

SIRT3 多酚激活剂的抗细胞氧化应激作用及机制

陈 慧, 彭雨欣, 徐莹皓, 赵 冲*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘要 建立 Caco-2 单层细胞与 HaCaT 细胞形成的迁移小室(trans-well)共培养体系,采用 HaCaT 细胞 SIRT3-EGFP 报告基因系统评价 5 种膳食多酚(白藜芦醇、山奈酚、安石榴苷、漆树黄酮、月见草素 B)对 SIRT3 基因表达的影响,并进一步评价筛选的 SIRT3 多酚激活剂对 UVB 诱导的 HaCaT 细胞氧化应激的抑制作用。结果表明:5 种膳食多酚中白藜芦醇、山奈酚、月见草素 B 均能显著增强外源及内源性 SIRT3 基因的表达。其中,月见草素 B 可显著降低 HaCaT 细胞内 ROS 水平,而下调 SIRT3 的表达明显降低了月见草素 B 对 UVB 诱导的氧化应激的抑制作用。结论:在 Caco-2 与 HaCaT 细胞共培养体系下,月见草素 B 对 HaCaT 细胞氧化应激的抑制作用依赖于 SIRT3 的调控。

关键词 多酚; SIRT3; 细胞共培养; 氧化应激

文章编号 1009-7848(2022)01-0012-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.01.002

多酚是植物性食物中广泛存在的一种非营养成分,根据其化学结构特点主要分为酚酸、类黄酮、芪类、香豆素、单宁等,具有丰富的生物活性,如抗氧化、抗炎、抗衰老、抗动脉粥样硬化、抗代谢性疾病、抗菌和光损伤保护作用等,在促进人体健康、美容护肤等方面发挥重要作用^[1-3]。日常膳食中多酚的主要来源包括水果、蔬菜、全谷物、香草、香料、咖啡豆和茶叶等^[4]。本课题组前期研究发现部分多酚类化合物可直接作用于 Caco-2 或 HaCaT 细胞,促进 SIRT3 的转录表达,上调抗氧化酶 SOD2 的活性,从而增强细胞的抗氧化能力,缓解细胞的氧化应激损伤^[5-6]。近年来,临床发现皮肤与肠道之间具有密切的关系。肠道吸收异常会引发皮肤病,如肠病性肢端皮炎、皮肤过敏、银屑病等,而患有这些皮肤病的同时,肠道也会表现出腹胀、腹泻、大便粘稠等症状^[7-8]。多酚类化合物经肠道吸收后,是否还能发挥保护作用需要进一步探究。

Caco-2 细胞来源于人结肠腺肿瘤,可在体外培养条件下自发分化形成连续单层的肠上皮样细胞,与肠道上皮细胞在形态学和生理功能上具有相似性^[9-10]。由于 Caco-2 单层细胞模型简便、高效的特点,国内外通常将其作为体外模拟肠道吸收

模型,应用于大量口服药物的筛选以及药物的转运吸收研究中^[11-12]。近年来在食品领域,特别是膳食活性成分的功能研究领域也开始运用 Caco-2 单层细胞模型预测活性成分在体内的吸收情况,如利用 Caco-2 单层细胞模型检测类胡萝卜素类化合物的运输效率,发现虾青素的运输效率最高^[13];利用 Caco-2 细胞单层模型评价蓝莓花色苷类化合物的吸收情况,可以得到花色苷在 Caco-2 细胞单层的吸收规律,即羟基基团越多,-OCH₃基团越少,其渗透性越差^[14]。通过对膳食活性成分在 Caco-2 单层细胞模型吸收、转运情况的探究,筛选高效的目标活性物质。此外,将膳食活性成分处理 Caco-2 单层细胞后与靶细胞共培养,则能直观反映活性成分在肠道吸收后对靶器官或组织的影响。

前期研究表明,白藜芦醇、山奈酚、安石榴苷、漆树黄酮 4 种多酚均能促进 HaCaT 细胞 SIRT3 基因的表达,是潜在的 SIRT3 多酚激活剂,其中白藜芦醇、安石榴苷、漆树黄酮降低了 UVB 诱导的 HaCaT 细胞内 ROS 水平,安石榴苷对 UVB 引起的细胞衰老具有修复作用^[6]。这些多酚类化合物对 HaCaT 细胞的保护作用极有可能与 SIRT3 介导的抗氧化途径有关。在此基础上,本文进一步探究这 4 种多酚类化合物以及月见草素 B 在被肠道转运后的保护作用及机制。通过建立 Caco-2 与 HaCaT 细胞 trans-well 共培养体系,体外模拟肠道转运吸收,从以下两个方面探究白藜芦醇、山奈酚、安石

收稿日期: 2021-01-18

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31901691)

作者简介: 陈慧(1992—),女,博士生

通信作者: 赵冲 E-mail: zhaoch0206@cau.edu.cn

榴苷、漆树黄酮以及月见草素 B 这 5 种多酚类化合物的保护作用:一是多酚对 HaCaT 细胞 SIRT3 的间接激活作用,二是多酚对 UVB 诱导的 HaCaT 细胞氧化应激的间接抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

白藜芦醇、山奈酚、安石榴苷、漆树黄酮和月见草素 B 的来源见表 1,化学结构参照 Ito 等^[15]的研究结果。

表 1 多酚类化合物

Table 1 Polyphenols			
分类	中文名称	英文名称	来源
芪类	白藜芦醇	Resveratrol	葡萄
黄酮类	山奈酚	Kaempferol	茶叶
	漆树黄酮	Fisetin	青稞
单宁类	安石榴苷	Punicalagin	石榴
	月见草素 B	Oenothien B	石榴

