

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.10.008

SS-31 通过调控线粒体功能延缓细胞衰老的分子机制*

时孝晴^{1,2} 揭立士^{1,2} 吴 鹏¹ 茆 军¹ 张农山¹ 王培民¹ 殷松江^{1△}

(1 南京中医药大学附属医院 江苏 南京 210029; 2 南京中医药大学第一临床医学院 江苏 南京 210029)

摘要 目的:探讨 SS-31 通过调控线粒体功能延缓细胞衰老的调控效应。**方法:**将 HEK293T 细胞分为空白组、模型组、SS-31 组。使用 H₂O₂ 诱导应激性衰老模型,然后采用 SS-31 对 HEK293T 细胞进行干预。SA-β-gal 衰老染色试剂盒检测细胞衰老水平;JC-1 试剂盒检测细胞线粒体膜电位水平;荧光倒置显微镜观察线粒体活性氧(ROS)荧光强度;ATP 检测试剂盒检测细胞内 ATP 水平;蛋白质免疫印迹检测 P53, P21, Acetyl-p53, Sirt1 蛋白表达。**结果:**模型组 SA-β-gal 阳性率高于空白组,应用 SS-31 后阳性率显著降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);ROS 荧光检测:与空白组比较,模型组荧光强度上升,而 SS-31 组荧光强度较模型组下降,差异有统计学意义($P<0.05$);线粒体膜电位检测:与空白组比较,模型组红色荧光强度显著下降,SS-31 干预后,红色荧光强度显著上升,差异有统计学意义($P<0.05$);ATP 检测:模型组 ATP 水平低于对照组,SS-31 组高于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$);此外,模型组 P53, P21 及 Acetyl-p53 蛋白表达水平较空白组增加($P<0.05$),而 SS-31 组较模型组有所降低,差异有统计学意义($P<0.05$),模型组 Sirt1 蛋白表达水平较空白组降低($P<0.05$),而 SS-31 组较模型组升高,差异有统计学差异($P<0.05$)。**结论:**SS-31 能够通过改善线粒体功能延缓 HEK293T 细胞衰老。

关键词:SS-31;线粒体功能;细胞衰老

中图分类号:R-33;Q244;R339.38 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)10-1834-07

The Molecular Mechanism of SS-31 Mediating Mitochondrial Function to Delay the Senescence of HEK293T Cells*

SHI Xiao-qing^{1,2}, JIE Li-shi^{1,2}, WU Peng¹, MAO Jun¹, ZHANG Nong-shan¹, WANG Pei-min^{1,2}, YIN Song-jiang^{1,2△}

(1 Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu, 210029, China;

2 First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu, 210029, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the regulatory effect of SS-31 in delaying cell senescence through mediating mitochondrial function. **Methods:** The HEK293T cell were divided into blank group, model group and SS-31 group. Use H₂O₂ to induce a stress-induced aging model, and then use SS-31 to intervene in HEK293T cell. SA-β-gal senescence staining kit detects cell senescence level; JC-1 kit detects cell mitochondrial membrane potential level; fluorescence inverted microscope observes mitochondrial reactive oxygen species (ROS) fluorescence intensity; ATP detection kit detects intracellular ATP level; protein Western blotting was used to detect the expression levels of P53, P21, Acetyl-p53 and Sirt1. **Results:** The percentage of SA-β-gal positive cells in the model group was higher than that of the blank group, and the percentage of SA-β-gal positive cells in the SS-31 group was reduced, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); ROS fluorescence detection found that the model group produced a lot of Green fluorescence, while the fluorescence intensity of the SS-31 group decreased, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); mitochondrial membrane potential detection showed that the red fluorescence intensity of the model group decreased significantly compared with the blank group. After the intervention of SS-31, the red fluorescence The intensity increased significantly, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); ATP detection showed that the ATP level of the model group was lower than that of the control group, and the SS-31 group was higher than the model group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); The protein expression levels of P53, P21 and Acetyl-p53 increased compared with the blank group ($P<0.05$), while the SS-31 group was lower than the model group. The difference was statistically significant ($P<0.05$). The expression level of Sirt1 protein in the model group was higher than that of the blank group. The blank group decreased ($P<0.05$), while the SS-31 group was higher than the model group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion:** SS-31 can improve the function of mitochondria, thereby delaying the senescence of HEK293T cell.

