

基于网络药理学和体内外实验探讨虾青素对聚苯乙烯纳米塑料导致肝损伤的保护作用

周宏^{1,2}, 周炜¹, 包梦佳¹, 仇叶丹¹, 张佳雯¹, 刘倩琦^{1*}

(1. 南京医科大学附属儿童医院儿童保健科, 江苏南京 210008; 2. 江苏省丹阳市人民医院儿科, 江苏丹阳 212300)

摘要: **目的** 基于网络药理学探讨虾青素对聚苯乙烯纳米塑料 (PS-NPs) 所致肝损伤的作用。**方法** 通过 PubChem 数据库获得虾青素化学成分结构; 在 SwissTargetPrediction 和 PharmMapper 数据库中获得虾青素的靶点信息; 利用 Genecards 与 PharmGKB 数据库获得 PS-NPs 的致病靶点; 利用 R 语言获得的前两者的交集靶点; 利用 STRING 数据库构建交集靶点蛋白-蛋白相互作用网络, 并用 Cytoscape 3.9.1 软件进行拓扑学分析筛选核心靶点, 绘制相互作用网络图; 运用 R 语言软件对交集靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析; 利用 PyMOL 和 AutoDock 软件进行分子对接。采用 CCK-8 法确定 L02 细胞中虾青素和 PS-NPs 的给药浓度; 给予 L02 细胞虾青素和 PS-NPs 后, 利用 Calcein/PI 荧光染色检测细胞, DCFH-DA 染色法检测细胞 ROS 水平, MitoSOX Red 染色法检测细胞线粒体 ROS 水平, Western blot 法检测关键靶点的蛋白表达。通过灌胃给予 PS-NPs 构建小鼠肝损伤模型, 并灌胃给予虾青素干预, 1 个月后检测小鼠血清肝功能指标, Western blot 法检测关键靶点的蛋白表达。**结果** 网络药理学筛选得到 33 个虾青素治疗 PS-NPs 的潜在靶点, 富集分析主要涉及脂质和动脉粥样硬化、前列腺癌相关的多个信号通路。细胞实验结果显示, 与正常组比较, PS-NPs 处理 L02 细胞 24 h 后, 细胞凋亡率升高 ($P < 0.01$), 细胞内和线粒体 ROS 水平均升高 ($P < 0.01$), 细胞 p-EGFR 和 cleaved-Caspase3 蛋白表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 PS-NPs 暴露组比较, 虾青素与 PS-NPs 共处理组 ROS 水平降低 ($P < 0.01$), 细胞 p-EGFR、cleaved-Caspase3 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。动物实验结果显示, 与正常组比较, PS-NPs 组肝重降低 ($P < 0.05$), 血清 ALT 和 AST 活性升高 ($P < 0.01$), 肝组织 p-EGFR 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 虾青素干预后血清 ALT 和 AST 活性降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 肝组织 p-EGFR 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。**结论** 虾青素能改善 PS-NPs 诱导的肝损伤, 其机制可能与抑制 p-EGFR 表达, 降低细胞凋亡, 降低细胞和线粒体 ROS 水平有关。

关键词: 虾青素; 聚苯乙烯纳米塑料; 肝损伤; 网络药理学; 凋亡; 细胞活性氧簇; 表皮生长因子受体

中图分类号: R285.5; R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)09-3132-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.09.048

随着生活水平的提高, 塑料制品的使用日益增加, 但其不易降解, 会导致严重的环境和健康问题^[1]。塑料制品在环境中会不断分解成 ≤ 5 mm 和 $1 \mu\text{m}$ 的颗粒, 分别定义为微米塑料 (microplastic, MPs) 和纳米塑料 (nanoplastics, NPs), 可污染膳食产品并被人类摄入^[2-4]。聚苯乙烯 (polystyrene, PS) 是目前使用最广泛的塑料原料之一^[5-6]。聚苯乙烯纳米塑料 (polystyrene-nanoplastics, PS-NPs) 可以通过各种途径 (皮肤、消化道和呼吸系统) 进入生物体, 是潜在的致癌物^[7]。然而, PS-NPs 是否诱导肝损伤, 其机制和治疗药物尚未有研究。

虾青素是一种天然的类胡萝卜素, 广泛存在于海藻类、浮游生物和甲壳类动物中^[8], 具有抗氧化、抗炎、抗凋亡等特性^[9], 可以减轻非酒精性脂肪肝和酒精性肝损伤

的发生发展^[10-11], 还能参与脂质和葡萄糖代谢的调节, 防止心血管损伤^[12]。然而, 虾青素对 PS-NPs 诱导肝损伤的效果尚未被探索。

本研究运用网络药理学, 通过高通量筛选、网络分析以及网络可视化等技术, 预测虾青素缓解 PS-NPs 诱导肝损伤的潜在机制, 并进一步结合体外细胞和体内动物实验, 对虾青素治疗 PS-NPs 诱导的肝损伤的效果及功能富集程度较强的关键靶点进行验证, 以期对虾青素防治 PS-NPs 诱导肝毒性的临床应用与推广提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 网络药理学

1.1.1 天然虾青素作用靶点分析 通过检索 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库, 得到虾

收稿日期: 2024-12-25

基金项目: 江苏省卫生厅科研基金 (M2020030)

作者简介: 周宏 (1986—), 女, 硕士生, 从事儿科及儿童保健等研究。E-mail: 282708206@qq.com

* 通信作者: 刘倩琦 (1972—), 女, 博士, 主任医师, 从事儿童保健、内分泌等研究。E-mail: 18951769617@163.com

青素化学成分结构文件。通过 SwissTargetPrediction 数据库 (<https://www.expasy.org/resources/swisstargetprediction/>), 条件设置为“Probability > 0”进行筛选^[13]。进一步通过 PharmMapper 数据库 (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper>), 将虾青素结构文件 (sdf 格式) 导入 PharmMapper 数据库检索对应靶点^[14]。将上述药物靶点进行合并, 去除重复, 并通过 Uniprot 数据库 (<http://www.uniprot.org>) 将所有药物靶点转换为官方基因符号。

