

# 九香虫肽缓解槟榔碱诱导的胃粘膜上皮细胞损伤

蒋玉珍, 成钰莹, 杨扬, 钟膳蔚, 黄安晴, 刘俊熙, 杜冰, 黎攀\*

(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

**摘要:** 九香虫 (*Aspongopus chinensis* Dallas) 属于传统药食两用资源昆虫, 具有多种生物学功效。该研究旨在探讨九香虫肽对槟榔碱诱导的人胃粘膜上皮细胞 (GES-1) 损伤的保护作用。采用九香虫肽干预槟榔碱诱导的 GES-1 细胞, 测定抗氧化和线粒体功能等指标。结果显示, 250、1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的九香虫肽处理后, 细胞活力分别提高了 4.94% 和 10.89%, SOD 活力分别增加了 22.33%、38.29%, GSH 含量增加了 23.65%、40.10%; LDH 活力分别下降 1.51%、8.99%, ROS 水平降低 25.62%、48.75%。此外, 九香虫肽通过回调线粒体膜电位和 ATP 酶活力, 减轻线粒体损伤。采用转录组学技术进一步分析, 发现九香虫肽主要通过调节程序性坏死通路来缓解 GES-1 损伤。最后利用 RT-qPCR 和 Western-blot 验证得到九香虫肽显著下调该通路 p62、Hsp90、cPLA<sub>2</sub> 和 RIPK1、RIPK3、MLKL 的表达水平 ( $P<0.01$ )。综上, 九香虫肽通过下调程序性坏死通路关键基因和蛋白表达, 进而改善细胞氧化损伤, 维持线粒体功能, 缓解细胞坏死。该研究为缓解槟榔碱引发的胃黏膜损伤提供新的思路, 并为九香虫肽产品开发奠定理论依据。

**关键词:** 九香虫肽; 槟榔碱; 人胃粘膜上皮细胞; 转录组学; 程序性坏死

文章编号: 1673-9078(2025)05-36-48

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.5.0222

## The Role of Polypeptides from *Aspongopus chinensis* Dallas in Ameliorating Arecoline-induced GES-1 Cell Injury

JIANG Yuzhen, CHENG Yuying, YANG Yang, ZHONG Shanwei, HUANG Anqing, LIU Junxi, DU Bing, LI Pan\*

(College of Food Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** *Aspongopus chinensis* Dallas (ACD) is classified as a traditional medicinal and edible insect, and exhibits diverse biological effects. Polypeptides from ACD (hereinafter referred to as ACD polypeptides) were used to treat arecoline-induced GES-1 cells to clarify their protective effects against arecoline-induced GES-1 cell injury. After treatment, antioxidant and mitochondrial function indicators were evaluated. Treatment with 250 and 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of ACD polypeptides increased respective cell viability scores by 4.94% and 10.89%, superoxide dismutase activities by 22.33% and 38.29%, and glutathione content by 23.65% and 40.10%, while reducing respective lactate dehydrogenase activities by 1.51% and 8.99% and reactive oxygen species (ROS) levels by 25.62% and 48.75%. Additionally, ACD polypeptides alleviated mitochondrial damage by modulating mitochondrial membrane potential and ATPase activity. Transcriptomic analyses revealed that ACD polypeptides mitigate GES-1 cell injury by regulating necroptosis. Finally, RT-qPCR and western blot were employed to

引文格式:

蒋玉珍,成钰莹,杨扬,等.九香虫肽缓解槟榔碱诱导的胃粘膜上皮细胞损伤[J].现代食品科技,2025,41(5):36-48.

JIANG Yuzhen, CHENG Yuying, YANG Yang, et al. The role of polypeptides from *Aspongopus chinensis* dallas in ameliorating arecoline-induced GES-1 cell injury [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(5): 36-48.

收稿日期: 2024-02-26

基金项目: 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系 (CARS-21)

作者简介: 蒋玉珍 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 新资源食品与功能性原料, E-mail: jiangyz1211@163.com

通讯作者: 黎攀 (1990-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 新资源食品原料有效成分评价, E-mail: lp19900815@scau.edu.cn

confirm that ACD polypeptides downregulate p62, Hsp90, cPLA<sub>2</sub>, RIPK1, RIPK3, and MLKL expression in this pathway ( $P < 0.01$ ). In summary, ACD polypeptides mitigate cellular oxidative damage, preserve mitochondrial function, and alleviate cell necrosis by downregulating key genes and protein expression in the necroptosis pathway. This study provides new insights into mitigating arecoline-induced damage to the gastric mucosa and establishes a theoretical foundation for developing ACD polypeptide products.

**Key words:** polypeptide from *Aspongopus chinensis* Dallas; arecoline; GES-1; transcriptomics; necroptosis

槟榔 (*Areca catechu* L.) 属于棕榈科槟榔属, 原产于马来西亚, 在南亚和东南亚国家广泛分布, 我国主要产地为台湾、海南、云南等地。作为我国“四大南药”之首, 槟榔富含生物碱、粗纤维、皂苷和微量元素等<sup>[1]</sup>。然而槟榔碱具有一定毒性, 易引发癌变, 如口腔癌<sup>[2]</sup>、咽喉癌<sup>[3]</sup>、胃癌<sup>[4]</sup>等。胃癌是全球范围内发病率和死亡率均居高不下的多发性消化系统恶性肿瘤, 约有 8.2% 的癌症死亡与其相关<sup>[5]</sup>。现代研究表明咀嚼槟榔与胃癌存在一定联系, 动物实验也证实槟榔碱能够导致胃损伤<sup>[4]</sup>。目前相关文献均为槟榔碱的毒性实验研究, 对于如何缓解槟榔碱带来的毒性损伤鲜少报道, 本实验就缓解槟榔碱诱导的胃粘膜上皮细胞损伤开展研究, 为槟榔碱毒性缓解奠定基础。

九香虫 (*Aspongopus chinensis* Dallas) 是蝽科九香虫经干燥处理后的产物, 具有较高的食用价值和药用价值。《本草纲目》中记载到九香虫炒熟后香气浓郁, 酥脆可口, 贵州、云南、四川等少数民族地区常把它当作小吃食用, 传统中医会用来治疗胃炎、胃病等<sup>[6]</sup>。近年的现代药理研究表明九香虫具有改善生殖损伤<sup>[7]</sup>、抗乳腺癌<sup>[8]</sup>、抗胃癌<sup>[9]</sup>等多种药理作用, 然而对于九香虫蛋白及多肽是如何发挥生物活性功能的研究鲜有报道。因此, 本研究采用酶解法制备九香虫肽, 并对其开展活性研究。

为探究九香虫肽是否可缓解槟榔碱诱导的胃粘膜细胞损伤, 在前期建立的槟榔碱诱导人胃黏膜上皮细胞 GES-1 的毒性损伤模型<sup>[10]</sup>的基础上, 通过检测氧化损伤指标和线粒体功能评价其效果, 结合转录组学联合荧光定量聚合酶链式反应 (Quantitative Real Time PCR, RT-qPCR) 和蛋白免疫印迹 (Western-blot, WB) 技术阐述其作用机制。该研究旨在为防治槟榔碱引发的胃黏膜损伤提供切实有效的策略, 同时为九香虫肽产品的开发奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

九香虫购于广州清平中药材市场; 槟榔碱 (分

析标准品, CAS : 63-75-2) 购于上海源叶生物科技有限公司; GES-1 细胞购于武汉普诺赛生命科技有限公司; 中性蛋白酶、碱性蛋白酶, 杰能科生物工程有限公司; 乳酸脱氢酶 (Lactate Dehydrogenase, LDH) 试剂盒 (货号: C0016)、超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 试剂盒 (货号: S0101S)、还原型谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 试剂盒 (货号: S0075S)、活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 检测试剂盒 (货号: S0033S), 碧云天生物技术公司; 三磷酸腺苷 (Adenosine Triphosphate, ATP) 酶试剂盒 (货号: A070-1-2)、Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATP 酶试剂盒 (货号: A070-2-2), 南京建成生物工程研究所; RIPA 裂解液, 中国 Abiowell; RPMI-1640 培养基、胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)、含 EDTA 胰酶 (Trypsin-EDTA), 美国 Gibco 公司;  $\beta$ -actin、p62 抗体、热休克蛋白 (Heat Shock Proteins 90, Hsp90) 抗体、胞浆型磷脂酶 A<sub>2</sub> (Cytoplasmic Phospholipase A<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub>) 抗体、受体相互作用蛋白激酶 1 (Receptor-interacting Protein Kinase 1, RIPK1) 抗体、受体相互作用蛋白激酶 3 (Receptor-interacting Protein Kinase 3, RIPK3) 抗体、混合谱系激酶样蛋白 (Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein, MLKL) 抗体, Abcam; Tris-HCl 缓冲液、Western 转膜缓冲液, 中国 Abiowell。