人结直肠腺癌细胞(Caco-2)、人正常皮肤永生角质形成细胞(HaCaT),日本理研生物资源中心(筑波,日本);4孔板细胞培养皿、0.4 μm 高密度半透明 PET 膜,美国 Corning 公司;DMEM 培养基,日本 Nissui 公司;0.25%胰蛋白酶消化液、胎牛血清,美国 Life Technologies 公司;总 RNA 提取试剂盒,日本 Roche 公司;pEGFP-C3 荧光蛋白报告系统,日本 Takara 公司;慢病毒表达质粒 pSUPER.retro.puro,美国 OligoEngine 公司;HilyMax 转染试剂,日本 Dojindo 公司;聚凝胺,美国 Merck Millipore 公司;Thunderbird SYBR qPCR Mix 荧光定量 PCR 试剂盒,日本 Tiyobo 公司;BES-H2O2-Ac 过氧化氢荧光探针,日本 WAKO 公司。

1.2 仪器与设备

CO₂ 培养箱,美国 Thermo 公司;细胞电阻仪 Millicell-ERS-2,美国 Millipore 公司;Thermal Cycler Dice Real Time System TP-800 实时荧光定量 PCR 仪,日本 Takara 公司;IN Cell Analyzer 1000,英国 GE Healthcare 公司;CL-1000 紫外光联仪,美国 UVP 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 Caco-2 细胞的分化 Caco-2 细胞,采用含

10%胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。选取培养至 3~6 代的处于对数生长期的 Caco-2 细胞,接种于细胞培养小室的 PET 膜上(AP 侧,Apical side),密度为 2×10⁵/mL,体积 250 μL,在小室的下侧(BL 侧,Basolateral side)加入 750 μL DMEM 完全培养基。每 3 d 更换一次培养基,进行 Caco-2 细胞的自发分化。空白对照组中 AP 侧和 BL 侧中加入对应等量的 DMEM 完全培养基。

1.3.2 单层 Caco-2 细胞跨膜电阻值(TEER)的测定 Caco-2 细胞自发分化后会形成连续的单层细胞。采用细胞电阻仪测定单层 Caco-2 细胞的 TEER 值。首先将电极放入预热至 37 °C 的 Hank's 平衡盐溶液(Hank's balanced salt solution, HBSS)中平衡 20 min。吸走 AP 侧和 BL 侧的培养基,在 AP 侧和 BL 侧分别加入 500 μL 和 1.5 mL 的 HBSS 洗涤,重复 2 次。吸走 HBSS 后,在 AP 侧和 BL 侧分别加入 500 μL 和 1.5 mL 的 HBSS,检测单层细胞两侧的跨膜电阻。空白对照组也按照以上操作,获得空白值。TEER 值($\Omega \cdot \text{cm}^2$)=(测定电阻值-空白值)/单层表面积。试验重复 3 次。通过测定 Caco-2 细胞的 TEER 值,可以判断 Caco-2 细胞是否形成紧密连续的单层细胞。

1.3.3 Caco-2 细胞与 HaCaT 细胞 trans-well 共培养体系的建立 HaCaT 细胞,采用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 37 °C、5%CO₂ 的细胞培养箱中培养。将处于对数生长期的 HaCaT 细胞接种于 24 孔板,每孔细胞数量为 1×10⁵,待细胞完全贴壁后,将接种有自发分化形成紧密连续的单层 Caco-2 细胞的小室,置于接种有 HaCaT 细胞的 24 孔板上,即形成 Caco-2 细胞与 HaCaT 细胞 trans-well 共培养体系,AP 侧为 Caco-2 细胞,BL 侧为 HaCaT 细胞。在共培养体系的 AP 侧分别加入终浓度为 10 μmol/L 的白藜芦醇、山奈酚、安石榴苷、漆树黄酮、月见草素 B,对照组中加入等量的 DMSO。整个共培养体系在 37 °C、5%CO₂ 的条件下继续培养 48 h,用于下一步试验。

1.3.4 构建 HaCaT 细胞 SIRT3-EGFP 报告基因系统 HaCaT 细胞 SIRT3-EGFP 报告基因系统的构建参考 Zhao 等^[5]的方法。以人类基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增人类 SIRT3 启动子(-653 -

-1), 将其装入无启动子的 pEGFP-C3 表达载体中, 得到特定的 pSIRT3p-EGFP 质粒。将构建的 pSIRT3p-EGFP 质粒转染 HaCaT 细胞, 用于评价受试物对 SIRT3 启动子活性的影响。利用 IN Cell Analyzer 1000 监测 EGFP 荧光的变化, 可定量测定 SIRT3 启动子的活性。SIRT3 激活剂筛选系统如文献[6]中的图 1 所示。试验重复 3 次。

1.3.5 HaCaT 细胞 SIRT3 基因表达水平的测定

按照总 RNA 提取试剂盒说明提取细胞 RNA, 参照 Fujiki 等^[6]的方法反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板, 根据 Thunderbird SYBR qPCR Mix 试剂盒说明进行半定量实时荧光定量聚合酶链式反应 (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR), 测定细胞 *SIRT3* 基因 mRNA 表达水平。 β -actin 为内参基因。*SIRT3* 和 β -actin 基因的 PCR 引物序列见表 2。试验重复 3 次。

