

## 白藜芦醇介导SIRT2干预地塞米松诱导的骨髓间充质干细胞线粒体自噬

李雨珊<sup>1</sup>, 王鹏皓<sup>2</sup>

(中国医科大学附属第一医院 1. 药学部; 2. 骨科, 沈阳 110001)

**摘要** 目的 探讨白藜芦醇(Res)通过SIRT2干预地塞米松(Dex)诱导骨髓间充质干细胞(BMSCs)线粒体自噬的作用机制。方法 应用Res、Dex和SIRT2拮抗剂(NAM)分别作用小鼠BMSCs;使用透射电子显微镜(TEM)观察细胞线粒体自噬小体;采用Western blotting和实时PCR测定SIRT2、LC-3、Beclin-1、TOM20和Hsp60 mRNA和蛋白活性表达水平。结果 Res以剂量依赖性和时间依赖的方式增强了BMSCs中SIRT2的表达;10<sup>-6</sup> mol/L的Dex抑制了BMSCs细胞的增殖和活力,并且显著下调了BMSCs细胞内SIRT2 mRNA和蛋白活性的表达,而Res(10<sup>-6</sup> mol/L)显著抑制了Dex对BMSCs细胞增殖及SIRT2表达的负性调控作用;Res(10<sup>-6</sup> mol/L)显著增加了LC-3 mRNA和Beclin-1 mRNA的表达( $P < 0.05$ ),显著降低了TOM20和Hsp60蛋白的表达水平( $P < 0.05$ )。结论 Res通过介导SIRT2参与调控Dex诱导的BMSCs线粒体自噬。

**关键词** 白藜芦醇; 地塞米松; SIRT2; 线粒体自噬; 骨髓间充质干细胞

中图分类号 R336 文献标志码 A 文章编号 0258-4646(2024)08-0731-05

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20240722.1305.032>

DOI:10.12007/j.issn.0258-4646.2024.08.010

### Study of resveratrol-mediated SIRT2 intervention in dexamethasone-induced mitophagy in bone marrow mesenchymal stem cells

LI Yushan<sup>1</sup>, WANG Penghao<sup>2</sup>

(1. Department of Pharmacy, The First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Department of Orthopaedics, The First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

**Abstract Objective** To investigate the mechanism of resveratrol (Res)-intervening dexamethasone (Dex)-induced mitochondrial autophagy in bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) through SIRT2. **Methods** Mouse osteoblastic BMSCs were treated with Res, Dex, and the SIRT2 antagonist NAM. The mitochondria autophagosomes were observed using transmission electron microscopy (TEM). The protein and mRNA expression levels of SIRT2, LC-3, Beclin-1, TOM20, and Hsp60 were determined using Western blotting and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Res enhanced SIRT2 expression in BMSCs in a dose- and time-dependent manner. Dex (10<sup>-6</sup> mol/L) inhibited the proliferation and viability of BMSCs, and significantly down-regulated the expression of SIRT2 mRNA and protein in BMSCs, whereas Res (10<sup>-6</sup> mol/L) significantly inhibited the negative regulatory effects of Dex on the proliferation of and SIRT2 expression in BMSCs. Res (10<sup>-6</sup> mol/L) significantly increased the mRNA expression of LC-3 and Beclin-1 ( $P < 0.05$ ), but significantly decreased the protein expression of TOM20 and Hsp60 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Res plays a role in the regulation of Dex-induced mitochondrial autophagy in BMSCs by mediating SIRT2.

**Keywords** resveratrol; dexamethasone; SIRT2; mitochondrial autophagy; bone marrow mesenchymal stem cells

骨质疏松症是一种典型的衰老相关疾病,而骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)功能障碍被认为骨丢失的主要原因。研究<sup>[1]</sup>认为,骨组织氧化应激增加是骨质疏松症的主要

因素之一。自噬在缺氧或应激条件下被激活,是细胞内稳态的重要调节因子,而线粒体自噬是一种选择性自噬形式,能够选择性地消除衰老或受损的线粒体,有助于线粒体质量控制,并参与应激反应<sup>[2]</sup>。SIRT2是NAD<sup>+</sup>依赖的Ⅲ类组蛋白去乙酰化酶的sirtuin家族之一,影响NAD酶解过程中蛋白质底物的去乙酰化。SIRT2在多种生物学功能调节中起着重要作用,包括线粒体稳态、细胞衰老和细胞死亡。SIRT2在小鼠中的激活与骨质疏松症等多种

