

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.18.004

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220524.1907.010.html\(2022-05-25\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220524.1907.010.html(2022-05-25))

铁过载对肝 LO2 细胞糖代谢关键酶活性的影响\*

陶秀娟,刘贺荣,蔡慧珍,范彦娜,高清茜,杨建军  
(宁夏医科大学公共卫生与管理学院,银川 750004)

**[摘要]** **目的** 探讨铁过载对人正常肝 LO2 细胞的葡萄糖代谢关键酶:葡萄糖激酶(GK)、丙酮酸激酶(PK)活性水平的影响,阐明铁过载对肝细胞氧化应激水平的影响,分析铁过载引起肝细胞糖代谢紊乱的可能机制。**方法** 体外培养人肝 LO2 细胞株,以不添加枸橼酸铁铵(FAC)为对照组,以加入不同浓度(7.5、75.0、750.0  $\mu\text{mol/L}$ )的 FAC 作为低、中、高剂量干预组,以 FAC(75  $\mu\text{mol/L}$ ) + 去铁胺(DFO,250  $\mu\text{mol/L}$ )作为 DFO 处理组,CCK-8 法测定各组 LO2 细胞活性,ELISA 检测 GK、PK 活性,活性氧(ROS)荧光探针(DCFH-DA)染色检测细胞内 ROS 水平。**结果** 所有组 LO2 细胞活性比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。中、高剂量干预组细胞 GK 活性低于对照组,高剂量干预组细胞 PK 活性低于对照组( $P<0.05$ );DFO 处理组细胞 GK、PK 活性高于中剂量干预组,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。高剂量干预组细胞内 ROS 水平高于对照组( $P<0.05$ )。**结论** 随着 FAC 干预浓度的增加,LO2 细胞内 GK、PK 活性降低,ROS 水平增加。

**[关键词]** LO2 细胞;铁过载;葡萄糖激酶;丙酮酸激酶;活性氧  
**[中图分类号]** R151.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)18-3079-04

Effect of iron overload on the activity of key enzymes of  
glucose metabolism in LO2 cells\*

TAO Xiujuan,LIU Herong,CAI Huizhen,FAN Yanna,GAO Qinghan,YANG Jianjun  
(College of Public Health and Management,Ningxia Medical University,  
Yinchuan,Ningxia 750004,China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of the iron overload on the activity levels of the key enzymes of glucose metabolism,glucokinase (GK) and pyruvate kinase (PK) in human LO2 cells,to clarify the effects of the iron overload on the level of oxidative stress in LO2 cells,and to analyze the possible mechanism of glucose metabolism disorder caused by iron overload. **Methods** Human liver LO2 cell line was cultured in vitro,with no addition of ferric ammonium citrate (FAC) as the control group,and with the addition of different concentrations (7.5,75.0,750.0  $\mu\text{mol/L}$ ) of FAC as the low,medium and high dose intervention groups,FAC (75  $\mu\text{mol/L}$ ) + deferoxamine (DFO,250  $\mu\text{mol/L}$ ) was used as the DFO treatment group. CCK-8 method was used to measure the activity of LO2 cells in each group,GK and PK activities were detected by ELISA, and reactive oxygen species (ROS) was detected by fluorescent probe needle (DCFH-DA) staining to detect intracellular ROS levels. **Results** The GK activity in the medium and high dose intervention groups was lower than that in the control group,and the PK activity in the high dose intervention group was lower than that in the control group ( $P<0.05$ ). The GK and PK activities in the DFO treatment group were higher than those in the medium dose intervention groups,but the difference was not statistically significant ( $P>0.05$ ). The intracellular ROS level in the high dose intervention group was higher than that in the control group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** With the increase of FAC intervention concentration,the GK and PK activities in LO2 cells decreased,and the level of ROS increased.

