

原花青素 B₂ 通过 GATA4/p53 通路 改善肝细胞衰老的研究

段丽¹, 李聪¹, 罗悦¹, 周永芹², 张长城², 袁丁³, 刘朝奇¹

(1. 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 三峡大学, 湖北宜昌 443000)

(2. 三峡大学医学院, 湖北宜昌 443000) (3. 三峡大学附属仁和医院, 湖北宜昌 443000)

摘要: 本研究探索了原花青素 B₂ 对 BNL.CL2 肝细胞衰老的拮抗作用。应用棕榈酸(PA)诱导肝细胞衰老细胞模型, 通过 MTT 实验测定 PA 和 PCB₂ 的细胞增殖效应; 利用衰老特异性 β -半乳糖苷酶试剂盒检测 PCB₂ 对细胞衰老特异性 β -半乳糖苷酶表达的影响; 通过实时定量 PCR 检测 PCB₂ 对细胞周期相关基因 CDK6 和 p53 mRNA 表达水平的影响; 采用免疫荧光染色法检测 PCB₂ 对 P53 和 GATA4 蛋白表达以及细胞核大小的影响。结果表明, PA 浓度为 100 μ M 时能够有效抑制细胞增殖 (control: 1.289, PA: 0.655, $p < 0.001$), 而 PCB₂ 浓度为 12.5 μ g/mL 时可明显改善细胞增殖作用 (0.766; $p < 0.01$); 与 PA 组比, PCB₂ 组中表达 β -半乳糖苷酶的阳性细胞明显降低; PA 诱导细胞核增大 (control: 1973.9 vs PA: 7995.1, $p < 0.05$), 而 PCB₂ 可降低细胞核大小 (3848.8, $p < 0.05$); PA 能够诱导衰老相关基因 p53 表达上调 (3.36, $p < 0.05$) 和 CDK6 基因表达下调 (0.49, $p < 0.05$), PCB₂ 可有效改善 PA 诱导的肝细胞衰老 (p53: 1.11; CDK6: 1.01, $p < 0.05$)。免疫荧光染色显示, PA 诱导的肝细胞衰老使 p53 和 GATA4 共定位于细胞核; 经 PCB₂ 处理后, p53 和 GATA4 蛋白在核表达减少, 且共定位于细胞质中。因此 PCB₂ 能够拮抗肝细胞衰老, 其可能通过 GATA4/p53 信号通路发挥作用。

关键词: 原花青素 B₂; GATA4/p53 通路; 肝细胞衰老

文章编号: 1673-9078(2019)08-1-5

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.8.001

The Effect of Procyanidin B₂ on Alleviating Cellular Senescence Through GATA4/P53 Pathway in BNL.CL2 Cells

DAN Li¹, LI Cong¹, LUO Yue¹, ZHOU Yong-qin², ZHANG Chang-cheng², YUAN Ding³, LIU Chao-qi¹

(1.Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, China Three Gorges University, Yichang 443000, China)(2.Medical College, China Three Gorges University, Yichang 443000, China)

(3.Affiliated Renhe Hospital of China Three Gorges University, Yichang 443000, China)

Abstract: The alleviation of BNL.CL2 hepatocyte senescence by procyanidin B₂ was investigated. Palmitic acid (PA) was used to induce hepatocyte senescence. The MTT assay was used to identify the cell viability treated by PA and PCB₂. The effect of PCB₂ on cell senescence-specific β -galactosidase (SA- β -Gal) expression was detected by senescence-specific β -galactosidase assay kit. The effect of PCB₂ on the expression of cell cycle-related genes CDK6 and p53 mRNA was examined by real-time quantitative PCR. The effect of PCB₂ on P53 and GATA4 protein expression and nuclear size was detected by immunofluorescence staining. The results showed that the 100 μ M PA inhibited cell proliferation (control: 1.289 vs PA: 0.655, $p < 0.001$), 12.5 μ g/mL PCB₂ improved the cell proliferation (0.766, $p < 0.01$) which was inhibited by PA. Compared with PA group, the number of positive cells expressing β -galactosidase in PCB₂ group is significantly decreased. The nucleus size was increased after PA treatment (PA: 7995.1, $p < 0.05$), while PCB₂ reversed the effect (3848.8, $p < 0.05$). Senescence associated gene p53 expression was raised (3.36, $p < 0.05$), CDK6 gene expression decreased (0.49, $p < 0.05$) in the PA group; PCB₂ could effectively improve the senescence of pa induced liver cells (p53: 1.11; CDK6: 1.01, $p < 0.05$). Immunofluorescence staining showed that p53 and GATA4 were co-localized in the nucleus of the PA-induced senescent cells. After the PCB₂ treatment, expression of p53 and GATA4 proteins in nucleus decreased, and p53 and GATA4 proteins co-occurred in the cytoplasm. Therefore, we believe that PCB₂ can alleviate hepatocyte senescence,

