

丹皮酚减轻 SIRT6/PARP1 介导的 DNA 损伤抑制 血管平滑肌细胞衰老的作用

蒋婷婷, 刘雅蓉, 施晓艳, 杨宇龙, 戴敏*

(安徽中医药大学药学院, 安徽省中药研究与开发重点实验室, 合肥 230012)

[摘要] 目的:探讨丹皮酚(Pae)对血管紧张素 II (Ang II)诱导的血管平滑肌细胞(VSMCs)衰老的作用及对沉默调节信息因子 6(SIRT6)/腺苷二磷酸核糖聚合酶 1(PARP1)信号通路的影响。方法:建立 Ang II (100 nmol·L⁻¹)诱导的 VSMCs 应激性衰老模型,实验分为正常组、模型组、Pae 低、中、高(30、60、120 μmol·L⁻¹)浓度组。采用 β-半乳糖苷酶(SA-β-Gal)染色法检测细胞衰老阳性率;细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测细胞增殖能力;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 SIRT6、PARP1、衰老相关基因 p16、p21、p53、增殖细胞核抗原(PCNA)、脱氧核糖核酸(DNA)损伤蛋白磷酸化的组蛋白 H2AX(即 p-H2AX 或 γ-H2AX)的表达并采用 EdU 染色法检测 VSMCs 增殖变化;siRNA-SIRT6 转染制备沉默的 VSMCs,观察 SIRT6 沉默的 VSMCs 中 Pae 对 SIRT6、PARP1 及 p16、γ-H2AX 蛋白的表达。结果:SA-β-Gal 染色结果显示,与正常组比较,模型组 SA-β-Gal 染色衰老阳性率增加(P<0.01);与模型组比较,Pae 给药组均有效降低 SA-β-Gal 染色阳性率(P<0.05, P<0.01)。Western blot 结果显示,与正常组比较,模型组 PCNA、SIRT6、PARP1 表达下调,衰老相关蛋白 p16、p21、p53、γ-H2AX 的表达上调(P<0.05, P<0.01);与模型组比较,Pae 给药干预后,各浓度组促进了 PCNA、SIRT6、PARP1 的蛋白表达,抑制了 p16、p21、p53、γ-H2AX 的蛋白表达,且呈剂量依赖性(P<0.05, P<0.01)。EdU 染色结果显示,与正常组比较,模型组 EdU 阳性细胞数减少(P<0.01);与模型组比较,Pae 给药组 EdU 阳性细胞数明显增加(P<0.05, P<0.01)。SIRT6 沉默后,Pae 促进 SIRT6、PARP1 及抑制 p16 的作用被逆转(P<0.05, P<0.01)。此外加入 SIRT6 抑制剂 IN-1 可促进 Ang II 诱导细胞衰老的发生(P<0.05, P<0.01)。结论:Pae 能够有效抑制 VSMCs 的衰老,其机制作用可能与调控 SIRT6/PARP1 信号通路相关。

[关键词] 丹皮酚;沉默调节信息因子 6(SIRT6);腺苷二磷酸核糖聚合酶 1(PARP1);血管平滑肌细胞(VSMCs);衰老

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)10-0083-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230707

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20230317.1318.001.html>

[网络出版日期] 2023-03-19 11:29:15

Inhibitory Effect of Paeonol on Vascular Smooth Muscle Cell Senescence by Reducing SIRT6/PARP1-mediated DNA Damage

JIANG Tingting, LIU Yarong, SHI Xiaoyan, YANG Yulong, DAI Min*

(Key Laboratory of Research and Development of Traditional Chinese Medicine in Anhui Province,
School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether the effects of paeonol (Pae) on angiotensin II (Ang II)-induced senescence in vascular smooth muscle cells (VSMCs) were related to angiotensinogen of silencing regulatory information factor 6 (SIRT6)/adenosine diphosphate ribose polymerase 1 (PARP1) signaling pathway in VSMCs. **Method:** The model of VSMC-stress aging induced by Ang II (100 nmol·L⁻¹) was established. The rats were divided into normal group, model group, low, medium, and high-concentration Pae groups (30, 60,

[收稿日期] 2022-11-29

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82174014);安徽省自然科学基金项目(2108085QH375)

[第一作者] 蒋婷婷,在读硕士,从事中药及其有效成分抗动脉粥样硬化作用及分子机制研究,E-mail:2036892979@qq.com

[通信作者] *戴敏,博士,教授,博士生导师,从事中药及其有效成分抗动脉粥样硬化作用及分子机制研究,E-mail:daiminliao@163.com

120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). The positive rate of cell senescence was detected by SA- β -Gal staining, the ability of cell proliferation was detected by the cell counting kit-8 (CCK-8) method, the expression of SIRT6, PARP1, p16, p21, p53, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), deoxyribonucleic acid (DNA)-damaged protein γ -H2AX was detected by Western blot, and VSMC proliferation was detected by EdU staining. The silenced VSMCs were prepared by siRNA-SIRT6 transfection, and the protein expressions of SIRT6, PARP1, p16, and γ -H2AX in VSMCs silenced by SIRT6 were observed. **Result:** The results of SA- β -Gal staining showed that the senescence positive rate of SA- β -Gal staining in the model group was higher than that in the normal group ($P<0.01$), and the positive rate of SA- β -Gal staining in the Pae group was significantly lower than that in the model group ($P<0.05$, $P<0.01$). The results of Western blot showed that as compared with the normal group, the expression of PCNA, SIRT6, and PARP1 in the model group was down-regulated, and the expression of aging-related proteins p16, p21, p53, and γ -H2AX was up-regulated in the model group ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, Pae promoted the protein expression of PCNA, SIRT6, and PARP1 and inhibited the protein expression of p16, p21, p53, and γ -H2AX in a dose-dependent manner ($P<0.05$, $P<0.01$). The results of EdU staining showed that the number of EdU positive cells in the model group was lower than that in the normal group ($P<0.01$), and the number of EdU positive cells in Pae groups was significantly higher than that in the model group ($P<0.05$, $P<0.01$). After SIRT6 silencing, the effects of Pae on promoting SIRT6 and PARP1 and inhibiting P16 were reversed ($P<0.05$, $P<0.01$). In addition, the addition of SIRT6 inhibitor (IN-1) promoted the occurrence of cell senescence induced by Ang II ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** Pae can effectively inhibit the aging of VSMCs, and its mechanism may be related to the regulation of SIRT6/PARP1 signal pathway.

