在细胞的生长调节中发挥重要作用, 而 ER 应激引发未折叠和错误折叠蛋白的积累, 破坏细胞器功能^[20]。

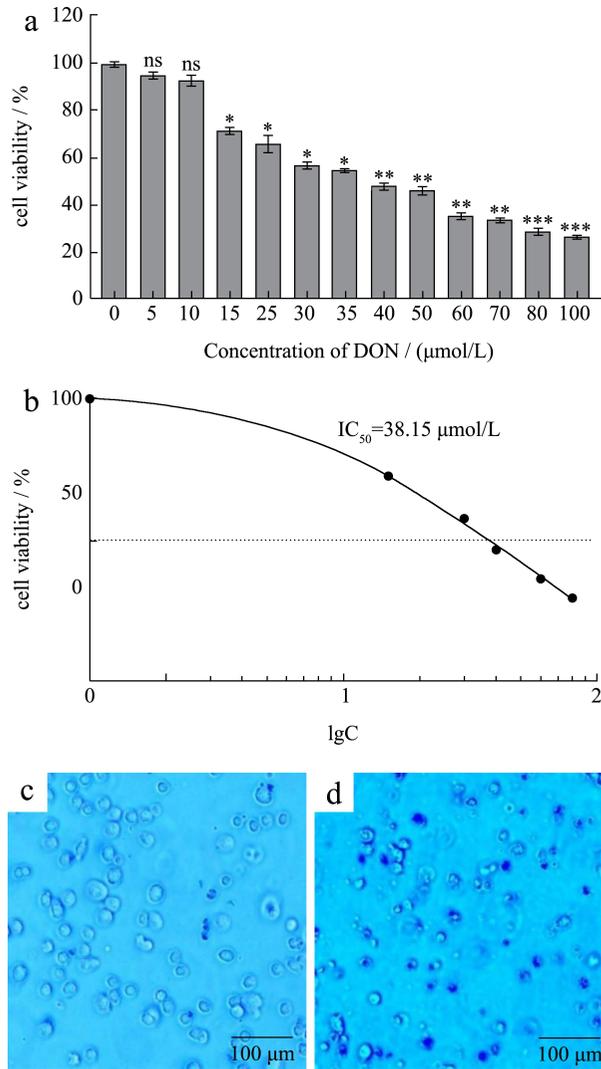


图1 不同浓度 DON 对 HK2 细胞增殖的影响 (24 h) (a、b) 和显微镜下 (100×) 台盼蓝染色 (c、d)

Fig.1 Various concentrations of DON reduce the viability of HK2 cells (24 h) (a, b) and Trypan blue staining under microscope (c, d)

注: c 为空白对照, d 为 40 μmol/L DON。ns 表示 $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与空白对照组相比。图 2、4、5 同。

2.2 DON对HK2细胞氧化还原系统的影响

如图 2a~2c 所示, 随着 DON 浓度的增大, 细胞内 SOD 活性和 GSH 水平不断下降, MDA 含量持续上升。与对照组相比, 当 DON 浓度低于 15 μmol/L 时, 细胞内 SOD 活性和 GSH 含量下降趋势平缓, MDA 含量上升约 2.8 倍。当 DON 浓度为 40 μmol/L 时, SOD 酶活性下降 64%, GSH 含量下降 52%, MDA 含量上升为 3.7 倍, 具有极显著性差异 ($P<0.01$)。当 DON 浓度为 80 μmol/L, 细胞 SOD 酶活性和

GSH 水平最低, MDA 含量上升约 5.9 倍。结果表明, 当 DON 刺激 HK2 细胞后, SOD 与 GSH 被急剧消耗, 氧化还原平衡被破坏, 脂质过氧化速度加快, MDA 含量不断上升使氧化程度加剧, 氧化产物的积累造成了氧化应激和氧化损伤。当 DON 诱导 HK₂ 细胞时, 细胞抗氧化指标 SOD 与 GSH 水平下降, 细胞内过氧化氢含量升高, MDA 和 GSSG 含量逐渐积累。研究表明, DON 使细胞脂质氧化程度加剧, 清除自由基的能力减弱, 从而引起细胞的凋亡和坏死^[21]。Ndlovu 等^[22]研究发现, DON 作用于 HepG2 细胞, 抗氧化因子被抑制, 导致细胞器损伤, 氧化产物含量升高。