1.3.6 评价 SIRT3 多酚激活剂对 UVB 诱导 HaCaT 细胞产生 ROS 的清除作用

Caco-2 细胞培养 14 d 后, 自发分化形成紧密连续的单层细胞, 可以用于下一步试验。第 15 天将需要评价的受试物加入含有 Caco-2 细胞的 AP 侧, 培养 48 h 后收集 BL 侧的培养液, 并于 -80 °C 保存以备用。

将处于对数生长期的 HaCaT 细胞接种于 10 mm 细胞培养皿中, 每孔的细胞数量为 5×10^5 。培养 24 h 后, 吸出培养基, 加入少量磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 覆盖细胞, 利用紫外交叉仪对细胞进行紫外线处理, 照射剂量为 $8 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ 。24 h 后, 使用 0.25% 胰蛋白酶消化液消化 HaCaT 细胞, 将其重新接种于 96 孔板, 培养 6 h 后, 吸走培养基, 加入

之前回收的已解冻预热的 Caco-2 细胞培养体系中 BL 侧的培养液, 培养 48 h 后测定 HaCaT 细胞内活性氧含量。试验重复 3 次。

1.3.7 HaCaT 细胞内活性氧含量的测定

采用过氧化氢特异性荧光探针 BES-H₂O₂-Ac 法测定细胞内活性氧分子 (Reactive oxygen species, ROS) 的含量。吸出培养基, 用 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, HEPES, pH = 7.4] 缓冲液洗涤细胞 2 次, 然后加入终浓度为 $5 \mu\text{mol}/\text{L}$ 的 BES-H₂O₂-Ac 和 Hoechst 33342 染料, 37 °C 培养箱内孵育 30 min。消化并收集细胞, HEPES 润洗 2 次后用显微细胞图像分析测定系统 IN Cell Analyzer 1000 进行检测。

1.3.8 shSIRT3-HaCaT 细胞模型的构建

shSIRT3-HaCaT 细胞模型按照先前建立的方法^[7]构建。设计靶向 *SIRT3* 基因特异性短发夹 RNA (shRNA) 表达的引物序列 (表 2) 并连接到慢病毒表达质粒 pSUPER.retro.puro 中, 成功构建慢病毒重组表达质粒 pSUPER-puro-shSIRT3。使用 HilyMax 转染试剂将 pGag-pol, pVSV-G 质粒以及构建的重组表达质粒 pSUPER-puro-shSIRT3 共转染 293T 细胞后, 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h 之后, 弃去旧培养基, 用含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养 24 h。收集病毒上清液, 并添加 10 mg/mL 聚凝胺, 用于感染 HaCaT 细胞。24 h 后, 在 HaCaT 细胞中添加 $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素, 处理 3 d, 筛选得到 pSUPER-puro-shSIRT3 稳转 HaCaT 细胞系。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

基因名称	序列方向	碱基序列
<i>SIRT3</i>	上游引物	5'-CTGTACAGCAACCTCCAGCA-3'
<i>SIRT3</i>	下游引物	5'-CTCCTTGCCCAAAGTGAAAA-3'
β -actin	上游引物	5'-TGGCACCAGCACAATGAA-3'
β -actin	下游引物	5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'
sh <i>SIRT3</i>	Top 链	5'-GATCCCCCAACGTCACCTACTACTTTTTTCGAAGAGAAAAGTAGTGAGTGACGTTGGGTTTTTA-3'
sh <i>SIRT3</i>	Bottom 链	5'-AGCTTAAAAACCAACGTCACCTACTACTTTTCTTCGAAAAAGTAGTGACTGACGTTGGGGG-3'

1.4 数据统计分析

试验数据采用软件 SPSS 19.0 进行统计学分析,组间比较采用单因素 ANOVA 方差分析, Turkey 法进行事后检验,结果以“平均数±标准差”表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 单层 Caco-2 细胞跨膜电阻值的测定结果

Caco-2 细胞可在体外培养条件下自发进行上皮样分化,并且形成紧密连接的单层。TEER 值用于评价单层 Caco-2 细胞是否形成了致密的紧密连接。本试验分别测定了 Caco-2 细胞在体外培养 3 d 及 14 d 时的 TEER 值,结果如图 1 所示。Caco-2 细胞在体外培养 14 d 时,TEER 值显著高于培养 3 d 时细胞的 TEER 值,且其远远大于 $500 \Omega \cdot \text{cm}^2$,表明单层 Caco-2 细胞具有足够的紧密连接和完整性^[18-19]。因此,选择在 Caco-2 细胞培养 14 d 时,建立 Caco-2 和 HaCaT 细胞共培养体系。

2.2 多酚类化合物对 HaCaT 细胞 SIRT3 表达的影响

构建 HaCaT 细胞 SIRT3-EGFP 报告基因系统,在 Caco-2 和 HaCaT 细胞共培养体系(图 2)中分别评价了白藜芦醇(Resveratrol, RSV)、山奈酚(Kaempferol)、安石榴苷(Punicalagin)、漆树黄酮(Fisetin)、月见草素 B(Oenothain B)这 5 种多酚类化合物在干预 Caco-2 细胞后,对 HaCaT 细胞 SIRT3 表达的影响,结果如图 3、图 4 所示。利用 IN Cell Analyzer 1000 对细胞内 EGFP 荧光定量分析结果显示,在多酚类化合物的干预下,HaCaT 细胞内 EGFP 荧光强度相比于对照组(DMSO)均显著增强。利用 qRT-PCR 技术进一步检测 HaCaT 细胞内源性 SIRT3 基因 mRNA 表达水平的结果显示,白藜芦醇、山奈酚、月见草素 B 显著上调了该基因的表达水平,而安石榴苷与漆树黄酮没有显著影响。上述研究结果表明,白藜芦醇、山奈酚、月见草素 B 可以间接增强 HaCaT 细胞 SIRT3 基因的表达。

