

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200108002

周磊, 薛永来, 崔雯, 等. 离子液体[Bmim]Cl对HepG2细胞糖代谢的影响[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(3): 323-330

Zhou L, Xue Y L, Cui W, et al. Effect of ionic liquid [Bmim]Cl on glucose metabolism in HepG2 [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(3): 323-330 (in Chinese)

离子液体 [Bmim] Cl 对 HepG2 细胞糖代谢的影响

周磊, 薛永来*, 崔雯, 何锦, 高璐, 杜道林

江苏大学环境生态研究所, 镇江 212013

收稿日期: 2020-01-08 录用日期: 2020-04-17

摘要: 离子液体是一类广泛用于生产、科研的有机溶剂, 其生物毒性已被验证, 然而在非致死浓度下离子液体对于生物体的潜在影响还有待研究。为探究离子液体对糖代谢的影响, 选取人体肝癌细胞 HepG2 为受试对象进行体外实验, 研究一种常用的咪唑类离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑氯盐([Bmim]Cl)对 HepG2 细胞糖代谢的影响。结果表明, [Bmim]Cl 暴露会导致 HepG2 细胞对胞外葡萄糖的吸收显著降低, 减少胞内的糖原含量, 同时也会抑制细胞活性诱导细胞凋亡, 细胞存活率最高下降 57%。RT-qPCR 结果表明, [Bmim]Cl 暴露后, HepG2 细胞中糖原分解的重要基因糖原磷酸化酶(PYGL)的表达上调, 而调控糖原合成的重要基因糖原合酶 2(GYS2)的基因表达在中、低浓度暴露后受到了抑制。此外, 葡萄糖转运、糖酵解、糖异生和 TCA 循环的相关基因在不同的暴露浓度下也出现了不同程度的变化。综上所述, [Bmim]Cl 暴露会影响 HepG2 细胞对胞外葡萄糖的吸收, 影响胞内糖原的合成和分解, 促进糖酵解, 抑制糖异生。高浓度的[Bmim]Cl 暴露会引起 HepG2 细胞的糖代谢紊乱。

关键词: 离子液体; HepG2 细胞; 糖代谢影响

文章编号: 1673-5897(2021)3-323-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effect of Ionic Liquid [Bmim] Cl on Glucose Metabolism in HepG2

Zhou Lei, Xue Yonglai*, Cui Wen, He Jin, Gao Lu, Du Daolin

Institute of Environmental Ecology, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

Received 8 January 2020 accepted 17 April 2020

Abstract: The effect of the potential environmental pollutant ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([Bmim]Cl) on the glucose metabolism of human liver cancer cells HepG2 was studied by using HepG2 cells as experimental models in this paper. The survival rate of HepG2 cells, extracellular glucose consumption, intracellular glycogen content, as well as the major glycometabolic pathway related genes of glycogen decomposition and anabolism, glycolysis, TCA cycle were investigated after the HepG2 cells were exposed to different concentrations of ionic liquid for 24 h. The results showed that [Bmim]Cl could inhibit the cell activity of HepG2 cells and induce cell apoptosis, lead to a significant decrease in extracellular glucose absorption and intracellular glycogen content. The results of real time quantitative PCR showed that the expression of the glycogen synthesis related gene, i.e., glycogen phosphorylase (PYGL) was up-regulated in HepG2 cells after exposure to [Bmim]Cl, while the expression of glycogen synthase 2 (GYS2) was inhibited after exposure to medium and low concentrations of [Bmim]Cl. In addition, we found that the genes involved in glucose transport, glycolysis, gluconeogenesis and TCA cycling

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31100379, 31601380); 江苏大学高层次人才基金资助项目(10JGD056)

第一作者: 周磊(1995—), 男, 硕士, 研究方向为环境毒理学, E-mail: 576117597@qq.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: xueyonglai@sina.com

were also changed to varying degrees at different exposure concentrations. Overall, [Bmim]Cl can influence the absorption of extracellular glucose by HepG2 cells, affect the synthesis and decomposition of intracellular glycogen, promote glycolysis, and inhibit gluconeogenesis. Exposure to high concentration of [Bmim]Cl can cause glucose metabolism disorder in HepG2 cells.