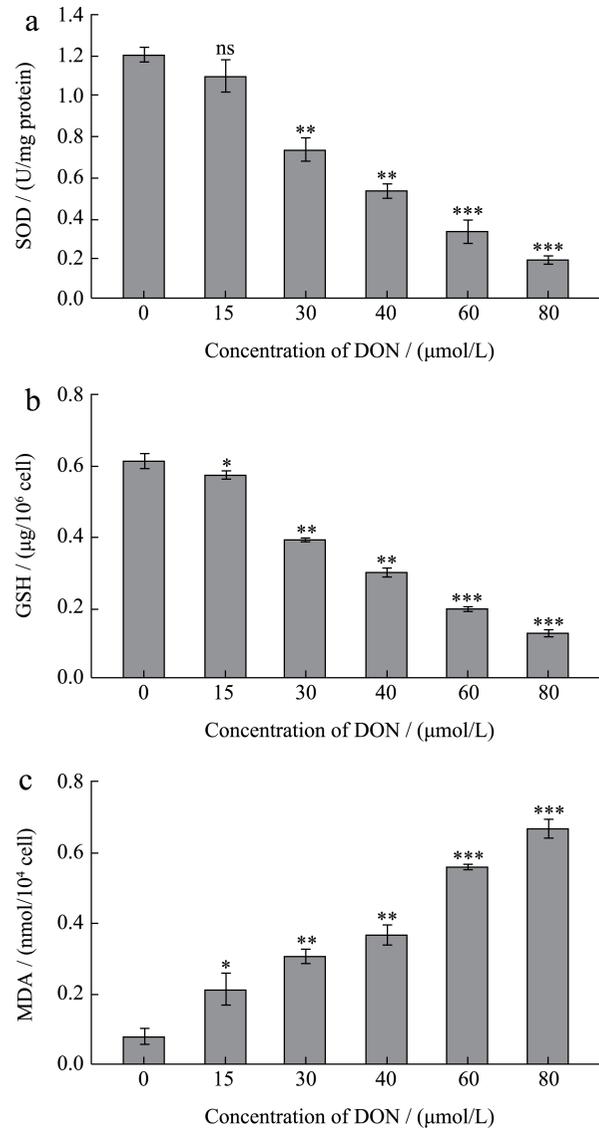


图2 不同浓度 DON 对 HK2 细胞内 SOD 活性 (a)、GSSG 含量 (b)、MDA 含量 (c) 的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of DON on SOD activity (a), content of GSSH (b), content of MDA (c) in HK2 cells

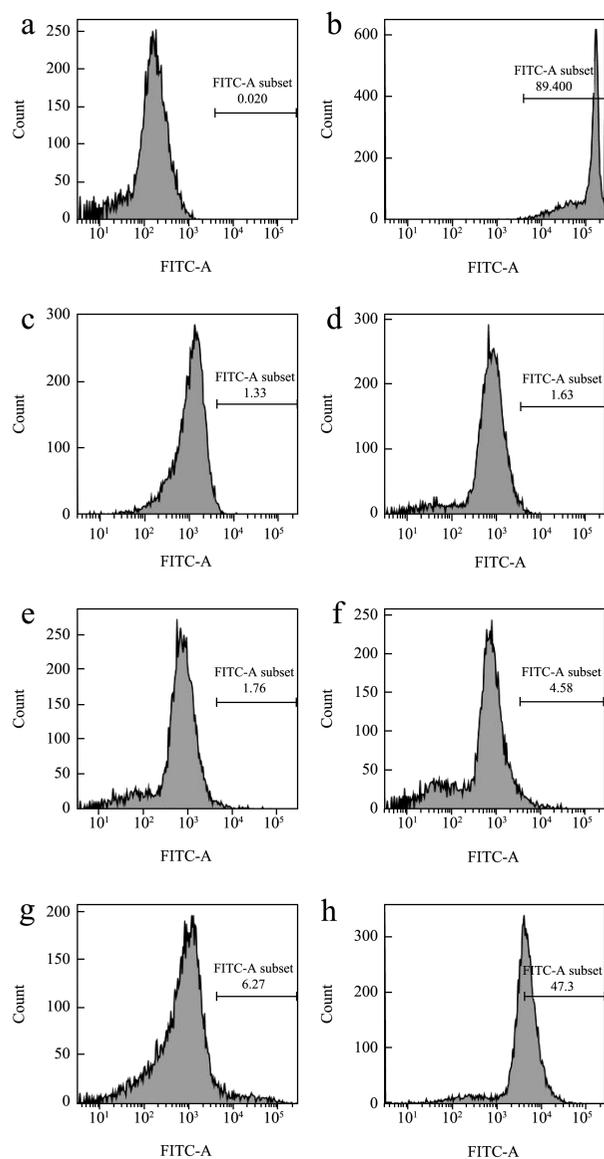


图3 不同浓度的DON对HK2细胞内ROS水平的影响
Fig 3 Effect of different concentrations of DON on the level of ROS in HK2 cells

注: a-h 依次为阴性对照、阳性对照、0、15、30、40、60 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.3 DON对HK2细胞ROS水平的影响