基金项目:辽宁省自然科学基金(LJKMZ20221188)

作者简介:李雨珊(1991-),女,护师,本科。

通信作者:王鹏皓, E-mail: phwang@cmu.edu.cn

收稿日期:2023-08-11

网络出版时间:2024-07-23 09:52:31

相关疾病的延迟发作相关<sup>[3]</sup>。白藜芦醇(resveratrol, Res)富含于红酒、葡萄和其他各种食物来源中,而SIRT2可被氧化应激和Res治疗激活<sup>[4]</sup>。Res通过激活SIRT2在BMSCs、成骨细胞和破骨细胞活性之间的平衡中发挥了重要作用,进而维持老年小鼠体内的骨密度<sup>[5]</sup>。Res可能通过激活BMSCs中的SIRT2来抑制二氧化氢诱导的细胞凋亡。本研究旨在阐明Res通过介导SIRT2调控地塞米松(dexamethasone, Dex)诱导的BMSCs线粒体自噬的作用机制,为骨质疏松症的治疗提供一种新的方向。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

细胞培养基和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Gibco公司, Res购自美国Sigma公司, SIRT2抑制剂NAM购自美国Sigma公司, 多克隆兔抗小鼠TOM20抗体(sc-11415)(1 : 200)、单克隆小鼠抗小鼠LC-3抗体(sc-376404)(1 : 1 000)和多克隆山羊抗小鼠Hsp60抗体(sc-10520)均购自美国圣克鲁斯生物技术公司, TRIzol试剂购自中国生命技术有限公司, TaqMan试剂购自日本TaKaRa公司。

### 1.2 小鼠BMSCs的培养及分组

小鼠BMSCs购自中国北京常青藤转化医学中心。细胞在含有10%胎牛血清MEM中传代培养, 在37℃下含5% CO<sub>2</sub>细胞于不同浓度的Res(0 mol/L、

10<sup>-8</sup> mol/L、10<sup>-7</sup> mol/L和10<sup>-6</sup> mol/L)中培养24 h。SIRT2抑制剂NAM也用于暴露或非暴露在10<sup>-6</sup> mol/L Dex后的BMSCs。细胞共分为5组: 正常对照组, 常规培养; Dex组, 培养液中加入Dex(10<sup>-6</sup> mol/L); Res组, 培养液中加入Res(10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup> mol/L); Dex+Res组, 培养液中加入Dex(10<sup>-6</sup> mol/L)及Res(10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup> mol/L); NAM组, 培养液中加入NAM(100 μmol/L)及Res(10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup> mol/L)。

### 1.3 蛋白质制备和Western blotting检测

采用PBS洗涤BMSCs细胞, 应用放射免疫沉淀试验缓冲液收集所有蛋白, 在4℃下12 000 r/min离心10 min, 收集上清液, 与缓冲液混合, 100℃10 min变性, 使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对样品进行分离。然后将样品转移到聚偏氟乙烯膜上。将细胞膜与含有Tween 20(TBST)和5%牛血清白蛋白的tris缓冲盐水(tris buffer saline, TBS)孵育120 min, TBS洗涤3次, 将细胞膜与相关的一抗在4℃下孵育过夜, 用辣根过氧化物酶标记的二抗孵育1.5 h。用TBST洗涤膜3次, 使用BeyoECL+试剂盒(Beyotime, 中国)显色。

### 1.4 实时PCR检测

从BMSCs细胞中提取总RNA, 逆转录为cDNA, 实时PCR检测SIRT2 mRNA表达。使用引物Premer5.0软件(美国)设计所有引物。见表1。引物由南京金思瑞科技有限公司合成。

表1 实时PCR引物序列

Tab.1 Primer sequences used for real time PCR

Gene	Primer design
SIRT2	Forward primer 5'-GTTGTGTGCCTTCGTTTTGGA-3'
	Reverse primer 5'-AGCCCGGTTTGGCTTATACA-3'
LC-3	Forward primer 5'-CTCTCTGAGCCTTAGGTGCC-3'
	Reverse primer 5'-ACTCGTGGGGTGACCATTTTC-3'
Beclin-1	Forward primer 5'-GAATGGAGGGGCTTAAGGCC-3'
	Reverse primer 5'-CCTCTTCCTCCTGGCTCTCT-3'
GAPDH	Forward primer 5'-AGTCTACTGGCGTCTTCACC-3'
	Reverse primer 5'-CCACGATGCCAAAGTTGTCA-3'