Keywords: ionic liquid; HepG2 cells; glucose metabolism

离子液体是指由有机阳离子和无机或有机阴离子组成的一类液体,相较于传统易挥发的有毒溶剂,离子液体具有良好的化学稳定性、非挥发性、不可燃性、几乎没有蒸气压等优点^[1],是被人们广泛应用于有机合成、生物催化和电化学等领域的“绿色溶剂”^[2-4]。然而近年来研究人员用细菌、真菌、小鼠、鱼类和哺乳动物细胞系等实验模型研究发现,离子液体存在生物毒性。

研究表明,咪唑类的离子液体会抑制鱼卵巢细胞(CCO)和人体宫颈癌细胞(HeLa)的增殖且具有明显的剂量依赖性^[5-6]。值得注意的是,Ranke等^[7]以白血病细胞(IPC-81)和神经胶质瘤细胞(C6)为实验模型,选取几种不同链长的咪唑类离子液体和传统的溶剂(丙酮、乙腈、甲醇和甲基叔丁基醚)一起进行暴露实验,发现烷基链越长其毒性越强,最长链的咪唑类离子液体,其毒性甚至超过同等浓度下的传统溶剂。除了体外实验,也有研究人员以斑马鱼、小鼠和蚯蚓等动物,以个体作为实验模型进行体内实验^[8-10]。Dong等^[11]研究发现,咪唑类的离子液体会诱导斑马鱼肝脏活性氧(ROS)和丙二醛(MDA)过量产生损伤肝脏,并且会导致斑马鱼的DNA损伤。离子液体生殖毒性也在体内实验中得到验证,经离子液体暴露后的CD-1小鼠的生殖能力会受到影响^[12]。离子液体的毒性也在植物中被验证,Liu等^[13]发现[C₈mim]Br暴露下小麦的光合作用被明显抑制并发生氧化应激反应。

研究者也对离子液体毒性作用的机制进行了研究。Cornmell等^[14]通过傅里叶红外检测发现离子液体会进入细胞并在生物膜上大量累积,在细胞质中却并未检出离子液体。Hartmann等^[15]研究发现,咪唑类的离子液体会与生物膜相互作用渗透进入细胞的磷脂双分子层中破坏其完整性,导致细胞内物质泄漏,最终诱导细胞凋亡。此外,侧链烷基长度的变化会显著影响离子液体的亲脂性,从而导致受试细胞生物膜的通透性发生变化,因此侧链长度越长的同类离子液体表现出的细胞毒性越大。总之,离子液体对细胞的影响主要表现破坏细胞膜的结构、增加膜的通

透性和降低膜电位进而诱导ROS过量,产生细胞破裂,诱导细胞凋亡^[16]。膜电位的改变可能会引起胞内线粒体的渗透压发生变化,从而对能量代谢造成影响。糖代谢作为生物体能量代谢的重要组成部分,一直以来都是研究热点。此外,也有研究表明,咪唑类的离子液体会损害模式生物的肝脏^[10],诱导HepG2凋亡^[17]。而肝脏作为代谢的中心,离子液体是否会对其糖代谢造成影响,这是我们想要探究的问题。

选用在工业上应用最为广泛的咪唑类离子液体中链长较短、毒性相对较小的1-丁基-3-甲基咪唑氯盐([Bmim]Cl)^[8,18],以人体肝癌细胞HepG2为实验模型进行体外实验,旨在探究离子液体对糖代谢的影响及其机制,进一步明确咪唑类离子液体存在环境毒性,为水生生态环境污染物标准的确定提供依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 化学药品和试剂

离子液体[Bmim]Cl购自上海成捷化工有限公司(中国上海),纯度99%,实验前称取所需剂量的离子液体加入培养基配制成母液,根据实验需要将母液逐级稀释成所需浓度进行暴露实验。实验中所用试剂盒均购于南京建成生物工程研究所(中国南京)。SYBR绿色荧光染料购自Bio-Rad公司,总RNA提取Trizol试剂和cDNA第一链式合成试剂盒均购于Beyotime Biotechnology公司,细胞培养中所用的高糖DMEM培养基购于Thermofisher Scientific公司,胎牛血清(FBS)购于杭州天杭生物科技有限公司(中国杭州),其他化学品和试剂均购于国药化学试剂有限公司(中国北京)或北京索莱宝科技有限公司(中国北京)。

1.2 细胞培养

人体肝癌细胞由江苏大学环境与安全工程学院环境生态研究所提供,细胞加入配制好的培养基后放置于37℃、含有5%CO₂的潮湿环境中进行培养。培养基配比为10%的FBS、1%的链霉素和青霉素以及88%的DMEM高糖培养基。实验培养时为了排除FBS对实验的影响,用0.2%的牛血清白蛋白(BSA)将其替换。

1.3 实验设计

本次实验分为2个部分:预实验探索合适的暴露浓度,正式实验探索合适浓度下[Bmim]Cl对细胞糖代谢的影响。预实验设置1个空白组、1个纯培养基组(无细胞)和7个[Bmim]Cl处理组,其暴露浓度分别为1、2、4、8、16和32 mmol·L⁻¹。将处于对数增长期的细胞铺入96孔培养板(每孔细胞量 1×10^4 个)中培养24 h使其贴壁生长,将原培养基吸出,用磷酸盐缓冲液(PBS)润洗3遍。加入含BSA和不同浓度[Bmim]Cl的培养基培养24 h后测定培养基中消耗的葡萄糖和细胞活性,通过比较选定合适的暴露浓度。后续实验选定浓度为1、2、4和8 mmol·L⁻¹,在保持细胞密度不变的情况下扩大样本数量放入6孔板中(每孔细胞量 3×10^5 个)进行暴露实验,具体操作与预实验保持一致,暴露结束后对各项指标进行测定。