L-8900 型全自动氨基酸分析仪, 日立高新技术公司; SH 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱, 上海善志仪器设备有限公司; DGG-9070B 型鼓风干燥箱, 上海森信实验仪器有限公司; ANKE TDL-5-A 型离心机, 上海安亭分析仪器有限公司; SW-CJ-1FD 苏洁超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; ZEISS Lab.A1 倒置生物学显微镜, 德国蔡司公司; Labserv K3 型酶标仪、BD FACSCalibur 流式细胞仪、PIKOREAL96 荧光定量 PCR 仪, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; Illumina HiSeq 2500 高通量测序平台, 美国 Illumina 公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 九香虫肽制备

九香虫洗净烘干，索氏抽提脱脂，粉碎后 4 ℃ 备用。酶解方法<sup>[11]</sup>：高温蒸煮 5 h，添加 0.5% 的中性蛋白酶和 1.5% 的碱性蛋白酶（体积分数）并调节 pH 值为 10，55 ℃ 酶解 6 h；酶解完成沸水浴 5 min 灭活酶；酶解液离心，上清液浓缩冷冻干燥，制得九香虫肽置于 -20 ℃ 备用。

#### 1.2.1.1 氨基酸组成

参照 GB5009.124-2016 和张慧莹等<sup>[12]</sup>的方法测定。

#### 1.2.1.2 多肽相对分子量分布测定

参考 GB/T22727-2008 采用高效凝胶渗透色谱法测定九香虫多肽的相对分子量分布。色谱柱为 TOSOH TSKgel G2000SWXL 凝胶柱，流动相为乙腈-水溶液（2:8，V/V），含  $\phi=0.1\%$  三氟乙酸，流速 0.5 mL/min，进样量 5  $\mu\text{L}$ （质量浓度 1 g/L），检测器为紫外检测器，波长 220 nm。

### 1.2.2 细胞处理

#### 1.2.2.1 细胞培养

GES-1 细胞培养在含 10% ( $\phi$ ) FBS 的 RPMI-1640 培养基中，在 5% ( $\phi$ )  $\text{CO}_2$ 、37 ℃ 的培养箱中培养，取对数生长期的细胞进行试验。

#### 1.2.2.2 CCK-8法测定细胞活力

设置只含有新鲜培养液为空白孔，含有细胞且不含样品作为对照孔，不同质量浓度的九香虫肽分别为 62、125、250、500、1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，每组样品设置 6 个复孔，培养 24 h 后加入 CCK-8，测定细胞活力。

设置空白对照组 NC、模型组 M、低剂量组 L 和高剂量组 H、M 组用 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  槟榔碱溶液培养 24 h，而实验组用 250、1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  九香虫肽预处理 12 h 后再用 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  槟榔碱溶液培养 24 h，每组样品设置 6 个复孔，测定细胞活力。

$$V = \frac{A - A_0}{A_1 - A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

$V$ ——细胞活力，%；

$A$ ——样品组在 450 nm 处的吸光值；

$A_0$ ——空白组在 450 nm 处的吸光值；

$A_1$ ——对照组在 450 nm 处的吸光值。

#### 1.2.2.3 GES-1细胞活性氧检测

取生长状态良好 GES-1 细胞，以每毫升  $1 \times 10^5$

个的密度接种于 6 孔细胞培养板内，培养 24 h 后按分组加入不同培养基，每孔 2 mL，放回培养箱内继续培养 24 h。培养完成后，参考冷彦等<sup>[13]</sup>的方法进行细胞活性氧检测。

#### 1.2.2.4 GES-1细胞GSH、SOD、LDH检测

同 1.2.2.3 方法培养，培养完成后，按照 LDH 试剂盒、T-SOD 试剂盒、GSH 试剂盒中的说明书进行检测。

#### 1.2.2.5 GES-1细胞线粒体膜电位（Mitochondrial Membrane Potential, MMP）检测

同 1.2.2.3 方法培养，培养完成后参考洗健安等<sup>[14]</sup>的方法进行细胞线粒体膜电位的检测。

#### 1.2.2.6 GES-1细胞ATP酶检测

同 1.2.2.3 方法培养，按照超微量 ATP 酶试剂盒（ $\text{Na}^+\text{K}^+$ 、T-ATP 酶）中的说明书进行检测。

### 1.2.3 转录组分析

收集细胞提取总 RNA，通过 Oligo(dT) 磁珠富集带有 polyA 尾的 mRNA，将 mRNA 片段化，利用随机寡核苷酸为引物，在 M-MuLV 逆转录酶体系中合成 cDNA，生成的双链 cDNA 进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头。用 AMPure XP beads 筛选 250~300 bp 左右的 cDNA，进行聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction, PCR）扩增并再次使用 AMPure XP beads 纯化。将不同文库 pooling 后进行 Illumina 测序，原始数据质控后除去低质量 reads（接头序列，含 N 比率超过 10% 的 reads、adapter（体积分数），及长度小于 20 bp 的序列），得到 clean data，使用 DESeq2 筛选差异表达基因（Differentially Expressed Genes, DEGs），设定错误发生率（False Discovery Rate, FDR）多重检验校正  $p\text{-adjust} < 0.05$  和样本表达量差异倍数（Fold Change, FC） $|\log_2\text{FC}| \geq 2$  为筛选标准。利用基因本体论（Gene Ontology, GO）数据库和京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG）数据库对 DEGs 进行功能注释和通路分析。

### 1.2.4 实时荧光定量聚合酶链式反应

参考 Zhao 等<sup>[15]</sup>的方法，提取总 RNA 以获得的总 mRNA，使用反转录酶将总 mRNA 反转录为 cDNA，引物序列是通过使用 primer 5 软件根据 NCBI 平台检索到的目的基因设计和合成的，引物序列如下。

表 1 引物序列

Table 1 Primer Sequence

基因		引物序列
<i>β-actin</i>	F	ACCCTGAAGTACCCCATCGAG
	R	AGCACAGCCTGGATAGCAAC
<i>p62</i>	F	CCCGTCTACAGGTGAACTCCA
	R	CTCCGATGTCATAGTTCTTGGTC
<i>Hsp90</i>	F	GTCCTGTGCGGTCACTTAG
	R	TGAAAGGCGAACGTCTCAAC
<i>cPLA2</i>	F	AGAATTACTCTCTGACCGACT
	R	ACGGGCTTCTCATATTGGAC
<i>RIPK1</i>	F	CCGTAAACTGGGCTTCACAC
	R	CTTTATGCCTTCCCTCATCACC
<i>RIPK3</i>	F	CCATAGAAAACCAGCACTCTCG
	R	GAACCTGCTCTCTTGTGCC
<i>MLKL</i>	F	GCAGGTTTCTAACAGCAAGCCA
	R	GCTCCTTCCAGACATCACTCA

1.2.5 蛋白免疫印迹

收集细胞加入适量 RIPA 裂解液裂解细胞和蛋白抽提, 参照 Zhao 等<sup>[15]</sup>的方法进行电泳、转膜、孵育等实验, 凝胶成像后利用 Image J 软件进行分析。

1.3 数据处理

本研究的数据结果采用 Excel 2019、SPSS 26、Graphpad Prism 8.3、Flowjo、ImageJ 等软件分析并作图。 $P < 0.05$  表示差异显著,  $P < 0.01$  表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 九香虫肽基本成分分析

九香虫肽氨基酸含量丰富, 共有 17 种氨基酸, 其氨基酸组成见表 2。其中, 含量最高的是谷氨酸和天冬氨酸, 分别占 15.19% 和 10.15%。研究表明, 谷氨酸和天冬氨酸具有较好的抗氧化活性且有助于保护胃肠道粘膜完整性, 通过调控其氨基酸代谢能在一定程度上改善胃黏膜病理状态<sup>[16]</sup>。必需氨基酸 / 非必需氨基酸比值为 70.46%, 优于 FAO/WHO 氨基酸模式要求的比值 60%, 说明九香虫肽的氨基酸组成较为优质, 具有良好营养价值。如 3 所示, 九香虫肽中相对分子质量小于 1 000 u 占比为 88.10%, 说明经酶解后所制备的九香虫肽大多数为小分子肽。