2.3 SIRT3 多酚激活剂对 UVB 诱导 HaCaT 细胞产生 ROS 的清除作用

在共培养体系中,本文进一步评价了能够激活 SIRT3 表达的 3 种多酚类化合物对 UVB 诱导

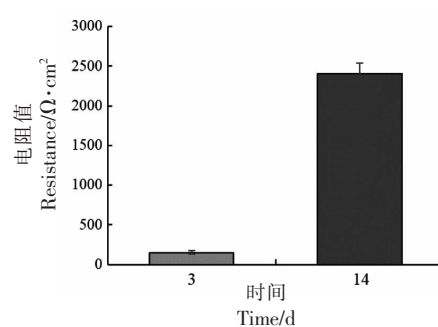


图 1 培养时间对 Caco-2 细胞跨膜电阻值的影响

Fig.1 Effects of culture time on trans-epithelial resistance of Caco-2 cells

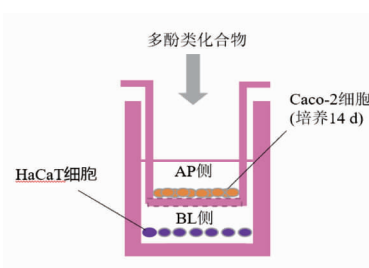
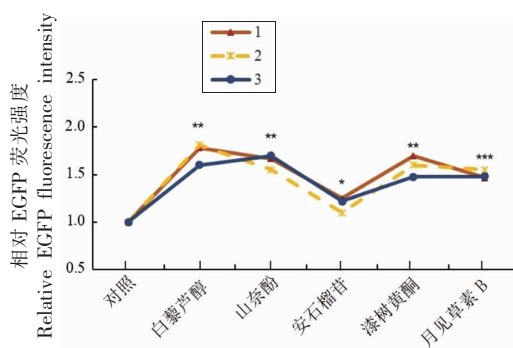


图 2 Caco-2 与 HaCaT 细胞 trans-well 共培养体系

Fig.2 Trans-well co-culture system of Caco-2 and HaCaT cells

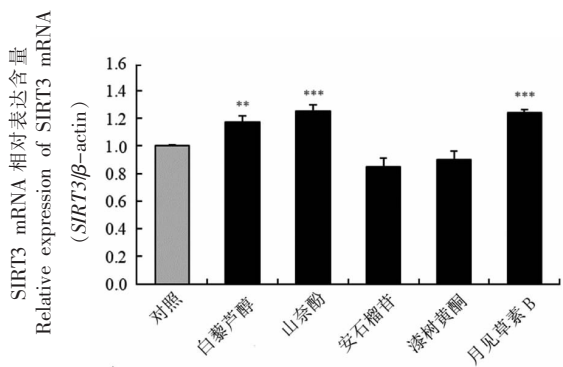


注:*. 与对照组相比较, $P < 0.05$; **. 与对照组相比较, $P < 0.01$; ***. 与对照组相比较, $P < 0.001$ 。

图 3 多酚类化合物对 EGFP 荧光强度的影响

Fig.3 Effects of polyphenols on EGFP fluorescence intensity

的 HaCaT 细胞内 ROS 的清除作用。如图 5 所示,在 UVB 照射条件下,HaCaT 细胞内 ROS 的含量显著增加($P < 0.01$),提示 HaCaT 细胞在 UVB 照射下发生了氧化应激;白藜芦醇、山奈酚、月见草素 B 在 Non-UVB 条件下对细胞内 ROS 的产生没有显著影响;而在 UVB 照射条件下,月见草素 B 极



注:**. 与对照组相比较, $P < 0.01$; ***. 与对照组相比较, $P < 0.001$.

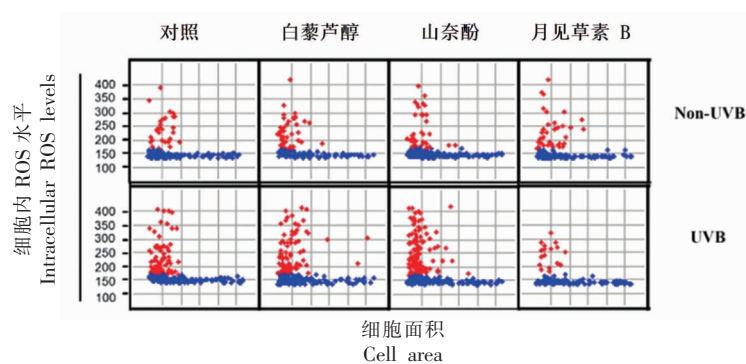
图4 多酚类化合物对 *SIRT3* mRNA 表达水平的影响
Fig.4 Effects of polyphenols on *SIRT3* mRNA expression

显著地降低了 HaCaT 细胞内 ROS 水平;白藜芦醇和山奈酚并未显著清除 UVB 诱导的过量 ROS 的产生。综上所述,在 Caco-2 和 HaCaT 细胞共培养

