

引文格式: 高梓琪, 王冬雪, 武思敏, 等. 重楼皂苷 I 对紫外损伤的人永生角质形成细胞 (HaCaT) 的保护作用研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2023, 38(4): 621–626. DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).202108043

重楼皂苷 I 对紫外损伤的人永生角质形成细胞 (HaCaT) 的保护作用研究*

高梓琪^{1,2}, 王冬雪², 武思敏², 黄业伟², 满佳旭², 高蕊蕊¹, 张冬英^{1,2**}

(1. 云南农业大学 理学院, 云南 昆明 650201;

2. 云南农业大学, 普洱茶学教育部重点实验室, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】研究重楼皂苷 I (polyphyllin I, PP I) 对急性中波紫外线 (medium wave ultraviolet rays, UVB) 损伤的人永生角质形成细胞 (HaCaT) 的保护作用及分子机制, 为重楼在日化用品中的应用提供理论依据。【方法】采用四甲基偶氮唑蓝法检测不同浓度 PP I 处理 HaCaT 的存活率, 筛选出无毒性 PP I 浓度; 将 HaCaT 细胞随机分为 4 组: 空白对照组、UVB 处理组 (21.6 mJ/cm²)、0.250 μmol/L PP I + UVB 处理组和 0.500 μmol/L PP I + UVB 处理组, 采用结晶紫染色法探究 2 种浓度 PP I 对 UVB 处理后 HaCaT 细胞增殖的影响; 采用蛋白质免疫印迹法检测 HaCaT 细胞凋亡蛋白多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymerase, PARP1)、cleaved-PARP1、乙酰基-赖氨酸、K68 位点的线粒体超氧化物歧化酶重组蛋白 (mitochondrial recombinant superoxide dismutase 2, K68-SOD2) 和沉默调节 3 蛋白 (sirtuin3, SIRT3) 的表达。【结果】与空白对照组相比, UVB 组的 HaCaT 细胞存活率显著下降, cleaved-PARP1 和 K68-SOD2 表达显著增加, 而 SIRT3 表达显著降低, 造模成功。与 UVB 组相比, PP I 各剂量处理组可提高 UVB 照射后 HaCaT 细胞的存活率, 增加 SIRT3 的表达, 降低 K68-SOD2 的乙酰化水平, 进而减少凋亡蛋白 cleaved-PARP1 的表达, 降低细胞的凋亡水平。【结论】PP I 可能通过增强 SIRT3 活性使 SOD2 去乙酰化, 以增强 SOD2 活性, 减轻 UVB 照射 HaCaT 细胞引起的氧化应激和凋亡, 从而对 HaCaT 细胞起到保护作用。

关键词: 重楼皂苷 I; 紫外损伤; 人永生角质形成细胞; 去乙酰化酶

中图分类号: S567.239.01 文献标志码: A 文章编号: 1004-390X (2023) 04-0621-06

Study on the Protective Effect of Polyphyllin I on HaCat Cells Injured by Ultraviolet Ray

GAO Ziqi^{1,2}, WANG Dongxue², WU Simin², HUANG Yewei²,
MAN Jiaxu², GAO Ruirui¹, ZHANG Dongying^{1,2}

(1. College of Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Key Laboratory of Pu'er Tea Science, Ministry of Education, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] To study the protective effects and molecular mechanism of polyphyllin I (PP I) on the HaCaT cell exposed to acute medium wave ultraviolet rays (UVB) injury, providing a theoretical basis for application of PP I in daily chemical products. [Methods] Methyl thiazolyl

收稿日期: 2021-08-26 修回日期: 2023-04-13 网络首发日期: 2023-09-06

*基金项目: 国家自然科学基金项目 (31760226); 云南省重大科技项目 (2018IA060)。

作者简介: 高梓琪 (1996—), 女, 湖南常德人, 在读硕士研究生, 主要从事营养代谢免疫学研究。

E-mail: 857173887@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 张冬英 (1976—), 女, 湖南常德人, 博士, 教授, 主要从事茶及特色植物资源开发利用研究。E-mail: 757664982@qq.com