[Keywords] paeonol; silencing regulatory information factor 6 (SIRT6); adenosine diphosphate ribose polymerase 1 (PARP1); vascular smooth muscle cells (VSMCs); senescence

血管平滑肌细胞(VSMCs)衰老是导致动脉粥样硬化(AS)性心血管疾病发生发展的重要因素^[1]。在AS斑块中发现衰老的VSMCs,表现为体积增大、增殖能力降低、且衰老相关蛋白p16、p21表达增加;此外,衰老的VSMCs可分泌大量的衰老相关分泌表型(SASP),从而增加单核细胞趋化,导致邻近的非衰老的VSMCs表现出黏附分子、炎症因子增多的特征,进一步加剧AS的发生。同时VSMCs受到氧化刺激发生衰老后分泌许多降解蛋白酶,使纤维帽变薄,加速影响斑块的不稳定性发生^[2-4]。DNA损伤是诱导细胞衰老的最主要因素,AS斑块VSMCs中发现明显的DNA损伤反应,包括DNA双链断裂、端粒缩短,若DNA损伤不断持续积累,最终将导致细胞衰老^[5],从而加剧AS的进程。因此,探讨VSMCs衰老的分子机制,寻找修复DNA损伤,延缓衰老的干预方法对防治心血管疾病的发生具有重要意义^[6-7]。

沉默调节信息因子6(SIRT6)是Ⅲ类组蛋白脱乙酰酶Sirtuins家族的成员,其在调节细胞衰老和衰老相关心血管疾病的多种细胞中发挥关键作用^[8-9]。研究发现,敲除SIRT6的小鼠出现早衰症状,在细胞中过表达SIRT6不仅降低炎症细胞因子的表达,还

影响VSMCs代谢的变化^[10]。在细胞受到氧化应激时,SIRT6被激活到达DNA双链断裂(DSBs)位点,并通过非同源端连接和同源重组刺激DNA损伤修复^[11-12],与腺苷二磷酸核糖聚合酶1(PARP1)结合从而激活PARP1聚ADP-核糖化酶活性,增强氧化应激下的DSB修复,进而延缓细胞衰老^[13],表明SIRT6是调节VSMCs衰老的重要调控因子,但迄今为止,药物作用于SIRT6从而调控细胞衰老的机制尚不清楚。

丹皮酚是从芍药科植物牡丹的干燥根皮中提取纯化得到的活性成分之一,本课题组研究发现其具有显著的抗AS、抗炎作用^[14],可抑制VSMCs异常增殖和迁移,减少炎症因子的释放。最新研究显示,丹皮酚可以改善过氧化氢诱导的内皮细胞衰老,提高细胞增殖能力,具有抗衰老的作用^[15-17]。但丹皮酚是否具有改善VSMCs衰老作用及其发挥抗衰老作用与SIRT6是否有关,尚不知晓。本研究采用血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)刺激VSMCs,建立细胞衰老模型,探究丹皮酚是否具有抗VSMCs衰老的作用,并进一步探讨该作用是否通过调控SIRT6/PARP1信号通路而实现的。本研究从细胞衰老的角度进一步探究AS的病理机制,并揭示丹皮酚调

控VSMCs衰老发挥抗AS的作用途径,为AS的临床研究提供新的方向。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性健康C57BL/6J小鼠20只,体质量(21±5)g,7~8周龄,由常州卡文斯实验动物有限公司提供,实验小鼠合格证号SCXK(苏)2020-0010,所有动物实验均符合安徽中医药大学动物伦理委员会要求(批准号2020018)。

1.2 试剂 丹皮酚(纯度99%,宣城百草植物工贸有限公司,批号100321);Ang II(美国GlpBio公司,批号GP10023);BCA蛋白浓度测定试剂盒、RIPA细胞裂解液、 β -半乳糖苷酶染色试剂盒、细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒、BeyoClick™EdU-488细胞增殖检测试剂盒(上海碧云天生物技术公司,批号分别为P0012S、P0013B、C0602、C0038、C0071S);兔抗p16抗体(美国Affinity公司,批号AF5484);兔抗p21抗体、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体(英国Abcam公司,批号分别为EPR3993、ab42167);兔抗p53抗体、兔抗 γ -H2AX抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(Abmart公司,批号分别为T40061、T56572、Ab8226);兔抗增殖细胞核抗原(PCNA)抗体(瑞士Abbkina公司,批号ABL1040);鼠抗SIRT6(美国Immunoway公司,批号YM1275);SIRT6抑制剂(IN-1,上海麦克林生化科技股份有限公司,批号S872947)。

1.3 仪器 Spectra Max M5型多功能酶标仪(美国MD公司);XSZ-D型倒置相差显微镜(日本Olympus公司);MiniTransBlotCell型蛋白免疫印迹法(Western blot)电泳装置(德国Biometra Eco-Mini公司);DMi8-M型荧光显微镜(德国Leica公司);ZHPW-250型恒温振荡培养箱(天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司);YJ-1450型超净工作台(苏净集团安泰公司)。

2 方法

2.1 VSMCs的分离、培养及鉴定 将小鼠脱颈处死,随后将小鼠移入超净工作台中,使用无菌器械剪开胸腔取出小鼠主动脉组织。迅速放入含有20%胎牛血清(FBS)的DMEM的细胞培养皿中,快速分离主动脉的脂肪和结缔组织,在显微镜下将主动脉纵向剖开,小心用刀片刮去血管内皮细胞;左手持显微镊轻压血管一端,右手持弯头镊同样轻轻刮中膜直至出现小豁口,边压边推直至中膜脱落;在盛有完全DMEM的细胞培养皿中将中膜剪呈1 mm²组织块;取出组织块移入0.15%胶原酶溶液

里消化15 min,再低速离心机1 000 r·min⁻¹离心5 min(离心半径6.5 cm)收集组织块,将其移至培养瓶中,并吸出培养瓶中的多余液体;将培养瓶在细胞培养箱中倒扣静置30 min,查看组织块略干后加入2 mL完全DMEM培养基;约3 d后进行半量换液,约2周左右细胞均匀爬出后将组织块剔除。采用免疫细胞化学SP法检测VSMCs中标志蛋白 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达情况。

2.2 分组与造模 实验分为正常组、模型组、模型组+丹皮酚预处理组(丹皮酚组),将细胞悬浮液以1×10⁶个/孔接种于96孔板中,正常组给予含有10% FBS的细胞培养液培养;模型组使用100 nmol·L⁻¹ Ang II处理细胞48 h;丹皮酚各组先给予15、30、60、120、240 μ mol·L⁻¹丹皮酚后放置培养箱预培养24 h,24 h后再给予100 nmol·L⁻¹Ang II孵育48 h造成细胞衰老模型。小干扰RNA转染后,细胞分为正常组、模型组、模型+siSIRT6组(siSIRT6组)、模型+siSIRT6+丹皮酚组(丹皮酚组,丹皮酚60 μ mol·L⁻¹处理)。加入抑制剂后,细胞分为正常组、模型组、模型组+丹皮酚组(丹皮酚组,丹皮酚60 μ mol·L⁻¹处理)、模型组+IN-1组(IN-1组)、模型组+IN-1+丹皮酚组(IN-1+丹皮酚组,丹皮酚60 μ mol·L⁻¹处理)。