1.4 细胞存活率测定

使用MTT法测定暴露后的细胞存活率,具体操作如下:在暴露24 h后吸出原培养基(用于测定葡萄糖),用PBS溶液清洗3遍,加入配好的培养基100 μ L和10 μ L 5%的MTT溶液,在37 $^{\circ}$ C的培养箱中孵育4 h后,弃上清,加入DMSO溶液150 μ L溶解甲瓩,用酶标仪测定其在570 nm波长下的吸光度,计算细胞存活率。细胞存活率%=(暴露孔OD/对照孔OD) $\times 100$ 。

1.5 培养基内消耗葡萄糖含量测定

培养基内消耗葡萄糖含量测定参照Yan等^[19]的方法对培养基内葡萄糖消耗量进行测定,从侧面反映实验过程中细胞吸收葡萄糖的量。培养基内的葡萄糖含量通过商业化的葡萄糖测定试剂盒采用葡萄糖氧化酶法测得。消耗的葡萄糖含量(mmol·L⁻¹)=纯培养基组葡萄糖含量(mmol·L⁻¹)-实验组培养基葡萄糖含量(mmol·L⁻¹)。

1.6 细胞内糖原含量测定

细胞内糖原含量使用商业化的糖原测定试剂盒(蒽酮比色法)和总蛋白测定试剂盒(BCA法)测得。具体操作如下:用胰蛋白酶消解暴露后的细胞,加入培养基后1 000 r·s⁻¹离心3 min后得到细胞沉淀,加入0.5 mL PBS缓冲液,用超声细胞破碎仪冰水浴破碎。取破碎后的溶液测定糖原含量,并测定其蛋白浓度。将糖原含量进行蛋白水平标准化。

1.7 RT-qPCR

用Trizol方法提取经[Bmim]Cl暴露24 h的

HepG2细胞RNA进行相关基因的表达分析。提取后的RNA用琼脂糖电泳和超微量紫外分光光度计确定其未被DNA和蛋白污染,并使用cDNA第一链反转录试剂盒(Beyotime)进行反转录。转录完成后,将SYBR Green I(BIO-RAD)用作DNA结合染料,并将 β -肌动蛋白(β -actin)用作内部参考基因。使用primer5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。扩增程序设定为:预变性95 $^{\circ}$ C、30 s,变性95 $^{\circ}$ C、5 s,在52~57 $^{\circ}$ C退火10 s,40个循环,最后绘制熔解曲线以测试是否存在非特异性产物。

1.8 统计分析

通过单向方差分析评估对照组和[Bmim]Cl暴露组之间的差异,并使用IBM SPSS Statistic 19(IBM Corp.,美国)对数据进行多次比较测试。所有分析均在 $P < 0.05$ 水平下确定统计学差异。

2 结果(Results)

2.1 细胞存活率及葡萄糖消耗量

如图1所示,在不同浓度的[Bmim]Cl作用24 h后,随着[Bmim]Cl浓度的升高,其细胞存活率呈下降趋势。根据统计学分析,[Bmim]Cl浓度为16 mmol·L⁻¹和32 mmol·L⁻¹的处理组与空白对照组之间的细胞存活率存在显著差异。

为探究非致死浓度下[Bmim]Cl对细胞糖代谢的

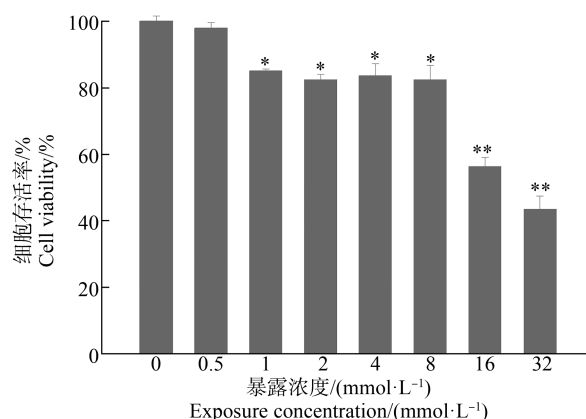


图1 离子液体[Bmim]Cl暴露后HepG2细胞的存活率

注:暴露时间为24 h;所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差(SD)值表示, $n=6$;与对照组相比,有显著性差异,* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$;下同。

Fig. 1 Survival rate of HepG2 cells after exposure to ionic liquid [Bmim]Cl

Note: The exposure time was 24 h; all data are expressed by average $\pm$ standard deviation (SD) value, $n=6$; compared with the control group, there was significant difference, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; the same below.