Key words: SS-31; Mitochondrial function; Cell senescence

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q244; R339.38 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)10-1834-07

* 基金项目:江苏省自然科学基金青年项目(SBK2020041404);国家自然科学基金青年项目(82074460);

江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX21_1684);江苏省高校自然科学基金面上项目(20KJB360003)

作者简介:时孝晴(1994-),男,博士研究生,E-mail: shixiaoqing_2016@163.com

△ 通讯作者:殷松江(1991-),男,讲师,主要从事骨关节病研究,E-mail: 260303@njucm.edu.cn

(收稿日期:2021-10-26 接受日期:2021-11-21)

前言

随着年龄的增长,衰老细胞会在各种组织中积累^[1]。衰老过程中,线粒体功能障碍是一个重要的“衰老标志”,并维持细胞衰老的状态^[2]。线粒体既是机体能量的主要来源,也是衰老过程中细胞活性氧(ROS)和氧化应激的主要来源^[3]。在疾病进展中,线粒体功能障碍,氧化应激和衰老表型之间具有明确的因果关系^[4]。研究表明,线粒体来源的ROS可加速端粒缩短,引起过早衰老,并通过持续DNA损伤反应维持衰老状态^[5]。此外,衰老细胞的线粒体显示出膜电位降低、ROS产生加快并且导致溶酶体酶泄漏^[6]。自由基理论提出,过量的ROS引起的细胞损伤,实质上会促进衰老表型的加剧与年龄相关性疾病的病理进展^[7]。探索衰老及相关疾病的机制,是预防和治疗老年性疾病的前提,具有重要的理论和社会意义。

SS-31 (D-Arg-2' 6' -dimethylTyr-Lys-Phe-NH₂)是一种细胞可渗透的线粒体靶向抗氧化剂四肽,可选择性地与线粒体内膜上的心磷脂相互作用^[8]。SS-31能清除线粒体ROS,从而促进线粒体功能和抑制线粒体通透性转换^[9]。同时,SS-31能够保护线粒体嵴和线粒体呼吸链的完整,抑制细胞凋亡,减少炎症反应^[10]。除了抗氧化活性,SS-31可以改善线粒体呼吸和ATP的合成。然而,很少有研究表明SS-31与细胞衰老之间的关系。 H_2O_2 被认为是氧化应激的天然诱导剂,可用于诱导应激性衰老^[11]。 H_2O_2 会引发细胞的氧化应激和炎症反应,导致细胞产生衰老相关的表型变化^[12]。因此,本研究选择利用 H_2O_2 去建立HEK293T细胞衰老模型。

为进一步研究SS-31在HEK293T细胞中引起细胞表型变化及内稳态失衡的分子机制,观察了线粒体相关表型,检测相关衰老蛋白分子水平的改变,初步揭示了SS-31通过调控线粒体功能来抑制 H_2O_2 诱导的细胞衰老。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

HEK293T(上海细胞库);线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)(C2003S,上海Beyotime生物公司);2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(D6883,美国Merck公司);细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒(C0602,上海Beyotime生物公司);Cell Counting Kit-8(C0039,上海Beyotime生物公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(P0012,上海Beyotime生物公司);DMEM/F12培养基,胎牛血清,胰蛋白酶消化液,链霉素,青霉素(美国Gibco公司);P21抗体、P53抗体、Acetyl-p53抗体和actin抗体(批号为37543,2524,2570,美国CST公司),Sirt1抗体(sc-74465,SANTA公司),SS-31(B27916,上海源叶生物)。酶标仪(美国En-spire公司);蛋白电泳系统,电泳凝胶成像系统,超灵敏化学发光成像系统LAS-4000(美国GE公司);荧光倒置显微镜(DMI-3000B,德国莱卡生物公司)。