2.3 CCK-8检测细胞活力 将VSMCs细胞混悬液接种于96孔板中并培养24 h,用不同浓度的丹皮酚(15、30、60、120、240 μ mol·L⁻¹)预处理细胞24 h,再用100 nmol·L⁻¹Ang II刺激48 h。干预结束后加入CCK-8溶液10 μ L,将其用锡箔纸遮盖放入细胞培养箱中孵育2 h,酶标仪检测450 nm下的吸光度A。计算VSMCs的增殖率,得出丹皮酚保护VSMCs的最佳浓度和时间。

2.4 β -半乳糖苷酶染色检测细胞衰老阳性率 VSMCs消化离心后接种于6孔板中,待细胞融合率达60%~70%,按试剂盒说明书的步骤进行操作,吸除细胞剩余培养液,加固定液固定(室温固定15 min),磷酸盐缓冲液(PBS)洗3次。再清洗细胞后每孔中加染色工作液1 mL于37℃不含CO₂的孵育箱过夜。普通光学显微镜拍照,每组随机观察8~10个视野,记录衰老阳性细胞率=(阳性细胞数/细胞总数)×100%。

2.5 EdU染色检测VSMCs增殖率 VSMCs细胞悬液接种于24孔板中,分组进行药物干预,按试剂说明书预先配制EdU工作液于37℃孵育过夜;每孔加4%多聚甲醛固定细胞,用PBS洗3次;再加入0.5% TritonX100透化细胞;按EdU染色说明书配制

反应液,避光孵育30 min;进行DAPI染色工作液,PBS洗3次,荧光显微镜观察并拍照。

2.6 Western blot检测SIRT6、PARP1和衰老相关蛋白p16、p21、p53的表达 收集各组细胞,加入预冷细胞裂解液1 mL,冰上裂解30 min,置于4 °C超速离心机12 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径6.5 cm)后提取上清,BCA法检测蛋白含量。按照制胶试剂盒配制SDS-PAGE进行电泳,PVDF转膜,脱脂奶粉封闭,分别加入特异性一抗(1:500)4 °C孵育过夜,弃去一抗后TBST清洗3次,放入二抗(1:10 000)孵育盒室温孵育。用化学发光法进行显影曝光,采用Image J图像分析蛋白灰度值。

2.7 细胞热迁移(CETSA)检测丹皮酚与SIRT6结合作用 按照Western blot实验方法提取SIRT6的总蛋白,提取上清蛋白将其均分2个离心管中,分别加入等量的二甲基亚砷(DMSO)和丹皮酚,室温孵育1 h。按照53、56、59、62、65、68、71 °C温度梯度分别依次加热3 min,室温冷却。按照Western blot实验方法中的电泳、转膜、封闭、一抗(1:500)及二抗(1:10 000)孵育、显影曝光。采用Image J图像分析蛋白灰度值。

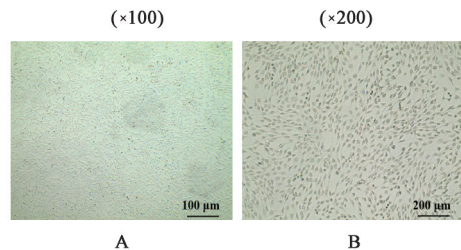
2.8 药物亲和反应靶点稳定性(DARTS)检测丹皮酚与SIRT6结合作用 按照Western blot实验方法提取SIRT6的总蛋白。将上清液蛋白等体积平均分到5个微型离心管,分别按照0、1:800、1:600、1:400、1:200比例加入链酶(1 g·L⁻¹),室温孵育30 min。按照Western blot实验方法检测SIRT6蛋白表达来筛选适宜的链酶浓度。重提蛋白分到5个微型离心管中,分别按照无链酶+DMSO、链酶+丹皮酚(0、30、60、120 μmol·L⁻¹)分组。Western blot检测SIRT6表达。

2.9 小干扰RNA转染实验 VSMCs细胞悬液接种于6孔板中,待细胞融合率达到60%左右,按照转染试剂说明书制备转染复合物,将含有转染复合物的细胞培养基加入6孔板中,静置6~8 h,转染48 h之后,提取细胞蛋白并用DAPI、Fam荧光染料分别标记细胞核、siRNA后于荧光显微镜下观察,检测siRNA转染效率及筛选最佳转染条件。

2.10 统计学分析 采用SPSS 23.0统计分析软件进行数据分析及图像处理。并且实验数据结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示,满足正态分布且方差齐性的多组间数据差异比较采用单因素方差分析,其中两组间差异比较采用独立样本t检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 VSMCs形态学观察及鉴定 采用组织块预消化贴壁法提取原代小鼠VSMCs,在贴壁培养7 d后,镜下观察看出组织块周围大量细胞迁出,细胞生长状态较好,且有些单个细胞呈梭形分布,此时移除组织块;细胞继续生长3~7 d后,观察发现细胞增殖分裂变多,具有典型的VSMCs特征。采用免疫细胞化学染色法检测原代细胞中 α -SMA的表达情况,镜下可观察到细胞质中显现深褐色颗粒。见图1。



注:A.原代培养12 d的VSMCs;B.免疫细胞化学染色法鉴定VSMCs结果

图1 小鼠主动脉VSMCs原代培养及免疫组化鉴定(倒置显微镜,×100、×200)

Fig. 1 Primary culture and immunohistochemical identification of mouse aortic VSMCs (inverted microscope, ×100, ×200)

3.2 丹皮酚对Ang II损伤VSMCs活力的影响

与正常组比较,模型组细胞活性显著降低,丹皮酚各浓度组具有明显的细胞保护作用,其中在作用时间24 h条件下,丹皮酚浓度为30、60、120 μmol·L⁻¹时,对VSMCs的存活率最大($P<0.05$, $P<0.01$)。上述结果表明,丹皮酚可以预保护VSMCs,减轻Ang II诱导的细胞损伤,实验选用60 μmol·L⁻¹作用24 h作为丹皮酚最佳浓度和时间。见表1。