**[Key words]** LO2 cell;iron overload;glucokinase;pyruvate kinase;reactive oxygen species

近几十年来,2 型糖尿病的患病人数在全世界都明显上升<sup>[1]</sup>。据估计到 2040 年,全球成年糖尿病患者

\* 基金项目:宁夏回族自治区教育厅高等教育一般项目(NGY2018-86)。 作者简介:陶秀娟(1977—),副教授,硕士,主要从事营养与慢性病研究。

者的比例将增加到 10.4%,即 6.42 亿糖尿病患者<sup>[2]</sup>。近年来,关于铁过载与糖尿病关系的研究已逐渐成为糖尿病相关研究领域的热点。体内铁过载可能是引起 2 型糖尿病发病的独立危险因素之一,机体铁储存量愈多,发生葡萄糖耐量异常、2 型糖尿病或妊娠糖尿病的风险也愈大<sup>[3-5]</sup>。临床研究或动物实验均提示,机体铁过载是糖尿病发病的危险因素,各种因素导致的铁过载在糖尿病发生、发展过程中均扮演着重要的角色<sup>[6-8]</sup>。体内铁含量的升高可导致葡萄糖代谢的紊乱,其机制可能与胰岛素分泌受损或胰岛素抵抗有关<sup>[9]</sup>。肝脏是铁代谢的主要器官,也是铁蓄积产生毒害的首要靶器官,铁过载产生的活性氧通过肝脏激酶-B1/丝裂原活化蛋白激酶信号通路抑制胰岛素受体在肝脏等组织中的磷酸化,降低胰岛素受体的敏感度<sup>[10]</sup>。但肝脏铁过载是否能引起肝细胞糖代谢关键酶活性的改变从而诱发肝脏糖代谢紊乱的相关报道尚少见。因此,本研究拟通过用不同浓度枸橼酸铁铵(ferric ammonium citrate,FAC)干预肝 LO2 细胞,探讨铁过载对 LO2 细胞活性氧水平及葡萄糖代谢关键酶活性的影响,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试剂与仪器

RPMI 1640 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)、胰蛋白酶购自上海道鹏生物科技有限公司;FAC 购自美国 MedChemexpress 生物科技有限公司;去铁胺(desferrioxamine,DFO)购自美国 Sigma-aldrich 生物科技有限公司;细胞计数试剂盒(CCK-8)购自江苏凯基生物技术有限公司;人葡萄糖激酶(glucokinase,GK)酶联免疫分析试剂盒、人丙酮酸激酶(pyruvate kinase,PK)酶联免疫分析试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司;活性氧(reactive oxygen species,ROS)试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。Multiskan GO 型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);CO<sub>2</sub> 培养箱(上海力申科学仪器有限公司);F-4600 型荧光分光光度计(日本日立公司)。

#### 1.1.2 细胞株

人肝 LO2 细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库,培养于含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 RPMI 1640 培养基,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中培养,待细胞贴壁长至 70% 左右传代,待细胞生长密度达到  $1 \times 10^4$  个/mL 时用于实验。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 LO2 细胞分组与处理

取生长状态良好 LO2 细胞胰酶消化后,取  $1 \times 10^4$  /mL 的细胞悬液,按检测指标所需分别接种于无菌的 96 孔、12 孔培养板内。以含 10% FBS 的 RPMI

1640 培养基培养 24 h 后,实验分为 5 组,每组设 5 个复孔。(1)对照组:正常接种的 LO2 细胞 + RPMI 1640 培养基;(2)低剂量干预组:正常接种的 LO2 细胞 + 含 7.5 mmol/L FAC 的 RPMI 1640 培养基;(3)中剂量干预组:正常接种的 LO2 细胞 + 含 75  $\mu$ mol/L FAC 的 RPMI 1640 培养基;(4)高剂量干预组:正常接种的 LO2 细胞 + 含 750  $\mu$ mol/L FAC 的 RPMI 1640 培养基;(5)DFO 处理组:正常接种的 LO2 细胞 + 含 75  $\mu$ mol/L FAC 的 RPMI 1640 培养基干预 18 h,加 DFO(250  $\mu$ mol/L)。