1.2 细胞培养

用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和链霉素的DMEM培养基培养HEK293T细胞,置于37℃、5%CO₂培养箱中。待细胞生长至80%融合时,用0.25%胰蛋白酶消化,分瓶传代。

1.3 CCK-8法检测HEK293T细胞增殖活性

HEK293T细胞按 2×10^3 个/孔细胞密度接种于96孔培养板,于37℃、5%CO₂培养箱中培养24h使细胞贴壁。用 H_2O_2 (100、200、300、400、500和600 μ mol/L)和SS-31(0.5、1、2和4 μ mol/mL)孵育细胞24h,设正常对照组(不含 H_2O_2),每组设置6个平行组。每孔加入20 μ L CCK-8孵育2h,使用酶标仪检测450 nm波长处的光密度(OD)值,计算细胞生存率(实验组OD值/对照组OD值 $\times 100\%$)。

1.4 实验分组及细胞衰老模型建立

将HEK293T细胞接种于6孔板中,于37℃、5%CO₂培养箱中培养24h使其贴壁,设置对照组(Con)、模型组(H_2O_2)与SS-31处理组(SS-31)。对照组用含10%血清的DMEM培养基培养24h, H_2O_2 模型组给予10%血清的DMEM培养基,加入确定浓度的 H_2O_2 作用24h;SS-31处理组用SS-31预处理4h后,加入确定浓度的 H_2O_2 作用24h。

1.5 SA- β -gal染色法观察细胞衰老变化

将各组HEK293T细胞接种到培养皿中的盖玻片上,当细胞生长到80%融合时,进行 β -半乳糖苷酶的染色以检测细胞的衰老。遵照试剂盒的步骤进行操作,PBS清洗和细胞固定后,衰老的细胞将被染色液染成蓝色,于倒置显微镜下计数变蓝的细胞(即衰老细胞)并拍照。

1.6 JC-1法检测线粒体膜电位变化

JC-1染色法来检测线粒体膜电位在各处理组中的变化。取对数生长期,生长状态良好的细胞,按1.4中方法对细胞进行分组处理。各组细胞处理结束后,遵照试剂盒的步骤进行操作,PBS清洗3次,每孔加入现配的JC-1染色工作液和培养液各1 mL,置于细胞培养箱中37℃孵育20 min,孵育结束后吸除染液,用JC-1染色缓冲液洗涤2次。于荧光显微镜下进行观察,通过绿、红荧光强度的比值来判断细胞线粒体膜电位的变化,实验平行重复3次。Image J图像软件分析红色荧光与绿色荧光平均荧光值并计算其比值,比值越小,表示线粒体膜电位下降越明显。

1.7 DCFH-DA荧光探针检测细胞内ROS含量

采用DCFH-DA荧光探针进行活性氧检测。各组细胞处理结束后,遵照试剂盒的步骤进行操作,吸去培养上清,无血清培养基洗涤细胞两次后,加入终浓度为10 μ mol/L的1:1000无血清稀释的DCFH-DA,37℃细胞培养箱内孵育20 min,用无血清细胞培养液洗涤细胞1-2次。荧光显微镜下观察ROS的强度,使用荧光酶标仪(激发波长488 nm,最大发射波长525 nm)对各组的ROS进行半定量分析。

1.8 ATP检测

采用化学发光法进行ATP检测。细胞处理结束后,每孔加入200 μ L裂解液,收集细胞于EP管中。4℃、12000 rpm离心5分钟,取上清。ATP检测裂解液稀释浓度:0.01、0.03、0.1、0.3、1、3和10 μ mol/L,制作标准曲线。每孔(不透光的96孔黑板)加入100 μ L ATP检测工作液,消耗本底性的ATP。然后每孔加入20 μ L样品及标准品,进行化学发光仪测定。