影响,选取 1、2、4 和 8 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为处理组的浓度。以暴露后细胞消耗培养基中的葡萄糖作为指标,分析 HepG2 细胞糖代谢的变化,结果如图 2 所示。与空白对照组相比,[Bmim]Cl 暴露后消耗葡萄糖的量发生了不同程度的变化,在暴露浓度为 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的情况下培养基中的葡萄糖消耗最少,由此可知该组细胞的糖代谢可能受到了较为严重的影响。结合图 1 分析,在[Bmim]Cl 暴露浓度为 1、2、4 和 8 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞活性并未受到特别明显的抑制,但是其消耗葡萄糖的量却发生了明显的改变。

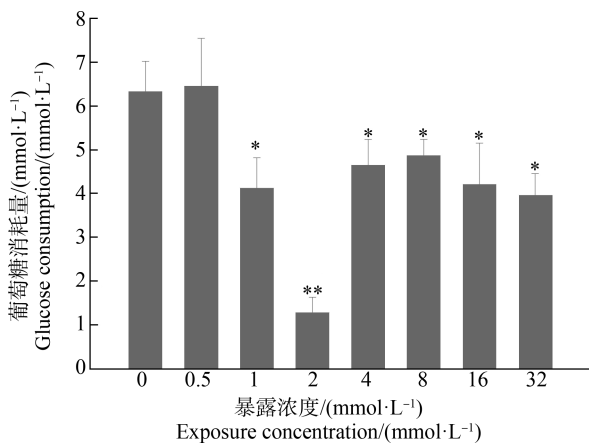


图2 离子液体[Bmim]Cl暴露后 HepG2 细胞培养基中葡萄糖的消耗量

Fig. 2 Consumption of glucose in HepG2 cell culture medium after exposure to ionic liquid [Bmim]Cl

2.2 细胞内糖原含量

为探究不同浓度的[Bmim]Cl对 HepG2 细胞糖代谢的影响,测定了糖代谢中重要的生化指标糖原含量。如图 3 所示,暴露于不同浓度的[Bmim]Cl 中 24 h 后,其糖原的含量相较于空白对照组均有显著降低。

2.3 对细胞糖代谢相关基因的影响

为研究[Bmim]Cl对 HepG2 细胞糖代谢影响的机制,考察了糖代谢中重要步骤的相关限速酶的基因表达情况。测定的基因及其作用如表 1 所示。

结果表明,细胞的 *GLUT1* 在暴露后表达有显著下调,这与葡萄糖消耗量的变化对应。糖酵解作为糖代谢的重要阶段,其关键的限速酶 *PKM* 和 *PFKL* 的表达有相同趋势的变化,基因的表达随暴露浓度的增加而上升,与糖酵解相对应的糖异生途径的相关基因 *G6PC* 的表达出现了下调。糖酵解之后的另一重要阶段柠檬酸循环阶段的限速酶 *IDH2*

也出现了明显的变化,该基因在暴露浓度为 8 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时出现了特别显著的上调。此外还检测了与糖原合成与分解相关的基因 *PYGL*、*GYS2* 的表达情况,*PYGL* 的表达出现剂量依赖式上升,而 *GYS2* 基因在中、低剂量暴露时其表达出现下调(图 4)。

3 讨论 (Discussion)

咪唑类离子液体作为被广泛使用的有机溶剂,研究者选取了不同的实验模型斑马鱼、小鼠、小麦和人体肝癌细胞 HepG2 等,研究了咪唑类离子液体引起的致死效应、氧化应激以及遗传毒性^[20-22],而其在