1.1.2 PS-NPs 疾病靶点筛选 通过 GeneCards 数据库查找 PS-NPs 的疾病靶点数据^[14], 以“polystyrene nanoparticles”为关键词检索疾病靶点, 筛选条件设置为“Relevance score > 0.5”。进一步通过 PharmGKB 数据库查找疾病靶点数据^[15], 以“polystyrene nanoparticles”为关键词检索疾病相关靶点。将上述药物靶点进行合并, 去除重复。

1.1.3 蛋白质相互作用网络 (PPI) 构建和关键靶点预测 将获得的虾青素作用靶点和 PS-NPs 疾病靶点数据通过 R 语言获取交集靶点, 利用 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 获得交集靶点基本数据及其关系数据, 将数据导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行 PPI 网络构建, 并利用插件 CytoNAC 计算连接“度中心性” (Degree), 并因此选择关键靶点^[15]。

1.1.4 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 下载 ClusterProfiler 和 org. Hs. eg. db R 功能包对交集靶点基因本体 (GO) 功能注释和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 以 $P < 0.05$, $Q < 0.05$ 为筛选阈值。

1.1.5 分子对接验证 虾青素作为小分子配体, 通过 PubChem 数据库搜索 3D 结构文件, 导入 Chem3D 中对其执行能量最低计算, 保存为 mol2 格式。从 Protein Data Bank (PDB) 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 数据库下载核心靶点蛋白的 PDB 格式三维结构, 利用 PyMOL 软件对核心靶点蛋白进行去水、加氢处理, 核心靶点作为受体。应用 AutoDock 软件进行分子对接, 应用 PyMOL 对分子对接结果进行分析和绘图^[14]。

1.2 体外实验

1.2.1 试剂与药物 虾青素 (北京索莱宝科技有限公司, 纯度 $\geq 98\%$, 货号 IA1110); DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶、TRIzol 试剂、逆转录试剂盒、SYBR Green Master Mix 试剂 (美国赛默飞世尔科技有限公司, 货号 11965092、25200056、12183555、4366596、A46012); 胎牛血清 (以色列 Biological Industries 公司, 货号 HS0502F); 100 nm PS-NPs (上海辉质生物科技有限公司, 货号 DS100); CCK-8 试剂盒、活性氧 (ROS) 检测试剂盒、BCA 试剂盒 (上海碧云天生物技术股份有限公司, 货号 C0038、S0036S、P0010S); CASP3 抗体、ALB 抗体、羊抗兔 IgG 二抗 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号 9664、4929、35401)。

1.2.2 细胞培养 人正常肝细胞系 L02 由李晓南课题组提

供, 培养在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中, 并放置在 37 °C、5% CO₂ 的恒温细胞培养箱中培养^[16]。

1.2.3 CCK-8 法筛选 PS-NPs 和虾青素浓度 取对数生长期 L02 细胞接种到 96 孔板中, 在培养箱中培养 24 h 后加入 100 μ L 含 PS-NPs 无血清培养基, 分组为 0、1、10、20、40、80、100、150、200 μ g/mL; 虾青素分组为 0、5、10、15、20、25、30、35、40 μ mol/L, 每组设 3 个复孔, 培养 24 h 后, 加入 10 μ L CCK-8 试剂, 孵育 1 h, 用酶标仪检测各组 450 nm 波长处吸光度值, 筛选出适宜的浓度。

1.2.4 细胞分组与干预 将系 L02 细胞分成对照组、PS-NPs 组、虾青素组、PS-NPs+虾青素组。对照组加入无血清 DMEM 高糖培养基, PS-NPs 组加入含 PS-NPs 的无血清 DMEM 高糖培养基, 虾青素组加入含虾青素的无血清 DMEM 高糖培养基, PS-NPs+虾青素组加入含虾青素和 PS-NPs 的无血清 DMEM 高糖培养基进行处理, 于培养箱中培养 24 h。

1.2.5 Calcein/PI 法检测细胞凋亡情况 将细胞接种于共聚焦培养皿中, 按“1.2.4”项下方法进行处理, 处理结束后用 PBS 洗涤 1 次, 加入 100 μ L Calcein AM/PI 检测工作液, 37 °C 下避光孵育 30 min。孵育结束后, 于共聚焦显微镜下观察染色效果, 通过 Image J 软件测量荧光值, 并采用 GraphPad 软件进行统计分析。

1.2.6 DCFH-DA 染色法检测细胞 ROS 水平 将细胞接种于共聚焦培养皿中, 按“1.2.4”项下方法进行处理, 去除细胞培养液, 用 PBS 洗涤 1 次, 加入适当体积无血清培养液稀释好的 DCFH-DA, 于 37 °C 细胞培养箱内孵育 20 min, 用无血清细胞培养液洗涤细胞 1 次, 于荧光显微镜下观察染色效果, 通过 Image J 软件测量荧光值, 并采用 GraphPad 软件进行统计分析。

1.2.7 MitoSOX Red 染色法检测细胞线粒体 ROS 水平 将细胞接种于 6 孔板中, 按“1.2.4”项下方法进行处理, 去除细胞培养液, 用 PBS 洗涤 1 次, 加入适当体积的 MitoSOX Red 染色工作液重悬细胞, 于 37 °C 细胞培养箱内孵育 15 min, 用无血清细胞培养液洗涤细胞 1 次, 采用流式细胞仪进行分析。

1.2.8 Western blot 法检测细胞 p-EGFR、cleaved-Caspase3 蛋白表达 将细胞接种于 6 孔板中, 按“1.2.4”项下方法进行处理, 用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解, 提取蛋白, BCA 法进行蛋白定量, 加入蛋白上样缓冲液后变性, 冷冻保存备用。制备聚丙烯酰胺凝胶, 电泳分离等量的总蛋白, 湿转法转移至 PVDF 膜。PVDF 膜加 5% 脱脂乳室温封闭 1 h, 加一抗在 4 °C 下孵育过夜, TBST 洗膜, 加辣根过氧化物酶结合的二抗在室温下孵育 1 h。使用化学发光液显影, 使用 Image Lab 软件进行扫描, 通过 Image J 软件分析条带灰度值, 计算蛋白相对表达量。

1.3 动物实验

1.3.1 动物 32 只 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠, 体质量 17~19 g, 购自江苏省药物研究所动物实验中心 [实验动物