1.9 蛋白质免疫印迹

各组细胞处理结束后,使用裂解液获取细胞蛋白,测定各组细胞蛋白浓度,BCA试剂盒提取总蛋白并检测各组蛋白浓

度。将等量(10 μg)的细胞蛋白进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,并转移至 PVDF 膜。在室温下用 50g/L 脱脂奶粉封闭溶液封闭 1-2 h,在 4℃ 下与目标一抗(P53、P21、Acetyl-p53 和 Sirt1)孵育过夜。12 h 后 TBST 洗膜三次,每次 15 min。室温下孵育二抗 1 h, TBST 再次洗涤三次。使用 ECL 发光液检测蛋白条带,并在凝胶成像系统中成像,使用 Image J 分析目标条带。

1.10 统计学分析

采用 GraphPad prism 6 绘制柱状图,采用 SPSS 25.0 统计软件对数据进行统计分析,数据表示为平均值 $\pm$ 标准差。多组之间采用单因素方差分析,两组之间采用 t 检验。认为 $P<0.05$ 是统计显著性的标准。

2 结果

2.1 H_2O_2 对 HEK293T 细胞活性的影响

CCK-8 法检测结果显示,不同浓度(100、200、300、400、500、600 $\mu\text{mol/L}$)的 H_2O_2 对 HEK293T 细胞活力有一定的影响,且呈浓度依赖性。当 H_2O_2 浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率降至对照组的 $(46.92\pm9.9)\%$ ($P<0.05$,图 1A)。因此,选择 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 作用 24 h 建立细胞衰老模型。然后我们使用不同浓度(0.5、1、2、4 $\mu\text{mol/mL}$)的 SS31 干预 HEK293T 细胞,结果表明在细胞中使用是安全的($P>0.05$,图 1B)。根据既往研究以及本次实验结果,我们使用 1 $\mu\text{mol/mL}$ 的 SS31 预处理 4 h,接着加入不同浓度(0、100、200、300、400、500、600 $\mu\text{mol/L}$)的 H_2O_2 处理细胞 24 h^[9,13,14]。结果显示,1 $\mu\text{mol/mL}$ SS-31 和 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 共培养的 HEK293T 细胞,活力明显增强($P<0.05$,图 1C)。

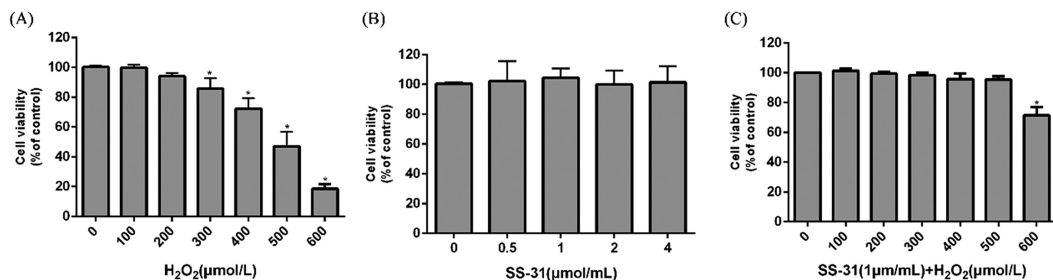


图 1 SS-31 保护 HEK293T 细胞免受 H_2O_2 损伤

注:(A)在 H_2O_2 暴露 24h 后 HEK293T 细胞体外存活率的 CCK8 测定;(B)SS-31 (0、0.5、1、2、4 μM)预处理 4 h 和 24 h 后 HEK293T 细胞存活率的 CCK8 测定;(C)细胞用 SS-31 (1 μM) 预处理 4 h,然后暴露于 H_2O_2 (500 $\mu\text{mol/L}$) 24h。* 表示与正常对照组比较, $P<0.05$, 差异有统计学意义。

