

乳源六肽通过 FoxO3a - MnSOD 通路 减少酒精诱导的氧化应激缓解肝损伤

李安琪¹ 祝晓梅² 黄九九¹ 秦宜德¹ 戚楠¹

摘要 目的 研究乳源六肽脯氨酸 - 甘氨酸 - 脯氨酸 - 异亮氨酸 - 脯氨酸 - 天冬酰胺 (PGPIP) 和其截短五肽脯氨酸 - 甘氨酸 - 脯氨酸 - 异亮氨酸 - 脯氨酸 (PGPIP) 缓解小鼠慢性酒精性肝损伤及其相关的分子机制。方法 60 只昆明小鼠 随机均分为对照组、模型组、谷胱甘肽 (GSH) 组、PG-PIP 组、截短五肽 PGPIP 组。采用梯度酒精灌胃的方法建立小鼠慢性酒精性肝损伤模型,造模的同时给予药物干预,共 12 周。肝脏 HE 染色分析各处理组对小鼠酒精性肝损伤的病理学影响。体外分离培养小鼠原代肝细胞和人正常肝细胞系 L-02,水溶性四氮唑-1 (WST-1) 细胞增殖及细胞毒性检测确定各种细胞合适的 PGPIP 诱导浓度。持续诱导 L-02 细胞不同时间,Western blot 检测人叉头框蛋白 O3 (FoxO3a) 和磷酸化 FoxO3a 蛋白质的表达,确定合适的诱导时间。免疫荧光染色检测 FoxO3a 在 L-02 细胞中的亚细胞定位。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测不同处理组小鼠原代肝细胞和 L-02 细胞 FoxO3a 和锰超氧化物歧化酶 (Mn-SOD) 基因 mRNA 的变化。结果 PGPIP 组和 PGPIP 组病理学检查类似 GSH 组,小鼠肝脏损伤明显减轻。分别选择中浓度和高浓度 PGPIP 诱导小鼠原代肝细胞和 L-02 细胞。在 16 h L-02 细胞 FoxO3a 蛋白表达显著增加,并且 FoxO3a

蛋白主要表达于细胞核内。此外,在相应剂量 PGPIP 诱导后,两种类型细胞中 mRNA 水平的显著增加。结论 PG-PIP 和截短五肽 PGPIP 能减少小鼠慢性酒精性肝损伤,其机制可能是通过 FoxO3a-MnSOD 信号通路,减少酒精诱导的氧化应激从而发挥作用。

关键词 PGPIP; 酒精性肝损伤; 氧化应激; FoxO3a; MnSOD
中图分类号 R 575. 3

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2022) 12 - 1864 - 06
doi: 10. 19405/j. cnki. issn1000 - 1492. 2022. 12. 003

牛乳来源的六肽脯氨酸 - 甘氨酸 - 脯氨酸 - 异亮氨酸 - 脯氨酸 - 天冬酰胺 (Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn, PGPIP) 是位于 A2 β -酪蛋白的 63 ~ 68 残基上,被酶解产生的肽段,可以通过化学方法人工合成。PGPIP 含有 3 个脯氨酸 (proline, Pro), 在体内不易被蛋白酶分解。PGPIP 已被报道^[1-3] 有许多重要的生物学功能,例如抗癌、免疫调节及减轻慢性酒精性脂肪肝和急性肝脏损伤。临床上对酒精性脂肪肝的治疗通常使用激素和抗氧化药物,副作用较多。目前口服谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 阿拓莫兰已经被作为处方药用于防治多种类型肝脏疾病^[4],但是口服 GSH 容易被消化系统蛋白酶降解。有研究^[5] 报道多肽类药物氨基酸序列中天冬酰胺 (asparagine, Asn) 的酰胺基在体内易发生脱酰胺化,侧链的酰胺基团脱去转变为羧基,从而使药物治疗效果不稳定。该研究在前期研究的基础上,使用

2022 - 09 - 15 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81472448); 安徽省自然科学基金 (编号: 1908085MH280)

作者单位: 安徽医科大学基础医学院¹ 生物化学与分子生物学教研室,² 组织学与胚胎学教研室,合肥 230032

作者简介: 李安琪,女,硕士研究生;