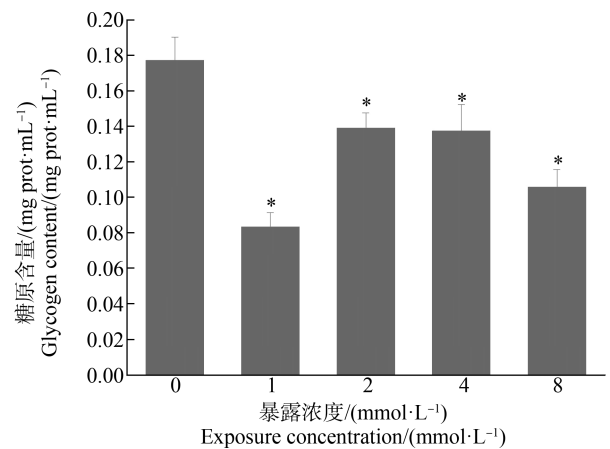


图3 离子液体[Bmim]Cl暴露后 HepG2 细胞内糖原含量

Fig. 3 Glycogen content in HepG2 cells after exposure to ionic liquid [Bmim]Cl

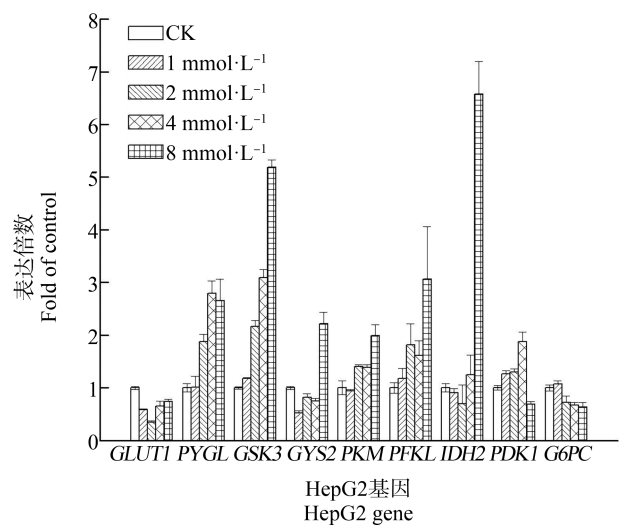


图4 离子液体[Bmim]Cl暴露后 HepG2 中细胞中糖代谢相关基因的表达情况

Fig. 4 Expression of glucose metabolism-related genes in HepG2 cells after exposure to ionic liquid [Bmim]Cl

表 1 糖代谢相关基因的名称及作用

Table 1 Names and roles of genes related to glucose metabolism

基因 Gene	功能 Function
葡萄糖转运体(<i>GLUT1/SLC2A1</i>) Glucose transporter (<i>GLUT1/SLC2A1</i>)	编码哺乳动物主要的葡萄糖转运蛋白,编码的蛋白质主要存在于细胞膜和细胞表面 This gene encodes a major glucose transporter, and the encoded protein is found primarily in the cell membrane and on the cell surface
糖原合成酶 2(<i>GYS2</i>) Glycogen synthase (<i>GYS2</i>)	编码肝糖原合酶,为催化糖原合成中的限速步骤,葡萄糖分子从 UDP 葡萄糖转移到糖原分子的末端分支 This gene encodes liver glycogen synthase, which catalyzes the rate-limiting step in the synthesis of glycogen that the transfer of a glucose molecule from UDP-glucose to a terminal branch of the glycogen molecule
糖原合成酶激酶 3β(<i>GSK3β</i>) Glycogen synthase kinase (<i>GSK3β</i>)	编码的蛋白质是属于糖原合酶激酶亚家族的丝氨酸-苏氨酸激酶,它是葡萄糖稳态的负调节剂,参与能量代谢、炎症、内质网应激、线粒体功能障碍和凋亡途径 The protein encoded by this gene is a serine-threonine kinase belonging to the glycogen synthase kinase sub-family. It is a negative regulator of glucose homeostasis and involved in energy metabolism, inflammation, ER-stress, mitochondrial dysfunction, and apoptotic pathways
糖原磷酸化酶(<i>PYGL</i>) Glycogen phosphorylase (<i>PYGL</i>)	编码一种同型二聚体蛋白,该蛋白催化 α-1,4-糖苷键的裂解,从而从肝糖原储存物中释放葡萄糖-1-磷酸,该蛋白质通过丝氨酸残基 15 的磷酸化,从无活性的磷酸化酶 B 转变为有活性的磷酸化酶 A This gene encodes a homodimeric protein that catalyses the cleavage of alpha-1,4-glucosidic bonds to release glucose-1-phosphate from liver glycogen stores. This protein switches from inactive phosphorylase B to active phosphorylase A by phosphorylation of serine residue 15
磷酸果糖激酶(<i>PFKL</i>) Phosphofructokinase (<i>PFKL</i>)	编码的蛋白质属于双功能蛋白质家族,该蛋白质与果糖 2,6-双磷酸酯的合成和降解有关,果糖-2,6-双磷酸酯是控制真核生物糖酵解的调节分子,编码的蛋白质具有催化果糖-2,6-双磷酸(F2,6BP)合成的 6-磷酸果糖-2-激酶活性和催化 F2,6BP 降解的果糖-2,6-双磷酸酶活性 This gene encoded a protein that belongs to the family of bifunctional proteins, which is related to the synthesis and degradation of fructose 2,6-bisphosphate. Fructose-2,6-bisphosphate is a regulatory molecule that controls glycolysis in eukaryotes. The encoded protein possesses the activity of 6-phosphate fructose-2-kinase which catalyzes the synthesis of fructose-2,6-bisphosphate (F2,6BP) and the activity of fructose-2,6-bisphosphatase which catalyzes the degradation of F2,6BP
丙酮酸激酶 M(<i>PKM</i>) Pyruvate kinase (<i>PKM</i>)	编码参与糖酵解的蛋白质,编码的蛋白是丙酮酸激酶,它催化磷酸基团从磷酸烯醇丙酮酸转移到 ADP,生成 ATP 和丙酮酸,该蛋白已显示与甲状腺激素相互作用,并可能介导由甲状腺激素诱导的细胞代谢作用 This gene encodes a protein involved in glycolysis. The encoded protein is a pyruvate kinase that catalyzes the transfer of a phosphoryl group from phosphoenolpyruvate to ADP, generating ATP and pyruvate. This protein has been shown to interact with thyroid hormone and may mediate cellular metabolic effects induced by thyroid hormones
异柠檬酸脱氢酶(<i>IDH2</i>) Isocitrate dehydrogenase (<i>IDH2</i>)	编码的蛋白质是线粒体中 NADP(+)依赖性异柠檬酸脱氢酶,它在中间代谢和能量产生中起作用,该蛋白质可能与丙酮酸脱氢酶复合物紧密结合或相互作用,选择性剪接导致多个转录物变体 The protein encoded by this gene is the NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase found in the mitochondria. It plays a role in intermediary metabolism and energy production. This protein may tightly associate or interact with the pyruvate dehydrogenase complex. Alternative splicing results in multiple transcript variants
丙酮酸脱氢酶激酶(<i>PDK1</i>) Pyruvate dehydrogenase kinase (<i>PDK1</i>)	丙酮酸脱氢酶(PDH)是一种线粒体多酶复合物,可催化丙酮酸的氧化脱羧作用,并且是负责调节哺乳动物碳水化合物体内平衡的主要酶之一;酶活性由磷酸化/去磷酸化循环调节,PDH 被特定的丙酮酸脱氢酶激酶(PDK)磷酸化导致失活 Pyruvate dehydrogenase (PDH) is a mitochondrial multienzyme complex that catalyzes the oxidative decarboxylation of pyruvate and is one of the major enzymes responsible for the regulation of homeostasis of carbohydrate fuels in mammals. The enzymatic activity is regulated by a phosphorylation/dephosphorylation cycle. Phosphorylation of PDH by a specific pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) results in inactivation