收稿日期: 2019-02-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81673675)

作者简介: 段丽(1991-), 女, 硕士, 研究方向: 分子免疫学

通讯作者: 刘朝奇(1962-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 分子生物学和免疫药理

which may be through the GATA4/p53 signaling pathway.

Key words: procyanidin B₂; GATA4/p53 pathway; hepatocyte aging

非酒精性脂肪性肝病 (Nonalcoholic fatty liverdisease, NAFLD) 是以肝细胞脂肪变性和脂质贮积为主要特征的临床病理综合征, 是影响人类健康常见的慢性病之一^[1]。研究表明, 高脂诱导的 NAFLD 中, 肝细胞表现出细胞周期阻滞, p21、p53、 γ -H2AX 等表达的增加, 肝细胞核体积增大等细胞衰老的特征^[2,3]。细胞衰老 (cellular senescence) 是细胞发生不可逆的复制停滞, 凋亡抵抗, 糖酵解代谢改变, 脂肪酸氧化减少, 活性氧产生增加, 衰老相关分泌表型 (senescence-associated secretory phenotype, SASP) 的产生等一系列变化的生理过程^[4]。细胞衰老的过程需要多种信号通路的调控, 其中包括 p53/p21、GATA4/SASP、p16 等通路, 其均可介导细胞衰老, 因此, 通过调控这些通路从而达到干预细胞衰老已经成为改善细胞衰老相关疾病的新思路和新靶点^[5]。

原花青素是以黄烷-3-醇单体为基本单位构成的一类聚合体, 具有很强的抗氧化、抗衰老、清除自由基等生理活性。原花青素 B₂ 是分布于自然界中较为广泛存在的二聚体, 由儿茶素或表儿茶素单体通过 C4→C8 磺烷键合成的, 在火龙果、沙棘果、蓝莓、葡萄籽、木瓜等水果中含量较为丰富, 原花青素 B₂ 含有 8 个均与双键共轭的酚羟基和 2 个脂肪族羟基, 这一特有的结构使得原花青素 B₂ 具有较强的抗氧化活性和抗衰老的作用^[6]。另外, 原花青素 B₂ 具有抑制脂质过氧化的作用, 抑制细胞遗传分子的氧化损伤, 刺激细胞抗氧化酶的合成能力^[7,8]。多项研究表明, 在体内外实验中, 原花青素具有明显的抗氧化, 抗衰老, 调节血脂, 以及抗炎等多种生物学活性^[9-11]。本课题将从 GATA4/p53 通路研究原花青素 B₂ 对棕榈酸 (PA) 诱导的 BNL.CL2 肝细胞细胞衰老的拮抗作用。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

原花青素 B₂ (procyanidin B₂, PCB₂) (CAS29106-49-8) 标准品大于或等于 98%, 购自成都植标化纯生物技术有限公司; DMSO、棕榈酸 (palmitic acid, PA) 购于德国 Sigma 公司; 兔多抗 P53、鼠单抗 GATA4 均属于美国 Santa Cruz 公司; 细胞衰老特异性 β -半乳糖苷酶检测试剂盒, 购自上海杰美基因科技有限公司; 抗荧光淬灭封片剂, 购于武汉谷歌生物科技有限公司; 引物合成于武汉生工; 反转

录试剂盒 Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time), SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) 购于宝生物工程 (大连) 有限公司 (大连 TaKaRa 公司); Veriti 96-Well Thermal Cycle PCR 反应仪和 Step One Plus Real-Time PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司; NanoDrop 2000 超微量分光光度计购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 激光共聚焦显微镜尼康 A1R+ 购自日本尼康公司。