生产许可证号 SCXK (苏) 2021-0001], 饲养于江苏省药物研究所实验动物中心 [实验动物使用许可证号 SYXK (苏) 2023-002, 饲养环境温度 21~25 °C, 相对湿度 40%~60%, 昼夜交替周期为 12 h。所有小鼠饲养的环境条件均符合中国国家标准《实验动物环境及设施》(GB14925-2001) 中的标准及国家卫健委指导动物研究准则 (实验动物饲养及使用准则), 动物实验已获实验动物伦理委员会审批 (批准号 IACUC-20230905-01)。

1.3.2 动物分组与干预 小鼠适应性饲养 1 周后随机分为对照组、PS-NPs 组 (50 mg/kg)、虾青素组 (60 mg/kg) 和 PS-NPs+ 虾青素组 (50 mg/kg+60 mg/kg)。灌胃给药 30 d 后处死, 称定质量, 采集外周血和肝脏, 外周血离心取血清后于 -80 °C 冰箱保存, 肝脏称定质量后于 -80 °C 冰箱保存。

1.3.3 血清 ALT 和 AST 活性检测 取于 -80 °C 冰箱保存的小鼠血清, 4 °C 冰浴溶解, 振荡混匀, 取 100 μL, 使用自动生化分析仪 (德国西门子公司, 型号 ADVIA 2120i) 检测小鼠血清 ALT 和 AST 活性。

1.3.4 Western blot 法检测肝组织 p-EGFR 蛋白表达 取出适量肝组织, 按“1.2.8”项下方法测肝组织 p-EGFR 蛋白表达。

1.4 统计学分析 通过 GraphPad Prism 9.0 软件进行处理, 结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用独立样本 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 虾青素作用靶点分析 通过 Pharm Mapper 和 SwissTargetPrediction 数据库检索和筛选并去重后共得到虾青素的有效作用靶点 179 个。

2.2 PS-NPs 相关靶点筛选 通过 Genecards 与 PharmGKB 数据库设置筛选条件后获得与 NPs 相关疾病靶点 455 个。

2.3 蛋白质-蛋白质相互作用网络 (PPI) 构建和关键靶点预测 对 179 个虾青素的有效作用靶点和 455 个 NPs 相关疾病靶点使用 R 语言生成韦恩图, 获得 33 个交集靶点, 见图 1。对 33 个交集靶点进行 PPI 网络分析, 此网络共有 33 个节点, 369 条边, 节点代表靶点, 每条边则代表靶点互作关系, 节点的大小与颜色代表靶点的 Degree, 节点越大, 红色越深, 作用越关键, 边的粗细表示综合评分值的大小, 见图 2。利用 Cytoscape 软件对 33 个交集核心靶点进行拓扑参数分析, 根据 Degree 来分析筛选出前 5 个核心交集靶点。分别为表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、白蛋白 (albumin, ALB)、胱天蛋白酶 3 (Caspase-3, CASP3)、胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF1)、热休克蛋白 90α 家族 A 类成员 (heat shock protein HSP 90-α, HSP90AA1)。

2.4 生物过程注释及可视化分析 运用 R 语言软件对上述步骤得到的 33 个预测靶点分别进行基因本体 (GO) 功能注释富集分析, 以 P < 0.05, Q < 0.05 为富集的筛选阈值, 富集显著性以气泡图体现, 各条目从小到大取排序靠前 10

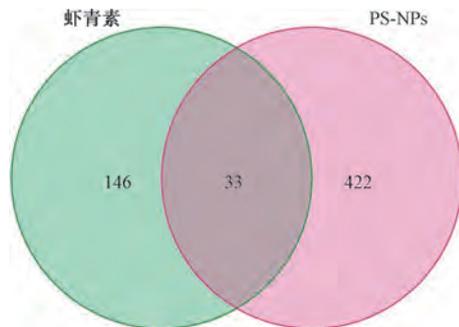


图 1 虾青素有效作用靶点和 PS-NPs 相关疾病靶点韦恩图

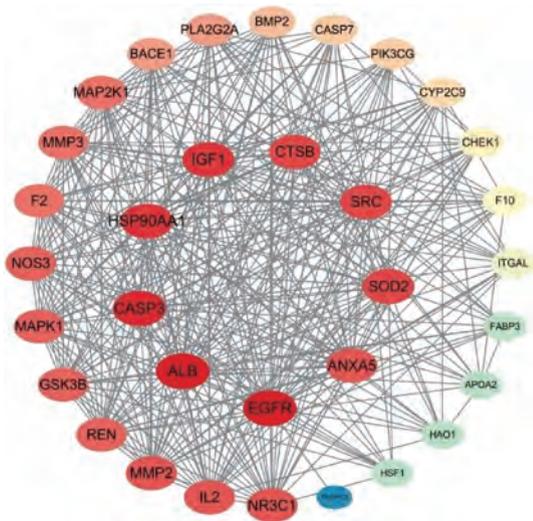


图 2 虾青素和 PS-NPs 相关疾病交集靶点的 PPI 网络图

位分析条目进行作图, 结果核心靶点主要涉及 1 087 个生物学过程, 26 个细胞组分, 105 个分子功能。生物学过程主要涉及对氧化应激的反应、对活性氧的反应、细胞对化学压力的反应; 细胞组分主要集中在内质网腔、囊腔、膜阀; 分子功能主要涉及肽链内切酶活性、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、激酶调节活性等, 见图 3。KEGG 通路富集分析得到 126 条信号通路, 选取基因数目最多的 30 位绘制富集条形图, 同时按照 Q 值从小到大排序进行可视化作图, 见图 4, 图中富集数目 (Count) 表示位于该条目中基因数目, 该值越大, 富集程度越高, 图中原点的颜色表示显著性, 由蓝色至红色变化, 颜色越偏向红色, 显著性越强。

2.5 分子对接 将虾青素与 5 个核心交集基因 EGFR、ALB、CASP3、IGF1、HSP90AA1 分别进行分子对接, 结果见表 1。结合能 < -5 kcal/mol 表明受体与配体分子之间能形成稳定的结合, 结合能越低, 结合效果越好。其中结合能较低的分子结合模式示意图, 见图 5。由此可知, 活性成分与核心靶点都具有稳定的结合, 可形成稳定的对接结构。