表 2 氨基酸组成分析

Table 2 Analysis of aminoacid composition

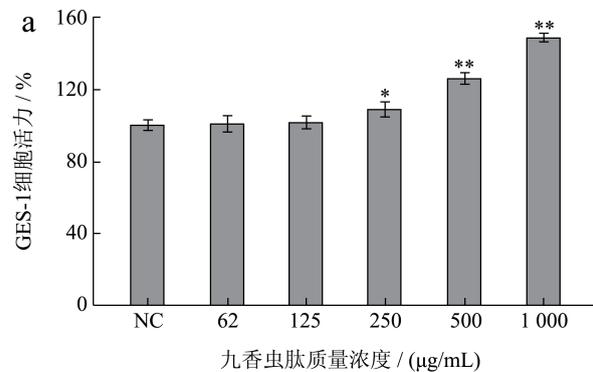
氨基酸种类	九香虫肽/% (质量分数)
谷氨酸	15.19 ± 3.27
丙氨酸	7.27 ± 0.68
天冬氨酸	10.15 ± 1.61
脯氨酸	4.30 ± 0.84
甘氨酸	4.89 ± 0.47
酪氨酸	4.23 ± 0.83
丝氨酸	4.94 ± 0.63
精氨酸	5.57 ± 0.74
胱氨酸	2.10 ± 0.37
组氨酸	3.26 ± 1.09
亮氨酸	7.62 ± 1.32
缬氨酸	6.06 ± 0.84
赖氨酸	7.30 ± 1.42
异亮氨酸	5.26 ± 0.89
苏氨酸	5.01 ± 0.71
蛋氨酸	3.59 ± 0.79
苯丙氨酸	3.22 ± 0.88
必需氨基酸	41.32
非必需氨基酸	58.64
必需氨基酸与非必需氨基酸比值	70.46%

表 3 相对分子质量分布

Table 3 Relative molecular mass distributions

相对分子质量/u	所占比例/%
< 1 000	88.10
1 000~2 000	6.40
2 000~5 000	4.60
5 000~10 000	0.90

2.2 九香虫肽对 GES-1 细胞活力、GSH、SOD、LDH 的影响



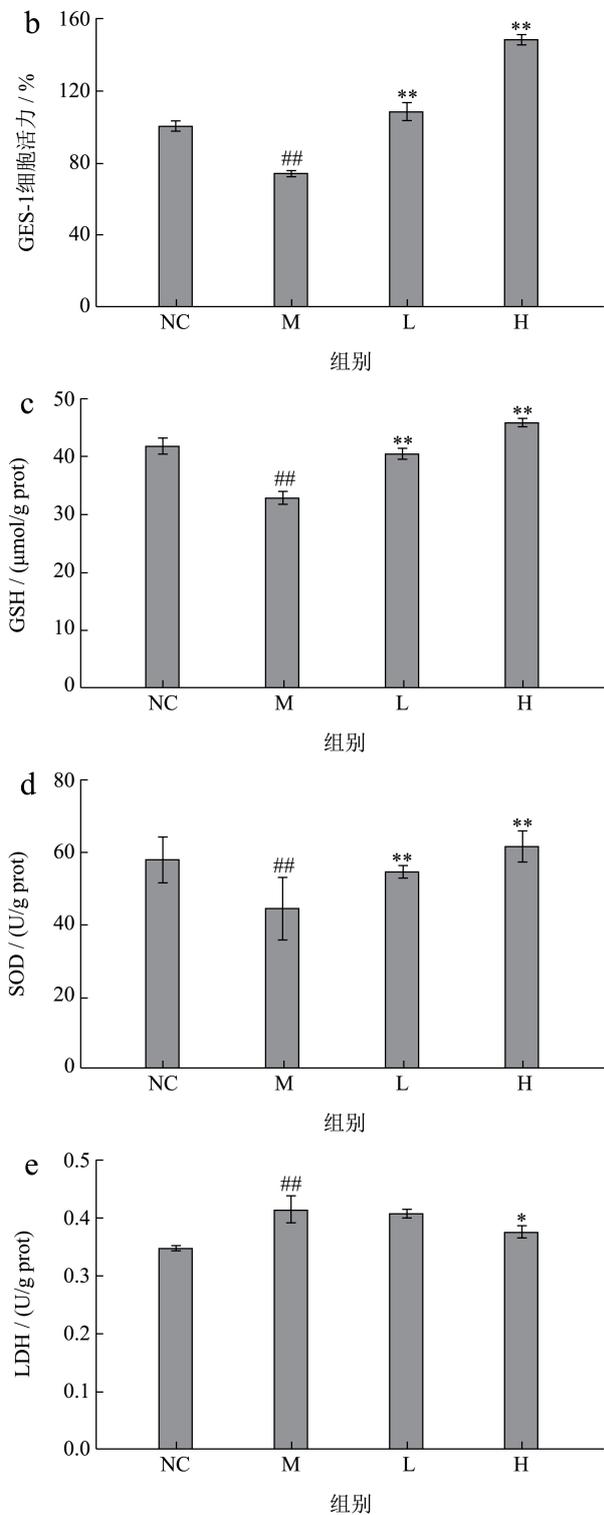


图1 九香虫肽对 GES-1 细胞活力、GSH、SOD、LDH 的影响

Fig.1 The effects of *Aspongopus chinensis* Dallas' polypeptide on the viability, GSH, SOD and LDH of GES-1 cells

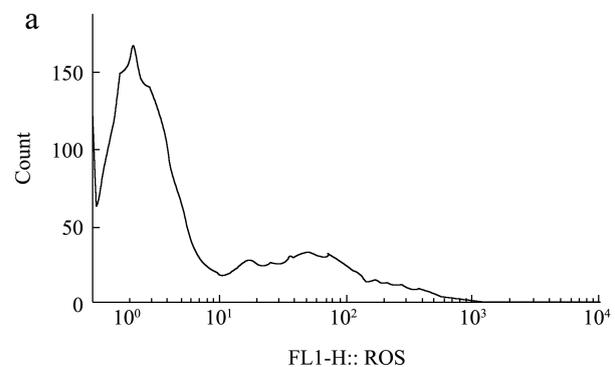
注：样本数  $n=6$ 。NC：对照组；M：模型组；L：低剂量组；H：高剂量组。图中#表示与正常组相比  $P<0.5$ ，##表示与 NC 正常组相比  $P<0.01$ ；\*表示与 M 模型组相比， $P<0.5$ ，\*\*表示与 M 模型组相比  $P<0.01$ 。

不同质量浓度九香虫肽对 GES-1 细胞活力的影响结果见图 1a，其中 250、500、1 000  $\mu\text{g/mL}$  的九香虫肽能够显著提高细胞活力，分别提高了 8.87% ( $P<0.05$ )、25.99% ( $P<0.01$ ) 和 48.12% ( $P<0.01$ )，选择低剂量 250  $\mu\text{g/mL}$  和高剂量 1 000  $\mu\text{g/mL}$  用作后续实验。九香虫肽对槟榔碱诱导的 GES-1 细胞活力的影响结果见图 1b。经过九香虫多肽的预处理，GES-1 细胞活力有所回升，分别提高了 4.94% ( $P<0.01$ ) 和 10.89% ( $P<0.01$ )。上述结果表明，九香虫肽可保护 GES-1 细胞，抵抗槟榔碱诱导的细胞活力降低。

九香虫肽对 GES-1 细胞内 GSH、SOD、LDH 的影响见图 1cde。在槟榔碱的作用下，GES-1 细胞内 GSH 含量以及 SOD 酶活力极显著降低 ( $P<0.01$ )，高剂量九香虫肽处理后，细胞内 GSH 含量 (质量分数) 以及 SOD 酶活力相对于 M 组极显著升高 ( $P<0.01$ )，分别增加了 40.10% 和 38.29%。与 NC 组相比，M 组中 GES-1 细胞的 LDH 活力极显著增加 ( $P<0.01$ )，GES-1 细胞受到毒性损伤。而经过九香虫肽的预处理，LDH 活力呈现下降趋势，在高剂量九香虫多肽的处理下，下降了 8.99% ( $P<0.05$ )。该结果表明，九香虫肽的预处理对槟榔碱的毒性具有一定的抵抗作用，九香虫肽可以提高细胞内 GSH 含量和 SOD 酶活力，降低 LDH 活力，从而抵抗氧化应激损伤。