3.3 丹皮酚可延缓Ang II诱导的VSMCs衰老

3.3.1 丹皮酚对VSMCs衰老的影响 通过SA-β-Gal染色法鉴定细胞衰老程度变化,观察衰老细胞胞质呈蓝色,细胞形状不规则,SA-β-Gal实验结果显示,正常组未见蓝色阳性细胞,模型组蓝色染色细胞数量显著增加($P<0.01$);与模型组比较,丹皮酚各浓度组SA-β-Gal染色阳性细胞数量显著降低,且呈现剂量依赖性($P<0.05$, $P<0.01$)。见图2、表2。

3.3.2 丹皮酚对VSMCs衰老相关蛋白表达的影响

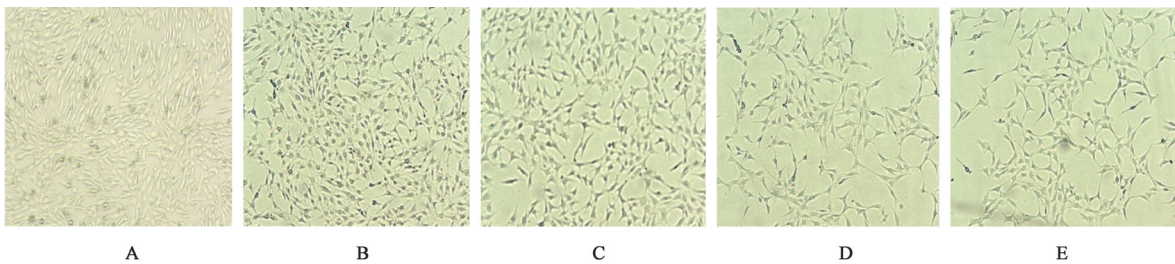
与正常组比较,模型组在Ang II刺激下p16、p21、p53、γ-H2AX蛋白表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,丹皮酚各浓度组可以明显降低p16、p21、p53、γ-H2AX蛋白表达,且呈现剂量依赖性($P<$

表1 丹皮酚对Ang II刺激下VSMCs的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of paeonol on VSMCs proliferation induced by Ang II ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	12 h	24 h	48 h
正常组		101.655±4.047	100.167±2.671	99.100±7.825
模型组		58.961±2.980 ²⁾	65.078±3.315 ²⁾	63.186±3.783 ²⁾
丹皮酚组	15	64.599±4.932	71.835±2.711	72.430±2.518
	30	71.684±2.641	83.865±2.214 ³⁾	78.702±2.640 ³⁾
	60	76.265±1.852	87.365±1.947 ⁴⁾	80.673±2.543 ³⁾
	120	82.341±2.480 ³⁾	91.064±1.651 ⁴⁾	81.423±4.588 ³⁾
	240	82.641±1.982 ³⁾	86.379±2.179 ⁴⁾	71.958±2.841

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表2-表7和图8、表9同)



注:A.正常组;B.模型组;C.丹皮酚30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组;D.丹皮酚60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组;E.丹皮酚120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组(图3、图4、图11同)

图2 丹皮酚对VSMCs衰老的影响(倒置显微镜,×100)

Fig. 2 Effect of paeonol on senescence of VSMCs (inverted microscope, ×100)

表2 丹皮酚对VSMCsβ-半乳糖苷酶染色的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of paeonol pretreatment on aging β-galactosidase staining of VSMCs ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SA-β-Gal 阳性染色率/%
正常组		2.667±1.275
模型组		65.294±2.260 ²⁾
丹皮酚组	30	52.000±2.944 ³⁾
	60	34.333±2.490 ⁴⁾
	120	26.667±1.700 ⁴⁾

0.05, $P<0.01$)。说明丹皮酚可以逆转对衰老蛋白表达的影响。见图3、表3。

3.3.3 丹皮酚对VSMCs增殖的影响 与正常组比较,模型组PCNA蛋白表达显著降低,且EdU阳性细胞数显著减少($P<0.01$);与模型组比较,丹皮酚组呈剂量依赖性恢复PCNA的表达,并明显抑制EdU

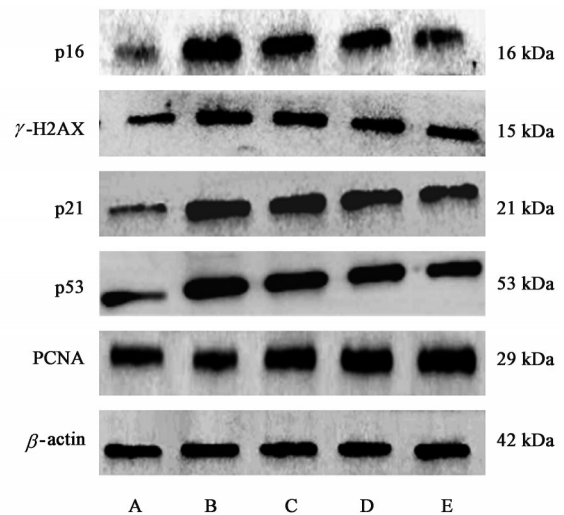


图3 各组VSMCs中p16、γ-H2AX、p21、p53、PCNA蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of p16, γ-H2AX, p21, p53 and PCNA protein expression in each group of VSMCs

表3 丹皮酚对VSMCs中衰老蛋白的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of paeonol on relative protein levels of VSMCs aging ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	p16/β-actin	γ-H2AX/β-actin	p21/β-actin	p53/β-actin	PCNA/β-actin
正常组		0.045±0.008	0.494±0.330	0.046±0.003	0.488±0.065	0.524±0.027
模型组		0.910±0.009 ²⁾	1.180±0.033 ²⁾	0.127±0.004 ²⁾	1.531±0.052 ²⁾	0.397±0.014 ¹⁾
丹皮酚组	30	0.810±0.036 ³⁾	0.960±0.042 ³⁾	0.103±0.006 ³⁾	1.097±0.022 ³⁾	0.890±0.013 ⁴⁾
	60	0.590±0.022 ⁴⁾	0.707±0.070 ³⁾	0.089±0.005 ³⁾	0.977±0.086 ⁴⁾	0.983±0.034 ⁴⁾
	120	0.440±0.037 ⁴⁾	0.445±0.070 ⁴⁾	0.068±0.005 ⁴⁾	0.660±0.030 ⁴⁾	1.062±0.049 ⁴⁾