实时PCR反应条件如下: 94℃4 min, 95℃变性20 s, 60℃退火30 s, 72℃延长30 s, 循环35次, 72℃延长6 min。扩增后, 加入5 μL PCR产物和1 μL DNA上载缓冲液, 在60 V下进行电泳。

### 1.5 透射电子显微镜观察

BMSCs细胞在2.5%戊二醛PBS中室温固定2 h, 然后在1%四氧化锇和2%醋酸铀酰水中固定1 h。经梯度乙醇脱水后包埋切片。将样品用醋酸铀酰和柠檬

檬酸铅双染色,使用JEM-1200EX透射电子显微镜(JEM-1200EX,日本电子株式会社)观察样品。

### 1.6 细胞增殖检测

BMSCs细胞接种在96孔板中培养24 h,分别用 $10^{-6}$  mol/L Dex、 $10^{-6}$  mol/L Res和 $10^{-6}$  mol/L NAM处理。在培养基中加入10 mmol/L BrdU溶液培养2.5 h。BMSCs细胞在4%多聚甲醛中固定后,使用细胞增殖ELISA BrdU比色试剂盒(罗氏公司,美国)测量BrdU掺入量。

### 1.7 细胞活力检测

BMSCs细胞接种在96孔板中培养24 h,分别用 $10^{-6}$  mol/L Dex、 $10^{-6}$  mol/L Res和 $10^{-6}$  mol/L NAM处理BMSCs细胞,加入10  $\mu$ L MTT试剂(5 mg/mL),37  $^{\circ}$ C孵育4 h,加入100  $\mu$ L二甲亚砷溶解。采用光谱Max Plus 384酶标仪(德国)在570 nm波长下测量光密度。

### 1.8 统计学分析

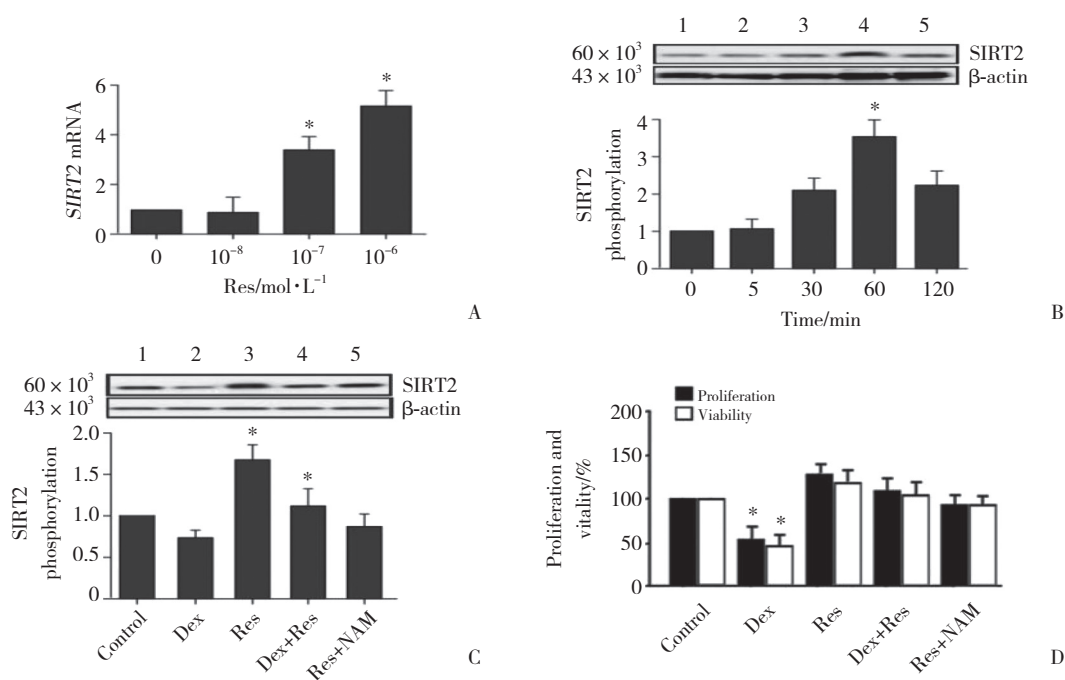
采用SPSS 15.0软件进行统计分析。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。方差齐性检验采用Leven检验。多组间比