### 2.3 九香虫肽对 GES-1 细胞 ROS 的影响

九香虫肽对 GES-1 细胞 ROS 的影响见图 2，图中峰往右侧偏移代表着荧光强度增加，平均荧光强度可反映 ROS 水平。与对照组相比，模型组的 ROS 平均荧光强度极显著增加 ( $P<0.01$ )，约为 NC 组的 6.2 倍。经过九香虫多肽的预处理，GES-1 细胞内的 ROS 水平呈现极显著降低的趋势 ( $P<0.01$ )。上述结果说明，九香虫肽可以逆转槟榔碱导致的 GES-1 细胞内 ROS 水平提高，从而发挥其抗氧化损伤的作用。



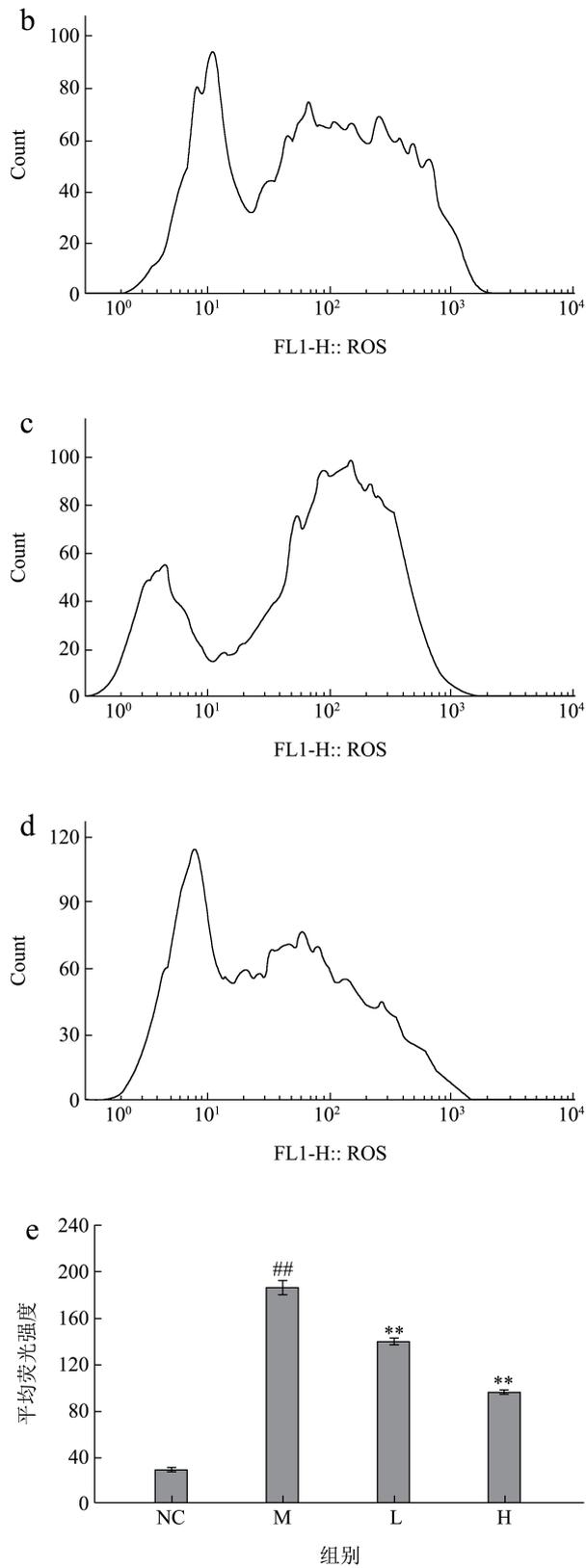


图2 九香虫肽对 GES-1 细胞 ROS 的影响  
 Fig.2 The effect of *Aspongopus chinensis* Dallas' polypeptide on ROS in GES-1 cells

注：样本数  $n=6$ 。a 为 NC 组 GES-1 流式直方图；b 为 M 组；c 为 L 组；d 为 H 组；e 为平均荧光强度统计柱状图。

## 2.4 九香虫肽对 GES-1 细胞线粒体膜电位的影响

线粒体膜电位下降是细胞凋亡和线粒体功能障碍早期阶段的标志性事件，下降程度越高代表损伤越高，JC-1 以聚合物形式在高线粒体膜电位的条件下发射红色荧光，而在低线粒体膜电位时，则以单体形式发射绿色荧光<sup>[17]</sup>。九香虫肽对 GES-1 细胞线粒体膜电位的影响见图 3。与 NC 相比，M 组的 MMP 出现了极显著降低 ( $P<0.01$ )。而经过九香虫肽预处理，GES-1 细胞 MMP 水平呈现出上升趋势，在高质量浓度九香虫多肽处理下出现极显著上升 ( $P<0.01$ )。结果表明，九香虫肽可以在一定程度上通过提升线粒体膜电位，从而达到对 GES-1 细胞的保护作用，有效改善槟榔碱诱导的线粒体功能紊乱。

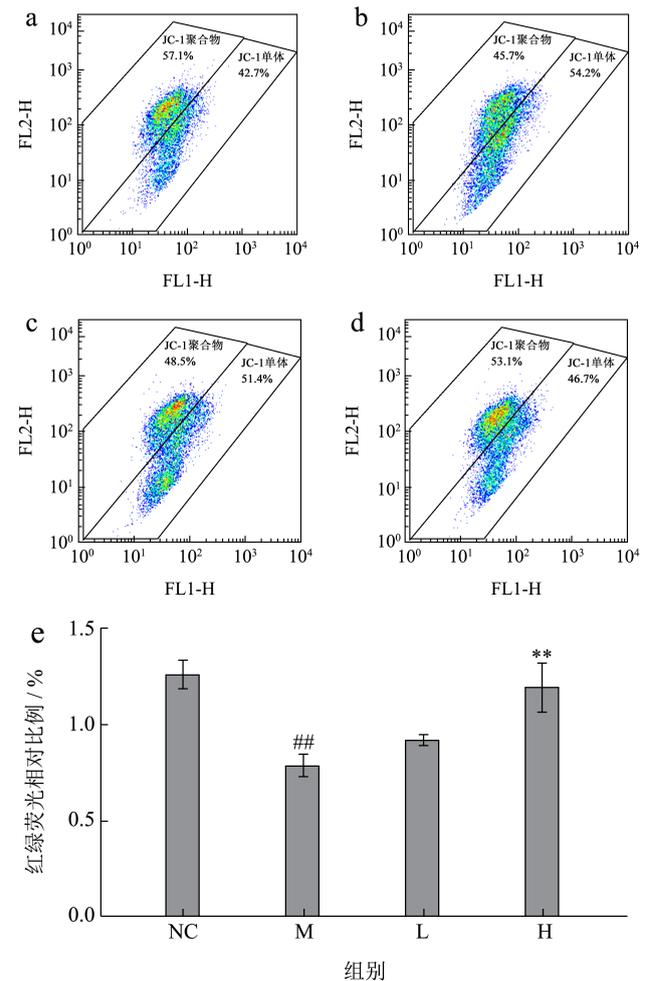


图3 九香虫肽对 GES-1 细胞线粒体膜电位的影响  
 Fig.3 The effect of *Aspongopus chinensis* Dallas' polypeptide on the mitochondrial membrane potential of GES-1 cells

注：样本数  $n=6$ 。a 为 NC 组 GES-1 流式散点图；b 为 M 组；c 为 L 组；d 为 H 组；e 为线粒体膜电位水平统计柱状图。

### 2.5 九香虫肽对GES-1细胞ATP酶的影响

九香虫肽对GES-1细胞ATP酶的影响见图4。与NC组相比，M组的Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATP酶活力极显著下降(P<0.01)。与M组相比，经过九香虫肽处理后，Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATP酶活力在H组中出现极显著升高(P<0.01)。同样处理条件下，总ATP酶活力的变化呈现出了相似的趋势，与M组相比，经过九香虫肽处理后，总ATP酶活力在H组中出现极显著升高(P<0.01)。上述结果表明，九香虫肽可能通过提高GES-1细胞内ATP酶活力和能量代谢，进而维持线粒体的渗透压，从而降低槟榔碱诱导的线粒体功能障碍。