阳性细胞数下调($P<0.05$, $P<0.01$)。见图3、表3和图4、表4。

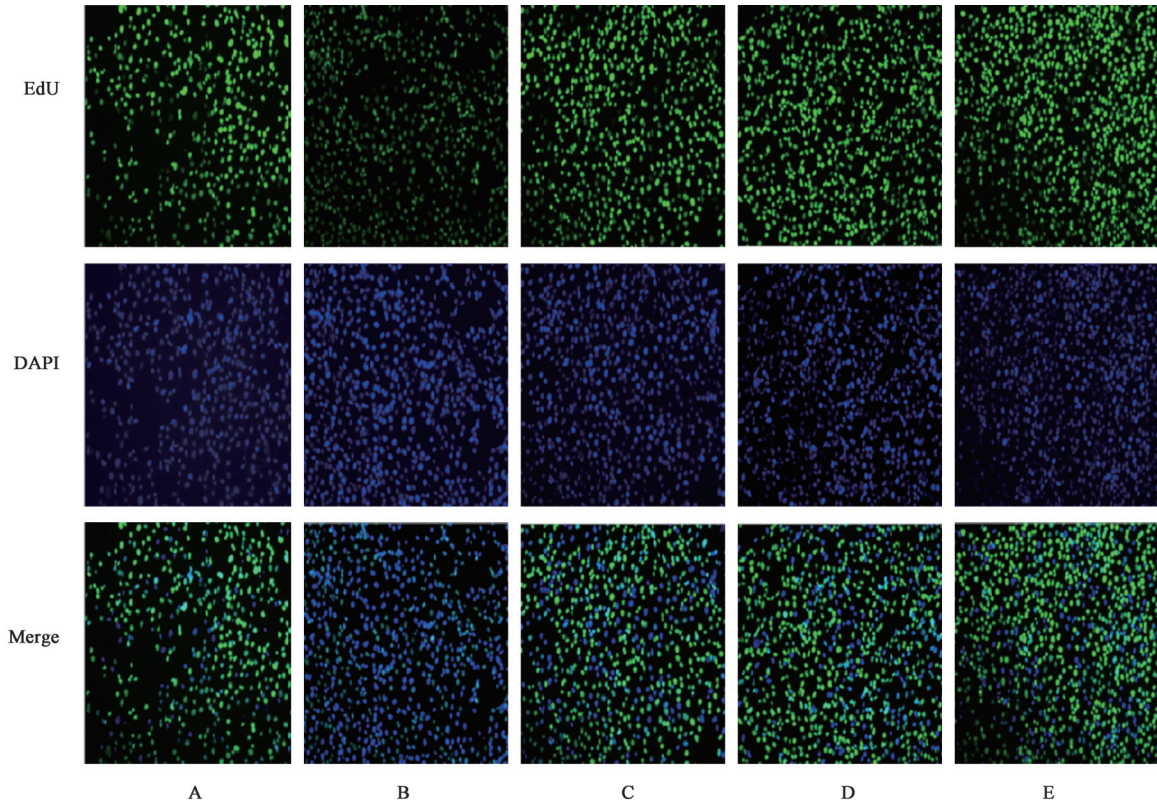


图4 不同浓度丹皮酚对衰老VSMCs增殖的影响(免疫荧光, $\times 100$)

Fig. 4 Effect of different concentrations of paeonol on proliferation of senescent VSMCs (IF, $\times 100$)

表4 丹皮酚对VSMCs细胞EdU阳性细胞的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of paeonol on EdU positive cells of VSMCs cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

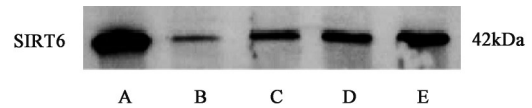
组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	EdU 阳性细胞数/%
正常组		64.892 \pm 3.269
模型组		42.274 \pm 2.719 ²⁾
丹皮酚组	30	52.719 \pm 1.823 ³⁾
	60	67.011 \pm 4.038 ⁴⁾
	120	78.473 \pm 2.717 ⁴⁾

3.4 丹皮酚通过调控SIRT6/PARP1信号通路延缓VSMCs衰老

3.4.1 SIRT6是丹皮酚的作用靶点 进一步通过DARTS方法探究丹皮酚体内发挥抗衰老作用的靶点,实验结果显示,与链酶组比较,随着丹皮酚药物浓度的上调SIRT6蛋白表达逐渐增加($P<0.01$),实验证明丹皮酚能够增强SIRT6抗链酶酶解的能力($P<0.05$, $P<0.01$),且具有结合SIRT6蛋白的作用。见图5和表5、图6和表6。

运用CETSA进一步验证丹皮酚与SIRT6的结合作用。结果表明,随着温度升高,SIRT6蛋白表达显著降低,与正常组(DMSO处理)比较,丹皮酚

组有明显的差异,在相同的温度处理下丹皮酚组SIRT6的表达稳定性更高($P<0.05$)。见图7、图8。



注:A.正常组;B.链酶1:200组;C.链酶1:400组;D.链酶1:600组;E.链酶1:800组

图5 各组SIRT6链酶浓度表达电泳

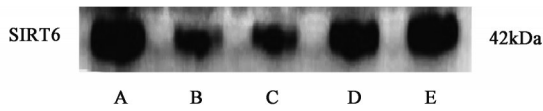
Fig. 5 Electrophoresis of SIRT6 chain enzyme concentration expression in each group

表5 链酶浓度的筛选($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度比	SIRT6
正常组		1.000 \pm 0.062
链酶	1:200	0.249 \pm 0.032 ²⁾
	1:400	0.503 \pm 0.070 ²⁾
	1:600	0.623 \pm 0.067 ²⁾
	1:800	0.648 \pm 0.059 ²⁾

3.4.2 丹皮酚对SIRT6延缓VSMCs衰老的影响

为了确保转染成功,本实验采用3条siRNA序列



注: A. 正常组; B. 链酶组; C. 链酶组 + 丹皮酚 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; D. 链酶组 + 丹皮酚 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; E. 链酶组 + 丹皮酚 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

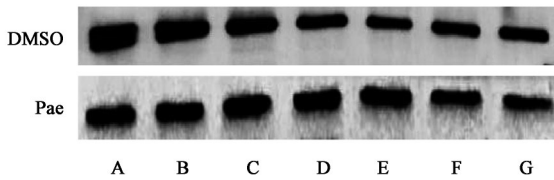
图6 各组 SIRT6 抗链酶酶解能力表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of paeonol enhancing enzymolysis ability of SIRT6 anti-chain enzyme

表6 丹皮酚增强 SIRT6 抗链酶酶解能力 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Pae enhanced enzymolysis ability of SIRT6 anti-chain enzyme ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SIRT6
正常组		0.983 \pm 0.024
链酶组		0.222 \pm 0.053 ²⁾
丹皮酚组	30	0.297 \pm 0.009 ³⁾
	60	0.645 \pm 0.038 ⁴⁾
	120	0.714 \pm 0.025 ⁴⁾