2.6 不同浓度 PS-NPs 及虾青素对 L02 细胞活力的影响 如图 6A 所示, 与对照组比较, 1、10、20 μg/mL PS-NPs 对 L02 细胞活力无显著影响 (P > 0.05), 当 PS-NPs 质量浓度大于 40 μg/mL 时候, 细胞活力降低 (P < 0.01), 故后续实验选择 20 μg/mL PS-NPs 作为造模条件。如图 6B 所

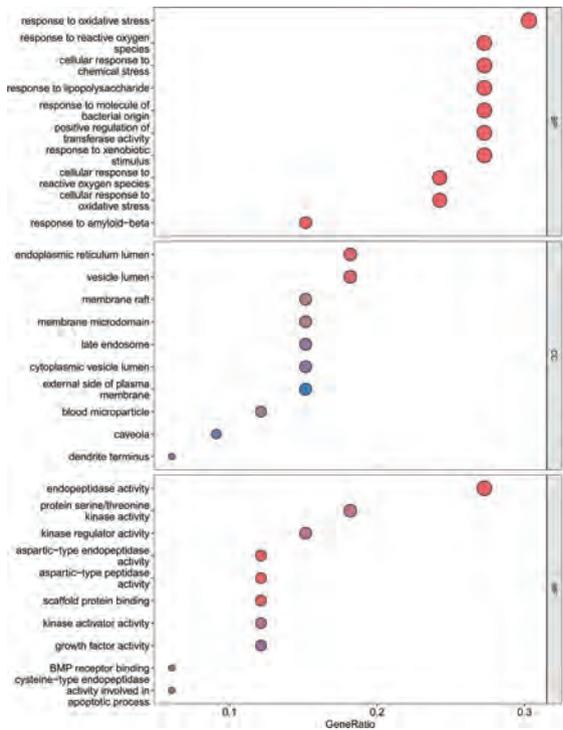


图3 虾青素和 PS-NPs 相关疾病交集靶点的 GO 富集分析

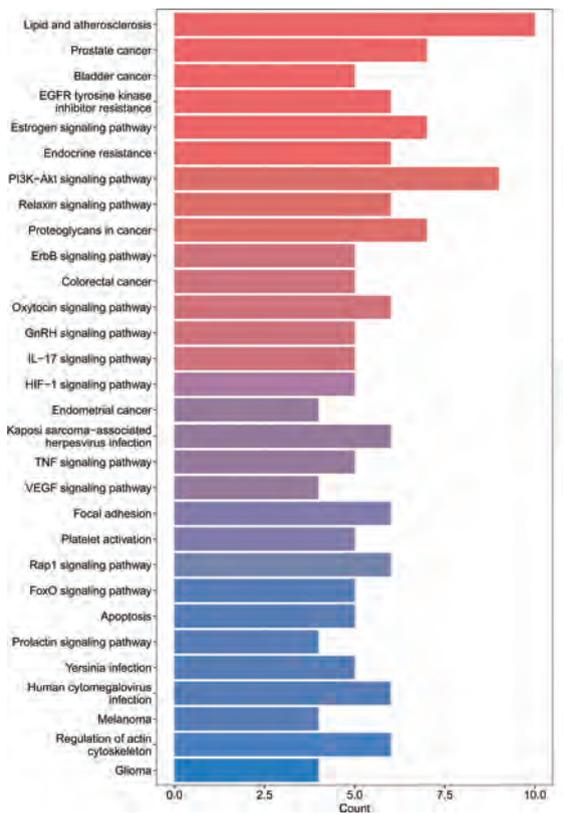


图4 KEGG 通路富集分析直方图

示,与正常组比较,5~25 μmol/L 虾青素对 L02 细胞活力无显著影响 ($P>0.05$),当虾青素浓度大于 30 μmol/L 时候,细胞活力降低 ($P<0.01$),故后续实验选择 25 μmol/L 作为干预剂量。

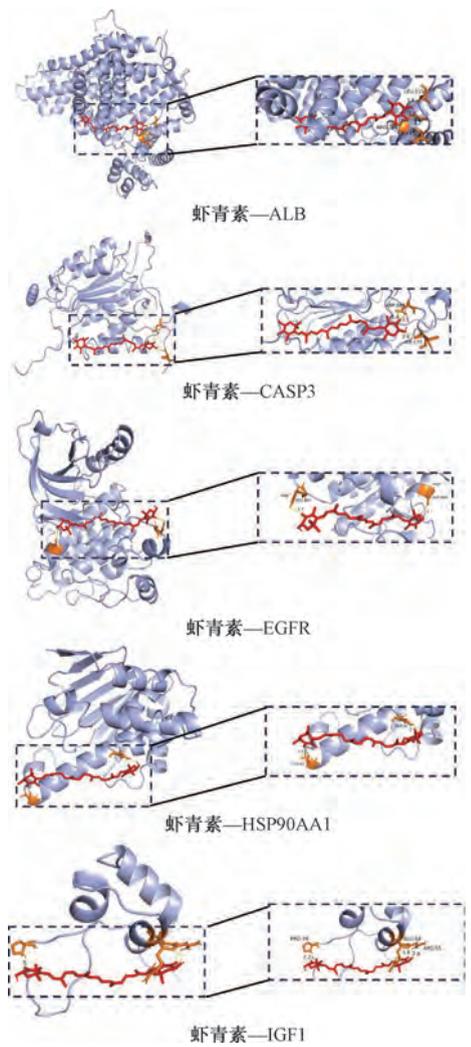


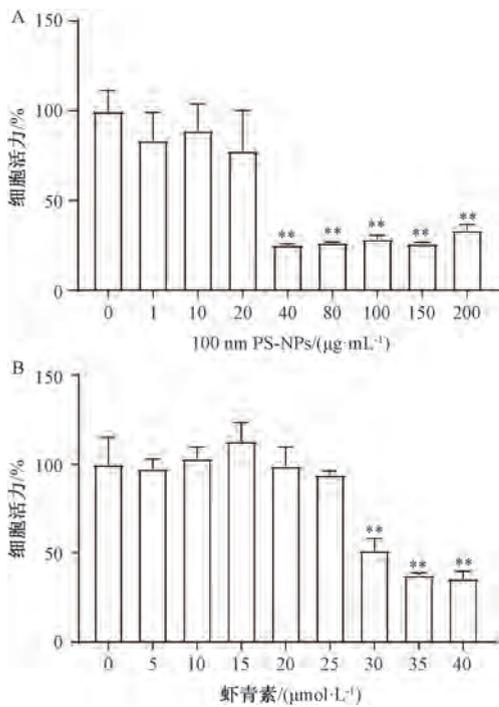
图5 虾青素与核心靶点分子对接图

表1 虾青素治疗 PS-NPs 导致损伤的潜在靶点

活性成分	核心靶点	结合能/(kcal·mol ⁻¹)
天然虾青素	CASP3	-8.1
天然虾青素	ALB	-8.4
天然虾青素	IGF1	-6.5
天然虾青素	HSP90AA1	-7.0
天然虾青素	EGFR	-7.9