Fig. 1 SS-31 protects HEK293T cells from H_2O_2 damage

(A) CCK8 determination of the in vitro viability of HEK293T cells after 24 h exposure to H_2O_2 ; (B) CCK8 determination of the survival rate of HEK293T cells after 4 h and 24 h pretreatment with SS-31 (0, 0.5, 1, 2, 4 μM); (C) Cells were pretreated with SS-31 (1 μM) for 4h, and then exposed to H_2O_2 (500 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h. * Indicates that compared with the normal control group, $P<0.05$ indicates that the difference is statistically significant.

2.2 SS-31 对 H_2O_2 诱导的 HEK-293T 细胞 ROS 水平的影响

根据文献报道,衰老细胞中氧自由基等超氧化物累积,我们使用活性氧检测试剂盒检测。如图 2A 所示,在各组干预之前,ROS 水平一致,基线无差异($P>0.05$)。如图 2B 所示,使用

相应药物处理后, H_2O_2 模型组荧光效果增强,ROS 水平增高 ($P<0.05$)。与 H_2O_2 模型组相比,SS-31 处理组 ROS 水平降低 ($P<0.05$)。

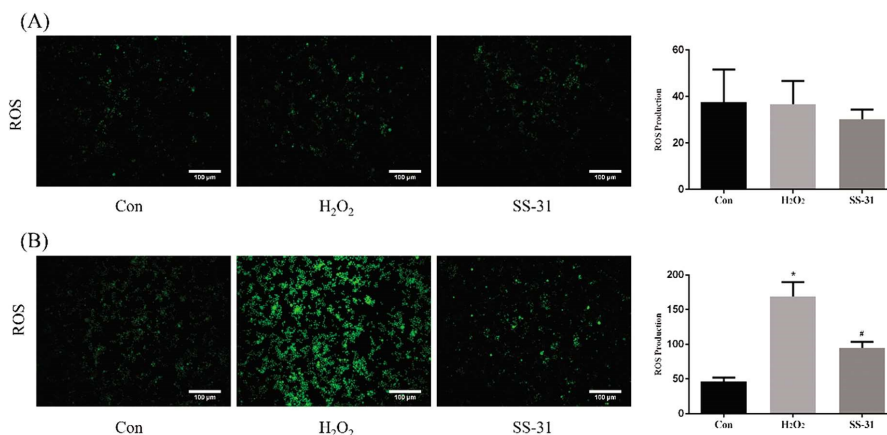


图 2 SS-31 对 H_2O_2 诱导的 HEK293T 细胞 ROS 生成的影响

注:图 2A:细胞在药物干预之前,使用荧光显微镜检测 ROS 的产生;图 2B:细胞用 SS-31 预处理,然后用或不用 H_2O_2 (500 μM) 刺激 24 小时,使用荧光显微镜检测 ROS 的产生。* 表示对照组比较 $P<0.05$, # 表示模型组比较 $P<0.05$ 。

Fig. 2 The effect of SS-31 on H_2O_2 induced ROS generation in HEK293T cells

Note: Fig.2A: Cells used fluorescence microscope to detect ROS production before drug intervention; Fig. 2B: The cells were pretreated with SS-31 and then stimulated with or without H_2O_2 (500 μM) for 24 hours. A fluorescence microscope was used to detect ROS production.

* Indicates the comparison of the control group $P<0.05$, # indicates the comparison of the model group $P<0.05$.