续表1

基因 Gene	功能 Function
葡萄糖 6 磷酸酶(<i>G6PC</i>) Glucose 6 phosphatase (<i>G6PC</i>)	葡萄糖 6 磷酸酶(<i>G6Pase</i>)是内质网的多亚基整合膜蛋白,由催化亚基和 <i>G6P</i> 转运蛋白、无机磷酸和葡萄糖组成; <i>G6PC</i> 是人体中 3 个编码葡萄糖 6 磷酸酶催化亚基的基因(<i>G6PC</i> 、 <i>G6PC2</i> 和 <i>G6PC3</i>)之一;葡萄糖 6-磷酸酶催化 D-葡萄糖 6-磷酸水解为 D-葡萄糖和正磷酸,并且是维持葡萄糖体内稳态的关键酶,在糖异生和糖原分解中起作用 Glucose-6-phosphatase (<i>G6Pase</i>) is a multi-subunit integral membrane protein of the endoplasmic reticulum that is composed of a catalytic subunit and transporters for <i>G6P</i> , inorganic phosphate, and glucose. This gene <i>G6PC</i> is one of the three glucose-6-phosphatase catalytic-subunit-encoding genes in human: <i>G6PC</i> , <i>G6PC2</i> and <i>G6PC3</i> . Glucose-6-phosphatase catalyzes the hydrolysis of D-glucose 6-phosphate to D-glucose and orthophosphate and is a key enzyme in glucose homeostasis, functioning in gluconeogenesis and glycogenolysis

注:表中信息均来自于 RefSeq 数据库。
Note: The information in the table refers to RefSeq database.

低剂量非致死浓度下对细胞代谢的影响却并未见报道。本实验结果表明,[Bmim]Cl 显著减少培养基内葡萄糖的消耗量,[Bmim]Cl 暴露后细胞糖原含量显著下降。肝细胞通过糖原分解、糖原合成和糖异生等作用消耗或产生葡萄糖,使体内的葡萄糖达到稳定状态^[17]。HepG2 细胞中糖原分解生成的葡萄糖增加而从胞外吸收的葡萄糖减少。经[Bmim]Cl 暴露后测定了 HepG2 糖代谢中关键基因的表达情况。在葡萄糖转运蛋白家族中, GLUT1 蛋白是最早发现的葡萄糖转运蛋白,是一种肿瘤标志物,其在肿瘤细胞的表达远高于在普通细胞中的表达^[23]。故其在 HepG2 细胞中表达情况在很大程度上能表征细胞对胞外葡萄糖的吸收情况,研究发现经[Bmim]Cl 暴露后 *GLUT1* 的表达出现明显的下调,其结果与胞外葡萄糖消耗的结果相对应。RT-qPCR 和葡萄糖消耗的实验结果存在一致性,两者都表明[Bmim]Cl 确实会影响 HepG2 细胞对葡萄糖的吸收,进而影响细胞的糖代谢。