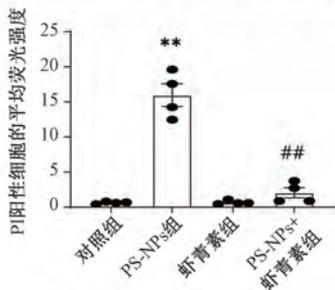
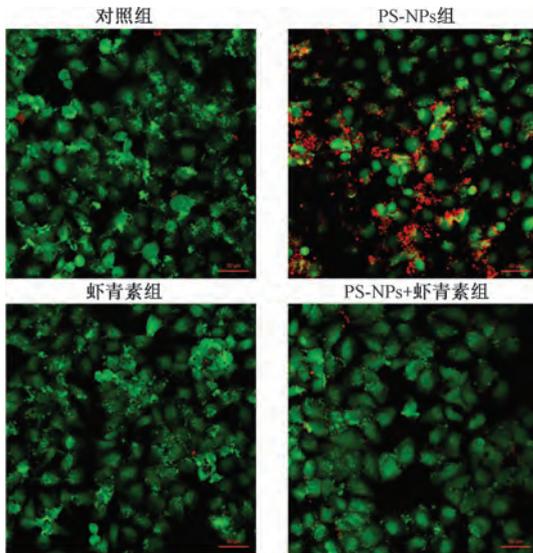
2.7 虾青素对 PS-NPs 诱导的 L02 细胞凋亡的影响 如图 7 所示,绿色荧光为 Calcein 标记的正常细胞,红色荧光为 PI 标记的凋亡细胞。与对照组比较,PS-NPs 组红色荧光表达增加 ($P<0.01$),表明凋亡细胞增多;与 PS-NPs 组比较,PS-NPs+虾青素组红色荧光表达减少 ($P<0.01$),表明凋亡细胞减少。

2.8 虾青素对 PS-NPs 诱导的 L02 细胞 ROS 水平的影响 如图 8 所示,绿色荧光强度与活性氧的水平成正比。与对照组比较,PS-NPs 组绿色荧光表达增加 ($P<0.01$),表明细胞内 ROS 水平升高;与 PS-NPs 组比较,PS-NPs+虾青素组绿色荧光表达降低 ($P<0.01$),表明细胞内 ROS 水平降低。



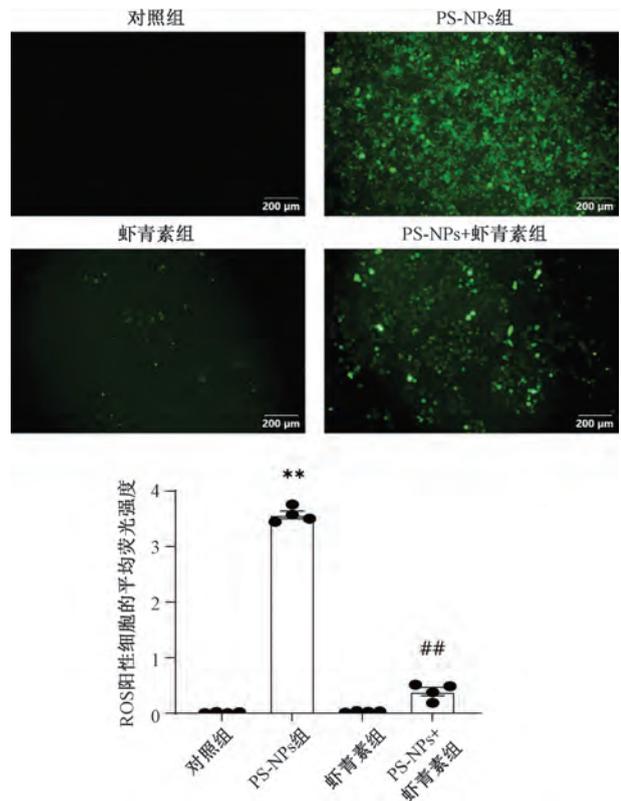
注：与对照组比较，** $P < 0.01$ 。

图6 不同浓度 PS-NPs 及虾青素对肝细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与 PS-NPs 组比较，## $P < 0.01$ 。

图7 各组细胞凋亡比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与 PS-NPs 组比较，## $P < 0.01$ 。

图8 各组细胞 ROS 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

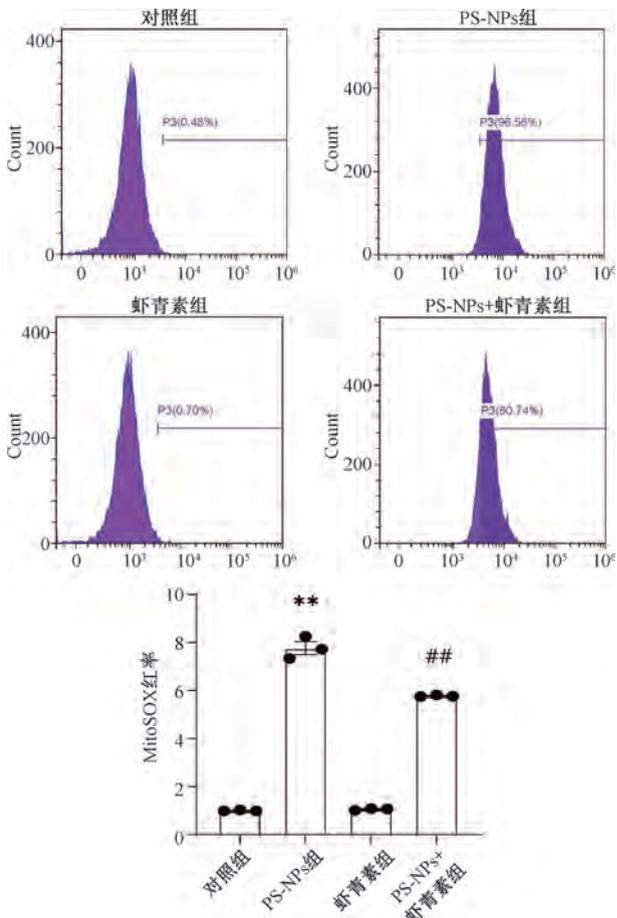
2.9 虾青素对 PS-NPs 诱导的 L02 细胞线粒体 ROS 水平的影响 如图 9 所示，与对照组比较，PS-NPs 组 MitoSOX Red 荧光强度增强 ($P < 0.01$)，表明细胞内线粒体 ROS 水平升高；与 PS-NPs 组比较，PS-NPs+虾青素组 MitoSOX Red 荧光强度减弱 ($P < 0.01$)，细胞内线粒体 ROS 水平降低。