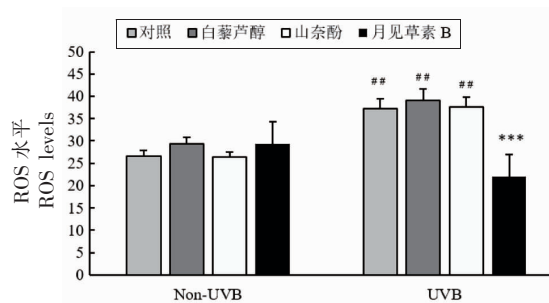
体系下,月见草素 B 具有降低 UVB 诱导的 HaCaT 细胞氧化应激的作用。

2.4 *SIRT3* 介导月见草素 B 调控 HaCaT 细胞氧化应激水平

为了进一步验证月见草素 B 清除 HaCaT 细胞中 UVB 诱导的 ROS 是否依赖于 *SIRT3*,本试验按照 1.3.8 节的方法建立了 HaCaT 细胞 *SIRT3* 基因沉默模型,并按照 1.3.6 节的方法评价了月见草素 B 对 Mock-HaCaT 细胞以及 sh*SIRT3*-HaCaT 细胞中 UVB 诱导产生的 ROS 的清除作用。结果如图 6 所示。在 Mock-HaCaT 细胞中,月见草素 B 对 UVB 诱导的 ROS 具有显著的清除作用,ROS 水平比 DMSO 处理组降低了 14%;当 *SIRT3* 基因沉默后,月见草素 B 不再有效地抑制 ROS 的产生。由此可见,月见草素 B 对细胞内 ROS 的清除作用具有 *SIRT3* 依赖性。



(a)高 ROS 水平细胞相对数量的散点图



(b)细胞 ROS 水平定量测定结果

注:***. 与 UVB-对照组相比较, $P < 0.001$; ##. 与 Non-UVB-对照组相比较, $P < 0.01$.

图5 具有激活 *SIRT3* 转录作用的多酚类化合物对 Non-UVB 及 UVB 照射下细胞内 ROS 含量的影响

Fig.5 Effects of polyphenols with *SIRT3* activation activity on intracellular ROS levels induced by Non-UVB exposure and UVB exposure

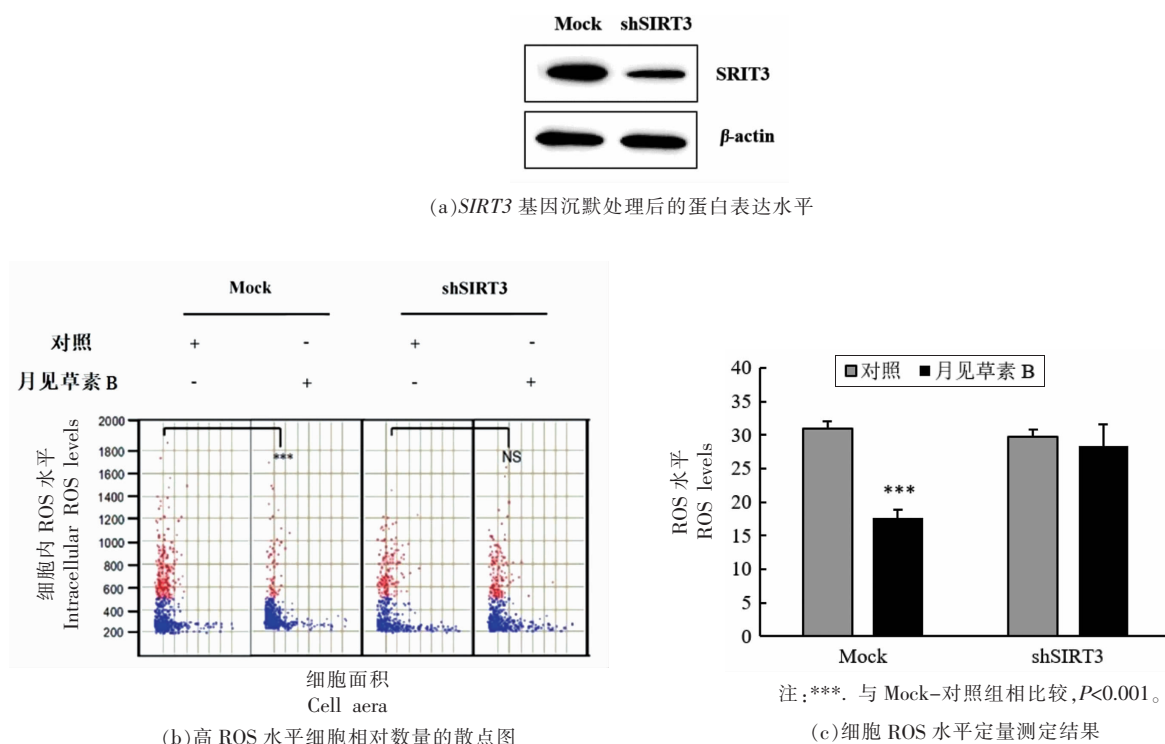


图 6 月见草素 B 对 UVB 照射条件下的 Mock 和 *SIRT3* 基因沉默 (*shSIRT3*) HaCaT 细胞内 ROS 水平的影响

Fig.6 Effects of oenothein B on intracellular ROS levels in UVB-irradiated Mock- and *SIRT3*- silenced (*shSIRT3*) HaCaT cells