注: A. 53 $^{\circ}\text{C}$; B. 56 $^{\circ}\text{C}$; C. 59 $^{\circ}\text{C}$; D. 62 $^{\circ}\text{C}$; E. 65 $^{\circ}\text{C}$; F. 68 $^{\circ}\text{C}$; G. 71 $^{\circ}\text{C}$

图7 各组 SIRT6 蛋白的热稳定性表达的电泳

Fig. 7 Electrophoresis of thermostable expression of SIRT6 protein in each group

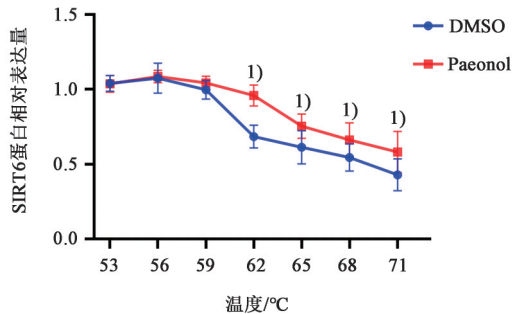


图8 各组 SIRT6 蛋白的热稳定性的表达 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 8 Thermostable expression of SIRT6 protein in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

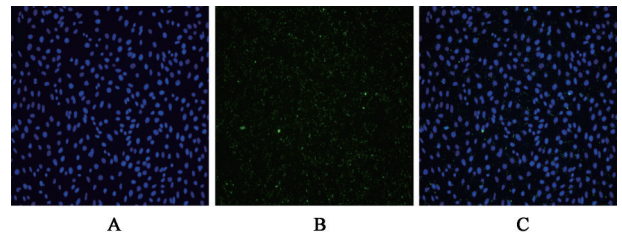
转染 VSMCs。与正常组比较,转染 siRNA-SIRT6 后 VSMCs 中 SIRT6 蛋白表达均显著降低 ($P<0.01$),表明转染成功。见图 9、表 7。

与正常组比较,模型组中 SIRT6 蛋白表达明显降低,且 p16、p21、p53、 γ -H2AX 衰老蛋白水平显著升高 ($P<0.05, P<0.01$);与 siSIRT6 组比较, SIRT6 转染后丹皮酚组抑制了 SIRT6 表达的下降,同时衰老相关蛋白表达明显降低 ($P<0.05$)。见图 10、表 8。

表7 VSMCs 中 SIRT6 沉默后的蛋白表达 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Expression of SIRT6 silencing protein in VSMCs ($\bar{x}\pm s, n=3$)

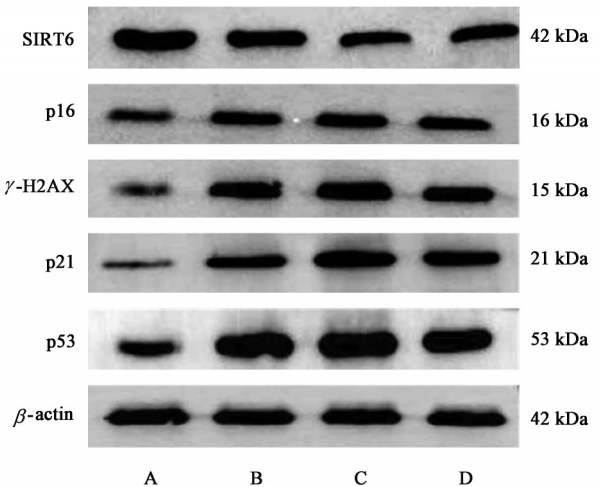
组别	SIRT6/ β -actin
空白组	1.004 \pm 0.071
正常组	0.889 \pm 0.024
siRNA-1	0.271 \pm 0.047 ²⁾
siRNA-2	0.451 \pm 0.021 ²⁾
siRNA-3	0.523 \pm 0.015 ²⁾



注: A. DAPI; B. Fam; C. Merg

图9 VSMCs 中 SIRT6 蛋白沉默检测(免疫荧光, $\times 100$)

Fig. 9 SIRT6 protein was detected by silencing in VSMCs (IF, $\times 100$)



注: A. 正常组; B. 模型组; C. siSIRT6 组; D. 丹皮酚+siSIRT6 组

图10 各组 VSMCs 中 SIRT6 及衰老蛋白表达电泳

Fig. 10 Electrophoresis of SIRT6 and senescence protein expression in each group of VSMCs

3.4.3 丹皮酚对 SIRT6 激活 PARP1 延缓 VSMCs 衰老的影响 与正常组比较,模型组 SIRT6、PARP1 水平均具有下调的趋势 ($P<0.01$);与模型组比较,丹皮酚各浓度组干预后, SIRT6、PARP1 表达随给药浓度增加而明显上调 ($P<0.05, P<0.01$)。见图 11、表 9。为进一步验证 SIRT6/PARP1 信号通路在丹皮酚减轻 VSMCs 衰老的作用,加入 SIRT6 抑制剂 (IN-1) 后。与正常组比较,模型组中 SIRT6、PARP1 蛋白水平明显下调, p16、 γ -H2AX 蛋白表达明显上升 ($P<$

表 8 VSMCs 中 SIRT6 沉默后对 SIRT6/PARP1 信号通路相关蛋白的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Effect of SIRT6 silencing on SIRT6/PARP1 signal pathway related proteins in VSMCs ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SIRT6/ β -actin	p16/ β -actin	γ -H2AX/ β -actin	p21/ β -actin	p53/ β -actin
正常组		0.881 \pm 0.032	0.224 \pm 0.034	0.478 \pm 0.048	0.155 \pm 0.017	0.351 \pm 0.025
模型组		0.716 \pm 0.030 ¹⁾	0.776 \pm 0.044 ²⁾	0.868 \pm 0.036 ²⁾	0.773 \pm 0.029 ²⁾	0.837 \pm 0.044 ²⁾
siSIRT6 组		0.544 \pm 0.024 ³⁾	0.981 \pm 0.032 ³⁾	1.016 \pm 0.031 ³⁾	0.997 \pm 0.063 ³⁾	1.018 \pm 0.065 ³⁾
丹皮酚+siSIRT6 组	60	0.610 \pm 0.037 ⁴⁾	0.760 \pm 0.039 ⁴⁾	0.791 \pm 0.013 ⁴⁾	0.732 \pm 0.046 ⁴⁾	0.781 \pm 0.024 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$;与 siSIRT6 组比较⁴⁾ $P<0.05$