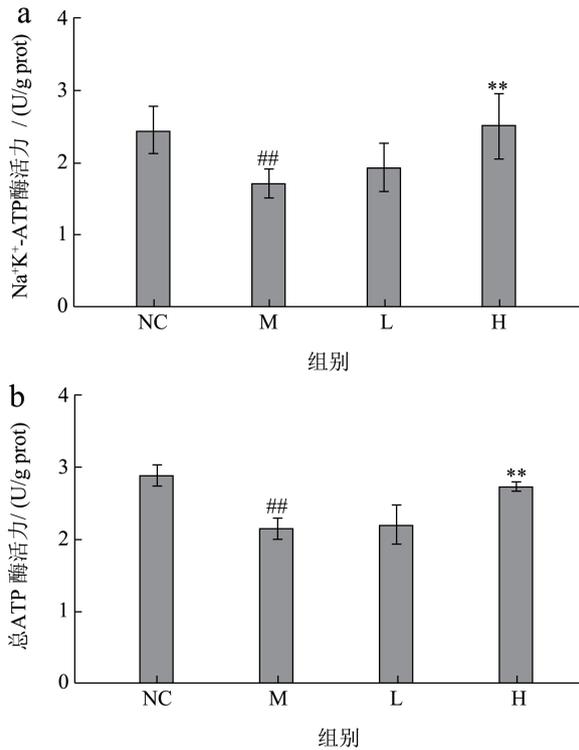


图4 九香虫肽对GES-1细胞ATP酶的影响

Fig.4 The effect of *Aspongopus chinensis* Dallas' polypeptide on ATPase in GES-1 cells

注: 样本数 n=6。

### 2.6 转录组分析

#### 2.6.1 差异表达基因分析

图5a中各组间的样本距离均比较接近，说明组间样本重复性好，不同组间距离分散表示不同组间存在差异。图5b中红色越深代表基因表达量越高，蓝色反之，低剂量以及高剂量九香虫肽预处理可以对应地调节槟榔碱诱导的GES-1细胞相应基因表达。图5c、5d火山图内红色为显著上调基因，绿色为显著下调基因，槟榔碱显著调节了GES-1细胞的基因转录水平，相比于M组，H组预处理能够有

效地调节由槟榔碱诱导的基因转录水平变化。

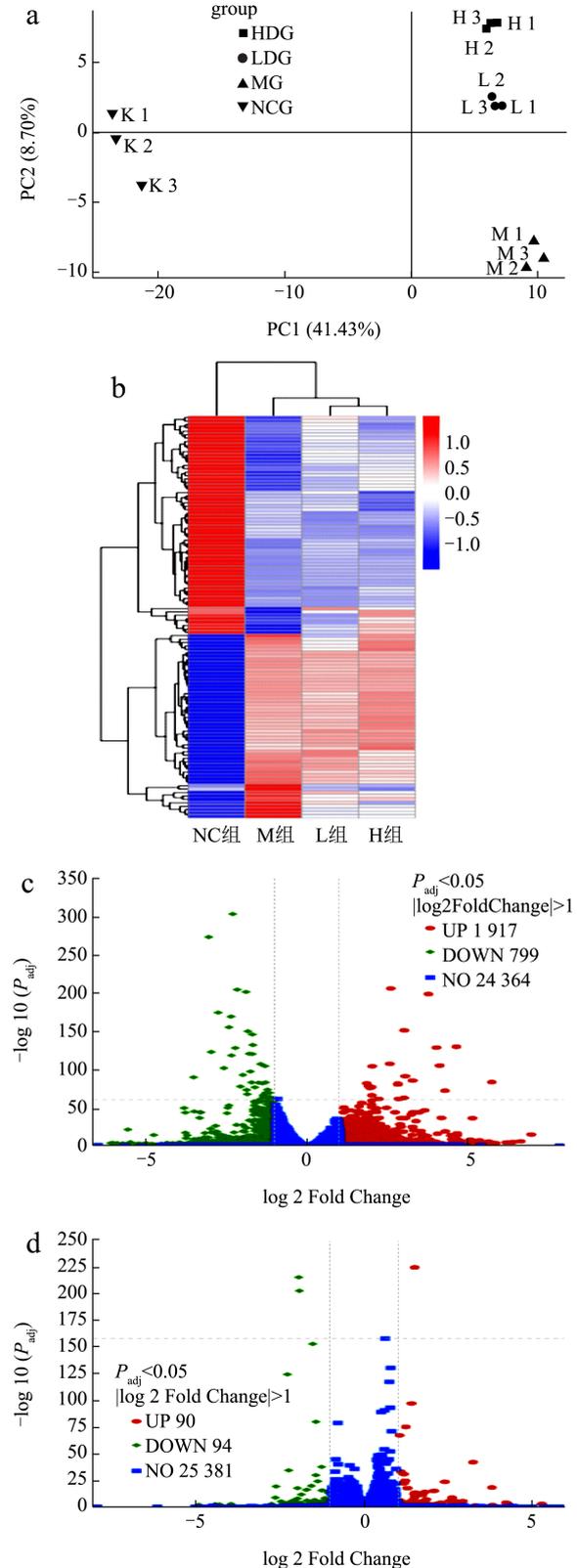


图5 差异表达基因分析

Fig.5 Differential gene expression analysis

注: 样本数 n=3。a 为各组基因表达主成分分析; b 为基因表达量聚类分析图; c 为显著差异表达基因火山图 (NC 组 vs M 组); d 为显著差异表达基因火山图 (M 组 vs H 组)。

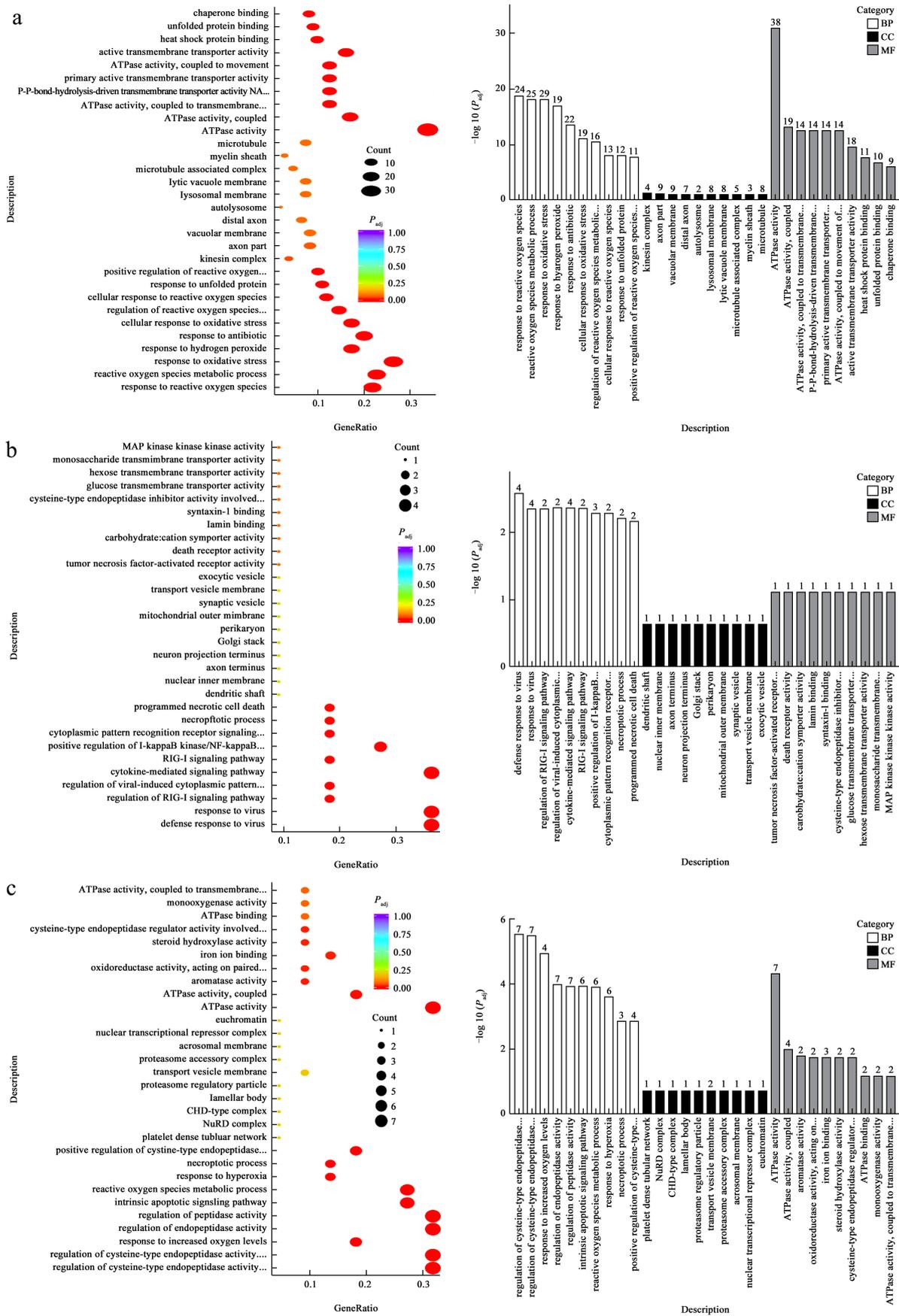


图 6 显著差异表达基因 GO 功能分析

Fig.6 Analysis of genes that are differentially expressed using Gene Ontology (GO)