3 讨论

本文构建了 HaCaT 细胞 *SIRT3*-EGFP 报告基因系统, 在 Caco-2 细胞及 HaCaT 细胞共培养体系中, 评价了白藜芦醇、山奈酚、安石榴苷、漆树黄酮、月见草素 B 这 5 种多酚类化合物在肠道吸收后对 HaCaT 细胞 *SIRT3* 表达的影响, 以及对 UVB 诱导的 HaCaT 细胞氧化应激的抑制作用。研究发现, 在 Caco-2 与 HaCaT 细胞共培养体系下, 月见草素 B 降低了 HaCaT 细胞氧化应激水平, *SIRT3* 介导了其 ROS 的调控。

在前期研究发现白藜芦醇、山奈酚、安石榴苷、漆树黄酮均能够在激活 HaCaT 细胞中 *SIRT3* 的表达。为了进一步探究几种多酚化合物在经过肠道吸收后, 对 HaCaT 细胞的影响, 构建了 Caco-2 与 HaCaT 细胞共培养体系。结果表明, 白藜芦醇、山奈酚、安石榴苷、漆树黄酮以及月见草素 B 均能显著增强 HaCaT 细胞外源性 *SIRT3* 的表达。内源性 *SIRT3* mRNA 表达结果表明, 安石榴苷在共培养体系下并不能激活 HaCaT 细胞的 *SIRT3*

基因的转录表达。前期研究发现, 当安石榴苷作用于单独培养的 HaCaT 细胞时, 它可以显著激活 HaCaT 细胞 *SIRT3* 基因的表达^[6]; 当它作用于单独培养的 Caco-2 细胞时, 并没有影响其 *SIRT3* 基因的转录活性^[5]。*P*-糖蛋白是一种跨膜转运糖蛋白, 主要分布于细胞质膜上, 是主要的外排转运蛋白, 也是耐药形成的重要因素^[20-21]。多项研究报道安石榴苷是 *P*-糖蛋白的底物, *P*-糖蛋白参与了安石榴苷的转运过程^[22-24]。由此推测, 上述原因可能导致了 Caco-2 细胞对安石榴苷的吸收率低, 进一步影响 HaCaT 细胞中 *SIRT3* 的表达。白藜芦醇、山奈酚、漆树黄酮作用于单独培养的 Caco-2 细胞与 HaCaT 细胞均能显著增强两种细胞 *SIRT3* 的表达^[5-6], 然而在共培养体系下, 白藜芦醇和山奈酚表现出显著的 *SIRT3* 激活作用, 漆树黄酮并未激活 *SIRT3* 的表达。漆树黄酮与山奈酚均属于黄酮醇类化合物, 也是同分异构体, 二者的差别在于山奈酚的 A 环 C5 位上多了一个羟基, 而漆树黄酮的 B 环 C5' 位上多了一个羟基。结构差异可能导致其

渗透性以及通过细胞单层所需要的共轭结合力的差异,从而导致漆树黄酮的作用效果不显著,而山奈酚却具有良好的效果^[25-26]。

综合上述结果可知,本文共筛选得到3种多酚(白藜芦醇、山奈酚以及月见草素B),可增强共培养体系下HaCaT细胞的*SIRT3*基因表达。*SIRT3*是去乙酰化酶(Sirtuin)家族中的一员,主要位于线粒体中,可以发挥去乙酰化活性,调节线粒体的功能、再生和动态,从而维持氧化还原稳态,以防止细胞代谢过程中发生的氧化应激^[27-28]。在共培养体系中,通过UVB诱导HaCaT细胞发生氧化应激,评价了白藜芦醇、山奈酚、月见草素B对活性氧的清除作用。试验数据表明,月见草素B显著减少了细胞内ROS水平。为了进一步验证*SIRT3*在月见草素B改善UVB诱导的细胞氧化应激中的必要性,本文构建了*SIRT3*基因沉默的HaCaT细胞,结果表明*SIRT3*基因表达的沉默显著抑制了月见草素B对ROS的清除能力。研究表明,桉叶水提物可显著减少抑制f-MLP(Formyl-met-leuphenylalanine)和PMA(4 β -phorbol-12 β -myristate- α 13-acetate)诱导的人中性粒细胞活性氧的产生,而且很大程度上归因于桉叶水提物中含有的月见草素B^[29]。Chen等^[30]发现月见草素B可减少线虫衰老过程中ROS的累积,并延长其寿命,其主要的靶点包括insulin/IGF-1、饮食限制以及线粒体电子传递链等途径上的关键基因。月见草素是一种潜在的高效抗氧化剂,并有助于延缓衰老。本研究发现月见草素B对UVB诱导的细胞活性氧也有很好的清除效果,并且为月见草素B的抗氧化机制提供了新的思路。

综上所述,本文首次发现了月见草素B在Caco-2与HaCaT细胞共培养体系中,增强HaCaT细胞*SIRT3*基因的表达,并抑制UVB引起的HaCaT细胞的氧化应激水平,其抗氧化作用具有*SIRT3*依赖性。月见草素B在单独培养的Caco-2细胞中并没有影响其*SIRT3*基因的表达^[5]。因此,月见草素B是通过Caco-2细胞的吸收、转运后,以原型的方式作用于HaCaT细胞,还是通过Caco-2细胞的代谢作用产生的活性物质作用于HaCaT细胞,尚有待研究。今后可进一步探究月见草素B在Caco-2细胞单层模型中的摄取特性、转