2.3 SS-31 对 H_2O_2 诱导的 HEK293T 细胞 SA- β -gal 衰老染色水平的影响

为了研究 SS-31 在 HEK293T 细胞衰老中的保护作用,如方法部分所述,对细胞进行氧化应激诱导的衰老模型。在衰老相关 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)染色实验中,如 A 图所示,在各组干预之前,衰老水平一致,基线无差异($P>0.05$)。如图 B 所

示,使用相应药物处理后,与正常细胞相比,模型组 SA- β -gal 阳性 HEK293T 细胞百分比明显高于空白组。同时,如图 3(B)所示,氧化应激诱导的衰老细胞变大,SA- β -gal 阳性细胞增多。正如预期的那样,用 SS-31 处理后,SA- β -gal 阳性细胞的数量显着减少。

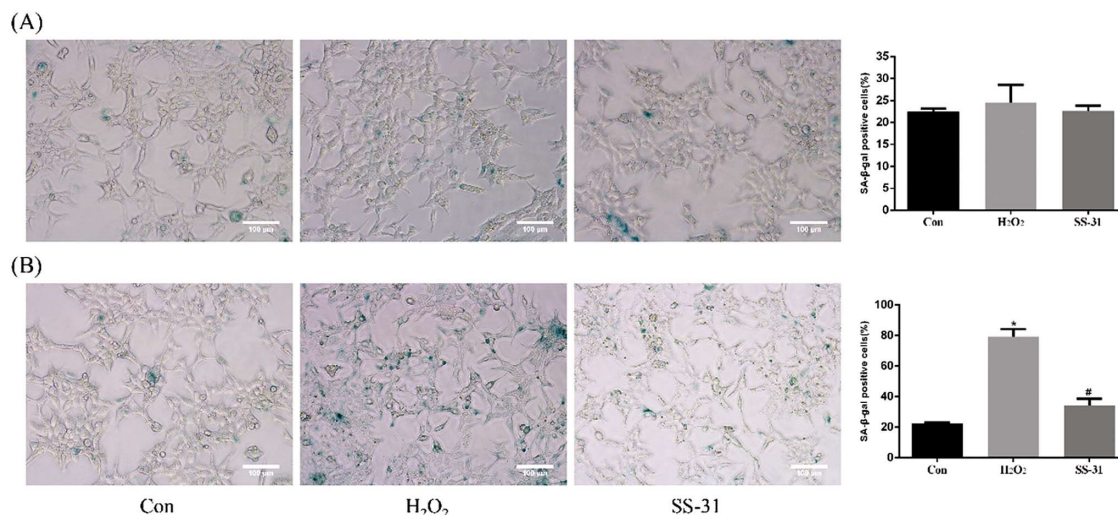


图 3 HEK293T 细胞 β -半乳糖苷酶染色结果

Fig. 3 Results of SA- β -gal staining in HEK293T cells

注:图 3A:细胞在药物干预之前,观察 SA- β -gal 衰老染色水平;图 3B:细胞用 SS-31 预处理,然后用或不用 H_2O_2 (500 μ M)刺激 24 小时,观察 SA- β -gal 衰老染色水平。* 表示对照组比较 $P<0.05$,# 表示模型组比较 $P<0.05$ 。

Note: Fig. 3A: Before drug intervention, observe the SA- β -gal senescence staining level; Fig. 3B: The cells were pretreated with SS-31 and then stimulated with or without H_2O_2 (500 μ M) for 24 hours. Observe the SA- β -gal senescence staining level.

* Indicates the comparison of the control group $P<0.05$, # indicates the comparison of the model group $P<0.05$.

2.4 线粒体膜电位检测

如图 4A 所示,在各组干预之前,线粒体膜电位水平一致,基线无差异($P>0.05$)。如图 4B 所示,与对照组相比,给与 H_2O_2 处理后,细胞红色荧光强度显著下降,表明线粒体膜电位下降;而给予 SS-31 处理后,SS-31 组细胞红色荧光强度明显增加,线粒体膜电位显著上升。表明 SS-31 处理能部分恢复 H_2O_2 所致的线粒体膜电位的下降,具有线粒体保护功能。

2.5 ATP 检测结果

与对照组相比,模型组 ATP 降低($P<0.05$);SS-31 处理后,ATP 含量较模型组增加($P<0.05$)。 H_2O_2 导致的氧化应激使线粒体受损,功能下降,SS-31 对此环节存在良性调控作用。