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/53.1044.S.20230905.1020.001>



tetrazolium method was used to detect the survival rate of HaCaT cell treated with different concentrations of PP I, and the non-toxic PP I concentration was screened out. HaCaT cells were randomly divided into four groups: blank control group, UVB treatment group (21.6 mJ/cm²), 0.250 μmol/L PP I +UVB treatment group, and 0.500 μmol/L PP I +UVB treatment group; crystal violet staining was used to explore the effects of two concentrations of PP I on the proliferation of HaCaT cells after UVB treatment. HaCaT cells were analyzed by Western-blot for protein expression of poly ADP-ribose polymerase (PARP1), cleaved-PARP1, acetyl-lysine, mitochondrial recombinant superoxide dismutase 2 on the K68 loci (K68-SOD2) and sirtuin3 (SIRT3). [Results] Compared with the blank control group, the UVB group showed a significant decrease in the survival rate of HaCaT cell, a significant increase in the expression of cleaved-PARP1 and K68-SOD2, and a significant decrease in the expression of SIRT3, modeling success. Compared with the UVB group, treatment with each dose of PP I significantly increased the survival rate of HaCaT cell after UVB irradiation, increased the expression of SIRT3, and decreased the acetylation level of K68-SOD2, which in turn decreased the expression of proapoptotic protein cleaved-PARP1 and decreased the apoptosis level of HaCaT cells.

[Conclusion] PP I may play a protective role in HaCaT cells by enhancing SIRT3 activity, deacetylating SOD2 to enhance SOD2 activity, and alleviate oxidative stress and apoptosis caused by UVB irradiation of HaCaT cells.

Keywords: polyphyllin I; UV damage; HaCaT cell; deacetylase

随着生活水平的提高和医美行业的发展,皮肤外源性老化(如紫外损伤)的问题日益受到关注。日常生活中不可避免的日晒会导致皮肤细胞产生大量的自由基,引发细胞的氧化应激,从而引起 DNA 损伤、线粒体等细胞器损伤、细胞内生物大分子过氧化和细胞外基质降解,宏观表现为皮肤红肿和晒斑等一系列老化现象,被称为皮肤光老化^[1]。过量紫外线刺激角质形成细胞会产生大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS)。ROS 可诱导转录因子激活蛋白-1(activator protein 1, AP-1),进而上调多种基质金属蛋白酶的表达式从而降解大量的真皮胶原,使皮肤出现褶皱,黯淡无光泽^[2-3]; ROS 还可以活化核转录因子核因子 κB(nuclear factor kappa-B, NF-κB),进而上调促炎症细胞因子及各种黏附分子的表达,这些细胞因子又会上调 AP-1 并进一步激活 NF-κB 通路,从而增强细胞的紫外损伤^[4-6]。沉默调节 3(sirtuin3, SIRT3)则可以刺激线粒体超氧化物歧化酶重组蛋白(mitochondrial recombinant superoxide dismutase 2, SOD2)的去乙酰化,进而清除紫外线导致的氧化应激^[7]。

重楼属植物是中国西南地区的特有植物资源,常被用于治疗炎症性皮肤病^[8-9],且其醇提物具备体外清除活性氧及抗氧化的功效^[10],重楼皂

昔 I(polyphyllin I, PP I)作为其主要活性成分可以缓解 ROS 诱导的细胞自噬以减少细胞的氧化应激^[11],但是对于紫外线诱导的细胞损伤保护作用报道甚少。本研究探讨了 PP I 对紫外损伤的人永生表皮角质细胞(HaCaT)的保护作用及分子机制,旨在为深入开发滇重楼资源在日化用品中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

HaCaT 细胞株由中国科学院昆明细胞库提供; PP I(C-036-171216)购自成都瑞芬思生物科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞培养

HaCaT 细胞在 37 ℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。待细胞融合度在 90% 以上时传代,经 0.5% 胰蛋白酶消化后,使用高糖 DMEM 培养基分别以对应的细胞密度将细胞接种于 60 和 90 mm 培养皿或 96 孔细胞培养板中。