戚楠,男,博士,副教授,责任作者, E-mail: 2002500034@ahmu. edu. cn

was applied for observing the apoptosis of neurons in striatum. **Results** Compared with the NC group, the mice of the AAV-shGDNF group, with down-regulation of GDNF in striatum, had poor motor ability, decreased Glu transporter (GLAST and GLT-1), and increased Glu content. Compared with the PBS group, the mice of the MPTP group had increased Glu content and decreased GluN2B in striatum. Compared with the MPTP group, the mice of the MPTP + AAV-GDNF group showed enhanced motor ability, along with decreased Glu content, increased GluN2B and less neurons apoptosis in striatum; while, the mice of the MPTP + AAV-GDNF group showed worse motor ability, along with augmented Glu content, reduced GluN2B and more neurons apoptosis in striatum. **Conclusion** In PD pathological process, decreased striatal GDNF may promote the neurons apoptosis by enhancing Glu excitotoxicity, thereby leading to the aggravation of motor symptoms.

Key words Parkinson's disease; glial cell line-derived neurotrophic factor; glutamic acid; striatum; motor symptom

GSH 作为阳性对照,通过去除最后一个位点的 Asn,合成截短的五肽脯氨酸-甘氨酸-脯氨酸-异亮氨酸-脯氨酸(Pro-Gly-Pro-Ile-Pro,PGPIP)对慢性酒精性肝脏损伤的小鼠模型的作用,分析该六肽发挥作用的有效氨基酸序列,并利用体外分离培养的小鼠原代肝细胞和人正常肝细胞 L-02,进一步探讨 PGPIP 作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 60 只健康雄性昆明小鼠,清洁级 8 周龄,购自安徽医科大学实验动物中心[许可证号:SCXK(皖)2017-001]。分笼饲养于 12 h/12 h 昼夜交替、相对湿度 45%~55%、温度 20~25 °C 的环境中,可自由饮水摄食。

1.1.2 主要试剂与仪器 人正常肝细胞系 L-02(中科院上海细胞库);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);PGPIP(纯度 >98%)、qRT-PCR 引物(上海生物工程有限公司);胎牛血清(浙江天杭生物技术公司);GSH、双抗、DAPI、逆转录和 qRT-PCR 试剂盒(江苏碧云天生物技术有限公司);FoxO3a 兔抗人抗体、磷酸化 FoxO3a(Ser253)兔抗人抗体、 β -actin 小鼠抗人抗体(美国 CellSignaling 生物技术公司);TRIzol(日本 TaKaRa 公司);FITC 标记二抗(北京中杉金桥生物技术公司);胶原酶 IV(美国 Sigma 公司);qRT-PCR 仪器(美国罗氏公司 LightCycler96)。

1.2 方法

1.2.1 人正常肝细胞株 L-02 的培养 细胞的培养使用含 100 U/ml 青-链霉素的 DMEM 培养基,10% 胎牛血清,培养在含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中。

1.2.2 慢性酒精性肝损伤模型的建立与给药 60 只小鼠饲养 1 周后,随机均分为对照组、模型组、GSH 组、PGPIP 组、PGPIP 组。采用梯度乙醇溶液灌胃的方法建立慢性酒精性脂肪肝动物模型,除对照组外,其余各组均采用如下方法进行灌胃:以 30% 乙醇溶液,10 ml/kg,每日 1 次灌胃至第 4 周末;自第 5 周,以 40% 乙醇溶液,11 ml/kg,每日 1 次灌胃至第 8 周末;自第 9 周,以 50% 乙醇溶液,12 ml/kg,每日 1 次灌胃至第 12 周末。对照组灌胃等体积生理盐水,连续 12 周诱导小鼠慢性酒精性肝损伤。造模的同时给予药物干预,GSH 作为药物阳性对照,与 PGPIP 组和 PGPIP 组同样都灌胃 4.2 mmol/kg,每天 1 次(在乙醇灌胃前 0.5 h),每次 250