1.2 实验方法

1.2.1 主要溶液配制方法

PCB₂ 溶液, 用二甲基亚砜 (DMSO) 直接溶解粉末状的 PCB₂ 制成 30 mg/mL 的母液, -20 °C 分装保存。

PA 存储液, 取 0.0307 g PA 加入 3 mL 浓度为 0.1 mol/L NaOH 溶液中, 置于 75 °C 水浴进行充分皂化约 30 min, 最终至无色透明澄清。得到 40 mM 棕榈酸钠皂化液。保持温度并迅速地加入 40% BSA 溶液, 得到 20 mM PA+20% BSA 溶液。将存储液于超净台用细菌滤器过滤, 分装保存于 4 °C 冰箱。

1.2.2 细胞培养与分组

小鼠胚胎肝细胞 BNL.CL2 购于中国典藏物培养中心中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。细胞采用 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基, 在 5% CO₂、37 °C 湿度饱和的恒温培养箱中培养。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖活性

取对数生长期细胞接种于 96 孔板, 细胞悬液浓度 10³~10⁴ 个/孔, 按 100 μ L 每孔细胞悬液进行铺板。待细胞贴壁后, 加入 100 μ L 稀释的棕榈酸。将 96 孔板放入 37 °C 细胞培养箱里孵育 48 h 后, 每孔加入 20 μ L MTT 溶液, 放入 37 °C 细胞培养箱里培养。4 h 后终止培养, 轻轻吸尽孔中液体, 每孔加 150 μ L DMSO, 置摇床上低速振荡约 15 min, 使结晶物充分溶解 (全程避光)。在全波长酶标仪 OD_{490 nm} 处测量各孔吸光值。

1.2.4 衰老相关 β -半乳糖苷酶染色

将细胞经过 PCB₂ 或者 PA 作用 84 h 后, 行特异性 β -半乳糖苷酶染色。操作按照说明书进行。表达衰老特异性 β -半乳糖苷酶的阳性细胞呈蓝色, 通过光学显微镜拍照记录结果。

1.2.5 实时荧光定量 PCR (qPCR)

将处理后的细胞收集后, 按照逆转录和 PCR 试剂盒进行操作, 在 ABI stepone plus Real-Time PCR 仪上检测相关基因的表达。扩增条件为: 95 °C 5 s, 60 °C 30

s, 扩增 40 个循环。在溶解曲线为单峰的前提下结合内参 *Gapdh* 的 Ct 值为参照对其他基因进行相对定量。以正常对照组细胞为参比, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算, 表达量以倍数表示。所涉及的引物见表 1。

表 1 PCR 反应引物表

Table 1 The primer sequences used for real-time PCR assay

Gene	Sequence of primer (5' to 3')
P53	Forward: ATGAACCGCCGACCTATCC
	Reverse: GGCAGGCACAAACACGAAC
Cdk6	Forward: GACCTACTTCTGAAATGCCTGACG
	Reverse: GGTGCTCTGGTTGGATGGC
Gapdh	Forward: GGTTGTCTCCTGCGACTTCAA
	Reverse: CCACCTGTGCTGTIAGCC

1.2.6 间接免疫荧光

待细胞处理后, 将培养板中的细胞用 PBS 清洗; 新鲜配制的 4%多聚甲醛室温固定 30 min; 用含 0.1% Triton X-100 和 0.02% BSA 的穿孔液处理 15 min; 5% BSA 封闭, 37 °C 封闭 60 min; 孵育抗 GATA4 和 P53 的抗体, 4 °C 冰箱过夜; 然后孵育相应的荧光二抗 60 min; 用 0.5 μg/mL 的 DAPI 染细胞核; 用抗荧光淬灭封片剂进行封片, 在共聚焦激光显微镜下进行扫描取图分析。

1.2.7 统计学处理

实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, SPSS 18.0 统计软件分析, 各组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)和最小有意义差异法(LSD 法), 当 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 MTT 法检测 PCB₂ 对细胞增殖作用的影响