如图3所示,与阴性对照组相比,阳性对照组ROS释放水平呈显著增加趋势。染毒组均产生了活性氧,ROS释放水平随DON浓度增大而升高。与空白对照组相比,当DON浓度为15 $\mu\text{mol/L}$ 和30 $\mu\text{mol/L}$ 时,ROS释放水平分别上升1.21倍和1.32倍。当DON浓度为80 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞内ROS释放水平上升约35.6倍。实验结果表明,DON可能导致细胞产生过量的ROS,造成了细胞凋亡和坏死。DON通过产生过量的ROS使细胞处于氧化应激状

态,有研究发现,而ROS的产生与内质网应激介导的炎症和凋亡有关^[23]。Czabotar等^[24]发现DON使细胞氧化应激,活性氧产物累积,导致细胞凋亡。

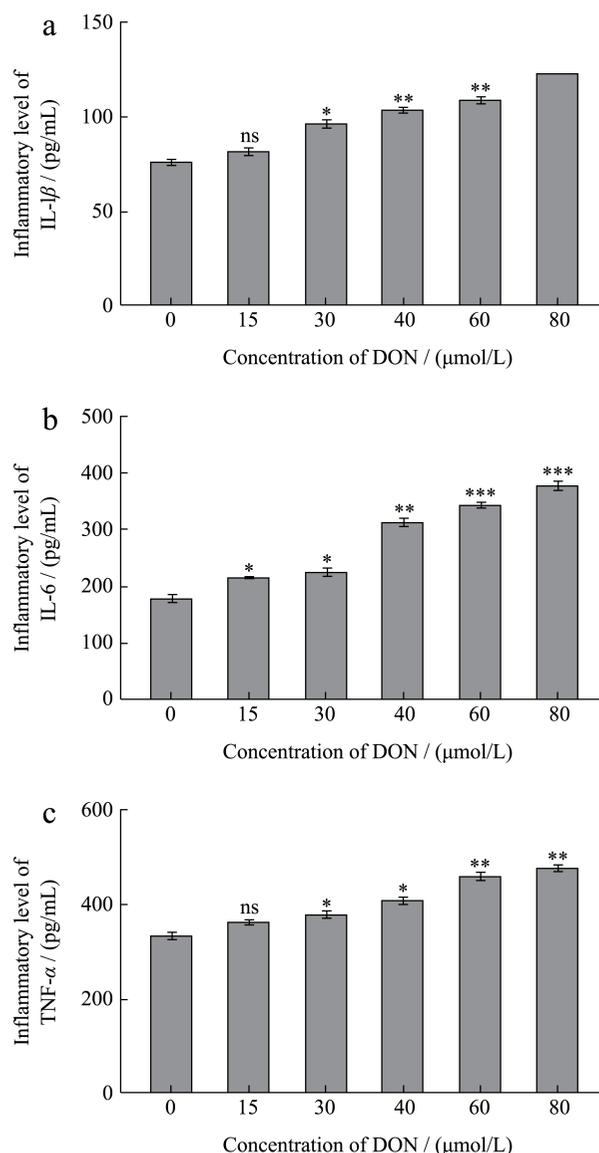


图4 不同浓度DON对HK2细胞内IL-1 β (a)、IL-6 (b)、TNF- α (c) 水平的影响

Fig.4 Effect of different concentrations of DON on IL-1 β (a), IL-6 (b), TNF- α (c) levels in HK2 cells

2.4 DON对HK2细胞炎症水平的影响

如图4a-4c所示,细胞IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平随DON浓度增大而升高。与对照组相比,低DON对HK2细胞IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量无显著性差异。当DON浓度为80 $\mu\text{mol/L}$ 时,IL-1 β 含量约为对照组的1.6倍,IL-6含量约为对照组的2倍,TNF- α 含量约为对照组的1.5倍,具有显著性差异($P < 0.01$)。结果表明,DON会引起HK2细

胞内 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平升高，炎症产物累积使细胞发生氧化损伤，引起炎症反应。