μ l,共 12 周。末次给药后禁食 8 h,小鼠眼眶取血,颈椎脱臼处死小鼠,取相应组织标本分析和待测。

1.2.3 实验动物健康状况及病例检测 实验期间小鼠每天称重,实验期结束处死动物,迅速取出肝脏,常规石蜡切片,HE 染色,光镜下观察组织病理学变化。

1.2.4 小鼠原代肝细胞的分离培养 小鼠原代肝细胞分离使用两步胶原酶灌注法。小鼠麻醉后剪开腹腔,肝门静脉通过套管插管,然后剪开下腔静脉。先后用 D-Hanks 缓冲液、DMEM 溶液(含 0.5 mg/ml 胶原酶 IV)灌注。肝细胞经 75 μ m 的细胞筛过滤后洗涤 3 次,台盼蓝染色鉴定细胞活力 >90%。肝细胞培养在含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中。

1.2.5 细胞活力测定 使用 WST-1 法测定细胞的存活。细胞培养实验分为对照组、模型组、酒精和 GSH 组、酒精和低剂量 PGPIP 组、酒精和中剂量 PGPIP 组、酒精和高剂量 PGPIP 组。小鼠原代肝细胞和人 L-02 细胞酒精组刺激浓度分别为 100、85.63 mmol/L 酒精和谷胱甘肽联合组使用同等浓度的酒精和 15 μ mol/L 的 GSH 刺激,低剂量、中剂量和高剂量 PGPIP 肽刺激浓度分别为 0.15、1.50、15.00 μ mol/L。在 450 nm 测定各组吸光度值。按照计算公式:细胞活力(%) = (实验组吸光度值 $A_{450\text{nm}}$ / 对照组吸光度值 $A_{450\text{nm}}$) \times 100%。

1.2.6 qRT-PCR 实验 培养的细胞使用 TRIzol 试剂盒提取细胞总 RNA,然后逆转录成 cDNA。目的基因的 mRNA 表达水平用 GAPDH 作为内参定量测定。每组设置 3 个复孔,目的引物序列见表 1。根据实验结果获得 Ct 值,目的基因 mRNA 的表达水平用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法定量。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	
	小鼠	人
MnSOD	F: CCGAGGAGAAGTACCACGAGG	F: TTTAGTCCCTGGTGTCCCC
	R: CACCACCCCTAGGGCTCAGG	R: CTTACCGAAAATCCAGGC
FoxO3a	F: CTGGGGGAACCTGTCTATG	F: TTCAAGGATAAGGGCGACAGCAAC
	R: TCATCTGAACCGCATGAAG	R: CTGCCAGGCCACTGGAGAG
GAPDH	F: CATGTTCTCATGGGCTGAACCA	F: CATGTTCTCATGGGCTGAACCA
	R: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	R: AGTGATGCCATGGACTGTGGTCAT

1.2.7 Western blot 实验 培养的细胞收获前,用预冷的 PBS 洗 2 次,然后加预冷的 RIPA 裂解液裂解细胞。蛋白浓度定量后,等量的蛋白(20 μ g)加到上样孔中进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。Western blot 转膜后,用含 5% 的脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 1 h,

一抗 1 : 1 000 TBST 稀释后 4 ℃ 孵育过夜。TBST 洗 3 次后 , 辣根酶标记的二抗 1 : 1 000 TBST 稀释后 37 ℃ 孵育 1 h , ECL 系统显色。

1.2.8 免疫荧光染色 细胞在 24 孔培养板中铺板 4% 多聚甲醛 37 ℃ 固定 30 min , 0.1% Triton X-100 PBS 溶液室温穿孔 15 min。羊血清封闭后 , 一抗 1 : 100 PBS 稀释后 4 ℃ 孵育过夜。PBS 洗 3 次后 , 用 FITC 标记的二抗 1 : 100 PBS 稀释后孵育。PBS 洗 3 次 , 细胞核用 DAPI 染色。共聚焦显微镜观察拍照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理 , 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示 , 两组间比较采用独立样本 *t* 检验 , 多组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 各处理组对小鼠酒精性肝损伤的病理学影响

HE 常规染色如图 1 所示 , 肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列 , 肝小叶结构清晰。肝细胞相互吻合成网 , 网眼间有窦状隙和血窦。肝细胞呈多角形 , 肝细胞核呈圆形。模型组肝脏肝细胞网状结构紊乱 , 肝细胞肿胀 , 胞质呈现严重的泡沫状改变 , 只