较采用单因素方差分析(ANOVA)和LSD检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Res增强BMSCs细胞增殖和SIRT2活性表达

将Res( $10^{-8}$ 到 $10^{-6}$  mol/L)作用于BMSCs(作用时间0~120 min),检测SIRT2 mRNA和蛋白的表达。应用Res( $10^{-8}$ 到 $10^{-6}$  mol/L)作用BMSCs 120 min(图1A),应用Res( $10^{-6}$  mol/L)作用BMSCs(0~120 min)后行Western blotting检测(图1B)。结果显示,Res以剂量依赖性和时间依赖的方式增强了BMSCs中SIRT2的表达。同时,将Res( $10^{-6}$  mol/L)作用于暴露在Dex( $10^{-6}$  mol/L)中的BMSCs细胞。BrdU和MTT检测结果显示,Dex( $10^{-6}$  mol/L)显著下调了BMSCs细胞内SIRT2 mRNA和蛋白的表达(图1C),并且抑制了BMSCs细胞的增殖和活力(图1D),Res( $10^{-6}$  mol/L)显著抑制了Dex对BMSCs细胞增殖及SIRT2表达的负性调控作用。然而,NAM可以消除Res对BMSCs中SIRT2表达的影响(图1C)。



A, real-time PCR was used to detect SIRT2 mRNA expression; B, Western blotting was performed to assess the time-dependent expression of SIRT2 expression; C, Western blotting was performed to assess the concentration-dependent expression of SIRT2 expression; D, detection of cell proliferation and viability. 1, control group; 2, Dex group; 3, Res group; 4, Dex+Res group; 5, Res+NAM group. \* $P < 0.05$  vs. control group.

图1 Res对BMSCs内SIRT2表达和细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of Res on SIRT2 expression and cell proliferation in BMSCs

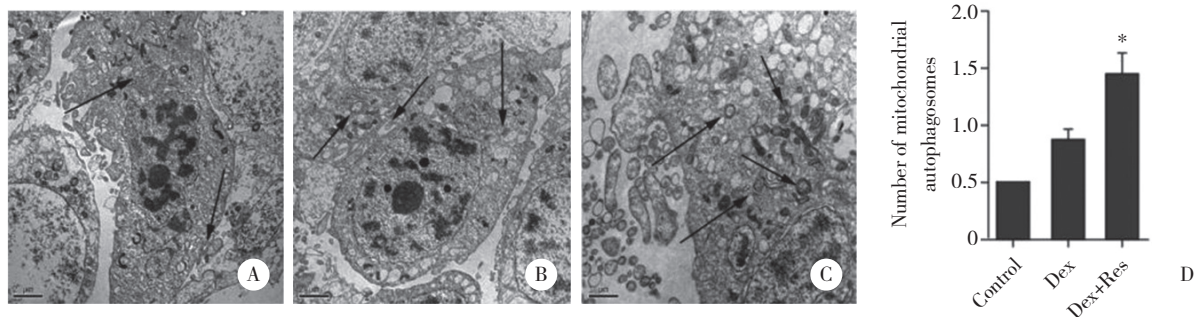
### 2.2 Res抑制Dex诱导的BMSCs线粒体自噬

应用透射电镜观测Res和Dex对BMSCs细胞内

线粒体自噬的影响。结果显示,Dex增加了BMSCs细胞内线粒体自噬小体的数量,而Res增强了此效应

(图2)。采用实时PCR和Western blotting检测细胞内线粒体自噬关键因子的表达,结果显示,Res (10<sup>-6</sup> mol/L) 显著增加了LC-3 mRNA和Beclin-1 mRNA的