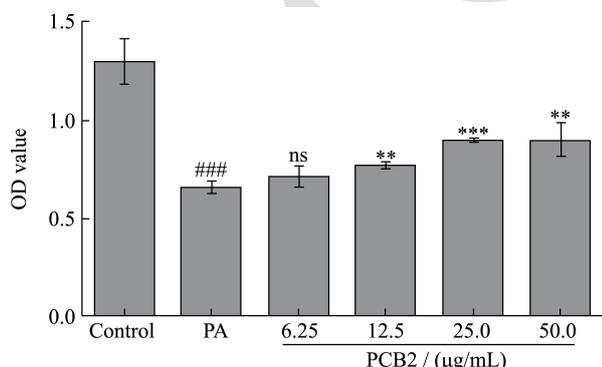


图 1 不同浓度原花青素 B₂ (PCB₂) 对衰老肝细胞的增殖作用的影响

Fig.1 Procyanidin B₂ (PCB₂) improved hepatocyte proliferation activity after PA treatment

注: 与 control 组比, ### $p < 0.001$, 与 PA 组相比, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n = 3$ 。

正常组、PA 处理组、PA+PCB₂ 各浓度组测得的 OD 值。结果发现 PA 处理后的细胞增殖受到显著抑制, 与对照组比较, 差异具有统计学意义 ($p < 0.001$)。以 PA 组为参照, 随着 PCB₂ 浓度增加, 细胞存活数增加, 成浓度依耐性, 除 6.25 μg/L 的 PCB₂, 其他浓度的具有统计学意义, 后续采用浓度为 12.5 μg/L 的 PCB₂ 进行实验。见图 1。

2.2 PCB₂ 对细胞衰老特异性 β-半乳糖苷酶表达及细胞核大小的影响

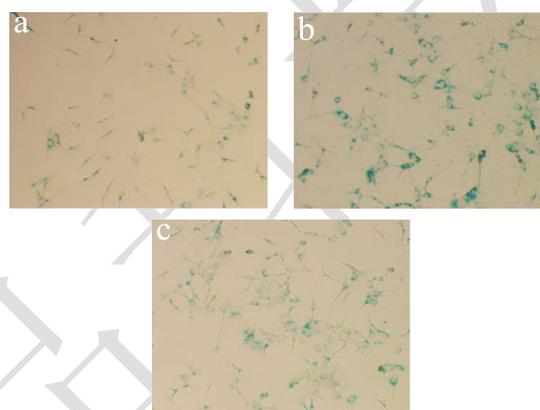


图 2 原花青素 B₂ (PCB₂) 对细胞衰老特异性 β-半乳糖苷酶表达的影响 (200×)

Fig.2 Effect of procyanidin B₂ (PCB₂) on cell senescence-specific β-galactosidase expression (200×)

注: a: Control; b: PA; c: PCB₂。图 3 同。

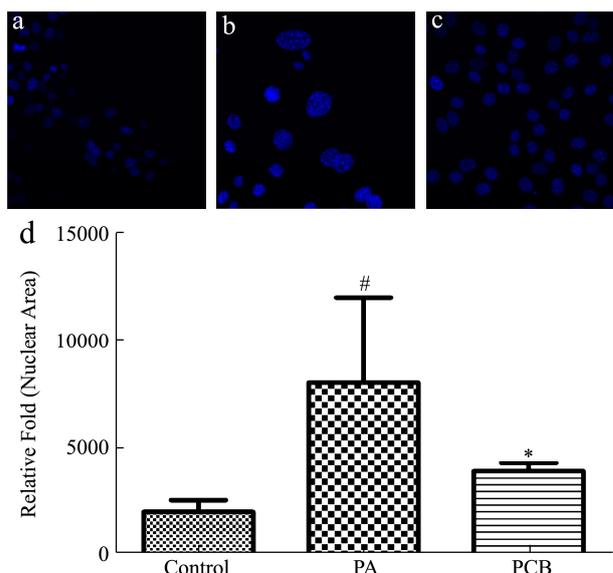


图 3 原花青素 B₂ (PCB₂) 对细胞衰老特异性细胞核大小的影响
Fig.3 Effect of procyanidin B₂ (PCB₂) on cell senescence related nuclear area under microscope ($n = 10$, 200×)