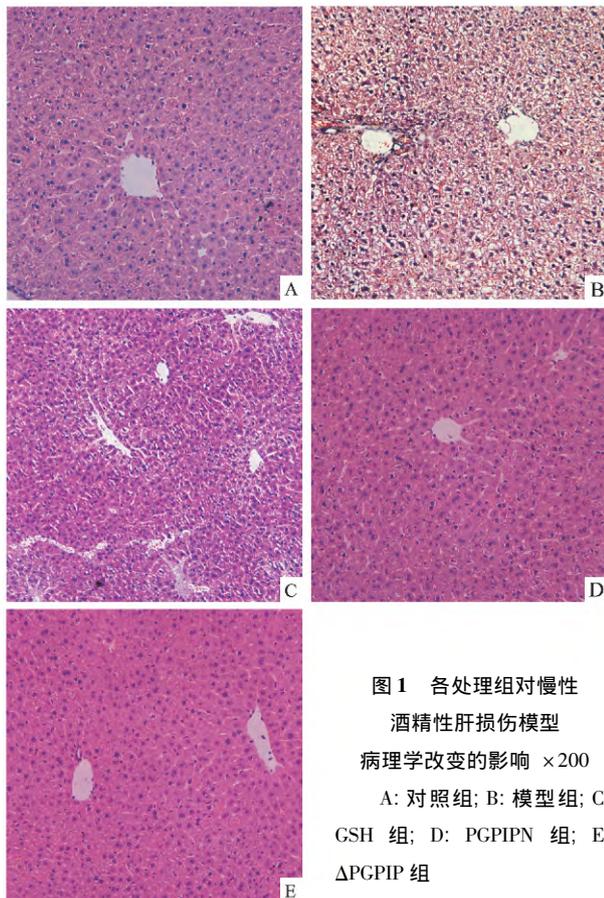


图 1 各处理组对慢性酒精性肝损伤模型病理学改变的影响 ×200

A: 对照组; B: 模型组; C: GSH 组; D: PGPIP 组; E: ΔPGPIP 组

有细胞核清晰可见。肝细胞之间界限模糊 , 窦状隙与血窦不明显。与模型组相比 , GSH 组肝细胞损伤明显减轻 , PGPIP 组和 ΔPGPIP 组无明显病理学变化。

2.2 小鼠原代肝细胞培养与各处理组细胞活力测定

2.2.1 小鼠原代肝细胞的分离培养 为研究各处理组对小鼠原代肝细胞活力的影响 , 该实验在体外分离培养了小鼠原代肝细胞。如图 2 所示 , 与培养的人正常肝细胞系 L-02 相比 , 大多数小鼠原代肝细胞呈现双细胞核形态 , 细胞呈多边形 , 细胞核清晰可见。细胞边界较明显。从原代细胞培养图可见 , 细胞纯度大于 90%。人正常肝细胞系 L-02 呈现明显的上皮样细胞特征。

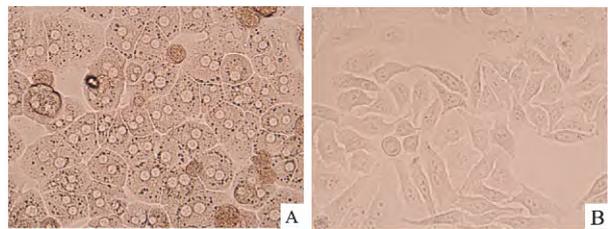


图 2 分离培养的原代小鼠肝细胞和人正常肝细胞系 L-02 ×400
A: 原代小鼠肝细胞; B: 人正常肝细胞系 L-02

2.2.2 各处理组细胞活力测定 如图 3 所示 , 与对照组相比 , 在酒精组、GSH 组、低剂量肽组、中剂量肽组和高剂量肽组中小鼠原代肝细胞活力明显减少。与酒精组 (65.2 ± 5.0) % 相比 , 中剂量肽组中小鼠原代肝细胞的活力显著增加 , 然而 , 高剂量肽组中小鼠原代肝细胞的活力显著减少 (50.1 ± 4.0) %。与小鼠原代肝细胞高剂量肽组的抑制效