2.5 DON对HK2细胞凋亡蛋白表达的影响

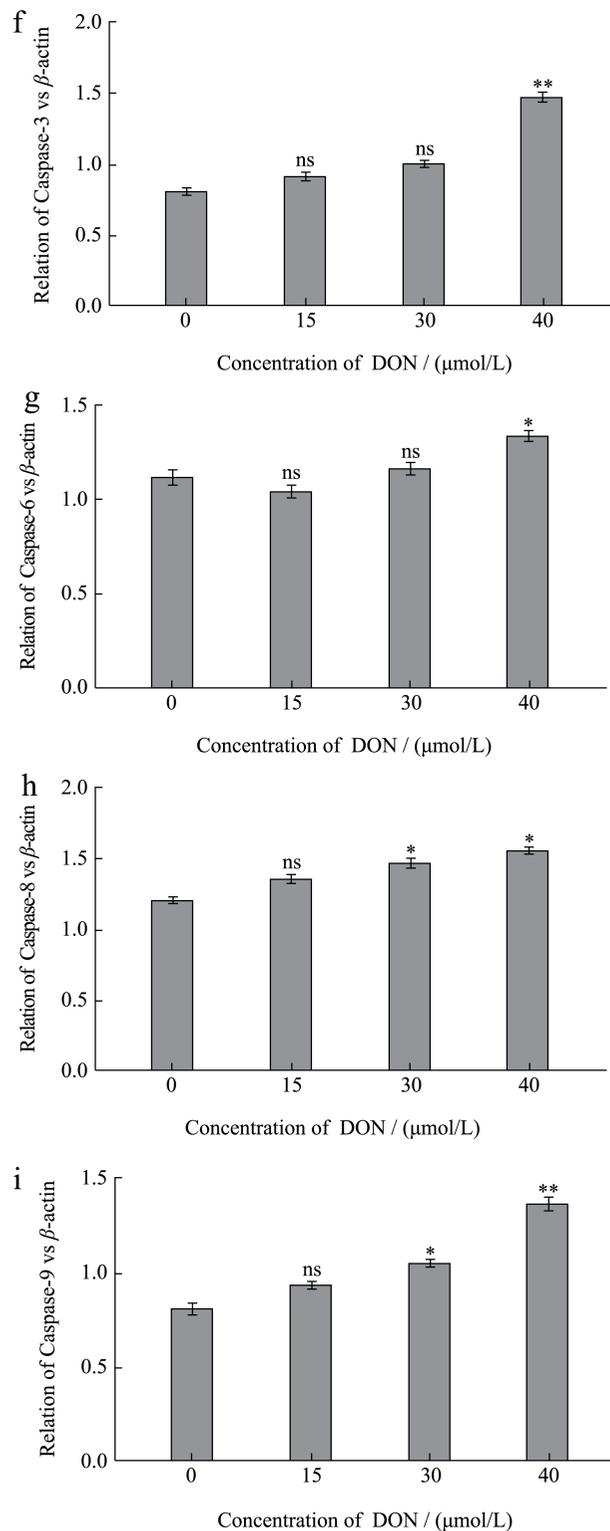
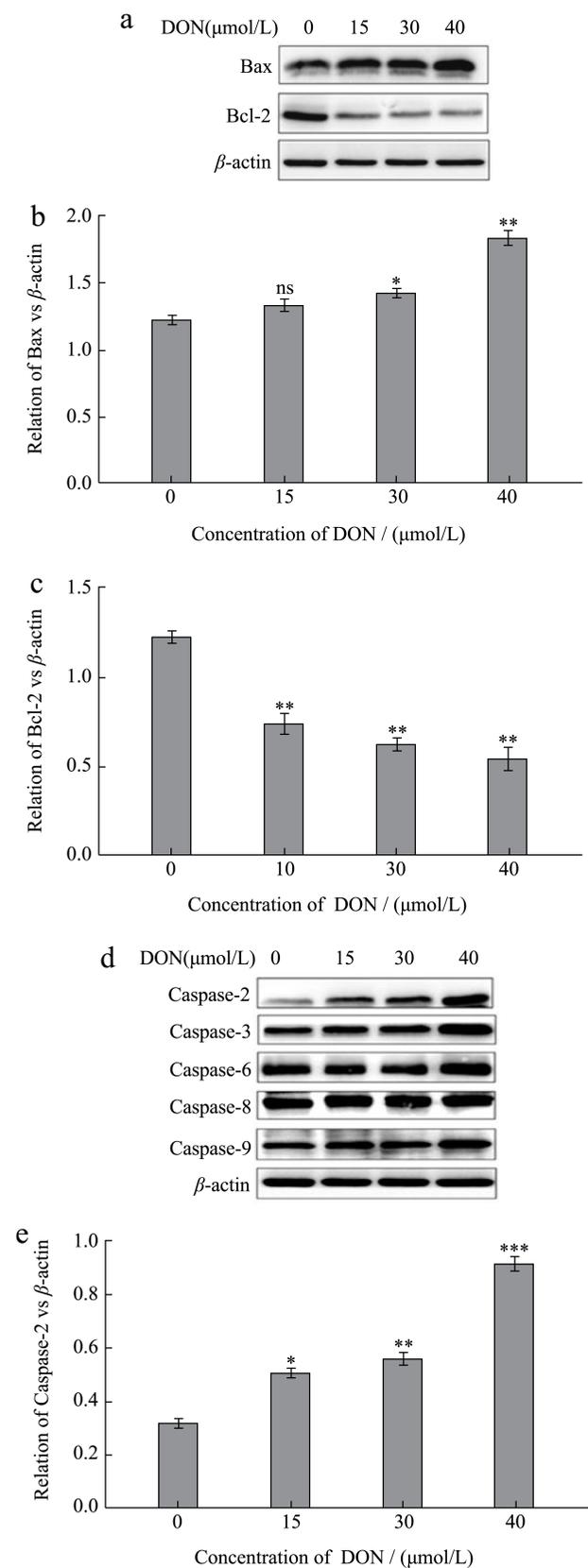