2.10 虾青素对 PS-NPs 诱导的 L02 细胞 p-EGFR、cleaved-Caspase3 蛋白表达的影响 如图 10 所示，与对照组比较，PS-NPs 组 p-EGFR、cleaved-Caspase3 蛋白表达升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)；与 PS-NPs 组比较，PS-NPs+虾青素组 p-EGFR、cleaved-Caspase3 蛋白表达降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

2.11 虾青素对 PS-NPs 诱导肝损伤小鼠一般情况及肝功能的影响 如图 11 所示，各组间小鼠体质量比较，均无明显变化 ($P > 0.05$)。与对照组比较，PS-NPs 组小鼠肝重降低 ($P < 0.05$)，血清 ALT 和 AST 活性升高 ($P < 0.01$)；与 PS-NPs 组比较，PS-NPs+虾青素组小鼠肝重增加 ($P < 0.05$)，血清 ALT 和 AST 活性降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

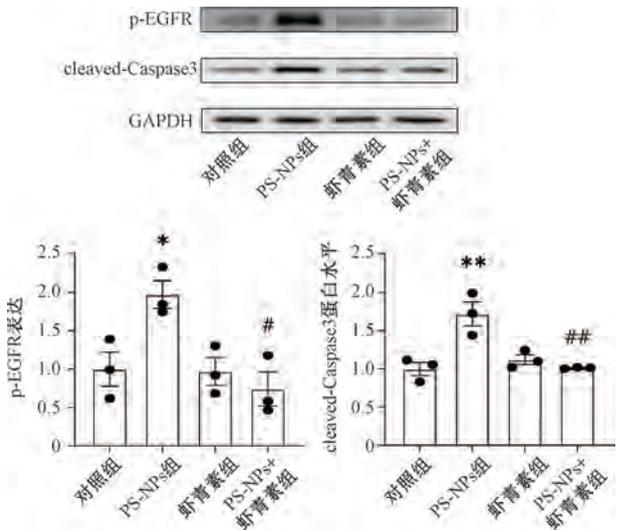
2.12 虾青素对 PS-NPs 诱导肝损伤小鼠肝组织 p-EGFR 蛋白表达的影响 如图 12 所示，与对照组比较，PS-NPs 组 p-EGFR 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)；与 PS-NPs 组比较，PS-NPs+虾青素组 p-EGFR 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。

3 讨论
近年来，纳米塑料因其广泛存在于环境中，并可能对生物产生不利影响而受到越来越多的关注。NPs 对机体的毒性机制主要与改变糖脂代谢、阻碍生长发育、干扰内分泌



注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与 PS-NPs 组比较，## $P < 0.01$ 。

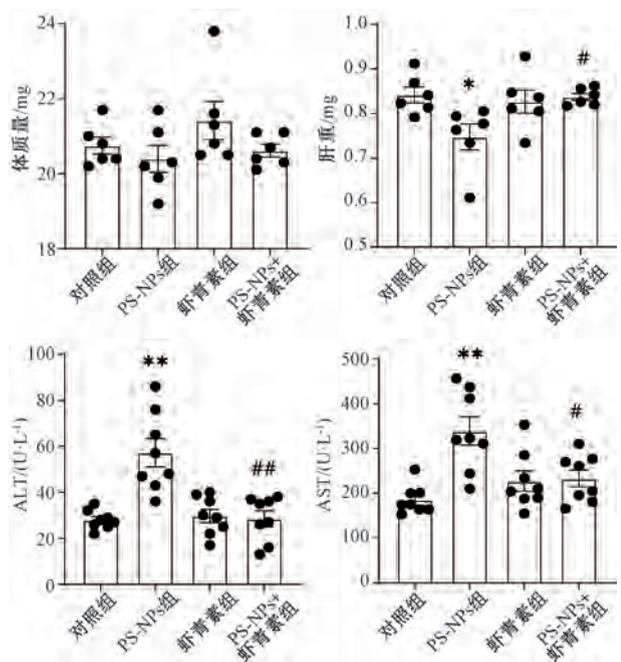
图9 各组细胞线粒体 ROS 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与 PS-NPs 组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

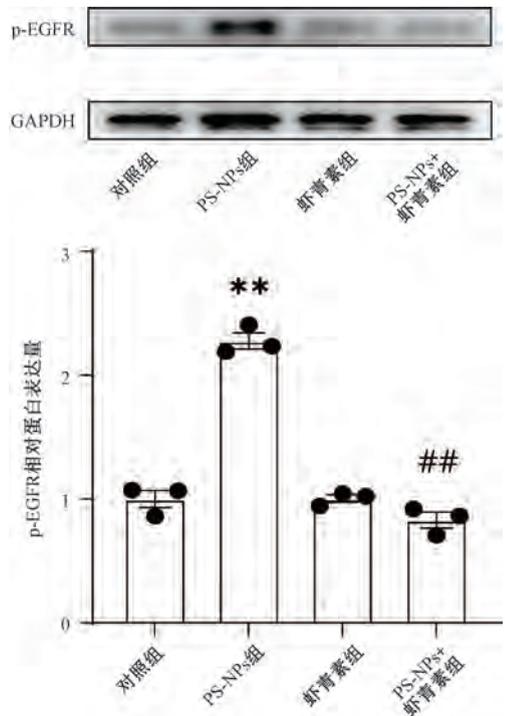
图10 各组细胞 p-EGFR、cleaved-Caspase3 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