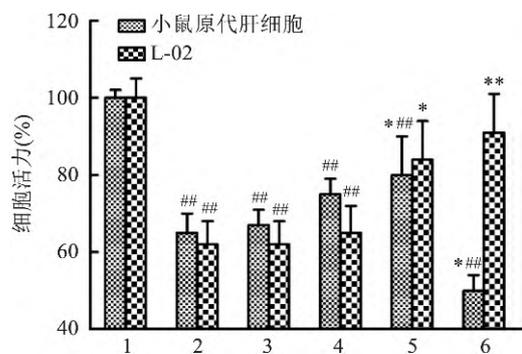


图 3 培养的各组处理组细胞活力测定

1: 对照组; 2: 酒精组; 3: 酒精和 GSH 组; 4: 酒精和低剂量 PGPIP 组; 5: 酒精和中剂量 PGPIP 组; 6: 酒精和高剂量 PGPIP 组; 与酒精组比较: * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01; 与对照组比较: ### *P* < 0.01

果相比,在高剂量肽组处理的 L-02 细胞中没有出现细胞活力显著减少的现象。因此,该实验选择中剂量肽组作为小鼠原代肝细胞合适的处理浓度,高剂量肽组作为人肝细胞系 L-02 合适的处理浓度。

2.3 PGIPN 对酒精诱导氧化应激的影响

2.3.1 不同诱导时间与 FoxO3a 蛋白的表达 为研究 PGIPN 是否通过转录因子 FoxO3a 减少酒精诱导的氧化应激,该研究用 Western blot 分析 FoxO3a 和磷酸化的 FoxO3a (P-FoxO3a) 蛋白的表达水平。如图 4 所示,实验用高剂量 PGIPN 和酒精在不同诱导时间(8、16、24 h)处理 L-02 细胞。 β -actin 作为内参,随着处理时间的增加,在 16 h, FoxO3a 蛋白的表达量达到最大,之后到 24 h,蛋白表达量又