2.6 SS-31 对 H_2O_2 诱导的 HEK-293T 细胞衰老相关蛋白 P53、P21、Acetyl-p53、Sirt1 表达的影响

如图 5 所示,与对照组相比, H_2O_2 模型组衰老相关蛋白 P53、Acetyl-p53、P21 的表达上调 ($P<0.05$),Sirt1 的表达下调 ($P<0.05$);与 H_2O_2 模型组相比,SS-31 处理组衰老相关蛋白 P53、Acetyl-p53、P21 的表达下调 ($P<0.05$),Sirt1 的表达上调 ($P<0.05$)。

3 讨论

了解年龄相关性疾病与衰老的内在联系,阐明其发病机制,对于提高患者的生活质量至关重要。线粒体是衰老过程中的关键参与者,因为它们生物能量学、氧化应激和细胞死亡

的调节中发挥着关键作用^[15]。因此,最大限度地减少氧化应激和维持正常的线粒体能量代谢以获得衰老的治疗策略引起了衰老研究人员的极大兴趣^[16]。能够靶向线粒体的天然产物提取物或靶向药物,在调控衰老相关性疾病中具有广阔前景。

线粒体功能障碍治疗的一个重大挑战是将药物分子有效递送至线粒体^[17]。Elamipretide (SS-31) 是一种合成四肽,属于一类新兴疗法,能够靶向线粒体以恢复线粒体生物能量学^[18]。SS-31 目前正在多种线粒体疾病的临床试验,包括线粒体遗传病、缺血、急性肾损伤和心力衰竭^[19,20]。目前关于 SS-31 研究较多的是作为一种抗氧化肽,作用在线粒体内膜上,通过抗氧化应激发挥其保护作用^[21]。为了更好地观察 SS-31 对 HEK293T 细胞衰老的保护作用,参考其他人的研究,本研究采用预给药的方式,让细胞和线粒体充分摄取 SS-31 从而更好发挥作用^[13,14,22]。

衰老和衰老细胞使用最广泛的生物标志物是衰老相关的 β -半乳糖苷酶 (SA- β -gal),它被定义为在 pH 6.0 时可在衰老细胞中检测到的 β -半乳糖苷酶活性^[13,14,22]。实验结果表明, H_2O_2 刺激可导致 SA- β -gal 阳性率显著升高,而 SS-31 处理后,SA- β -gal 阳性率降低,提示 SS-31 可延缓 H_2O_2 诱导的 HEK293T 细胞衰老。

本研究的基础之一是 SS-31 的抗氧化能力以及维持线粒体功能,进而探索 SS-31 对 H_2O_2 诱导的氧化应激所产生的衰老的作用机制。线粒体功能障碍和衰老之间存在复杂的级联关