图 5 Bax、Bcl-2 和 Caspase-2、3、6、8、9 蛋白在 HK2 细胞中的表达水平

Fig.5 The expression level of Bax, Bcl-2 and Caspase-2, 3, 6, 8, 9 protein in HK2 cells

如图 5a~5c 所示，在 Bax 与 Bcl-2 蛋白检测中，与对照组相比，DON 上调 Bax 蛋白表达水平，下调 Bcl-2 蛋白表达水平。当 DON 浓度为 15 $\mu\text{mol/L}$ 和

30 $\mu\text{mol/L}$ 时, Bax 蛋白表达量无显著性差异, 而 Bcl-2 蛋白表达量分别下降 1.6 倍和 2.0 倍, 当 DON 浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 时, Bax 蛋白表达量增加约 1.4 倍, Bcl-2 蛋白表达量下降约 2.5 倍, 具有显著差异 ($P < 0.01$)。DON 明显下调 Bcl-2 蛋白表达水平 ($P < 0.01$)。如图 5d 所示, DON 上调了 Caspase-2、3、6、8 和 Caspase-9 蛋白的表达量。如图 5e~5i 所示, 在 Caspase 蛋白检测中, 与对照组相比, 低浓度 DON 对 Caspase-2、3、6、8、9 蛋白表达量无显著性差异; 当 DON 浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 时, Caspase-2、3、6、8、9 蛋白表达量极显著增加 ($P < 0.01$)。结果表明, DON 通过调节 HK2 细胞蛋白表达量来诱导细胞凋亡。DON 主要通过诱导细胞凋亡影响 Bax、Bcl-2 和 Caspase 蛋白表达量。线粒体作为诱导细胞凋亡关键环节, 通过信号级联反应表达^[25]。研究发现, 在哺乳动物中, Apaf-1 从 Bcl-x1 的释放是通过与 Bax 和 Bcl-2 家族其他促凋亡成员异二聚介导的^[26]。DON 通过上调 Caspase-2、3、6、8、9 的蛋白表达量来诱导细胞凋亡, Caspase 凋亡酶主要功能为调节酶活性和蛋白表达。当细胞在外来因子的刺激下, 各种促凋亡信号如 DNA 损伤和生长因子清除, 它诱导细胞色素 c 从线粒体释放, 与 Apaf-1 的重复区结合, 促进 Apaf-1 的低聚, 形成 Apaf-1 细胞色素 c 多聚体。被激活的 Caspase-9 会激活 Caspase-3 和 Caspase-7, 从而启动 Caspase 级联反应, 该反应通过对底物的特定裂解导致细胞凋亡^[27]。以上研究表明, DON 诱导 HK₂ 细胞氧化应激可能通过线粒体途径。

2.6 差异基因筛选、GO与KEGG富集分析

通过 RNA-seq 技术分析 40 $\mu\text{mol/L}$ DON 处理 HK2 细胞后筛选出差异表达基因的个数。如图 6a 所示, 与对照组相比, 40 $\mu\text{mol/L}$ DON 处理 24 h 差异表达基因的总数为 5 962 个, 上调基因 (Up) 数为 2 813 个; 下调基因 (Down) 数为 3 149 个。为深入探究 DON 对 HK2 细胞基因表达的影响, 通过差异基因 GO 与 KEGG 富集分析方式从基因水平检测 DON 对 HK2 细胞氧化应激水平。GO 按照生物学过程 (Biological Processes, BP)、细胞组分 (Cellular Components, CC) 和分子功能 (Molecular Functions, MF) 将上述火山图差异表达基因进行分类。我们分别从 BP、CC 和 MF 三大类中挑选出富集最显著 (P -value 水平) 的 10 个 GO 功能在图中展示。如图 6b 差异基因 GO 富集条形图所示, BP