1.2.2 HaCaT 细胞紫外损伤模型的建立

将 HaCaT 细胞接种于 60 mm 细胞培养皿中,待细胞融合 80% 时,将 1 根 20 W 的 UVB 灯管悬于超净台内对细胞进行照射,辐射剂量参照

XU 等^[7]的研究结果,以 HaCaT 细胞刚发生增殖抑制的剂量进行后续试验,即 UVB 辐照剂量为 21.6 mJ/cm²。

1.2.3 无毒性 PP I 的浓度筛选

通过四甲基偶氮唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 法检测 PP I 对于细胞生长的毒性作用,进行浓度筛选,以用于后续试验。按 1.2.1 节所述方法将 HaCaT 细胞接种于 96 孔培养板中,当细胞融合 80% 时,换成含有不同浓度 PP I (0、0.125、0.250、0.500 和 1.000 $\mu\text{mol/L}$) 的培养液。PP I 处理细胞 24 h 后,每孔加入 20 μL 5 mg/mL MTT 溶液。避光于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 4 h,吸除上清,每孔加入 200 μL DMSO 溶液,室温振荡 10 min,采用酶标仪于 492 nm 处读板。

1.2.4 PP I 对紫外线损伤 HaCaT 细胞增殖的影响以及细胞形态观察

通过结晶紫染色法研究不同浓度 PP I 对紫外线损伤 HaCaT 细胞增殖的影响。以 70 万/皿的细胞密度将 HaCaT 细胞接种至 60 mm 细胞培养皿中过夜,待细胞贴壁牢固,用 PBS 清洗 1~2 次,将培养基换成含有 0.250 和 0.500 $\mu\text{mol/L}$ PP I 的无血清培养基;继续培养 1 h 后用 UVB 紫外灯管辐射细胞,然后放进细胞培养箱中培养;24 h 后缓慢吸除培养基,用 PBS 清洗 2~3 次,使用 4% 多聚甲醛固定 20 min;固定结束后用去离子水清洗 1 次,用 0.1% 结晶紫染液染色 1 min,用超纯水小心清洗 3~5 次后拍照记录。将细胞置于光学显微镜下,对细胞形态进行观察和拍照记录。

1.2.5 蛋白表达检测

采用蛋白质免疫印迹法 (Western-blot, WB) 检测凋亡蛋白多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymerase, PARP1)、cleaved-PARP1、乙酰基-赖氨酸、SOD2 (K68) 和 SIRT3 蛋白的表达。采用 RIPA 高效裂解液裂解细胞,经 150 000 r/min 离心 15 min 后取上清得到细胞总蛋白,采用 BCA 定量法测得蛋白浓度。取样品 30 μg 进行上样,电泳转膜后将转移到膜上的蛋白质与一抗 (β -Tubulin) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜孵育,第 2 天使用与一抗对应的二抗室温孵育 1 h,在曝光机中成像并拍照。

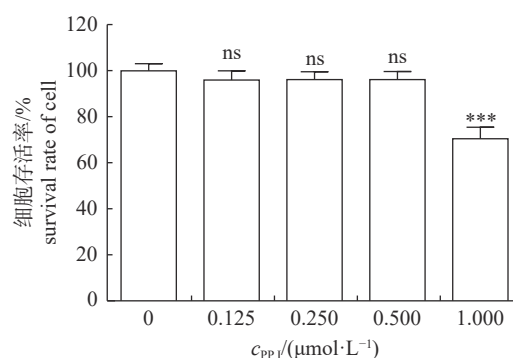
1.2.6 数据分析

所有数据均采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行作图和显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 PP I 对 HaCaT 细胞存活率的影响

由图 1 可知:PP I 对 HaCaT 细胞具有一定的毒性。当 PP I 浓度为 0.125、0.250 和 0.500 $\mu\text{mol/L}$ 时,对细胞增殖能力影响不大;当 PP I 浓度达到 1.000 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率显著降低,PP I 表现出显著的细胞毒性 ($P<0.001$)。考虑到给药浓度小于 1.000 $\mu\text{mol/L}$ 时,PP I 对细胞增殖能力没有显著影响,故选择 0.250 和 0.500 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续试验的浓度。



注:“*”“**”和“***”分别表示处理间在 0.05、0.01 和 0.001 水平上差异显著;ns. 无显著差异;下同。

Note: “*” “**” and “***” indicate significant differences under 0.05, 0.01, and 0.001 level among treatments, respectively; ns. without significant differences; the same as below.