#### 1.2.2 检测指标与方法

##### 1.2.2.1 LO2 细胞活力检测(CCK-8 法)

取对数生长期 LO2 细胞,按照每孔  $5 \times 10^3$  个细胞量接种于 96 孔板,待细胞贴壁后分 5 组干预。各组细胞每孔加入 10  $\mu$ L 的 CCK-8 试剂,放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱内培养 24 h,酶标仪测定在 450 nm 波长处测定吸光度(A)值。细胞活力(%) =  $[A(\text{加药}) - A(\text{空白})] / [A(0 \text{ 加药}) - A(\text{空白})] \times 100$ 。A(加药):具有细胞、CCK8 溶液和药物溶液的孔的 A 值;A(空白):具有培养基和 CCK-8 溶液而没有细胞的孔的 A 值;A(0 加药):具有细胞、CCK8 溶液而没有药物溶液的孔的 A 值。

##### 1.2.2.2 ELISA 检测 LO2 细胞 GK、PK 活性

取对数生长期 LO2 细胞按每孔  $2 \times 10^6$  个接种于 12 孔板,预先置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱内培养 24 h,待细胞贴壁后分组干预。将干预好的细胞从培养箱中拿出,胰蛋白酶消化后离心 5 min (1 000 r/min)磷酸盐缓冲液冲洗 2 次,并稀释细胞悬液使浓度达  $1 \times 10^7$  /mL 放入离心管。通过反复冻融,破坏细胞,2 000 r/min 离心 20 min,仔细收集上清液待检。采用 ELISA 法,按照人 GK、PK 活性检测试剂盒说明书进行操作。

##### 1.2.2.3 LO2 细胞 ROS 水平检测

取对数生长期 LO2 细胞按每孔  $2 \times 10^6$  个接种于 12 孔板,预先置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱内培养 24 h,待细胞贴壁后分组干预。按照 ROS 检测试剂盒安装荧光探针 2,7-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)后,收集细胞后用荧光分光光度计检测,设置激发波长 488 nm,发射波长 525 nm,检测各组细胞荧光强度。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS21.0 软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 铁过载对肝正常细胞 LO2 生物活性的影响

各组细胞活性比较,差异无统计学意义( $F =$

2.710,  $P=0.070$ ), 见图 1。

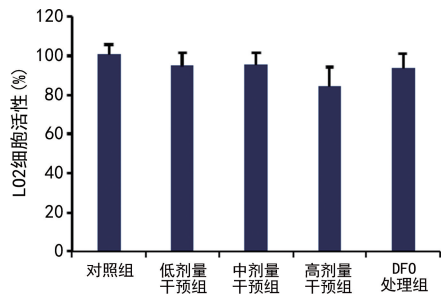
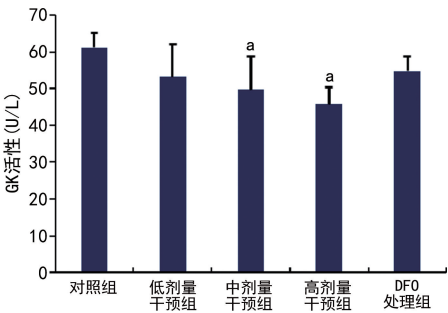


图 1 铁过载对肝 LO2 细胞活力的影响 ( $n=4$ )

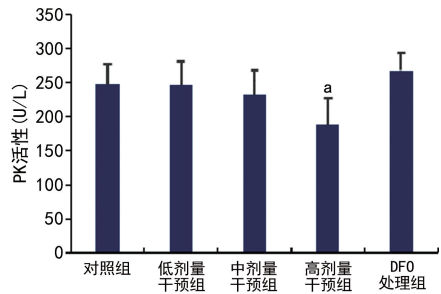
2.2 铁过载对正常肝 LO2 细胞葡萄糖代谢关键酶活性的影响

中、高剂量干预组细胞 GK 活性低于对照组, 高剂量干预组 PK 活性低于对照组, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); DFO 处理组 GK、PK 活性高于中剂量干预组, 但差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 见图 2、3。