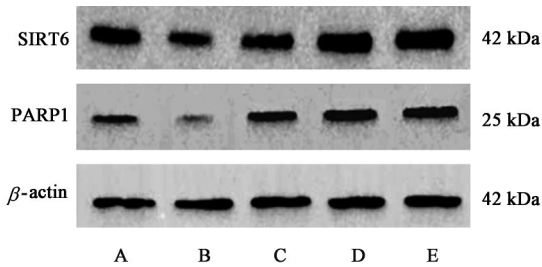


图 11 各组 VSMCs 中 SIRT6、PARP1 蛋白表达电泳

Fig. 11 Electrophoresis of SIRT6 and PARP1 proteins in each group of VSMCs

0.05, $P<0.01$); 与模型组比较,丹皮酚组 p16、 γ -HA2X 蛋白表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$); 与 IN-1 组比较,丹皮酚+IN-1 组 SIRT6、PARP1 表达显著增加, p16、 γ -H2AX 蛋白表达显著降低($P<0.01$)。

表 10 丹皮酚对 SIRT6 抑制后 SIRT6、PARP1 信号通路蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 10 Effect of paeonol on SIRT6 and PARP1 pathway proteins after SIRT6 inhibition ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SIRT6/ β -actin	PARP1/ β -actin	p16/ β -actin	γ -H2AX/ β -actin
正常组		0.825 \pm 0.033	0.816 \pm 0.017	0.466 \pm 0.036	0.481 \pm 0.023
模型组		0.625 \pm 0.061 ¹⁾	0.604 \pm 0.027 ¹⁾	1.019 \pm 0.015 ²⁾	0.946 \pm 0.023 ²⁾
丹皮酚组	60	1.038 \pm 0.032 ⁴⁾	1.027 \pm 0.029 ⁴⁾	0.775 \pm 0.033 ³⁾	0.408 \pm 0.037 ⁴⁾
IN-1 组		0.183 \pm 0.021	0.283 \pm 0.021	0.940 \pm 0.029	0.522 \pm 0.026
丹皮酚+IN-1 组	60	0.907 \pm 0.034 ⁵⁾	0.634 \pm 0.029 ⁵⁾	0.244 \pm 0.048 ⁵⁾	0.234 \pm 0.021 ⁵⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与 IN-1 组比较⁵⁾ $P<0.01$

4 讨论

细胞衰老是由多种刺激引起的表型改变过程,将导致不可逆转的生长停滞^[4],是 AS 相关心血管疾病的重要危险因素。AS 是一种慢性炎症性疾病^[18],血管中的多种衰老细胞与 AS 的进程密切相关,在 AS 斑块中发现了大量衰老的 VSMCs,其细胞形态发生改变,体积增大;同时,增殖减少、SA- β -Gal 活性增加,且衰老蛋白 p16、p21 的表达及 DNA 损伤增加^[2,19]。但是, VSMCs 衰老参与 AS 进程的分子机制尚不明确,本研究对此做进一步探讨。

Ang II 是肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)的主要活性肽激素,是促进 AS 等疾病发展

表 9 丹皮酚对 SIRT6 抑制后 SIRT6、PARP1 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

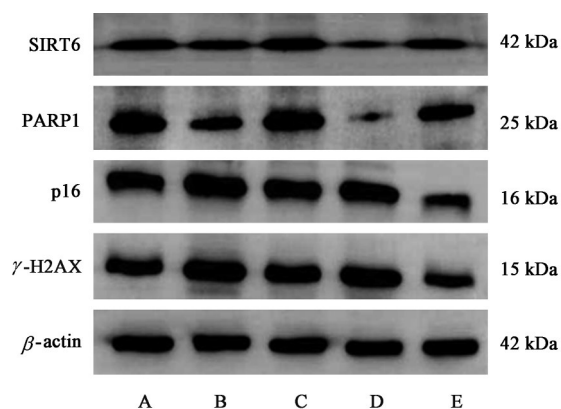
Table 9 Effect of paeonol on SIRT6 and PARP1 proteins after SIRT6 inhibition ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SIRT6/ β -actin	PARP1/ β -actin
正常组		0.763 \pm 0.049	0.724 \pm 0.029
模型组		0.518 \pm 0.090 ²⁾	0.215 \pm 0.044 ²⁾
丹皮酚组	30	0.708 \pm 0.015 ³⁾	0.859 \pm 0.047 ⁴⁾
	60	0.912 \pm 0.021 ⁴⁾	0.971 \pm 0.028 ⁴⁾
	120	1.014 \pm 0.011 ⁴⁾	1.112 \pm 0.016 ⁴⁾

表明 SIRT6 表达受到抑制剂阻碍后,丹皮酚对 SIRT6 升高的作用被显著逆转,同时其下游蛋白 PARP1 表达降低。见表 10、图 12。

的重要病理因素^[20]。有证据表明 Ang II 能促进氧化,通过 AT₁ 受体介导 VSMCs 衰老,同时也会引起细胞 DNA 损伤反应^[21]。因此,本实验采用 Ang II 刺激 VSMCs,复制细胞衰老模型。结果证实,Ang II 可显著诱导 VSMCs 衰老,加速细胞衰老相关蛋白的生成,造成 DNA 损伤累积。

课题组前期研究发现,丹皮酚具有显著的抗 AS 作用,能够抑制 VSMCs 过度增殖、促进 VSMCs 自噬^[22]。也有实验证明丹皮酚可延缓细胞衰老,提高衰老细胞存活率;丹皮酚可通过抑制丝裂原活化蛋白激酶/激活蛋白-1(MAPK/AP-1)通路和激活二氢硫辛酰胺脱氢酶/核因子 E₂ 相关因子 2/抗反应元件



注: A. 正常组; B. 模型组; C. 丹皮酚组; D. IN-1组; E. 丹皮酚+IN-1组

图12 各组VSMCs中SIRT6、PARP1及衰老蛋白表达电泳
Fig. 12 Electrophoresis of SIRT6, PARP1 and senescence protein in VSMCs of each group

(DLN/Nrf2/ARE)信号通路,从而延缓紫外线诱导的皮肤老化^[23];丹皮酚可显著减轻H₂O₂诱导的MRC-5细胞衰老,且其抑制衰老的作用与调节ID-1/p16^{INK4a}/p53/p21^{Waf1/Cip1}和Nrf2通路有关^[15]。以上研究表明丹皮酚在抗衰老方面有良好的应用前景^[17]。本研究结果显示,丹皮酚可以显著逆转Ang II诱导的VSMCs衰老,降低SA-β-Gal阳性率、提高VSMCs增殖能力,下调衰老蛋白表达,并且该作用呈现浓度依赖性。