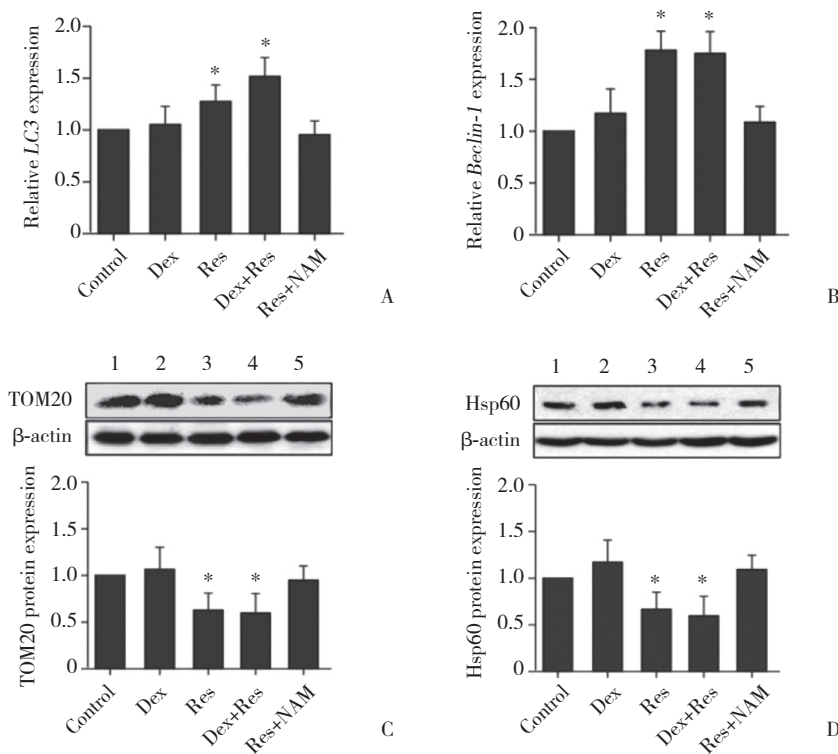
表达水平 (P < 0.05,图3A、3B), 降低了TOM20和Hsp60蛋白的表达水平 (P < 0.05,图3C、3D)。



A, control group (×1 000); B, Dex group (×1 000); C, Dex+Res group (×1 000); D, the number of mitochondrial autophagosomes in BMSCs cells. \*P < 0.05 vs. control group. Arrows indicate autophagosomes under election microscopy.

图2 Res对BMSCs内自噬小体的影响

Fig.2 Effect of Res on autophagosomes within BMSCs



A, real-time PCR was used to detect LC3 mRNA expression; B, real-time PCR was used to detect Beclin-1 mRNA expression; C, Western blotting was performed to detect TOM20 expression; D, Western blotting was performed to detect HSP60 expression. 1, control group; 2, Dex group; 3, Res group; 4, Dex+Res group; 5, Res+NAM group. \*P < 0.05 vs. control group.

图3 Res对BMSCs内线粒体自噬关键分子的影响

Fig.3 Effect of Res on key molecules of mitochondrial autophagy in BMSCs

### 3 讨论

线粒体在人类衰老的发展中发挥重要作用,线粒体功能障碍可引起一系列的代谢变化,包括活性

氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生增加,ATP和氧的消耗减少,甚至导致细胞死亡。线粒体自噬通过消除线粒体防止ROS的积累。不仅可以通过清除受损的线粒体来保护细胞,还可以促进新线粒体

的生物合成,这对细胞内稳态至关重要。在人类衰老过程中,自噬可以缓解氧化应激的增加,细胞自噬是年龄相关性骨质疏松症的一个重要因素。自噬的减少似乎促进了氧化应激的增加,从而导致骨丢失,而自噬的增加则抑制了这种作用<sup>[6]</sup>。此外,年龄相关的骨量丢失与骨ROS水平的增加和骨质疏松患者外周血SIRT2活性有关<sup>[7]</sup>。SIRT2是细胞防御氧化应激和细胞存活的重要调节因子之一,可以被Res激活来维持线粒体功能<sup>[8]</sup>。本研究结果显示,Res以剂量依赖和时间依赖的方式增强了BMSCs中SIRT2的表达。此外,Res增强了Dex处理的BMSCs的SIRT2表达,而NAM消除了Res对SIRT2表达的影响。

线粒体靶向自噬在预防衰老、神经退行性疾病等病理过程中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。本研究结果显示,Dex+Res组的线粒体自噬标志蛋白TOM20和Hsp60均低于Dex组。同样,最近的1项研究<sup>[10]</sup>报道显示,Hela细胞的血清饥饿可以诱导线粒体自噬,使LC-3增加、TOM20降低。自噬通常是一个自限性的过程,通过多种机制保护细胞免于细胞死亡,包括维持生物能量稳态、错误折叠和聚集倾向蛋白的循环、以及去除未偶联或可渗透性线粒体。细胞凋亡的内在途径由线粒体膜通透性(mitochondrial membrane permeability, MMP)启动<sup>[11]</sup>。如果MMP仅限于线粒体的一部分,将导致极化线粒体的选择性自噬去除,并防止细胞死亡。当SIRT2被抑制时,Res就失去了增加线粒体自噬的能力<sup>[12]</sup>。Res通过上调p53的去乙酰化来增加SIRT2的表达和激活,从而下调Akt的磷酸化<sup>[13]</sup>。本研究结果证实,Res可以通过增强SIRT2的表达诱导线粒体自噬,从而削减Dex对BMSCs的负性调节作用。然而,Res治疗骨质疏松症需要进一步的实验研究,以确认自噬功能障碍和骨质疏松症之间的可能关系,为预防和治疗骨质疏松症提供依据。