图 1 不同浓度 PP I 对 HaCaT 细胞存活率的影响

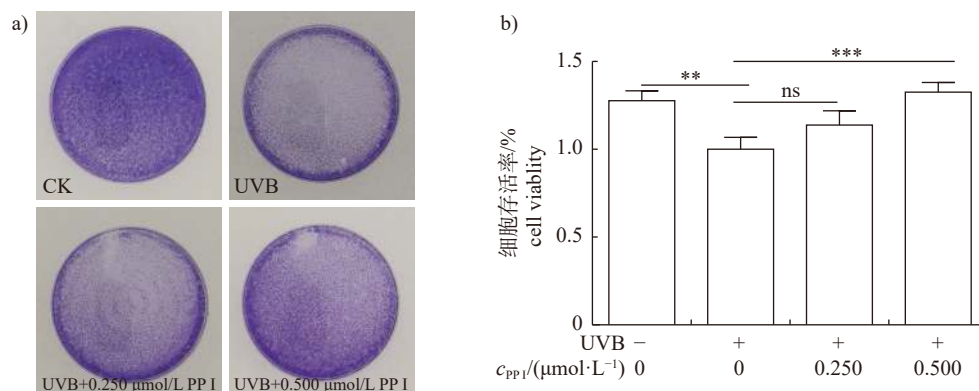
Fig. 1 Effects of different concentrations of PP I on the cell survival rate of HaCaT cells

2.2 PP I 对紫外损伤 HaCaT 细胞增殖的影响

由图 2 可知:与空白对照组相比,UVB 照射可显著抑制 HaCaT 增殖,使之无法形成明显的细胞群落;而 PP I 的加入则可以缓解由 UVB 照射引起的细胞增殖抑制,且这种缓解作用随着 PP I 浓度的增加而增加。

2.3 PP I 对 UVB 诱导细胞凋亡的影响

由图 3 可知:UVB 可以显著提高 HaCaT 细胞 cleaved-PARP1 蛋白的表达,从而引起细胞凋亡;PP I 的加入可显著降低其表达水平,且 0.500 $\mu\text{mol/L}$ PP I 的效果优于 0.250 $\mu\text{mol/L}$ PP I。此外,相较于空白对照组,UVB 处理可使细胞变圆、变亮,表示细胞正在死亡,而 PP I 处理组细胞虽然也有不同程度的损伤,但是相较于 UVB 处理组损伤明显减轻。



注: a) 紫色越深表示细胞存活率越高。b) - 空白组, + UVB 处理组; 下同。

Note: a) the darker the purple, the higher the survival rate of cell. b) - blank control group, + UVB treatment group; the same as below.

图 2 不同浓度 PP I 对紫外线损伤 HaCaT 细胞增殖的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of PP I on the proliferation of HaCaT cells damaged by ultraviolet radiation