注: 样本数  $n=3$ 。a 为 NC 组 vs M 组; b 为 M 组 vs L 组; c 为 M 组 vs H 组。

### 2.6.2 GO功能富集分析

为进一步研究九香虫肽对 GES-1 细胞的调控作用,对差异基因进行 GO 功能分析,GO 数据库包括相关生物学过程 (Biological Process, BP)、细胞组分 (Cellular Component, CC) 以及分子功能 (Molecular Function, MF)。与 NC 组相比, M 组显著调节的 BP 有活性氧反应 (Response to Reactive Oxygen Species)、氧化应激反应 (Response to Oxidative Stress) 等; MF 有 ATP 酶活性 (ATPase Activity) 等。与 M 组相比, L 组显著调节的 BP 有坏死过程 (Necroptotic Process)、程序坏死细胞死亡 (Programmed Necrotic Cell Death) 等, CC 有线粒体外膜 (Mitochondrial Outer Membrane) 等; H 组显著调节的 BP 有活性氧的代谢过程 (Reactive Oxygen Species Metabolic Process) 等, MF 有 ATP 酶活性等。以上结果说明,九香虫肽主要影响 BP 方面,通过活性氧代谢过程、ATP 酶活性等方面调节槟榔碱的刺激。

### 2.6.3 KEGG通路富集分析

采用 KEGG 数据库对显著差异表达基因进行代谢通路富集分析。结果表明 M 组显著影响了程序性坏死信号通路 (Necroptosis)、NOD 样受体信号通路 (NOD-like Receptor Signaling Pathway) 等; 与 M 组相比, L、H 组显著影响了程序性坏死信号通路、FoxO 信号通路 (FoxO Signaling Pathway) 等。综合各项指标, 后续研究围绕程序性坏死通路进行。

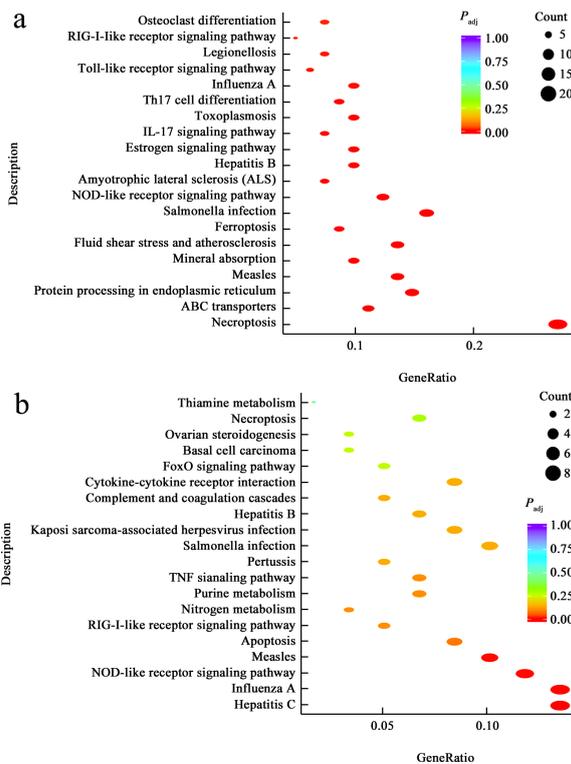


图 7 差异基因的 KEGG 富集分析

Fig.7 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes

注: 样本数  $n=3$ 。a 为 NC 组 vs M 组; b 为 M 组 vs L 组; c 为 M 组 vs H 组。

### 2.7 九香虫肽对程序性坏死通路关键基因表达的影响

九香虫肽对程序性坏死通路相关基因调控的影响见图 8。与 NC 组相比, M 组 GES-1 细胞中 p62、Hsp90、cPLA<sub>2</sub> 的基因水平极显著提高 ( $P < 0.01$ ), 对应地, 其通路下游的 RIPK1、RIPK3 以及 MLKL 的基因表达也极显著提高 ( $P < 0.01$ )。此外, 低剂量组以及高剂量组的相关基因表达水平相对于模型组则是呈现出相反趋势, 具有极显著调节作用 ( $P < 0.01$ )。上述结果表明, 槟榔碱刺激 GES-1 细胞可以调控程序性坏死相关基因高表达, 九香虫肽可以在基因水平上抑制相关改变, 从而缓解槟榔碱带来的细胞程序性坏死。

### 2.8 九香虫肽对程序性坏死通路关键蛋白表达的影响

九香虫肽对程序性坏死通路相关蛋白调控的影响见图 9。M 组中槟榔碱的刺激极显著提高了 p62、Hsp90、cPLA<sub>2</sub> 蛋白的水平, 对应其通路下游 RIPK1、RIPK3 以及 MLKL 的蛋白表达也显著升高, 九香虫肽显著逆转该变化。电泳条带图能直观看到 H 组的相关蛋白水平降低, 趋于 NC 组。上述结果表明, 槟榔碱刺激 GES-1 细胞可以上调程序性坏死相关蛋白的表达, 九香虫肽可以在蛋白水平上降低相关蛋白表达, 从而缓解槟榔碱带来的细胞程序性坏死。