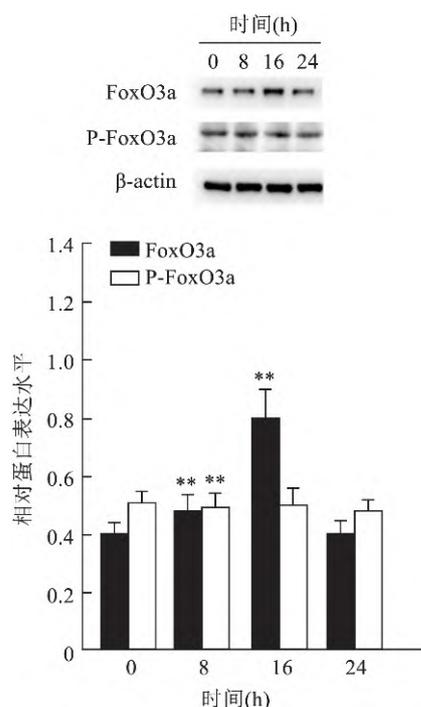


图 4 L-02 细胞不同时间点 FoxO3a 和 P-FoxO3a 蛋白表达水平与 0 h 组比较: ** $P < 0.01$

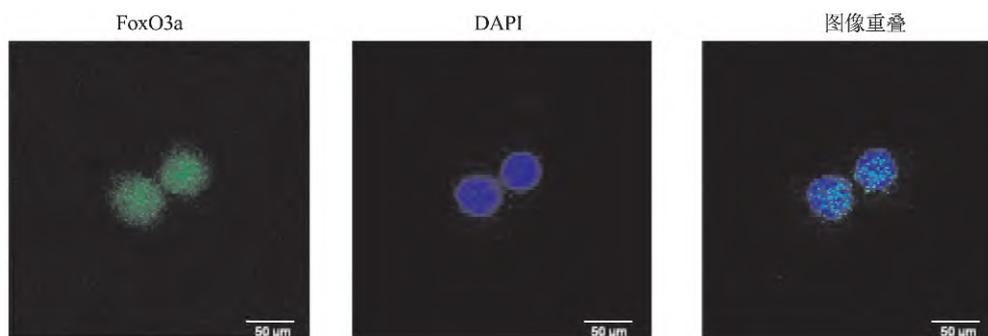


图 5 FoxO3a 蛋白在 L-02 细胞中的亚细胞定位 $\times 400$

减少。与 FoxO3a 蛋白这种变化趋势相比,随着处理时间的增减, P-FoxO3a 的蛋白表达量并没有显著的改变。

2.3.2 FoxO3a 蛋白的亚细胞定位 为了研究 FoxO3a 蛋白在 L-02 细胞中的亚细胞定位,该研究进行了共聚焦免疫荧光实验。如图 5 所示,在培养的 L-02 细胞中,绿色荧光标记的 FoxO3a 和蓝色荧光标记的细胞核,在进行图像融合后,两种颜色的荧光完全重叠,提示 FoxO3a 蛋白在 L-02 细胞中主要表达于细胞核内。在各处理组中,模型组、给药组和空白对照组结果一致, FoxO3a 在细胞核内的定位未发生变化。

2.4 qRT-PCR 检测小鼠原代肝细胞和 L-02 细胞相关基因 mRNA 的变化 由于锰超氧化物歧化酶 (MnSOD) 是转录因子 FoxO3a 调控的一个重要的目的基因,在不同处理组诱导 16 h 后,结果显示,与对照组或者酒精组相比,在小鼠原代肝细胞中,中浓度的 PGIPN 和酒精联合诱导 FoxO3a 和 MnSOD mRNA 水平增加。在 L-02 细胞中,高浓度的 PGIPN 和酒精联合诱导作用下,观察到同样的 mRNA 水平显著变化。见图 6。

3 讨论

酒精代谢主要发生在人体的肝脏实质细胞肝细胞中。乙醇先被位于肝细胞质中的乙醇脱氢酶催化生成乙醛,然后乙醛再进入肝线粒体被乙醛脱氢酶催化生成乙酸,在这些过程中生成大量的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH),增加细胞内 NADH/烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD^+) 的比率,从而进一步影响线粒体 β -氧化并导致脂类积累^[6]。除此之外,肝细胞中内质网和线粒体中的细胞色素 P4502E1 (CYP2E1) 也可以催化乙醇转变为乙醛。NADH 在正常的肝细胞内的主要代谢途径是进入线

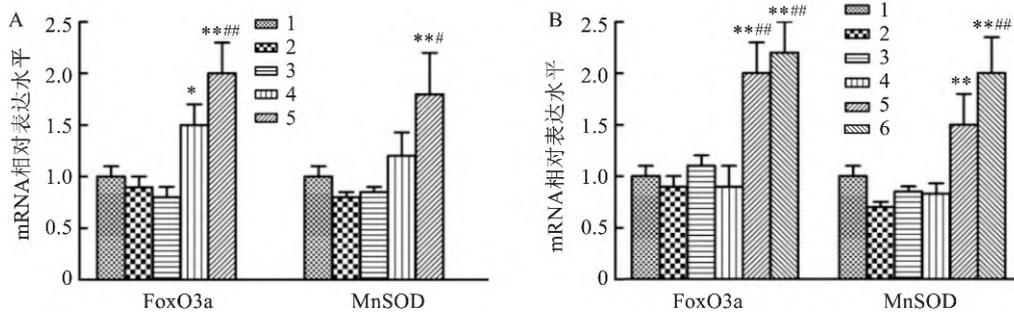


图6 qRT-PCR 测定 mRNA 相对表达水平

A: 小鼠原代肝细胞; B: 人 L-02 肝细胞; 1: 对照组; 2: 酒精组; 3: 酒精和 GSH 组; 4: 酒精和低剂量 PGPIP 组; 5: 酒精和中剂量 PGPIP 组; 6: 酒精和高剂量 PGPIP 组; 与酒精组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01; 与对照组比较: # P < 0.05, ## P < 0.01