泌、影响生殖能力、氧化应激、促进炎症反应和细胞死亡有关^[17-18]。人类通过饮食、呼吸和皮肤接触而摄入 NPs，并在肝脏、肾脏、肺和肠道等多个器官中积累，从而增加



注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与 PS-NPs 组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图11 各组小鼠体质量、肝重及血清 ALT、AST 活性比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与 PS-NPs 组比较，## $P < 0.01$ 。

图12 各组小鼠肝组织 p-EGFR 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

健康风险^[18]。研究表明，PS-NPs 对机体的毒性机制主要与改变糖脂代谢、阻碍生长发育、干扰内分泌、影响生殖能力、氧化应激、促进炎症反应和细胞死亡有关^[17]。虾青素具有极强的抗氧化性，具有抗衰老、抗炎症^[10]、光保护、维护视力、维护中枢神经^[19]、增强

免疫、预防癌症^[20]的作用,是目前发现的较强的天然抗氧化剂^[21]。

本研究以 L02 细胞和 C57BL/6 雄性小鼠为研究对象,发现暴露于 PS-NPs 后, L02 细胞凋亡增加, ROS 及线粒体 ROS 水平增加,小鼠血清 ALT 和 AST 活性升高,表明接触 NPs 可导致肝损伤,而补充虾青素可以降低 NPs 的损伤作用,提示虾青素可以有效改善 NPs 引起的肝损伤。

本研究通过网络药理学方法获得 PPI 网络,按 Degree 排序,可推测虾青素可通过 EGFR、ALB、CASP3、IGF1、HSP90AA1 核心靶点发挥改善 PS-NPs 诱导肝损伤的作用。分子对接结果也显示虾青素与核心靶点 EGFR、ALB、CASP3、IGF1、HSP90AA1 均具有较好的结合力。EGFR 是酪氨酸激酶的经典受体,属于 ErbB 受体家族,是肝脏中高表达的蛋白之一。研究表明,EGFR 参与肝细胞增殖和肝脏再生,也与肝细胞癌的发生有关^[21]。EGFR 还参与多种慢性肝损伤模型中的细胞损伤、氧化应激、炎症、肝星状细胞活化和纤维化^[22]。半胱天冬酶是一组介导细胞凋亡的半胱氨酸蛋白酶,对氧化应激非常敏感,活性氧诱导的线粒体功能障碍会最终激活 Caspase3,诱导细胞凋亡^[23]。本研究发现,PS-NPs 诱导的体外肝损伤模型中,EGFR 和 Caspase3 活化水平升高;虾青素干预可下调 EGFR 和 Caspase3 活化水平。进一步体内实验结果显示,虾青素干预可以降低 PS-NPs 诱导的 EGFR 活化。以上结果提示,经 PS-NPs 诱导的肝损伤进展以及虾青素减轻 PS-NPs 诱导肝损伤的作用机制可能均与 EGFR 通路有关,但其具体的下游信号途径还需进一步研究。

综上所述,本研究通过网络药理学结合细胞、动物实验,发现虾青素能改善 PS-NPs 诱导的肝损伤,其机制可能与抑制 p-EGFR 表达,降低细胞凋亡及细胞、线粒体 ROS 水平有关。

参考文献:

[1] Rochman C M, Browne M A, Halpern B S, et al. Policy: classify plastic waste as hazardous[J]. *Nature*, 2013, 494 (7436): 169-171.

[2] Jiménez-Arroyo C, Tamargo A, Molinero N, et al. The gut microbiota, a key to understanding the health implications of micro (nano) plastics and their biodegradation[J]. *Microb Biotechnol*, 2023, 16(1): 34-53.

[3] Senathirajah K, Attwood S, Bhagwat G, et al. Estimation of the mass of microplastics ingested-A pivotal first step towards human health risk assessment[J]. *J Hazard Mater*, 2021, 404 (Pt B): 124004.

[4] Leslie H A, vanVelzen M J M, Brandsma S H, et al. Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood[J]. *Environ Int*, 2022, 163: 107199.

[5] Liu R, Gao H, Liang X, et al. Polystyrene nanoplastics alter intestinal toxicity of 2, 4-DTBP in a sex-dependent manner in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *J Hazard Mater*, 2024,

478; 135585.

[6] Yin J, Ju Y, Qian H, et al. Nanoplastics and microplastics may be damaging our livers[J]. *Toxics*, 2022, 10(10): 586.

[7] Li Y, Liao H, Zeng M, et al. Exposure to polystyrene nanoplastics causes immune damage, oxidative stress and intestinal flora disruption in salamander (*Andrias davidianus*) larvae[J]. *Sci Total Environ*, 2024, 949: 175169.

[8] Dang Y, Li Z, Yu F. Recent advances in astaxanthin as an antioxidant in food applications[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2024, 13(7): 879.

[9] Si P, Zhu C. Biological and neurological activities of astaxanthin (Review) [J]. *Mol Med Rep*, 2022, 26(4): 300.

[10] Wu L, Mo W, Feng J, et al. Astaxanthin attenuates hepatic damage and mitochondrial dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease by up-regulating the FGF21/PGC-1alpha pathway[J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(16): 3760-3777.

[11] Wang P, Zheng X, Du R, et al. Astaxanthin protects against alcoholic liver injury via regulating mitochondrial redox balance and calcium homeostasis[J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71 (49): 19531-19550.

[12] Pereira C P M, Souza A C R, Vasconcelos A R, et al. Antioxidant and anti-inflammatory mechanisms of action of astaxanthin in cardiovascular diseases (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(1): 37-48.

[13] 李 慧, 李亚南, 周俊福, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨三草保肝汤抗肝癌作用机制[J]. 西南民族大学学报 (自然科学版), 2024, 50(2): 157-166.

[14] 谭靖怡, 胡莹莹, 陈 妹, 等. 结合网络药理学和体外实验探究半花旗抑制鼻咽癌的机制[J]. 海南医科大学学报, 2025, 31(4): 277-287.

[15] 林春风, 熊 清, 宁潇雨, 等. 基于网络药理学探讨 EGFR/JAK1/STAT3 通路在片仔癀抗肝纤维化中的作用[J]. 福建中医药, 2023, 54(6): 45-51.