糖原是葡萄糖在动物体内的储存形式,糖原的合成和分解代谢是生物体调节自身血糖和糖代谢的重要途径^[24-25]。本实验测定了糖原分解代谢的关键基因 *PYGL* 和合成代谢的关键基因 *GYS2*,发现相较于对照组,暴露浓度为 1、2 和 4 mmol·L⁻¹ 的处理组, *PYGL* 的表达上升而 *GYS2* 的表达下降,即基因的表达促进糖原分解酶的生成而抑制了糖原合成酶的生成,这导致了糖原分解加快而糖原生成减弱。结合葡萄糖消耗的研究,推断这是由于细胞从胞外吸收的葡萄糖量减少,开始分解自身的糖原以此来维持机体的稳定。而 8 mmol·L⁻¹ 的暴露组由于浓

度过高已经出现了代谢紊乱的现象,故其糖原的吸收和分解无规律。*GSK3β* 是另一种参与糖原合成的关键基因,它编码的酶通过磷酸化糖原合成酶(*GS*)来降低糖原的合成,该基因表达的上升也从另一个方面解释了胞内糖原减少的情况^[26-27]。

糖酵解作为生物细胞共同的葡萄糖分解代谢途径,是糖原分解形成的葡萄糖和胞外吸收葡萄糖分解代谢的必经阶段,而糖异生途径恰好与之相反,是机体生成葡萄糖的重要途径^[25]。本实验测定了糖酵解途径的关键酶 *PFKL* 的表达情况,该酶催化果糖-6-磷酸向果糖-2,6-二磷酸转化,有研究表明, *PFKL* 的增加会促进糖酵解,同时抑制糖异生^[28],而本实验还发现糖异生途径的关键酶葡萄糖 6 磷酸酶(*G6PC*)随着浓度增加表达下降。由此可知,[Bmim]Cl 暴露会在一定程度上促进 HepG2 细胞的糖酵解抑制糖异生,而且这种影响会随浓度的升高而增加。

柠檬酸循环又称为三羧酸循环,是糖类、脂质和氨基酸的最终代谢通路。葡萄糖经过糖酵解后生成丙酮酸,丙酮酸在有氧的情况下经 *PDK1* 的催化后生成乙酰 CoA 然后进入柠檬酸循环^[25]。探究了 *PDK1* 基因的表达情况,发现其表达随暴露浓度的升高逐步上升。该反应作为有氧糖酵解的下游反应,出现这种变化恰好与前文 *PFK2* 的表达增加相呼应。而 TCA 循环的关键酶 *IDH2* 的表达并没有出现相同趋势的增长,这可能与 TCA 循环受多个代谢反应影响有关,但可以肯定的是在最高浓度的 [Bmim]Cl 暴露下 TCA 循环受到了更加明显的影响。

综上所述,[Bmim]Cl 暴露会影响 HepG2 细胞的糖代谢,具体表现为减少细胞对胞外葡萄糖的吸

收,影响细胞内糖酵解、糖原合成与分解、糖异生等相关代谢途径,高浓度时甚至会引起胞内的糖代谢紊乱。

通讯作者简介:薛永来(1981—),男,博士,副教授,主要研究方向为环境毒理学。

参考文献(References):