采用浓度为 12.5 μg/L 的 PCB₂ 作用于 PA 诱导的衰老肝细胞后, 经衰老特异性 β-半乳糖苷酶染色, 结

果见图 2, 可以看出, 与正常对照组, PA 处理组中蓝染的阳性细胞数量相对增加, 提示 PA 处理能够诱导细胞表达衰老特异性 β -半乳糖苷酶。而与 PA 处理组相比, PCB₂ 组蓝染的细胞数量相对减少, 提示 PCB₂ 能够减少细胞内衰老特异性 β -半乳糖苷酶的表达, 起到拮抗细胞衰老的作用。

将上述细胞进行 DAPI 染色后在荧光显微镜下观察, 发现 PA 处理的细胞核显著增大, 并且不均匀, 表现为细胞衰老细胞核特征。而 PCB₂ 处理后可以逆转 PA 的毒性, 使细胞核明显改善, 通过软件定量分析细胞核面积, 统计结果发现, Control 组细胞核相对大小为 1973.9, PA 组为 7995.1, PCB₂ 组为 3848.8, 经统计分析显示, 与对照组比较 PA 组细胞核大小显著增大 ($p < 0.05$), 而 PCB₂ 处理后可明显改善 PA 的毒性作用 ($p < 0.05$), 见图 3。

2.3 PCB₂ 对细胞周期相关基因 mRNA 表达影响

响

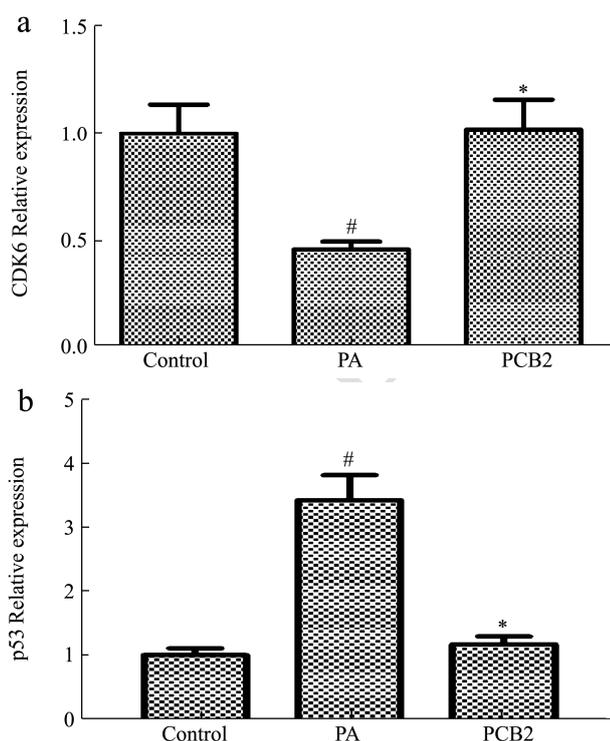


图 4 原花青素 B₂ (PCB₂) 对细胞周期相关基因 mRNA 表达水平的影响

Fig.4 Effect of procyanidin B₂ (PCB₂) on the expression of cell cycle-related gene mRNA by real time PCR

注: 与 control 组比, # $p < 0.05$, 与 PA 组相比, * $p < 0.05$, n=3。

细胞衰老的特征是细胞周期阻滞, 起主要作用的是 p53/p21 通路和 p16/Rb 通路。细胞衰老过程中 DNA

损伤反应(DNA damage response, DDR)激活 p53, 导致细胞周期停滞, 诱导细胞衰老(senescence)或者细胞凋亡。而 p16 是通过阻遏周期蛋白 D(cyclinD)与周期蛋白依赖性蛋白激酶 4/6(CDK4/CDK6)的结合, 抑制视网膜母细胞瘤(RB)的磷酸化, 阻断 E2F 结合启动 DNA 的复制过程, 从而将细胞周期阻滞于 G1/S 检查点, 导致细胞周期停滞。因此, 采用实时定量 PCR, 对细胞周期相关基因 CDK6 及 p53 的 mRNA 表达水平进行检测, 检测结果显示: 与正常对照组相比, PA 处理组中 CDK6 基因的相对表达量下调超过一半, 而 p53 基因的相对表达量上调超过 3 倍, 这种差异具有统计学意义 ($p < 0.05$) 这一结果与前述结果一致, 提示 PA 处理能够诱导细胞的衰老; 与 PA 处理组相比, PCB₂ 组能够上调 CDK6 和降低 p53 基因的表达, 使其恢复至接近正常对照水平, 这种差异具有统计学意义 ($p < 0.05$), 见图 4, 提示 PCB₂ 能够影响细胞周期相关基因的表达, 在一定程度上能够拮抗细胞的衰老。