<sup>a</sup>:  $P<0.05$ , 与对照组比较。

图 2 铁过载对正常肝 LO2 细胞 GK 活性影响 ( $n=4$ )

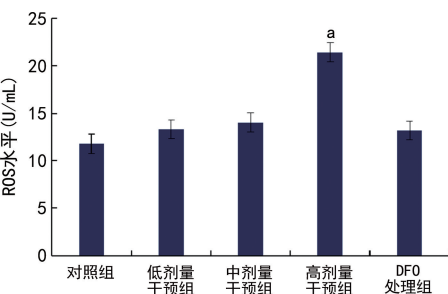


<sup>a</sup>:  $P<0.05$ , 与对照组比较。

图 3 铁过载对正常肝 LO2 细胞 PK 活性影响 ( $n=4$ )

2.3 铁过载对正常肝 LO2 细胞活性氧水平的影响

高剂量干预组细胞内 ROS 水平高于对照组, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 见图 4。



<sup>a</sup>:  $P<0.05$ , 与对照组比较。

图 4 铁过载对正常肝 LO2 细胞 ROS 水平影响 ( $n=4$ )

3 讨论

铁是人体必需的微量元素, 在机体吸收、利用、储存及循环利用过程中维持着稳态水平。高铁负荷和铁代谢障碍疾病已经被证明和糖代谢异常发病风险的增高有关<sup>[11]</sup>。多个流行病学研究显示铁过载与胰岛素抵抗相关, 其机制可能有多种<sup>[12-15]</sup>。

肝脏是铁代谢的主要器官, 也是铁蓄积产生毒害的首要靶器官。肝铁聚集与高铁蛋白血症、胰岛素抵抗、非酒精性脂肪肝有关<sup>[16-17]</sup>。在前期研究的基础上, 本研究以不同浓度 FAC 干预肝 LO2 细胞, 在各组细胞 FAC 干预后细胞活性无差异的前提下, 检测各组细胞 ROS 水平, 发现高剂量干预组细胞内 ROS 水平明显高于对照组, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 说明 LO2 细胞铁负荷达到一定水平后, 打破了机体内 ROS 产生与机体 ROS 自我清除之间的相对平衡, 可能对细胞造成过氧化损伤。

GK 是一种己糖激酶, 特异性存在于胰岛  $\beta$  细胞和成熟肝细胞中。前者是催化胰岛素分泌的限速步骤, 后者参与糖原合成, 因此, 在糖代谢中发挥着重要作用。在 GK 基因中已经发现了大量致病突变。在临床中, 激活突变表现为先天性高胰岛素血症, 而功能丧失突变会导致糖尿病<sup>[18]</sup>。通过 GK 传感器的作用, 人体不同细胞、器官形成了一个紧密调控和稳定的葡萄糖稳态网络系统, 始终维持人体血糖稳态<sup>[19]</sup>。本研究发现, GK 在中、高剂量干预组活性下降, 而在 DFO 处理组 GK 活性有所上升, 可能的原因是 DFO 通过螯合铁离子, 降低了细胞 ROS 的产生, 避免其对细胞产生氧化损伤, 从而降低了铁对 GK 活性的影响。

PK 是糖酵解途径的关键酶之一, 催化磷酸烯醇式丙酮酸形成丙酮酸并生成 ATP<sup>[20]</sup>。本研究发现 PK 在高剂量干预组活性下降。当肝细胞内 GK 与 PK 活性下降时, 会导致糖原合成与葡萄糖利用减少, 最终引起糖代谢紊乱, 与胰岛素抵抗的发生、发展密切相关<sup>[21]</sup>。

综上所述, 75、750  $\mu\text{mol/L}$  FAC 干预的细胞内 GK、PK 活性降低, 可能是导致细胞糖代谢紊乱的原因之一, 但其机制也有待进一步研究。

参考文献

[1] World Health Organization (2018) Diabetes[EB/OL]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> (accessed April 2019).