粒体参与氧化磷酸化途径,在其过程中伴随着生成 ROS 作为氧化过程的副产物^[7],然而酒精代谢产生的增多的 NADH 会导致在线粒体内生成大量的 ROS。乙醛和活性氧 ROS 是酒精代谢导致肝细胞损伤的两个主要因素^[8]。乙醛和 ROS 都可以结合蛋白质,改变蛋白质结构从而使其丧失功能,还可以诱导新抗原形成从而诱发免疫反应。乙醛和 ROS 还可以结合并损伤 DNA。ROS 还可以导致脂质过氧化,生成过氧化产物例如丙二醛(MDA)。这些脂质过氧化产物能结合到 DNA 上生成致癌性的 DNA 加合物^[9]。

线粒体是肝细胞代谢酒精产生 ROS 的一个主要来源。大量的 ROS 能改变线粒体膜的通透性,导致 ROS 从线粒体释放到胞质。因此,肝细胞产生了一系列针对氧化应激的防御机制,例如超氧化物歧化酶^[10]。MnSOD 也称为 SOD2,位于线粒体基质,在 ROS 的清除过程中发挥重要作用。小鼠原代肝细胞和 L-02 细胞中 mRNA 水平的显著增加提示 FoxO3a-MnSOD 信号通路在 PGPIP 减少酒精诱导的氧化应激的过程中发挥重要作用。PGPIP 能够在酒精性脂肪肝和急性肝损伤的小鼠模型中增加 SOD 的活性,为酒精相关性肝病的预防和治疗提供指导意义。

FoxO3a 是 O 型叉头框蛋白转录因子亚家族成员之一,有一个特征型的叉头形 DNA 结合域。在哺乳动物中,有 4 种 FoxO 基因(FoxO1、FoxO2、FoxO3、FoxO4)。FoxO3a 转录因子具有一个核定位序列和一个核输出序列,在多种组织中表达^[11]。FoxO3a 有多种生物学活性,例如调节氧化应激、糖类和脂类代谢、自噬、诱导凋亡和延长寿命^[12]。FoxO3a 被多种后翻译修饰过程调控,例如磷酸化、乙酰化、甲基

化和泛素化。这些调控改变 FoxO3a 的亚细胞定位、转录活性和稳定性,例如 AKT 激酶磷酸化其 253 位点的丝氨酸灭活 FoxO3a,使其从细胞核转位到细胞质,导致随后的泛素化和降解^[13]。FoxO3a 可以调控细胞对抗氧化应激防御机制中相关蛋白的表达,促进 ROS 和丙二醛的清除,增加抗氧化酶 MnSOD 的活性。在小鼠原代肝细胞和肝细胞系 L-02 中,PGPIP 可以显著增加 FoxO3a mRNA 的表达水平。在 L-02 细胞中,随着诱导时间的延长,FoxO3a 蛋白质表达量增加,但是磷酸化的 FoxO3a 并没有随着增加。因此,PGPIP 可能通过增加 FoxO3a 的表达并激活其转录因子活性,促进 MnSOD 酶编码基因的转录,生成更多的 MnSOD 酶并且发挥其催化活性,从而减少线粒体内由于酒精代谢,NADH 生成增多进入氧化磷酸化途径从而产生大量的 ROS,维持线粒体的正常功能和线粒体膜系统的完整性,继而避免了肝细胞凋亡和肝脏损伤。

综上所述,PGPIP 作为人类食品来源的生物活性肽之一,具有副作用小、成本低廉、分子量小、不易引起免疫反应、可口服等多种方式给药等优点,在酒精性肝病的防治过程中有其独特的作用。该研究通过合成截短的五肽 PGPIP 的方式,在小鼠慢性酒精性肝损伤的模型中初步表明五肽 PGPIP 是发挥作用的有效氨基酸序列,但是具体的分子机制还需要进一步深入探讨。

参考文献

[1] Qi N, Liu C, Yang H, et al. Therapeutic hexapeptide (PGPIP) prevents and cures alcoholic fatty liver disease by affecting the expressions of genes related with lipid metabolism and oxidative stress [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(50): 88079-93.