组最显著的功能主要是肾脏代谢、肾功能调节和细胞生长调节等。MF 组最显著的功能是蛋白磷酸酶结合、磷酸酶结合和活性调节等; CC 组最显著的功能主要是胞质核糖体、细胞外基质和细胞底物连接等。结果表明, 在 GO 富集分析过程中, DON 可能通过诱导 HK2 细胞基因表达谱变化, 影响生物学过程中肾系统功能与肾脏代谢。通过差异 mRNA 火山图直观反映差异基因表达的分布情况, 结果表明, 基因谱表达与蛋白水平表达趋势一致。与对照组相比, DON 使 HK2 细胞的差异表达基因发生了上调和下调, 这些基因按生物学过程、细胞组分和分子功能进行 GO 富集分析。本文通过火山图、GO 和 KEGG 差异基因富集分析等方法综合探究 DON 对 HK2 肾小管上皮细胞基因表达的影响。分析结果表明, 在 BP 组分中涉及功能有肾脏代谢和肾系统调节等, 说明 DON 通过调节基因表达刺激细胞氧化应激, 从而导致肾脏功能紊乱, 有关研究表明, DON 通过调节 HepG2 细胞基因表达影响细胞核糖体与磷酸酶结合, 从而导致细胞损伤^[28]。此外, 在 MF 组和 CC 组中, 线粒体激酶和信号转导因子 Caspase 也参与基因表达过程, You 等^[29]发现, 在 DON 氧化胁迫下, 细胞线粒体途径涉及到能量代谢、细胞凋亡等过程。如图 6c 差异基因 KEGG 富集图所示, 与此相关的通路主要有 MAPK 信号通路、凋亡信号通路、PI3K-Akt 信号通路、神经变性通路、钙离子信号通路和氧化磷酸化通路。如图 6 所示, MAPK 级联信号途径部分差异基因如 *C-Fos*、*FLT4* 等基因上调, *MAP3K7* 等基因下调, 该基因主要参与 DNA 增殖、分化和凋亡。凋亡通路的差异基因如 *CASP10*、*NFKB1*、*CASP8* 和 *CASP3* 表达上调, *BCL2L1* 和 *BCL-2* 差异基因表达下调。PI3K-Akt 通路部分差异基因如 *IL-6*、*AKT1* 等基因表达上调, *IGF1R*、*FNI* 等基因表达下调, 该基因与 HK2 细胞凋亡和炎症有关。钙离子信号通路中, *NDUFS6*、*NDUFS2* 和 *NDUFB9* 等表达均上调。氧化磷酸化通路差异基因如 *NDUFS6*、*NDUFS2*、*NDUFB9* 等表达均上调。KEGG 富集分析结果表明, DON 诱导 HK2 细胞凋亡可能通过调节多种信号通路, 使差异基因表现为上调或下调, 从而诱导 HK2 细胞发生坏死、凋亡、炎症和 DNA 损伤等毒性作用。另外, 本文通过 KEGG 富集分析探究 DON 诱导细胞氧化应激过程中涉及的代谢通路, 主要有凋亡信号通路、MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、神经变性通

路、钙离子信号通路和氧化磷酸化通路。MAPK 级联信号途径在发育过程主要起分化和增殖等作用^[30]。凋亡通路是 DON 诱导细胞氧化应激的主要通路，该通路参与基因的激活、表达及细胞死亡调控的过程^[31]。PI3K-Akt 通路使 HK2 细胞磷酸化的 Akt 激活下游蛋白 - 环磷酰苷效应蛋白 (CREB)，能够刺激抗凋亡蛋白基因如 *Bcl-2* 的表达^[32]。钙离子信号通路中，差异基因 *NDUFS2* 和 *NDUFB9* 属于 NADH 脱氢酶，与细胞 ATP 合成有关，该基因通过氧化磷酸化途径使细胞发生氧化应激。研究表明，*CASP10*、*NFKB1* 和 *NDUF* 基因主要参与细胞的凋亡、炎症和 DNA 的损伤作用^[33]。