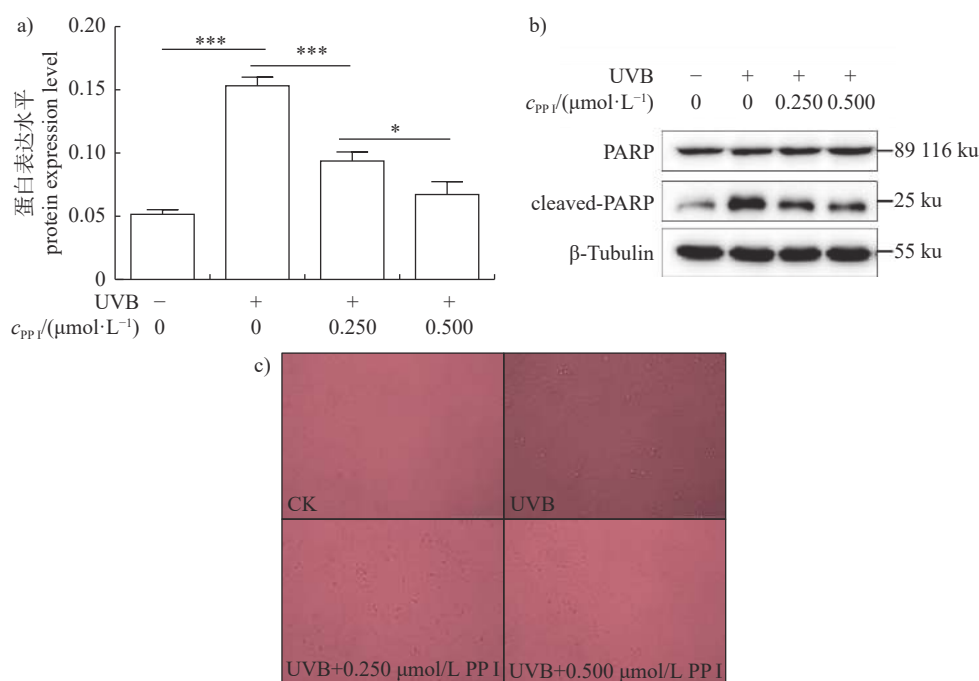


图 3 不同浓度 PP I 对凋亡蛋白 cleaved-PARP1 表达 (a 和 b) 以及 HaCaT 细胞形态 (c) 的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of PP I on the expression of apoptotic protein cleaved-PARP1 (a and b) and the morphology of HaCaT cell (c)

2.4 PP I 对 SIRT3 和 SOD2 表达水平的影响

由图 4 可知: 与空白对照组相比, UVB 处理下 SIRT3 的表达水平显著降低, 而加入 PP I 则可在一定程度上增加紫外损伤 HaCaT 细胞 SIRT3 蛋白的表达水平, 且 0.250 $\mu\text{mol/L}$ PP I 的效果优于 0.500 $\mu\text{mol/L}$ PP I。

由图 5 可知: UVB 处理使细胞内赖氨酸的乙

酰化水平增加, 而加入 PP I 处理后赖氨酸的乙酰化水平降低; UVB 照射可以显著诱导 SOD2 蛋白的 K68 位点发生乙酰化修饰, PP I 的加入则降低了 SOD2 的乙酰化修饰水平。因此, PP I 可能是通过 SIRT3 使 SOD2 去乙酰化, 增强 SOD2 活性, 减轻 UVB 引起细胞凋亡, 从而减缓细胞的紫外损伤。

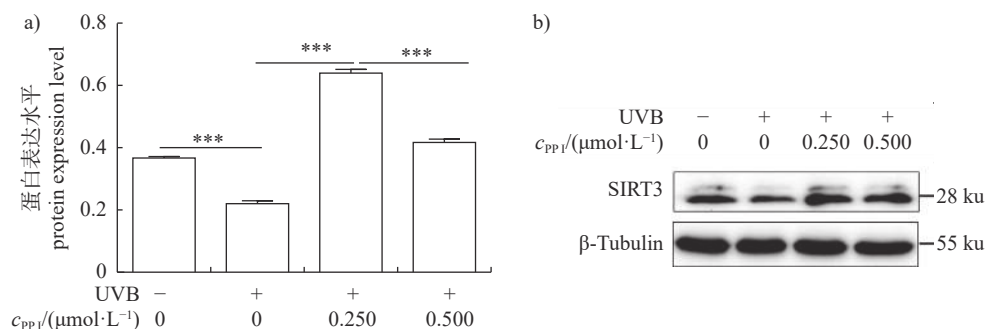


图4 不同浓度 PP I 对 SIRT3 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of different concentrations of PP I on the expression of SIRT3 protein

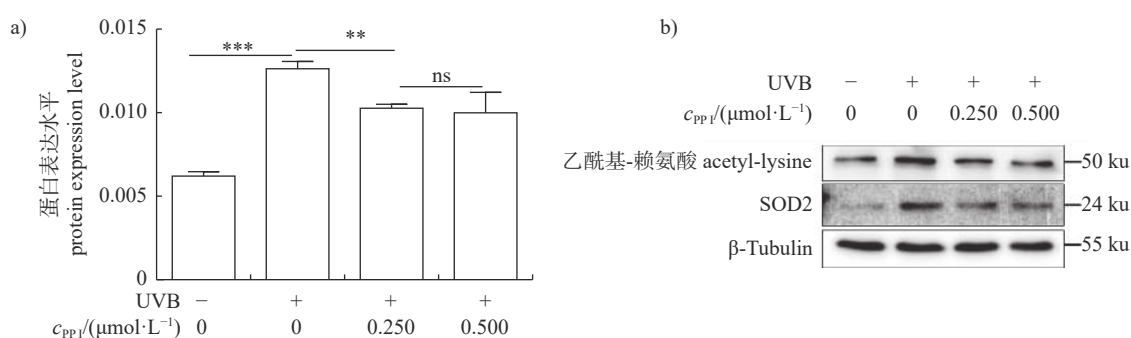


图5 不同浓度 PP I 对 SOD2 和乙酰基-赖氨酸蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of different concentrations of PP I on the expression of SOD2 and acetyl-lysine protein