2.4 PCB₂ 对 p53 和 GATA4 的蛋白表达影响

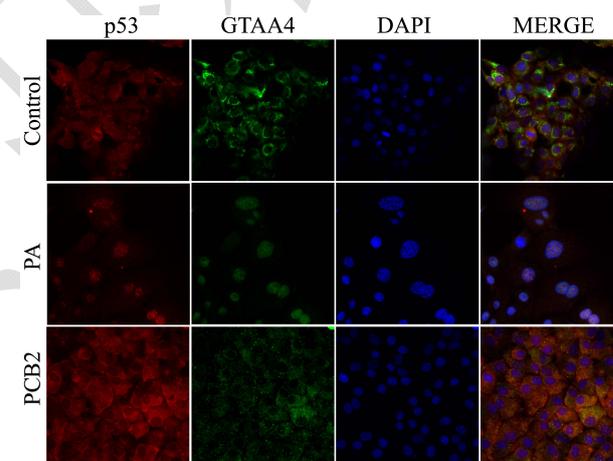


图 5 原花青素 B₂ (PCB₂) 对 p53 和 GATA4 蛋白表达及核浆定位的影响 (600 \times)

Fig.5 Effect of procyanidin B₂ (PCB₂) on p53 and GATA4 protein expression and their nuclear and cytoplasmic localization by confocal laser microscopy (600 \times)

P53 是多个调控网络的关键点, 可调控细胞周期、维持基因组的完整性及细胞应激反应等。活化的 p53 进入细胞核内, 结合到参与细胞周期等的靶基因启动子区域, 调控细胞衰老^[12]。GATA4 是 GATA 转录因子家族的主要成员之一, 是心脏、睾丸、前肠、肝、和胰腺等各个器官的重要转录因子。GATA4 基因能识别许多基因启动子上存在的 GATA 序列^[13]。GATA4 可通过 SASP 来调控细胞的衰老^[14]。有研究表明 p53 和 GATA4 作为细胞衰老的两个关键调控点, 具有潜在的联系^[15,16]。因此, 采用免疫荧光染色, 观察 PCB₂

作用衰老肝细胞后, 细胞内 p53 和 GATA4 的蛋白表达及其亚细胞定位。结果发现, 当 PA 作用肝细胞诱导细胞衰老时, 细胞内的 p53 从胞浆大量转移至胞核, 当采用 PCB₂ 作用于衰老的肝细胞后, p53 又能从胞核部分逆转至胞浆。而 GATA4 在 PA 作用后在细胞核内大量表达, PCB₂ 的处理也能将 GATA4 从胞核部分逆转至胞浆, 见图 5, 两种蛋白均存在核浆穿梭的现象。研究中, 我们发现在衰老的细胞高表达 p53, 且 GATA4 也是上调的, 两者趋势一致, 并且共定位于细胞核。提示 2 个转录因子之间可能具有直接结合活性, 调控细胞衰老过程, 与文献报道结果一致^[16,17]。综合以上结果提示, PCB₂ 能够改善 PA 诱导的肝细胞衰老作用, 其机制可能与调节 GATA4/p53 的核浆定位有关。