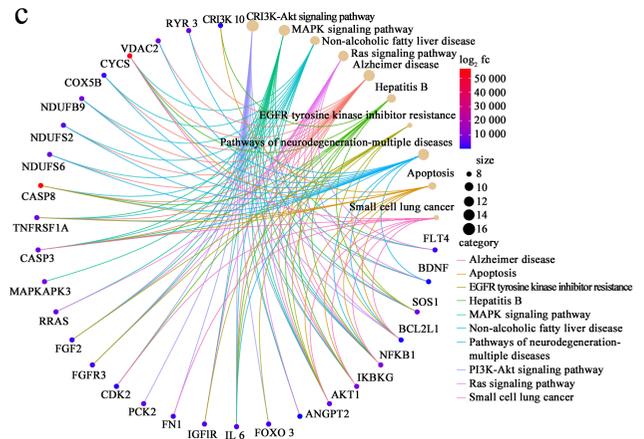
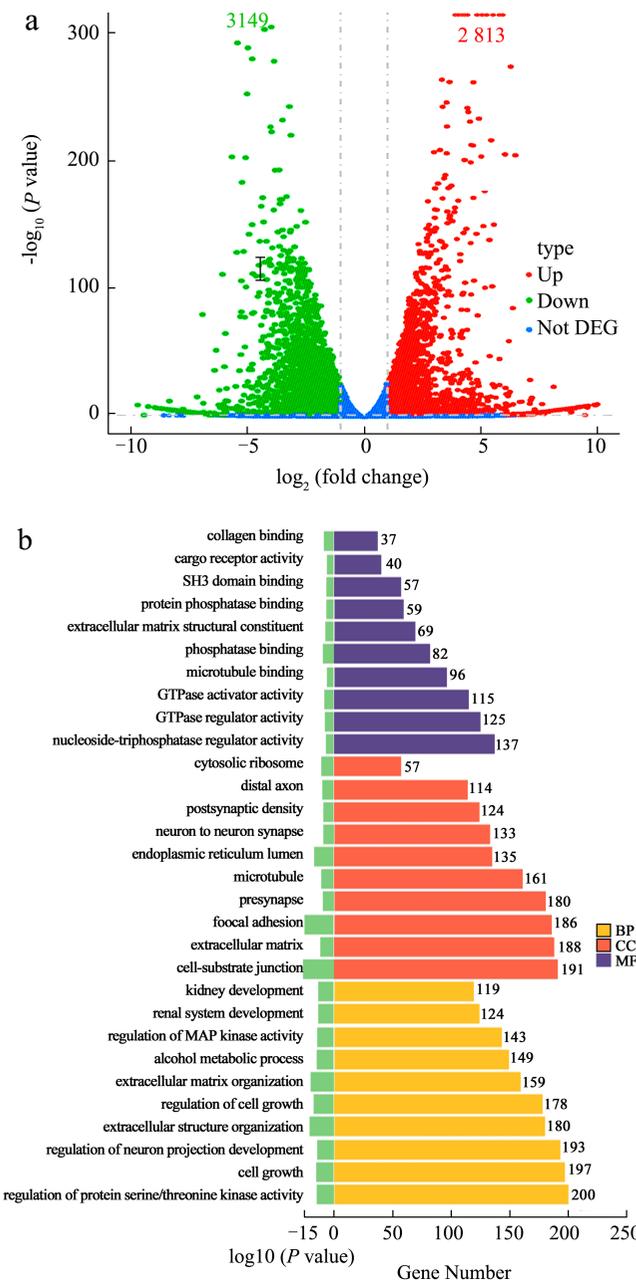


图 6 (a) 差异 mRNA 表达火山图；(b) 差异基因 GO 富集条形图；(c) 差异基因 KEGG 富集圈图

Fig.6 (a) Differential gene GO enrichment bar chart; (b) Volcanic map of differential mRNA expression; (c) Differential gene KEGG enrichment circle plot

3 结论

综上所述，DON 对 HK2 细胞具有明显的毒性作用，对细胞膜造成一定的破坏，影响细胞氧化还原系统，造成氧化产物积累，产生氧化应激，诱导细胞凋亡及炎症表现。差异基因分析表征 DON 对肾脏生长和肾功能具有重要的影响，但详细的作用机制尚需深入研究。

参考文献

- [1] SCHERM B, BALMAS V, SPANU F, et al. Fusarium culmorum: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat [J]. Molecular Plant Pathology, 2013, 14 (4): 323-341.
- [2] YOSHIZAWA T, TAKEDA H, OHI T. Structure of a novel metabolite from deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, in animals [J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 2014, 47(9): 33-35.
- [3] KHOSHAL A K, NOVAK B, MARTIN P G P, et al. Co-occurrence of DON and emerging mycotoxins in worldwide finished pig feed and their combined toxicity in intestinal cells [J]. Toxins, 2019, 11(12): 727.
- [4] LU J, ZHANG Y, DONG H, et al. New mechanism of nephrotoxicity of triptolide: Oxidative stress promotes cGAS-STING signaling pathway [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2022, 188: 26-34.
- [5] WANG M, WANG Z, CHEN Y, et al. Kidney damage caused by obesity and its feasible treatment drugs [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(2): 747.
- [6] BAO C, ZHU S, SONG K, et al. HK2: a potential