[2] Xu Q, Xi H, Chen X, et al. Milkderived hexapeptide PGPIP

- prevents and attenuates acute alcoholic liver injury in mice by reducing endoplasmic reticulum stress[J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46(3): 1107–17.
- [3] 徐 怡, 阮 昕, 汪慎燚, 等. 乳源六肽增加人卵巢癌细胞对顺铂的敏感性[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(8): 1221–6.
- [4] 刘 本, 侯秋月. 阿托莫兰对成人急性髓样白血病化疗患者肝功能损伤的预防作用观察[J]. *实用肝脏病杂志*, 2016, 19(6): 717–9.
- [5] Zapadka K L, Becher F J, Gomes D S A, et al. Factors affecting the physical stability (aggregation) of peptide therapeutics[J]. *Interface Focus*, 2017, 7(6): 20170030.
- [6] Seitz H K, Bataller R, Cortez-Pinto H, et al. Alcoholic liver disease[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4(1): 16.
- [7] Zhao R Z, Jiang S, Zhang L, et al. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (review) [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(1): 3–15.
- [8] Sugimoto K, Takei Y. Pathogenesis of alcoholic liver disease[J]. *Hepatol Res*, 2017, 47(1): 70–9.
- [9] Mansouri A, Gattolliat C H, Asselah T. Mitochondrial dysfunction and signaling in chronic liver diseases [J]. *Gastroenterology*, 2018, 155(3): 629–47.
- [10] Palma F R, He C, Danes J M, et al. Mitochondrial superoxide dismutase: what the established, the intriguing, and the novel reveal about a key cellular redox switch[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2020, 32(10): 701–14.
- [11] Lu M, Hartmann D, Braren R, et al. Oncogenic Akt-FOXO3 loop favors tumor-promoting modes and enhances oxidative damage-associated hepatocellular carcinogenesis[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 887.
- [12] Klotz L O, Sanchez-Ramos C, Prieto-Arroyo I, et al. Redox regulation of FoxO transcription factors[J]. *Redox Biol*, 2015, 6: 51–72.
- [13] Calissi G, Lam E W, Link W. Therapeutic strategies targeting FOXO transcription factors[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(1): 21–38.

Milk derived hexapeptide reduces alcohol – induced oxidative stress and alleviates liver injury through FoxO3a – MnSOD signaling pathway

Li Anqi¹, Zhu Xiaomei², Huang Jiujiu¹, Qin Yide¹, Qi Nan¹

(¹Dept of Biochemistry and Molecular Biology, ²Dept of Histology and Embryology, School of Basic Medical Science, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the milk-derived hexapeptide PGPIP and its truncated pentapeptide PGPIP to alleviate chronic alcoholic liver injury in mice and its associated molecular mechanisms. **Methods** Sixty Kunming mice were randomly divided into control group, model group, GSH group, PGPIP group, and truncated pentapeptide PGPIP group. The model of chronic alcoholic liver injury in mice was established by gavage with gradient alcohol. Drug intervention was given at the same time for 12 weeks. Liver HE staining was used to analyze the pathological effects of each treatment group on alcoholic liver injury in mice. Primary mouse hepatocytes and human normal hepatocyte line L-02 were isolated and cultured *in vitro*. The appropriate PGPIP induction concentrations of both cells were determined by WST-1 method. L-02 cells were induced at different times. The expression of FoxO3a and phosphorylated FoxO3a protein were detected by Western blot to determine the appropriate induction time. The subcellular localization of FoxO3a in L-02 cells was detected by cellular immunofluorescence. The mRNA changes of FoxO3a and MnSOD genes in primary hepatocytes and L-02 cells of mice in different treatment groups were detected by qRT-PCR. **Results** The pathological examination of PGPIP group and PGPIP group was similar to that of GSH group, and the liver injury of mice was significantly reduced. Medium and high concentrations of PGPIP were respectively selected to induce mouse primary hepatocytes and L-02 cells. At 16 hours, the expression of FoxO3a protein in L-02 cells increased significantly. FoxO3a protein was mainly expressed in the nucleus. In addition, mRNA levels in both types of cells increased significantly after induction with the corresponding dose of PGPIP. **Conclusion** PGPIP and truncated pentapeptide PGPIP can reduce chronic alcoholic liver injury in mice. The mechanism may be to reduce alcohol-induced oxidative stress through FoxO3a-MnSOD signaling pathway.

Key words PGPIP; alcoholic liver damage; oxidative stress; FoxO3a; MnSOD