- [1] Thuy Pham T P, Cho C W, Yun Y S. Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review [J]. *Water Research*, 2010, 44(2): 352-372
- [2] Shah K, Atkin R, Stanger R, et al. Interactions between vitrinite and inertinite-rich coals and the ionic liquid-[bmim][Cl] [J]. *Fuel*, 2014, 119: 214-218
- [3] Amarasekara A S, Reyes C D G. Acidic ionic liquid catalyzed liquefactions of corn cobs and switchgrass in acetone: Analysis of bio-oils using LC-MS and GC-MS [J]. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2020, 145: 104752
- [4] Peziak-Kowalska D, Syguda A, Ławniczak Ł, et al. Hybrid electrochemical and biological treatment of herbicidal ionic liquids comprising the MCPA anion [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 181: 172-179
- [5] Radošević K, Cvjetko M, Kopjar N, et al. *In vitro* cytotoxicity assessment of imidazolium ionic liquids: Biological effects in fish channel catfish ovary (CCO) cell line [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2013, 92: 112-118
- [6] Cvjetko M, Radošević K, Tomica A, et al. Cytotoxic effects of imidazolium ionic liquids on fish and human cell lines [J]. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 2012, 63(1): 15-20
- [7] Ranke J, Mölter K, Stock F, et al. Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004, 58(3): 396-404
- [8] Zhang C, Zhu L S, Wang J H, et al. The acute toxic effects of imidazolium-based ionic liquids with different alkyl-chain lengths and anions on zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 140: 235-240
- [9] Shao Y T, Wang J, Du Z K, et al. Toxic effect of [Omim]BF₄ and [Omim]Br on antioxidant stress and oxidative damage in earthworms (*Eisenia fetida*) [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2018, 60: 37-44
- [10] Yu M, Li S M, Li X Y, et al. Acute effects of 1-octyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquid on the antioxidant enzyme system of mouse liver [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008, 71(3): 903-908
- [11] Dong M, Zhu L S, Zhu S Y, et al. Toxic effects of 1-decyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquid on the antioxidant enzyme system and DNA in zebrafish (*Danio rerio*) livers [J]. *Chemosphere*, 2013, 91(8): 1107-1112
- [12] Bailey M M, Townsend M B, Jernigan P L, et al. Developmental toxicity assessment of the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium chloride in CD-1 mice [J]. *Green Chemistry*, 2008, 10(11): 18-23
- [13] Liu P, Ding Y F, Liu H Y, et al. Toxic effects of 1-methyl-3-octylimidazolium bromide on the wheat seedlings [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2010, 22(12): 1974-1979
- [14] Cornmell R J, Winder C L, Tiddy G J T, et al. Accumulation of ionic liquids in *Escherichia coli* cells [J]. *Green Chemistry*, 2008, 10(8): 836-841
- [15] Hartmann D O, Shimizu K, Siopa F, et al. Plasma membrane permeabilisation by ionic liquids: A matter of charge [J]. *Green Chemistry*, 2015, 17(9): 4587-4598
- [16] 胡立新. 基于傅里叶变换红外光谱的生物毒性测试方法及咪唑类离子液体毒性作用机制研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2018: 7-8
- Hu L X. Preliminary investigation into biological toxicity based on FTIR and the toxic mechanism of imidazolium based ionic liquids [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2018: 7-8 (in Chinese)
- [17] Li X Y, Ma J G, Wang J J. Cytotoxicity, oxidative stress, and apoptosis in HepG2 cells induced by ionic liquid 1-methyl-3-octylimidazolium bromide [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 120: 342-348
- [18] Cvjetko Bubalo M, Hanousek K, Radošević K, et al. Imidazolium based ionic liquids: Effects of different anions and alkyl chains lengths on the barley seedlings [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, 101: 116-123
- [19] 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 & Function*, 2016, 7(1): 425-433
- [20] Wan R Y, Xia X H, Wang P J, et al. Toxicity of imidazoles ionic liquid [C₁₆mim]Cl to HepG2 cells [J]. *Toxicology in Vitro*, 2018, 52: 1-7
- [21] Tot A, Vraneš M, Maksimović I, et al. The effect of imidazolium based ionic liquids on wheat and barley germination and growth: Influence of length and oxygen functionalization of alkyl side chain [J]. *Ecotoxicology and Envi-*

- ronmental Safety, 2018, 147: 401-406
- [22] Younes N, Salem R, Al-Asmakh M, et al. Toxicity evaluation of selected ionic liquid compounds on embryonic development of zebrafish [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 161: 17-24
- [23] 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]. Biochimica et Biophysica Acta, 2008, 1778(4): 1091-1099
- [24] Furukawa F, Irachi S, Koyama M, et al. Changes in glycogen concentration and gene expression levels of glycogen-metabolizing enzymes in muscle and liver of developing Masu salmon [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular & Integrative Physiology, 2018, 225: 74-82
- [25] 黄熙泰, 于自然, 李翠凤. 现代生物化学[M]. 第2版. 北京: 化学工业出版社, 2005: 311-338
- [26] Bian C C, Huang X C, Hu Z C, et al. Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): Synteny, structure, tissue distribution and expression in oleic acid (OA)-induced adipocytes and hepatocytes [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2019, 241: 110391
- [27] Fang G X, Zhang P L, Liu J F, et al. Inhibition of GSK-3 β activity suppresses HCC malignant phenotype by inhibiting glycolysis via activating AMPK/mTOR signaling [J]. Cancer Letters, 2019, 463: 11-26
- [28] Okar D A, Manzano A, Navarro-Sabatè A, et al. PFK-2/FBPase-2: Maker and breaker of the essential biofactor fructose-2, 6-bisphosphate [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2001, 26(1): 30-35 ◆