- regulator of osteoarthritis via glycolytic and non-glycolytic pathways [J]. *Cell Communication and Signaling*, 2022, 20(1): 132.
- [7] BREZNICEANU M L, GANDOLFO M T, FERRARIO F, et al. Apoptosis in the kidneys of patients with type II diabetic nephropathy [J]. *Kidney International*, 2007, 72 (10) : 1262-1272.
- [8] ZHANG L, JIANG C, ZHONG Y, et al. STING is a cell-intrinsic metabolic checkpoint restricting aerobic glycolysis by targeting HK2 [J]. *Nature Cell Biology*, 2023, 25(8): 1208-1222.
- [9] LI F, HE C, YAO H, et al. Glutamate from nerve cells promotes perineural invasion in pancreatic cancer by regulating tumor glycolysis through HK2 mRNA-m6A modification [J]. *Pharmacological Research*, 2023, 187: 106555.
- [10] PESTKA J J. Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis [J]. *Food Additives and Contaminants*, 2008, 25(9): 1128-1140.
- [11] FEIZOLLAHI E, ROOPESH M S. Mechanisms of deoxynivalenol (DON) degradation during different treatments: A review [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(21): 5903-5924.
- [12] PINTO A C S M, DE PIERRI C R, EVANGELISTA A G, et al. Deoxynivalenol: Toxicology, degradation by Bacteria, and phylogenetic analysis [J]. *Toxins*, 2022, 14(2): 90.
- [13] YANG W, YU M, FU J, et al. Deoxynivalenol induced oxidative stress and genotoxicity in human peripheral blood lymphocytes [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2014, 64: 383-396.
- [14] SIES H, BELOUSOV V V, CHANDEL N S, et al. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2022, 23(7): 499-515.
- [15] LI K, QIU H, YAN J, et al. The involvement of TNF- α and TNF- β as proinflammatory cytokines in lymphocyte-mediated adaptive immunity of Nile tilapia by initiating apoptosis [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021, 115: 103884.
- [16] BAINOR A, CHANG L, MCQUADE T J, et al. Bicinchoninic acid (BCA) assay in low volume [J]. *Analytical Biochemistry*, 2011, 410(2): 310-312.
- [17] THÜRING K, SCHMID K, KELLER P, et al. Analysis of RNA modifications by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Methods*, 2016, 107: 48-56.
- [18] KANG R LI R, DAI P, LI Z, et al. Deoxynivalenol induced apoptosis and inflammation of IPEC-J2 cells by promoting ROS production [J]. *Environmental Pollution*, 2019, 251: 689-698.
- [19] MEIZLISH M L, FRANKLIN R A, ZHOU X, et al. Tissue homeostasis and inflammation [J]. *Annual Review of Immunology*, 2021, 39: 557-581.
- [20] MALHOTRA J D, KAUFMAN R J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2007, 9(12): 2277-2294.
- [21] QU L, LI J, DU Y, et al. Designing triangular silver nanoplates with GSH/GSSG surface mixed states as novel nanoparticle-based redox mediators for electrochemical biosensing [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2022, 14(22): 26271-26278.
- [22] NDLOVU S, NAGIAH S, ABDUL N S, et al. Deoxynivalenol downregulates NRF2-induced cytoprotective response in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells [J]. *Toxicon*, 2021, 193: 4-12.
- [23] HARTWICK BJORKMAN S, OLIVEIRA PEREIRA R. The interplay between mitochondrial reactive oxygen species, endoplasmic reticulum stress, and Nrf2 signaling in cardiometabolic health [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2021, 35(4): 252-269.
- [24] CZABOTAR P E, GARCIA-SAEZ A J. Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2023, 24(10): 732-748.
- [25] 赵帆, 李佳钰, 陆麒麟, 等. 当归拈痛汤调控Fas/caspase-8通路促进类风湿关节炎滑膜成纤维细胞凋亡[J]. *南方医科大学学报*, 2020, 40(8): 1119-1126.
- [26] PARK C, JIN C Y, KWON H J, et al. Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia U937 cells: Roles of Bcl-2 and extracellular-regulated kinase signaling [J]. *Toxicology in Vitro*, 2010, 24(2) : 486-494.
- [27] BOATRIGT K M, SALVESEN G S. Mechanisms of caspase activation [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2003, 15(6): 725-731.
- [28] BAI Y, XUE Y, XIE X, et al. The RNA expression signature of the HepG2 cell line as determined by the integrated analysis of miRNA and mRNA expression profiles [J]. *Gene*, 2014, 548(1): 91-100.
- [29] YOU L, ZHAO Y, KUCA K, et al. Hypoxia, oxidative stress, and immune evasion: A trinity of the trichothecenes T-2 toxin and deoxynivalenol (DON) [J]. *Archives of Toxicology*, 2021, 95: 1899-1915.
- [30] ZHANG Z, RICHMONDA, YAN C, et al. Immunomodulatory properties of PI3K/AKT/mTOR and MAPK/MEK/ERK inhibition augment response to immune checkpoint blockade in melanoma and triple-negative breast cancer [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(13): 7353.
- [31] GILLEY R, MARCH H N, COOK S J. ERK1/2, but not ERK5, is necessary and sufficient for phosphorylation and activation of c-Fos [J]. *Cellular Signalling*, 2009, 21 (6): 969-977.
- [32] FAN H, LIU X, ZHANG L, et al. Intervention effects of QRZSLXF, a Chinese medicinal herb recipe, on the DOR- β -arrestin1-Bcl-2 signal transduction pathway in a rat model of ulcerative colitis [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, 154(1): 88-97.
- [33] SU P, LUO X, ZENG C, et al. Madecassic acid suppresses osteoclast differentiation and bone resorption by inhibiting RANKL-induced NF- κ B, JNK and NFAT signaling pathways [J]. *Rheumatology & Autoimmunity*, 2023, 3(4): 220-229.