3 结论

本研究采用饱和脂肪酸棕榈酸 (PA) 成功诱导了肝细胞株 BNL.CL2 的衰老模型, 表现为表达衰老相关 β -半乳糖苷酶细胞数量增加, 细胞核显著增大, p53 的表达上调以及 CDK6 的表达下调。当采用原花青素 B₂ 干预后, 结果显示, 与 PA 处理组相比较, PCB₂ 处理后细胞内表达衰老相关 β -半乳糖苷酶的细胞数量下降, 细胞核大小得以恢复, 接近正常对照水平, 与细胞周期相关的基因 p53 表达下调, CDK6 表达上调, 两个基因表达接近正常对照水平, 说明 PCB₂ 能够干预细胞衰老过程, 起到改善细胞衰老的作用。另外, 当 PA 诱导细胞衰老时, 细胞内的 p53 和 GATA4 从胞浆大量转移至胞核, 当采用 PCB₂ 干预后 p53 和 GATA4 又能从胞核部分逆转至胞浆, 结果提示这两个转录因子参与了细胞衰老的过程, 而 PCB₂ 能够通过调节 p53 和 GATA4 核浆穿梭来改善肝细胞的衰老。当然本研究需进一步的体内外实验, 证实 PCB₂ 能够起到改善肝细胞衰老的作用, 为肝细胞衰老相关的老龄性疾病及非酒精性脂肪性肝病的治疗提供新的思路和药物。

参考文献

- [1] Chalasani N, Younossi Z, Lavine J E, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American association for the study of liver diseases [J]. *Hepatology*, 2017
- [2] Gong Z, Tas E, Yakar S, et al. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease in aging [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2017, 5(455): 115-130
- [3] Nakajima T, Nakashima T, Okada Y, et al. Nuclear size measurement is a simple method for the assessment of hepatocellular aging in non-alcoholic fatty liver disease: Comparison with telomere-specific quantitative FISH and p21 immunohistochemistry [J]. *Pathology International*, 2010, 60(3): 175-183
- [4] Thomas F. A new definition of aging? [J]. *Frontiers in Genetics*, 2012, 3: 148
- [5] Kang C, Xu Q, Martin T D, et al. The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4 [J]. *Science*, 2015, 349(6255): 5612
- [6] Beatriz Sarriá, Sara Martínez-López, José Luis Sierra-Cinos, et al. Effects of bioactive constituents in functional cocoa products on cardiovascular health in humans [J]. *Food Chemistry*, 2014, 174(1): 214-218
- [7] 张振江, 姜云, 孙向军. 原花青素 B₂ 延长秀丽线虫寿命的研究 [J]. *食品科技*, 2016, 1: 250-254
ZHANG Zhen-jiang, JIANG Yun, SUN Xiang-jun. Proanthocyanidins B₂ on extension of caenorhabditis *Elegans*' longevity [J]. *Food Science and Technology*, 2016, 1: 250-254
- [8] 王丽萍, 李莉, 姚计文, 等. 原花青素单一活性成分 B₂ 对高糖作用下人内皮祖细胞的保护作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(7): 1180-1188
WANG Li-ping, LI Li, YAO Ji-wen, et al. Protective effect of procyanidin single active ingredient B₂ on human endothelial progenitor cells under high glucose stimulation [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2016, 32(7): 1180-1188
- [9] 胡中志. 原花青素 B₂ 抗衰老作用与代谢产物分析鉴定的研究 [D]. 上海: 上海应用技术大学, 2017
HU Zhong-zhi. Anti-aging effect of procyanidin B₂ and analysis and identification of metabolites [D]. Shanghai: Shanghai University of Applied Sciences, 2017
- [10] Yin W, Li B, Li X, et al. Anti-inflammatory effects of grape seed procyanidin B₂ on a diabetic pancreas [J]. *Food Funct*, 2015, 6(9): 3065-3071
- [11] Baselga-Escudero L, Blade C, Ribas-Latre A, et al. Chronic supplementation of proanthocyanidins reduces postprandial lipemia and liver miR-33a and miR-122 levels in a dose-dependent manner in healthy rats [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2014, 25(2): 151-156
- [12] 雷岳山. P53 与细胞衰老、自噬和凋亡 [D]. 武汉大学, 2013
LEI Yue-shan. P53 and cellular senescence, autophagy and apoptosis [D]. Wuhan University, 2013
- [13] Robert S, Viger, et al. Copyright and license information role of the GATA family of transcription factors in endocrine development, function, and disease [J]. *Mol Endocrinol*. 2008, 22(4): 781-798

(下转第 41 页)