3 讨论

在皮肤外源老化的诸多诱因中,最主要的便是紫外线引起的细胞氧化应激。皮肤细胞在接受紫外线辐射时会产生高浓度的自由基,使线粒体内的电子传递链发生泄漏,产生活性氧,造成氧化应激,进而导致细胞凋亡^[12]。SIRT3 是位于线粒体基质中的一类去乙酰化酶,是一种 NAD^+ 依赖的脱乙酰基酶,它能够将 ADP-核糖从 NAD^+ 转移至底物,并去掉底物中赖氨酸残基上的乙酰基,从而生成烟酰胺和去乙酰化的底物肽,许多转录后翻译的蛋白质经去乙酰化修饰可以激活其活性,是细胞能量代谢和氧化还原状态的关键调节器^[13-15]。SOD2 是位于线粒体基质中的一类超氧化物歧化酶,它以锰离子为活性中心,通过将超氧阴离子转化为毒性较低的过氧化氢使机体免受氧化应激的损伤^[16-17]。SOD2 的乙酰化水平与其清除自由基的能力息息相关^[18],SOD2 作为 SIRT3 的去乙酰化反应底物之一,SIRT3 的激活可进一步增加 SOD2 的活性,降低细胞的紫外损

伤。因此,PP I 可能是通过 SIRT3 使 SOD2 去乙酰化,增强 SOD2 活性,减轻 UVB 引起的细胞凋亡,从而减缓细胞的紫外损伤。

PP I 作为甾体皂苷类物质,除了作为供氢体发挥清除自由基的功能外^[10],还能够通过抑制 STAT3 和 VEGF 蛋白的表达从而缓解缺氧引起的 HaCaT 细胞损伤^[9]。LI 等^[19]研究发现:在细胞凋亡前的滞后期,PP I 通过有丝分裂促进了细胞的存活,延缓线粒体凋亡,进而降低细胞氧化损伤。这与本研究的结果基本一致,均证明了 PP I 清除氧化应激的方式是多样的。本研究表明:低浓度的 PP I 可以通过增加 SIRT3 和 SOD2 的表达缓解 UVB 引起的紫外损伤,降低细胞凋亡水平,但是,SIRT3 与 PP I 是否有直接的相互作用仍不清楚,还需要更加深入的研究。

4 结论

PP I 可以通过增加 SIRT3 的表达和活化进一步激活 SOD2,从而降低细胞内的 ROS 水平以减轻 UVB 引起的氧化应激,从而表现出抗氧化作

用。本研究可为 PP I 的抗皮肤紫外损伤机制提供一定的理论依据,同时可为深入开发抗皮肤紫外损伤的功能产品及含 PP I 的天然产物应用提供新思路。

[参考文献]