[2] OGURTSOVA K, DA ROCHA FERNANDES J D, HUANG Y, et al. IDF diabetes atlas: global estimates for the prevalence of diabetes for

- 2015 and 2040 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2017, 128: 40-50.
- [3] HE J J, FANG A P, YU S W, et al. Dietary nonheme, heme, and total iron intake and the risk of diabetes in adults: results from the China health and nutrition survey [J]. *Diabetes Care*, 2020, 43(4): 776-784.
- [4] 沈郁. 孕期补铁和血红蛋白水平对妊娠期糖尿病的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
- [5] IBSEN D B, WARBERG C K, WURTZ A M L, et al. Substitution of red meat with poultry or fish and risk of type 2 diabetes: a Danish cohort study [J]. *Eur J Nutr*, 2019, 58(7): 2705-2712.
- [6] ALTAMURA S, MUDDER K, SCHLOTTERER A, et al. Iron aggravates hepatic insulin resistance in the absence of inflammation in a novel db/db mouse model with iron overload [J]. *Mol Metab*, 2021, 51: 101235.
- [7] ZHOU Y R, WU W Y, XU Z F, et al. Iron regulatory protein 2 deficiency may correlate with insulin resistance [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 510(2): 191-197.
- [8] LI S, WANG F, LU X, et al. Dietary iron intake and the risk of type 2 diabetes mellitus in middle-aged and older adults in urban China: a prospective cohort study [J]. *Br J Nutr*, 2020, 126(7): 1091-1099.
- [9] KATARIA Y, WU Y X, HORSKJÆR P H, et al. Iron status and gestational diabetes-A meta-analysis [J]. *Nutrients*, 2018, 10(5): 621.
- [10] NAKAMURA T, NAGURO I, ICHIJO H. Iron homeostasis and iron-regulated ROS in cell death, senescence and human diseases [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2019, 1863(9): 1398-1409.
- [11] VELA D, SOPI R B, MLADENOV M. Low hepcidin in type 2 diabetes mellitus: examining the molecular links and their clinical implications [J]. *Can J Diabetes*, 2018, 42(2): 179-187.
- [12] ESHAK E S, ISO H, MARUYAMA K, et al. Associations between dietary intakes of iron, copper and zinc with risk of type 2 diabetes mellitus: a large population-based prospective cohort study [J]. *Clinical nutrition*, 2018, 37(2): 667-674.
- [13] KHAMBALIA A Z, NAGUBANDI P, ROBERTS C L, et al. High maternal iron status, dietary iron intake and iron supplement use in pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus: a prospective study and systematic review [J]. *Diabet Med*, 2016, 33(9): 1211-1221.
- [14] CHEN L, LI Y, ZHANG F, et al. Association of serum ferritin levels with metabolic syndrome and insulin resistance in a Chinese population [J]. *J Diabetes Complications*, 2017, 31(2): 364-368.
- [15] KRISAI P, LEIB S, AESCHBACHER S, et al. Relationships of iron metabolism with insulin resistance and glucose levels in young and healthy adults [J]. *Eur J Intern Med*, 2016, 32: 31-37.
- [16] ABBATE M, MONTEMAYOR S, MASCARO C M, et al. Albuminuria is associated with hepatic iron load in patients with non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome [J]. *J Clin Med*, 2021, 10(14): 3187.
- [17] 马岩. 铁负荷和饮酒对肝损伤影响风险分析及海兔素改善效果动物实验研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2018.
- [18] STERNISHA S M, MILLER B G. Molecular and cellular regulation of human glucokinase [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 663: 199-213.
- [19] 李小英. 葡萄糖激酶在葡萄糖稳态中的核心作用 [J]. *中华糖尿病杂志*, 2019, 11(7): 500-502.
- [20] ISRAELSEN W J, DAYTON T L, DAVIDSON S M, et al. PKM2 isoform-specific deletion reveals a differential requirement for pyruvate kinase in tumor cells [J]. *Cell*, 2013, 155(2): 397-409.
- [21] WANG D, ZHAO X, LIU Y. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of a polysaccharide from flower buds of *Lonicera japonica* in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 102: 396-404.