#### 参考文献:

- [1] MARCUCCI G, DOMAZETOVIC V, NEDIANI C, et al. Oxidative stress and natural antioxidants in osteoporosis: novel preventive and therapeutic approaches [J]. *Antioxidants*, 2023, 12 (2) : 373. DOI: 10.3390/antiox12020373.
- [2] MAIORANA A, TAGLIAFERRI F, DIONISI-VICI C. Current understanding on pathogenesis and effective treatment of glycogen storage disease type Ib with empagliflozin; new insights coming from diabetes for its potential implications in other metabolic disorders [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1145111. DOI: 10.3389/fendo.2023.1145111.
- [3] MORENO-Q G, HERRERA-R A, YEPES AF, et al. Proapoptotic effect and molecular docking analysis of curcumin-resveratrol hybrids in colorectal cancer chemoprevention [J]. *Molecules*, 2022, 27 (11) : 3486. DOI: 10.3390/molecules27113486.
- [4] GIORDO R, WEHBE Z, POSADINO AM, et al. Disease-associated regulation of non-coding RNAs by resveratrol: molecular insights and therapeutic applications [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 894305. DOI: 10.3389/fcell.2022.894305.
- [5] GOWD V, KANIKA, JORI C, et al. Resveratrol and resveratrol nano-delivery systems in the treatment of inflammatory bowel disease [J]. *J Nutr Biochem*, 2022, 109: 109101. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2022.109101.
- [6] SANTOS BUGLIO D, MARTON LT, LAURINDO LF, et al. The role of resveratrol in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a systematic review [J]. *J Med Food*, 2022, 25 (8) : 797-806. DOI: 10.1089/jmf.2021.0084.
- [7] BYRNES K, BLESSINGER S, BAILEY NT, et al. Therapeutic regulation of autophagy in hepatic metabolism [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12 (1) : 33-49. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.07.021.
- [8] ZHANG JY, LI R, MAN K, et al. Enhancing osteogenic potential of hDPSCs by resveratrol through reducing oxidative stress via the Sirt1/Nrf2 pathway [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60 (1) : 501-508. DOI: 10.1080/13880209.2022.2037664.
- [9] SIDDHI J, SHERKHANE B, KALAVALA AK, et al. Melatonin prevents diabetes-induced nephropathy by modulating the AMPK/SIRT1 axis: focus on autophagy and mitochondrial dysfunction [J]. *Cell Biol Int*, 2022, 46 (12) : 2142-2157. DOI: 10.1002/cbin.11899.
- [10] FENG JL, MANSOURIPOUR A, XI ZC, et al. Nujiangexanthone A inhibits cervical cancer cell proliferation by promoting mitophagy [J]. *Molecules*, 2021, 26 (10) : 2858. DOI: 10.3390/molecules26102858.
- [11] LAI XY, ZHANG YJ, WU JN, et al. Rutin attenuates oxidative stress via PHB2-mediated mitophagy in MPP<sup>+</sup>-induced SH-SY5Y cells [J]. *Neurotox Res*, 2023, 41 (3) : 242-255. DOI: 10.1007/s12640-023-00636-5.
- [12] ZHAO LX, SUN W, BAI DC. Protective effect of resveratrol on rat cardiomyocyte H9C2 cells injured by hypoxia/reoxygenation by regulating mitochondrial autophagy PTEN-induced putative kinase protein 1/Parkinson disease protein 2 signaling pathway [J]. *J Tradit Chin Med*, 2022, 42 (2) : 176-186. DOI: 10.19852/j.cnki.jtcm.20220311.002.
- [13] DAWOOD AF, AL HUMAYED S, MOMENAH MA, et al. MiR-155 dysregulation is associated with the augmentation of ROS/p53 axis of fibrosis in thioacetamide-induced hepatotoxicity and is protected by resveratrol [J]. *Diagnostics*, 2022, 12 (7) : 1762. DOI: 10.3390/diagnostics12071762.

(编辑 于 溪)