- [1] 王小燕, 刘子菁, 马仁燕, 等. 皮肤光老化研究新进展[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2019, 35(5): 305. DOI: [10.12144/zgmfskin201905305](#).
- [2] ZILLICH O V, SCHWEIGERT W U, EISNER P, et al. Polyphenols as active ingredients for cosmetic products[J]. International Journal of Cosmetic Science, 2015, 37(5): 455. DOI: [10.1111/ics.12218](#).
- [3] 郑锦芬, 陆春, 赖维. 基质金属蛋白酶抑制剂抗光老化的研究进展[J]. 中国美容医学, 2010, 19(7): 1087. DOI: [10.3969/j.issn.1008-6455.2010.07.070](#).
- [4] SEOK J K, LEE J W, KIM Y M, et al. Punicalagin and (-)-epigallocatechin-3-gallate rescue cell viability and attenuate inflammatory responses of human epidermal keratinocytes exposed to airborne particulate matter PM-10[J]. Skin Pharmacology and Physiology, 2018, 31(3): 134. DOI: [10.1159/000487400](#).
- [5] 吴斯敏, 杨慧龄. 紫外线引起皮肤光老化机制及防治的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(2): 341. DOI: [10.3969/j.issn.1006-2084.2018.02.025](#).
- [6] YUE Z, YAN P W, YING H H, et al. Ginsenoside Rg1 performs anti-aging functions by suppressing mitochondrial pathway-mediated apoptosis and activating sirtuin 3 (SIRT3)/superoxide dismutase 2 (SOD2) pathway in Sca-1⁺ HSC/HPC cells of an aging rat model[J]. Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research, 2020, 26: e920661. DOI: [10.12659/MSM.920666](#).
- [7] XU H H, GAN C X, GAO Z Q, et al. Caffeine targets SIRT3 to enhance SOD2 activity in mitochondria[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2020, 8: 822. DOI: [10.3389/fcell.2020.00822](#).
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [9] 龙剑文, 皮先明, 涂亚庭. 重楼皂苷 I 对 IL-17 刺激 Ha-CaT 细胞分泌 VEGF 和 IL-23 的影响[J]. 中国皮肤性病杂志, 2016, 30(5): 453. DOI: [10.13735/j.cjdv.1001.201509086](#).
- [10] 高云涛, 杨利荣, 杨益林, 等. 重楼提取物体外清除活性氧及抗氧化作用研究[J]. 中成药, 2007, 29(2): 195. DOI: [10.3969/j.issn.1001-1528.2007.02.013](#).
- [11] YU S, WANG L J, CAO Z X, et al. Anticancer effect of polyphyllin I in colorectal cancer cells through ROS-dependent autophagy and G2/M arrest mechanisms[J]. Natural Product Research, 2018, 32(12): 1489. DOI: [10.1080/14786419.2017.1353512](#).
- [12] 王雪, 杨智, 万屏, 等. 皮肤光老化信号通路及激光、强脉冲光对信号通路影响的研究新进展[J]. 中国皮肤性病杂志, 2015, 29(6): 629. DOI: [10.13735/j.cjdv.1001-7089.201403171](#).
- [13] SARA I, LUIGINO A G, FILOMENA L, et al. Antioxidant modulation of sirtuin 3 during acute inflammatory pain: the ROS control[J]. Pharmacological Research, 2020, 157: 104851. DOI: [10.1016/j.phrs.2020.104851](#).
- [14] LI Y F, OUYANG S H, TU L F, et al. Caffeine protects skin from oxidative stress-induced senescence through the activation of autophagy[J]. Theranostics, 2018, 8(20): 5713. DOI: [10.7150/thno.28778](#).
- [15] DUAN W J, LIANG L, PAN M H, et al. Theacrine, a purine alkaloid from *kucha*, protects against Parkinson's disease through SIRT3 activation[J]. Phytomedicine, 2020, 77: 153281. DOI: [10.1016/j.phymed.2020.153281](#).
- [16] LIU T, MA X R, OUYANG T X, et al. Efficacy of 5-aminolevulinic acid-ased photodynamic therapy against keloid compromised by downregulation of SIRT1-SIRT3-SOD2-mROS dependent autophagy pathway[J]. Redox Biology, 2019, 20: 195. DOI: [10.1016/j.redox.2018.10.011](#).
- [17] YUN U J, YANG D K. Sinapic acid inhibits cardiac hypertrophy via activation of mitochondrial SIRT3/SOD2 signaling in neonatal rat cardiomyocytes[J]. Antioxidants, 2020, 9(11): 1163. DOI: [10.3390/antiox9111163](#).
- [18] 阿达莱提·买买提明. SIRT3 及相关蛋白乙酰化的变化在朊病毒致病机制中作用的研究[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2019.
- [19] LI G B, FU R Q, SHEN H M, et al. Polyphyllin I induces mitophagic and apoptotic cell death in human breast cancer cells by increasing mitochondrial PINK1 levels[J]. Oncotarget, 2016, 8(6): 10359. DOI: [10.18632/oncotarget.14413](#).

责任编辑: 何承刚