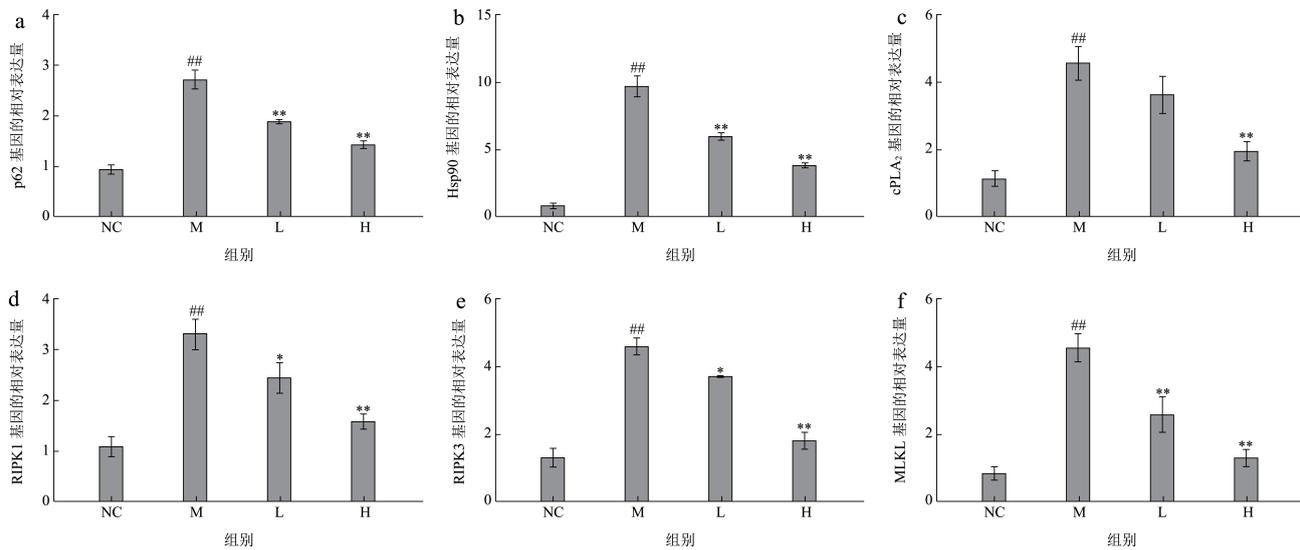


图 8 程序性坏死通路相关基因相对表达量

Fig.8 Relative expression of genes associated with the necroptosis pathway

注: 样本数  $n=3$ 。

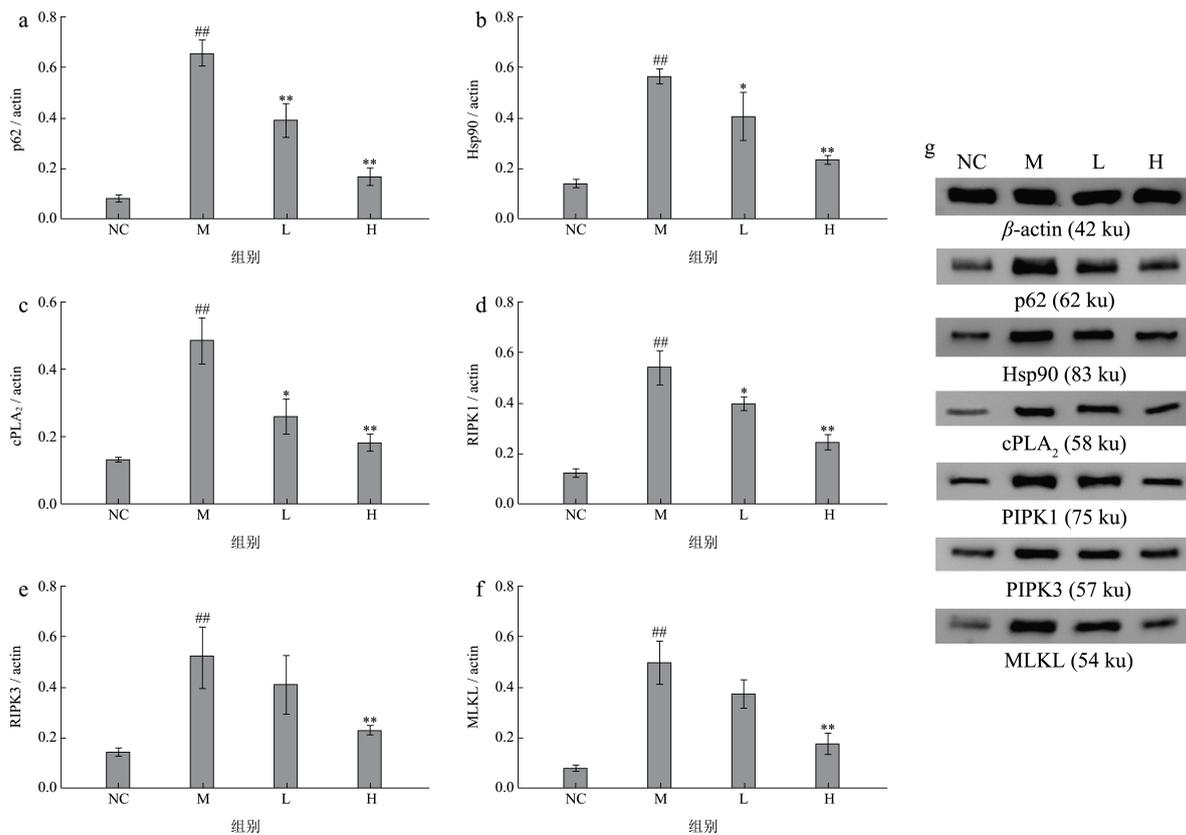


图 9 九香虫肽对程序性坏死通路关键蛋白的影响

Fig.9 Effect of *Aspongopus chinensis* Dallas' polypeptide on key proteins of necroptosis pathway

注: 样本数  $n=3$ 。a~f 为程序性坏死通路关键蛋白的表达; g 为程序性坏死通路关键蛋白电泳条带图。

### 3 讨论

近年来, 食用槟榔的人数仍在增加, 由槟榔碱造成的不良效应也备受关注, 位于表层的上皮细胞

极易受其影响, 前期研究证实槟榔碱导致胃黏膜上皮细胞损伤<sup>[10]</sup>。本研究选用传统的药食两用资源九香虫进行活性研究, 旨在深入剖析九香虫肽缓解槟榔碱诱导的 GES-1 细胞损伤的作用机制, 具体保护

机制见图 10。

前期研究表明槟榔碱造成 GES-1 细胞损伤主要表现在过度的氧化应激和线粒体损伤。当细胞内产生过多 ROS 时,会导致氧化应激,对细胞结构功能造成损害,为缓解该负担,细胞依赖于多个内源性抗氧化防御系统来清除 ROS 或阻止其形成。其中, GSH 作为有效的抗氧化剂,能够中和自由基,有效保护细胞免受氧化应激的损伤<sup>[18]</sup>。SOD 是一种含金属的抗氧化酶,参与催化超氧化物向过氧化氢和分子氧的分解,有助于减轻氧化压力<sup>[19]</sup>。这两种酶在细胞内的抗氧化防御中扮演着关键的角色,维护细胞内的氧化还原平衡。此外, LDH 是一种参与乳酸代谢的细胞内酶,通常在细胞受到损伤或氧化应激时释放<sup>[19]</sup>。经九香虫肽处理后, GSH 含量和 SOD 酶活力出现显著增加, LDH 酶活力降低,从而减轻细胞内氧化损伤。

氧化应激中过量 ROS 会诱导线粒体损伤,线粒体损伤后进一步生成更多的 ROS,三者恶性循环相互影响细胞代谢。当线粒体功能受损时, ROS 导致线粒体膜通透性的增加,诱导 MMP 下降,而 Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATP 酶活力降低,导致 Na<sup>+</sup>和 K<sup>+</sup>浓度不平衡,进一步产生更多的 ROS,最终细胞出现功能障碍而坏死<sup>[20,21]</sup>。低高剂量的九香虫肽能够显著降低 ROS 水平,分别下降 25.62% 和 48.75%,并调节 MMP 和 ATP 酶活力,使其趋于正常水平。类似的,鹿茸多肽提高人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 的 MMP 并降低 ROS 水平,抑制由 A $\beta$ <sub>25-35</sub> 诱导的线粒体功能障碍和氧化损伤<sup>[22]</sup>。因此,九香虫肽通过提高线粒体膜电位和 ATP 酶活力,降低 ROS 水平,维持线粒体的渗透压,从而维护氧化应激系统、ROS 和线粒体功能之间的稳态。

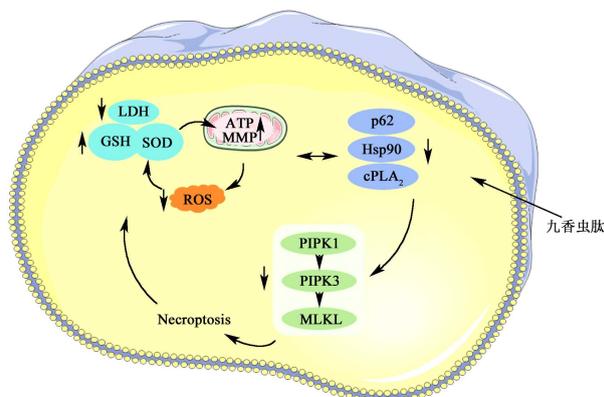


图 10 九香虫肽对 GES-1 细胞的保护机制

Fig.10 Mechanism of protection of GES-1 cells by *Aspongopus chinensis* Dallas' polypeptide

为进一步探究九香虫缓解槟榔碱诱导的细胞损伤作用机制,本研究通过转录组学技术分析得出程序性坏死通路是九香虫肽对 GES-1 细胞的主要调控途径。程序性坏死是一种由 RIPK1 和 RIPK3 级联磷酸化调控的死亡形式,死亡信号诱导 RIPK3 激酶激活后,进而磷酸化细胞坏死的特异性执行蛋白 MLKL, MLKL 蛋白聚合在膜上打孔裂解细胞膜,以致细胞死亡和胞内物质的外漏<sup>[23]</sup>。降低 RIPK1 和 RIPK3 表达以及 MLKL 的磷酸化,能够抑制其程序性坏死的发生<sup>[24]</sup>。大量研究表明,下调 RIPK1 和 RIPK3 的 mRNA 和蛋白表达水平能够缓解肝细胞<sup>[25,26]</sup>、肾小管细胞<sup>[27]</sup>和心肌细胞<sup>[28]</sup>的程序性坏死。细胞发生程序性坏死是由内源和外源性因素的共同引起的,其中包括氧化应激和线粒体损伤,通路中的关键蛋白也与它们有着相互作用。p62 是适应性应激蛋白,能调控多条信号通路,其表达可以在氧化应激条件下上调,作为选择性自噬的适应性蛋白, p62 能选择性降解氧化应激引起的受损蛋白和细胞器,调节氧化应激水平<sup>[29]</sup>。一项动物实验表明,二甲双胍能够降低 p62 的表达,通过减少 p62 与坏死小体的结合抑制 RIPK1/RIPK3/MLKL 通路<sup>[30]</sup>。Hsp90 主要作为分子伴侣参与蛋白质的合成、折叠等过程,在程序性坏死中, Hsp90 会促进 RIPK1 与其他蛋白之间相互作用,若抑制 Hsp90 的表达,坏死体的形成就会被阻断,抑制程序性坏死<sup>[31,32]</sup>。cPLA<sub>2</sub> 是具有催化甘油磷酸酯二位酰基水解脱活性的一类酶,细胞中氧化应激水平升高时,大量自由基破坏细胞膜, cPLA<sub>2</sub> 表达增加,这一过程产生多种游离脂肪酸,可作为下游反应信号最终引发细胞损伤或死亡<sup>[33]</sup>。cPLA<sub>2</sub> 和 ROS 之间相互依赖会导致细胞线粒体超极化与氧化破裂,最终诱发细胞程序性坏死<sup>[34]</sup>。在本研究中,通过 RT-qPCR 和 WB 技术检测该通路上游 p62、Hsp90、cPLA<sub>2</sub> 和下游 RIPK1、RIPK3、MLKL 的表达,显示九香虫肽显著下调了基因和蛋白水平的表达,进一步验证了九香虫肽通过抑制程序性坏死通路缓解细胞损伤。