运机制以及代谢产物的组成。再者,体外模拟肠道吸收的条件与实际情况还存在偏差,因此月见草素B的体内药动学研究对于优化其生物利用度、发挥其最佳的功效具有重要意义。此外,月见草素B可能通过影响Caco-2细胞自身分泌物的改变,而间接影响HaCaT细胞。研究表明,肌肽是一种*SIRT3*的激活剂,可促进Caco-2细胞分泌可激活神经元SH-SY5Y细胞的外泌体,并促进外泌体中一种新型miRNA-miR-6769-5p的表达,从而增强了其靶基因*ATXN1*的表达,激活SH-SY5Y细胞^[31]。多项研究发现靶向调节*SIRT3*的miRNA有很多,如miRNA-31、miRNA-1、miRNA-19b和miRNA-320等^[32-33]。因此,从miRNA层面深入探究在Caco-2与HaCaT细胞共培养体系下,月见草素B依赖*SIRT3*发挥抗氧化作用的分子机制是个潜在的研究方向。本文的研究为月见草素B作为食品功能因子的开发提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] 左丹, 廖霞, 李瑶, 等. 基于肠道吸收机制的膳食多酚代谢研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(7): 266-271.
ZUO D, LIAO X, LI Y, et al. Progress in research on dietary polyphenols metabolism based on a mechanism involving intestinal absorption[J]. Food Science, 2017, 38(7): 266-271.
- [2] CHERUBIM D J, MARTINS C V, FARIÑA L, et al. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications[J]. Journal of Cosmetic Dermatology, 2019, 19(1): 33-37.
- [3] GÜNEŞ B A, AKSOY A N, KOÇYİĞİT A. The Importance of polyphenols as functional food in Health[J]. Bezmialem Science, 2019, 7(2): 157-163.
- [4] YANG J, DWYER J T, PETERSON J J. Polyphenols in foods[J]. Nutrition Today, 2016, 51(6): 290-300.
- [5] ZHAO C, SAKAGUCHI T, FUJITA K, et al. Pomegranate-derived polyphenols reduce reactive oxygen species production via *SIRT3*-mediated *SOD2* activation[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016, 2016: 1-9.

- [6] 陈慧, KATAKURA Y, 扈洪波, 等. SIRT3 多酚激活剂的筛选及其对 UVB 诱导皮肤细胞衰老的修复作用[J]. 食品科学, 2020, 42(5): 115-121.
CHEN H, KATAKURA Y, HU H B, et al. Anti-aging effects of SIRT3-augmenting polyphenols on UVB-irradiated HaCaT cells[J]. Food Science, 2020, 42(5): 115-121.
- [7] 段云峰, 金锋. 肠道微生物与皮肤疾病-肠-脑-皮轴研究进展[J]. 科学通报, 2017, 62(5): 360-371.
DUAN Y F, JIN F. Gut microbes and skin disease, gut-brain-skin axis: A review (in Chinese)[J]. Chinese Science Bulletin, 2017, 62(5): 360-371.
- [8] DOHIL M. The skin-gut connection[J]. Australasian Journal of Dermatology, 2012, 53(4): A8.
- [9] ARTURSSON P, PALM K, LUTHMAN K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012, 64: 280-289.
- [10] 黄海智, 陈健乐, 程焕, 等. Caco-2 细胞模型预测活性物质吸收代谢的研究进展[J]. 中国食品学报, 2015, 15(1): 164-172.
HUANG H Z, CHEN J L, CHENG H, et al. Research progress of Caco-2 models in absorption and metabolism of active substance[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(1): 164-172.
- [11] FEARN R A, HIRST B H. Predicting oral drug absorption and hepatobiliary clearance: Human intestinal and hepatic *in vitro* cell models[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2006, 21(2): 168-178.
- [12] 沈凯, 王景田. 药物肠吸收实验研究方法进展[J]. 中国新药杂志, 2003, 12(12): 988-991.
SHEN K, WANG J T. Progress in experimental methods for study of drugs' intestinal absorption[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2003, 12(12): 988-991.
- [13] LAURIE O, RYAN L, O'BRIEN N. Comparison of the uptake and secretion of carotene and xanthophyll carotenoids by Caco-2 intestinal cells[J]. Comparison of the uptake and secretion of carotene and xanthophyll carotenoids by Caco-2 intestinal cells, 2008, 98(1): 38-44.
- [14] YI W, AKOH C C, FISCHER J, et al. Absorption of anthocyanins from blueberry extracts by Caco-2 human intestinal cell monolayers[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(15): 5651-5658.
- [15] ITO H, LI P, KOREISHI M, et al. Ellagitannin oligomers and a neolignan from pomegranate arils and their inhibitory effects on the formation of advanced glycation end products[J]. Food Chemistry, 2014, 152: 323-330.
- [16] FUJIKI T, MIURA T, MAURA M, et al. TAK1 represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene[J]. Oncogene, 2007, 26(36): 5258-5266.
- [17] ZHAO C, HARUKA M, SHIORI O, et al. Identification of polyphenols that repair the ultraviolet-B-induced DNA damage via SIRT1-dependent XPC/XPA activation[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 54: 119-127.
- [18] 杨秀伟, 杨晓达, 王莹, 等. 中药化学成分肠吸收研究中 Caco-2 细胞模型和标准操作规程的建立[J]. 中西医结合学报, 2007, 5(6): 634-641.
YANG X W, YANG X D, WANG Y, et al. Establishment of Caco-2 cell monolayer model and standard operation procedure for assessing intestinal absorption of chemical components of traditional Chinese medicine[J]. Journal of Integrative Medicine, 2007, 5(6): 634-641.
- [19] 陈锐, 丁国芳, 杨最素, 等. 鲑鱼皮胶原蛋白肽在 Caco-2 细胞单层模型中的吸收机制[J]. 食品科学, 2018, 39(19): 154-161.
CHEN R, DING G F, YANG Z S, et al. Absorption mechanism of cod skin collagen peptide in Caco-2 cell monolayer model[J]. Food Science, 2018, 39(19): 154-161.
- [20] BAJAJ G, RODRIGUEZ-PROTEAU R, VENKATARAMAN A, et al. MDR1 function is sensitive to the phosphorylation state of myosin regulatory light chain[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 398(1): 7-12.
- [21] ELMELIEGY M, VOURVAHIS M, GUO C, et al. Effect of *P*-glycoprotein (*P*-gp) inducers on exposure of *P*-gp substrates: Review of clinical drug-drug interaction studies[J]. Clinical Pharmacokinetics, 2020, 59(6): 699-714.
- [22] 谢莉, 田莉, 高晓黎. 安石榴苷在 Caco-2 细胞的摄取特性研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(11): 79-82.
XIE L, TIAN L, GAO X L, et al. Uptake property