SIRT6是一种参与细胞衰老、增殖、基因组稳定性等多种细胞生命活动的调控分子,在调节细胞衰老和衰老相关心血管疾病中发挥了关键的作用^[8]。SIRT6能够维持衰老细胞的代谢稳定,并能与C-端结合蛋白结合促进DNA碱基切除修复^[24];SIRT6还能通过调节核转录因子-κB(NF-κB)抑制衰老细胞的炎症反应^[25]。敲除SIRT6的小鼠与正常小鼠比较,表现出寿命缩短、代谢失调、淋巴细胞减少等衰老症状并加剧AS进展^[26]。PARP1作为DNA损伤的传感器可识别DNA损伤,SIRT6通过激活PARP1减少DNA损伤,从而改善细胞衰老^[27-28]。本研究中,笔者采用细胞热迁移和药物亲和反应靶点稳定实验,表明SIRT6是丹皮酚延缓VSMCs衰老的重要靶点;而抑制或沉默SIRT6后,丹皮酚延缓VSMCs衰老的作用被显著逆转,提示丹皮酚是通过上调SIRT6/PARP1信号通路减轻DNA损伤,发挥延缓VSMCs衰老的作用。

本研究建立Ang II诱导小鼠VSMCs衰老的细胞模型,探索丹皮酚调控VSMCs衰老抗AS的作用机制。下一步将在AS动物模型基础上验证丹皮酚

的抗VSMCs衰老作用及作用靶点,以期为AS的临床治疗提供新的研究依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 赵雅,吴安东,廖立勇,等. 血管衰老及心血管疾病[J]. 中国科学:生命科学,2022,52(2):138-150.
- [2] MATTHEWS C, GORENNE I, SCOTT S, et al. Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: Effects of telomerase and oxidative stress[J]. *Circ Res*, 2006, 99(2):156-164.
- [3] GROOTAERT M, MOULIS M, ROTH L, et al. Vascular smooth muscle cell death, autophagy and senescence in atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(4):622-634.
- [4] BENNETT M R, SINHA S, OWENS G K. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2016, 118(4):692-702.
- [5] XIANG X, XIE L, LIN J, et al. Estrogen receptor alpha mediates 17β-estradiol, up-regulates autophagy and alleviates hydrogen peroxide-induced vascular senescence[J]. *Biogerontology*, 2023, 23.
- [6] URYGA A K, GROOTAERT M, GARRIDO A M, et al. Telomere damage promotes vascular smooth muscle cell senescence and immune cell recruitment after vessel injury[J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1):611.
- [7] CHI C, LI D J, JIANG Y J, et al. Vascular smooth muscle cell senescence and age-related diseases: State of the art[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(7):1810-1821.
- [8] 陈嘉睿,练桂丽. Sirtuin 6抑制平滑肌细胞衰老,减少动脉粥样硬化[J]. 中华高血压杂志, 2021, 29(3):284.
- [9] GUO Z, LI P, GE J, et al. SIRT6 in aging, metabolism, inflammation and cardiovascular diseases [J]. *Aging Dis*, 2022, 13(6):1787-1822.
- [10] KAWAHARA T L, MICHISHITA E, ADLER A S, et al. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span[J]. *Cell*, 2009, 136(1):62-74.
- [11] ONN L, PORTILLO M, ILIC S, et al. SIRT6 is a DNA double-strand break sensor[J]. *Elife*, 2020, 29(1):e51636.
- [12] TIAN X, FIRSANOV D, ZHANG Z, et al. SIRT6 is responsible for more efficient DNA double-strand break repair in long-lived species[J]. *Cell*, 2019, 177(3):622-638.

- [13] MAO Z, HINE C, TIAN X, et al. SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1 [J]. *Science*, 2011, 332(6036):1443-1446.
- [14] 刘雅蓉, 邵倩, 张慧慧, 等. 丹皮酚上调小凹蛋白-1抑制NF- κ B通路减轻动脉粥样硬化模型大鼠主动脉血管内皮炎症的作用[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(11):2578-2585.
- [15] 孙艺丹, 侯晓峰. 丹皮酚对H₂O₂诱导血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. *中国处方药*, 2019, 17(4):37-38.
- [16] 杨丽花. 丹皮酚对MRC-5细胞的抗衰老和抑制HaCaT细胞的EMT作用[D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [17] JAMAL J, MUSTAFA M R, WONG P F. Paeonol protects against premature senescence in endothelial cells by modulating Sirtuin 1 pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 154(2):428-436.
- [18] ZHU Y, XIAN X, WANG Z, et al. Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation[J]. *Biomolecules*, 2018, 8(3):80.
- [19] KHAVINSON V, LINKOVA N, DYATLOVA A, et al. Senescence-associated secretory phenotype of cardiovascular system cells and inflammaging: Perspectives of peptide regulation[J]. *Cells*, 2022, 12(1):106.
- [20] HSU P Y, LIN W Y, LIN R T, et al. MicroRNA let-7g inhibits angiotensin II -induced endothelial senescence via the LOX-1-independent mechanism [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(4):2243-2251.
- [21] PARK S H, BELCASTRO E, HASAN H, et al. Angiotensin II -induced upregulation of SGLT1 and 2 contributes to human microparticle-stimulated endothelial senescence and dysfunction: Protective effect of gliflozins [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2021, 20(1):65.
- [22] CHEN J, DAI M, WANG Y. Paeonol inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells stimulated by high glucose via Ras-Raf-ERK1/2 signaling pathway in coculture model [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014:484269.
- [23] SUN Z, DU J, HWANG E, et al. Paeonol extracted from *Paeonia suffruticosa* Andr. ameliorated UVB-induced skin photoaging via DLD/Nrf2/ARE and MAPK/AP-1 pathway [J]. *Phytother Res*, 2018, 32(9):1741-1749.
- [24] KAIDI A, WEINERT B T, CHOUDHARY C, et al. Human SIRT6 promotes DNA end resection through CtIP deacetylation [J]. *Science*, 2010, 329(5997):1348-1353.
- [25] XIE T, YUAN J, MEI L, et al. Luteolin suppresses TNF- α -induced inflammatory injury and senescence of nucleus pulposus cells via the Sirt6/NF- κ B pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2022, 24(1):469.
- [26] HE J, ZHANG G, PANG Q, et al. SIRT6 reduces macrophage foam cell formation by inducing autophagy and cholesterol efflux under ox-LDL condition [J]. *FEBS J*, 2017, 284(9):1324-1337.
- [27] KIM C, WANG X D, YU Y. PARP1 inhibitors trigger innate immunity via PARP1 trapping-induced DNA damage response [J]. *Elife*, 2020, 9:e60637.
- [28] WANG Y, LUO W, WANG Y. PARP-1 and its associated nucleases in DNA damage response [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2019, 81:102651.

[责任编辑 周冰冰]