[16] Du S, Zhu X, Zhou N, et al. Curcumin alleviates hepatic steatosis by improving mitochondrial function in postnatal overfed rats and fatty L02 cells through the SIRT3 pathway[J]. *Food Funct*, 2022, 13(4): 2155-2171.

[17] Han M M, Zhu C X, Tang S K, et al. The effects of a polystyrene nanoplastic on the immune response and gut microbiota of *Eriocheir sinensis* and its post-recovery state[J]. *Aquat Toxicol*, 2023, 262: 106644.

[18] Senol O, Sulukan E, Baran A, et al. Global warming and nanoplastic toxicity; small temperature increases can make gill and liver toxicity more dramatic, which affects fillet quality caused by polystyrene nanoplastics in the adult zebrafish model[J]. *Sci Total Environ*, 2023, 892: 164682.

[19] Rahman S O, Panda B P, Parvez S, et al. Neuroprotective role of astaxanthin in hippocampal insulin resistance induced by Aβ peptides in animal model of Alzheimer's disease[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 47-58.

- [20] Han J H, Lee Y S, Im J H, *et al.* Astaxanthin ameliorates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation, oxidative stress and memory dysfunction through inactivation of the signal transducer and activator of transcription 3 pathway[J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(2): 123.
- [21] Chung B Y, Park S H, Yun S Y, *et al.* Astaxanthin protects ultraviolet B-induced oxidative stress and apoptosis in human keratinocytes via intrinsic apoptotic pathway[J]. *Ann Dermatol*, 2022, 34(2): 125-131.
- [22] Huang Y W, Wang L T, Zhang M, *et al.* Caffeine can alleviate non-alcoholic fatty liver disease by augmenting LDLR expression via targeting EGFR[J]. *Food Funct*, 2023, 14(7): 3269-3278.
- [23] Zeng C, Zhu X, Li H, *et al.* The role of interferon regulatory factors in liver diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(13): 6874.

基于 UPLC-MS/MS 测定重楼皂苷 VII 逆转肝癌耐药过程中胆固醇及其关键产物的含量

李杰, 路璐, 刘焱利, 丁越, 张彤*
(上海中医药大学, 上海 201203)

摘要: 目的 建立 UPLC-MS/MS 法测定重楼皂苷 VII 逆转肝癌耐药过程中胆固醇及其 4 种合成代谢关键化合物(羊毛甾醇、链甾醇、7-脱氢胆固醇、27-羟基胆固醇)的含量。方法 分析采用 Zorbax Eclipse plus C₁₈ (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm) 色谱柱; 流动相水(含 0.1% 甲酸)-甲醇, 梯度洗脱; 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 40 °C; 大气压化学电离; 正离子扫描; 多反应监测模式。结果 5 种成分在各自范围内线性关系良好 ($r^2 \geq 0.992$), 提取回收率为 81.9%~97.1%, 基质效应为 79.9%~101.6%, 日内、日间精密度和稳定性均符合生物样品分析的要求。重楼皂苷 VII 可逆转 HepG2 细胞的索拉非尼耐药, 降低耐药细胞中胆固醇含量, 升高 27-羟基胆固醇含量。结论 该方法简便、准确、灵敏, 可用于肿瘤耐药与胆固醇合成代谢相关性研究, 为中药成分靶向胆固醇代谢调控逆转肿瘤耐药提供技术支撑。

关键词: 重楼皂苷 VII; 肝癌; 耐药性; 胆固醇; LC-MS/MS

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)09-3139-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.09.049

胆固醇是细胞膜磷脂双分子层的重要成分, 维持膜的完整性和流动性^[1-3]。细胞内胆固醇代谢稳态由其合成、摄取、外排、氧化和酯化过程共同调节^[4-5]。胆固醇内源性合成途径通过甲羟戊酸途径将乙酰辅酶 A 转化为羊毛甾醇, 再经过一些中间产物合成 7-脱氢胆固醇和链甾醇, 再分别经 7-脱氢胆固醇还原酶 (DHCR7) 和 24-脱氢胆固醇还原酶 (DHCR24) 催化合成胆固醇。胆固醇可代谢为 27-羟基胆固醇, 再转化为胆汁酸进行代谢^[6]。

肿瘤细胞往往需大量胆固醇满足其快速生长需求, 通常表现为胆固醇代谢失调^[7-8], 具体为合成水平上调及代谢产物异常堆积^[9-11], 随之细胞膜胆固醇水平升高, 通过脂筏介导的膜蛋白(如 ABCB1、EGFR)进一步高表达从而引起耐药^[12]。研究表明, DHCR24 可促进黑色素瘤对维莫

非尼的耐药, 其机制与 27-羟基胆固醇积累及 AKT 通路激活有关^[13]。DHCR24 作为胆固醇合成途径的关键酶, 研究其作用相关的底物和产物水平可为肿瘤耐药研究提供重要依据。

重楼作为清热解毒药, 其主要成分重楼皂苷对肿瘤耐药和胆固醇代谢具有一定影响^[14]。重楼皂苷 VII 可通过阻滞细胞周期、诱导凋亡和自噬, 抑制肿瘤血管生成和转移^[15-16]。重楼皂苷 I 可破坏脂筏结构, 抑制膜上耐药相关蛋白合成, 从而逆转耐药^[17]。胆固醇及代谢物的常用检测方法有 GC-MS、LC-MS/MS 等^[18-22], 但其分析时间长、前处理复杂。因此, 本研究建立 UPLC-APCI-MS/MS 方法, 可同时检测细胞内胆固醇及其关键代谢产物(羊毛甾醇、链甾醇、7-脱氢胆固醇、27-羟基胆固醇), 具有样品前处

收稿日期: 2025-01-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82374002); 上海市学术带头人项目 (22XD1423000); 上海市“科技创新行动计划”生物医药创新发展项目 (20S21902500); 上海市自然科学基金 (21ZR1460800); 上海中医药大学科技发展项目 (24KFL026)

作者简介: 李杰 (2001—), 男, 硕士生, 研究方向为中药学。Tel: 15212762986, E-mail: 2798061045@qq.com

* **通信作者:** 张彤 (1972—), 男, 博士生导师, 从事中药制药及中药分析技术研究。Tel: (021) 51322318, E-mail: zhangtdmj@hotmail.com