#### 4 结论

槟榔碱导致 GES-1 细胞发生程序性坏死,而九香虫肽通过多方面作用机制缓解细胞损伤。经九香虫肽预处理后, GES-1 细胞活力明显提升,通过增加 GSH、SOD 酶活力和降低 ROS 水平缓解氧化应激,同时维护线粒体膜电位的稳态以及正常的能量供应,进一步下调 p62、Hsp90、cPLA<sub>2</sub> 蛋白表达,

靶向介导 RIPK1/RIPK3/MLKL 通路, 抑制细胞程序性坏死发生, 共同缓解槟榔碱造成的 GES-1 细胞损伤。本研究为槟榔碱引起的细胞损伤及九香虫肽的应用开发奠定基础, 也为相关胃部疾病的治疗策略提供了新的思路和可能性。

### 参考文献

- [1] 聂安政,高梅梅,钞艳慧,等. 槟榔药理毒理探讨与合理用药思考[J]. 中草药,2020,51(12):3329-3336.
- [2] TRIVEDI C R, CRAIG G, WARNAKULASURIYA S. The oral health consequences of chewing areca nut [J]. *Addiction Biology*, 2002, 7(1): 115-125.
- [3] CHEN P H, MAHMOOD Q, MARIOTTINI G L, et al. Adverse health effects of betel quid and the risk of oral and pharyngeal cancers [J]. *Biomed Research International*, 2017, 2017: 3904098.
- [4] KURKALANG S, BANERJEE A, GHOSHAL N, et al. Induction of chromosome instability and stomach cancer by altering the expression pattern of mitotic checkpoint genes in mice exposed to areca-nut [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 315.
- [5] ENTEZAM M, SANAEI M, MIRZAEI Y, et al. Current progress and challenges of immunotherapy in gastric cancer: A focus on CAR-T cells therapeutic approach [J]. *Life Sciences*, 2023, 318: 121459
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典3部[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2010.
- [7] 王凤月,刘川燕,付惠惠,等. 九香虫对慢性锰中毒大鼠生殖损伤的保护作用[J]. 现代食品科技,2017,33(7):31-35.
- [8] ZHAO S, TAN J, YU H M, et al. *In vivo* and *in vitro* antiproliferative and antimetastatic effects of hemolymph of *Aspongopus chinensis* Dallas on breast cancer cells [J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2021, 41(4): 523-529.
- [9] TAN J, TIAN Y, CAI R, et al. Chemical composition and antiproliferative effects of a methanol extract of *Aspongopus chinensis* Dallas [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019, 2019: 1-9
- [10] 李家旭,成钰莹,杨扬,等. 槟榔碱对人胃黏膜上皮细胞的毒性作用研究[J]. 食品工业科技,2024,45(9):341-349.
- [11] 杜冰,李家旭,成钰莹,等. 一种降低槟榔碱毒性的九香虫多肽及其应用:中国,CN116377006A[P].2023-07-04.
- [12] 张慧莹,杨为乔,陈瑶,等. 鸡内金酶解物制备工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械,2022,38(4):169-174.
- [13] 冷彦,王静,吴文斗,等. 高压脉冲电场预处理普洱熟茶对SD大鼠体内活性氧(ROS)水平的影响[J]. 西南农业学报, 2021,34(6):1208-1214.
- [14] 冼健安,李彬,郭慧,等. JC-1标记的流式细胞术测定虾类血细胞的线粒体膜电位[J]. 水产科学,2013,32(3):157-160.
- [15] ZHAO W J, ZHANG Y W, LI W J, et al. Probiotic-fermented *Portulaca oleracea* L. alleviated DNFB-induced atopic dermatitis by inhibiting the NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2023, 313: 116613.
- [16] 朱景茹,洪银洁,黄婉仪,等. 柴芍六君汤对慢性萎缩性胃炎肝郁脾虚证模型大鼠胃黏膜组织代谢物表达的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2021,23(8):2672-2680.
- [17] 郑雨微,于浪潮,夏士杰,等. 异鼠李素对6-羟基多巴胺诱导的神经元细胞毒性的影响及氧化损伤的保护作用[J]. 中国农业大学学报,2023,28(11):140-150.
- [18] OLATUNJI O J, CHEN H, ZHOU Y. *Lycium chinensis* Mill attenuates glutamate induced oxidative toxicity in PC12 cells by increasing antioxidant defense enzymes and down regulating ROS and Ca<sup>2+</sup> generation [J]. *Neuroscience Letters*, 2016, 616: 111-118.
- [19] JIN W, XU X, CHEN X, et al. Protective effect of pig brain polypeptides against corticosterone-induced oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis in PC12 cells [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 115: 108890
- [20] SHI C, LIU J, WU F, et al. *Ginkgo biloba* extract in Alzheimer's disease: from action mechanisms to medical practice [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, 11(1): 107-123.
- [21] YU S P. Na(+), K(+)-ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66(8): 1601-1609.
- [22] 张旭帆. 鹿茸多肽对鱼藤酮致SH-SY5Y细胞损伤的保护作用及其机理研究[D]. 北京:北京中医药大学,2020.
- [23] ZHOU S, ZHANG W, CAI G, et al. Myofiber necroptosis promotes muscle stem cell proliferation via releasing Tenascin-C during regeneration [J]. *Cell Research*, 2020, 30(12): 1063-1077.
- [24] LI L, HE Z, ZHU Y, et al. Hydrogen sulfide suppresses skin fibroblast proliferation via oxidative stress alleviation and necroptosis inhibition [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 2022: 7434733.
- [25] KHODAYAR M J, KALANTARI H, KHORSANDI L, et al. Taurine attenuates valproic acid-induced hepatotoxicity via modulation of RIPK1/RIPK3/MLKL-mediated necroptosis signaling in mice [J]. *Molecular Biology Reports*, 2021, 48(5): 4153-4162.
- [26] LU C, XU W, ZHANG F, et al. Nrf2 knockdown disrupts the protective effect of curcumin on alcohol-induced hepatocyte necroptosis [J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2016, 13(12):

- 4043-4053.
- [27] CHEN S Q, HU B F, YANG Y R, et al. The protective effect of rabeprazole on cisplatin-induced apoptosis and necroptosis of renal proximal tubular cells [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2022, 612: 91-98.
- [28] LEWINSKA A, ADAMCZYK-GROCHALA J, BLONIARZ D, et al. Remifentanyl preconditioning protects against hypoxia-induced senescence and necroptosis in human cardiac myocytes *in vitro* [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(14): 13924-13938.
- [29] 隋馨莹,徐平,段昌柱,等.p62蛋白的分子功能及其在疾病中的研究进展[J].生物工程学报,2023,39(4):1374-1389.
- [30] LI C, MU N, GU C, et al. Metformin mediates cardioprotection against aging-induced ischemic necroptosis [J]. Aging Cell, 2020, 19(2): e13096.
- [31] LI D, LI C, LI L, et al. Natural product kongensin A is a non-canonical HSP90 inhibitor that blocks RIP3-dependent necroptosis [J]. Cell Chemical Biology, 2016, 23(2): 257-266.
- [32] YANG C K, HE S D. Heat shock protein 90 regulates necroptosis by modulating multiple signaling effectors [J]. Cell Death & Disease, 2016,7(3): e2126.
- [33] SHARAPOVA T N, ROMANOVA E A, SASHCHENKO L P, et al. FasL on the surface of Tag7 (PGRP-S)-activated lymphocytes induces necroptosis in HLA-negative tumor cells with the involvement of lysosomes and mitochondria [J]. Biochimie, 2018, 152: 174-180.
- [34] BERGHE T V, VANLANGENAKKER N, PARTHOENS E, et al. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features [J]. Cell Death and Differentiation, 2010, 17(6): 922-930.