- study on punicalagin in Caco-2 cells[J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2015, 22(11): 79-82.
- [23] 周本宏, 李旷宇, 姜姗, 等. 安石榴苷在 Caco-2 细胞模型的肠吸收机制[J]. 中国现代中药, 2019, 21(3): 316-322.
- ZHOU B H, LI K Y, JIANG S, et al. Transport mechanism of punicalagin based on human intestinal Caco-2 cells[J]. Modern Chinese Medicine, 2019, 21(3): 316-322.
- [24] 周本宏, 张红盼, 郭咸希, 等. 安石榴苷在 MDCK 细胞单层模型上的转运机制研究[J]. 中国药师, 2018, 21(1): 1-5.
- ZHOU B H, ZHANG H P, GUO X X, et al. Study on the transport mechanism of punicalagin in MDCK cells monolayer model[J]. China Pharmacist, 2018, 21(1): 1-5.
- [25] BARRINGTON R, WILLIAMSON G, BENNETT R N, et al. Absorption, conjugation and efflux of the flavonoids, kaempferol and galangin, using the intestinal CaCo-2/TC7 cell model[J]. Journal of functional foods, 2009, 1(1): 74-87.
- [26] TIAN X, YANG X, YANG X, et al. Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2009, 367(1/2): 58-64.
- [27] ANSARI A, RAHMAN M S, SAHA S K, et al. Function of the SIRT3 mitochondrial deacetylase in cellular physiology, cancer, and neurodegenerative disease[J]. Aging Cell, 2017, 16(1): 4-16.
- [28] ALEXANDRA S B, MARCIA C H. SIRT3 regulation of mitochondrial oxidative stress[J]. Experimental Gerontology, 2013, 48(7): 634-639.
- [29] KISS A K, BAZYLKO A, FILIPEK A, et al. Oenothien B's contribution to the anti-inflammatory and antioxidant activity of *Epilobium* sp [J]. Phytomedicine, 2011, 18(7): 557-560.
- [30] CHEN Y, ONKEN B, CHEN H, et al. Healthy lifespan extension mediated by oenothien B isolated from *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* GL9 in *Caenorhabditis elegans*[J]. Food & Function, 2020, 11(3): 2439-2450.
- [31] SUGIHARA Y, ONOUE S, TASHIRO K, et al. Carnosine induces intestinal cells to secrete exosomes that activate neuronal cells[J]. PLoS ONE, 2019, 14(5): e217394.
- [32] KAO Y, CHOU C, YE H L, et al. MicroRNA miR-31 targets SIRT3 to disrupt mitochondrial activity and increase oxidative stress in oral carcinoma [J]. Cancer Letters, 2019, 456: 40-48.
- [33] LIU J, CHEN S, BISWAS S, et al. Glucose-induced oxidative stress and accelerated aging in endothelial cells are mediated by the depletion of mitochondrial SIRT3s[J]. Physiological Reports, 2020, 8(3): e14331.

Inhibitive Effects of SIRT3-augmenting Polyphenols on Cellular Oxidative Stress

Chen Hui, Peng Yuxin, Xu Yinghao, Zhao Chong*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract In this study, the trans-well co-culture system of Caco-2 monolayer cells and HaCaT cells was established, and the effects of resveratrol, kaempferol, punicalagin, fisetin and oenothien B on SIRT3 expression were evaluated by the SIRT3-EGFP reporter gene system in HaCaT cells, as well as the protective effect of the selected SIRT3-augmenting polyphenols on UVB-induced oxidative stress in HaCaT cells were further investigated. The result showed that resveratrol, kaempferol and oenothien B significantly enhanced the expression of exogenous and endogenous *SIRT3* gene; among them, oenothien B significantly reduced the level of ROS in HaCaT cells; however, knockdown SIRT3 expression significantly reduced the inhibitory effect of oenothien B on UVB-induced oxidative stress. In conclusion, the inhibition effect of oenothien B on UVB-induced ROS generation depends on SIRT3 in the co-culture system of Caco-2 cells and HaCaT cells.

Keywords polyphenols; SIRT3; cells co-cluture; ROS