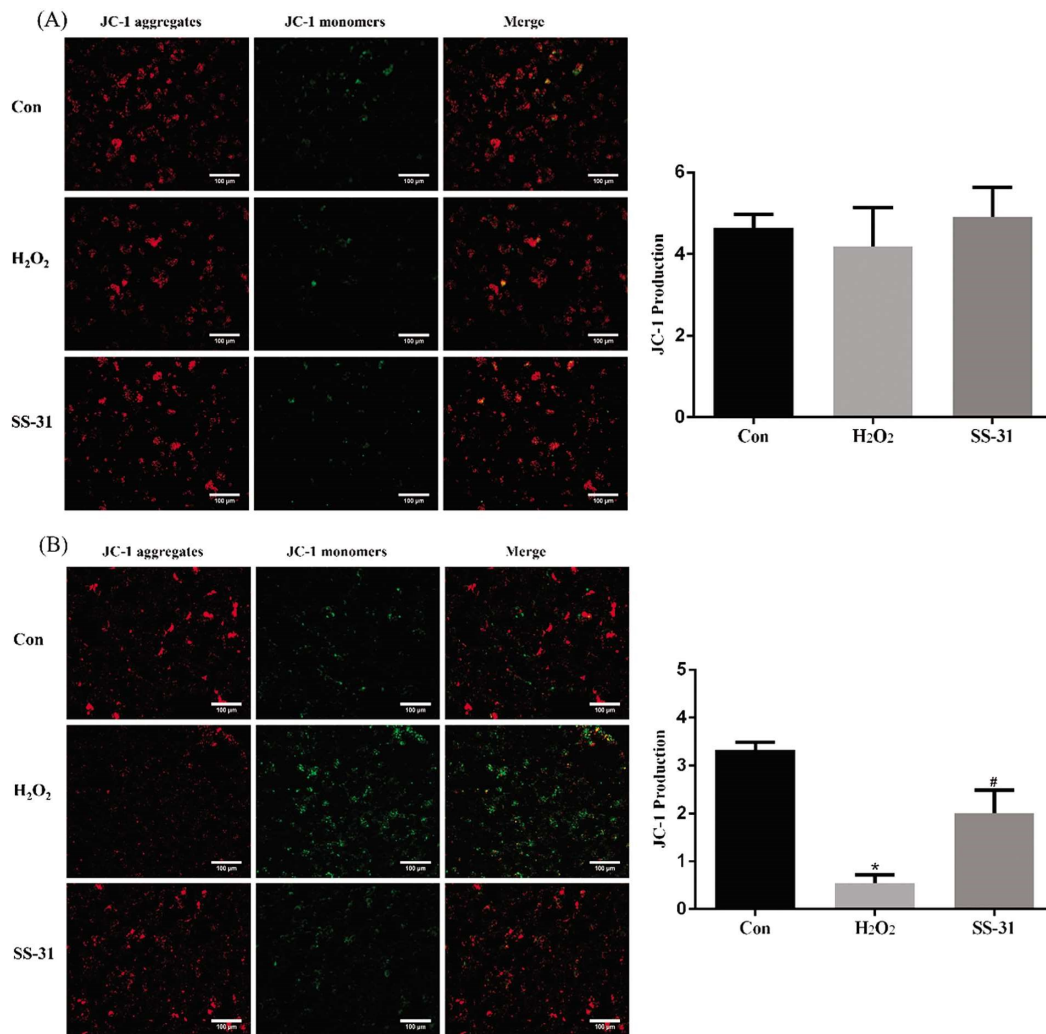


图 4 SS-31 对 H₂O₂ 损伤 HEK293T 细胞线粒体膜电位变化的影响

Fig. 4 The effect of SS-31 on the change of mitochondrial membrane potential of HEK293T cells damaged by H₂O₂

注: 图 4A: 细胞在药物干预之前, 观察线粒体膜电位水平; 图 4B: 细胞用 SS-31 预处理, 然后用或不用 H₂O₂ (500 μM) 刺激 24 小时, 观察线粒体膜电位水平。* 表示对照组比较 $P < 0.05$, # 表示模型组比较 $P < 0.05$ 。

Note: Fig. 4A: Observe the level of mitochondrial membrane level before drug intervention; Fig. 4B: The cells were pretreated with SS-31 and then stimulated with or without H₂O₂ (500 μM) for 24 hours. Observe the level of mitochondrial membrane level.

* Indicates the comparison of the control group $P < 0.05$, # indicates the comparison of the model group $P < 0.05$.

表 1 ATP 检测结果
Table 1 ATP test results

Groups	N	Result	
Con	6	9.59±1.05	1.00±0.11
H ₂ O ₂	6	5.64±0.27*	0.59±0.28*
SS-31	6	10.23±1.09 [#]	1.07±0.11 [#]

系。线粒体产生的 ATP 不足和线粒体膜电位下降会导致代谢功能降低, 进而产生一系列衰老变化^[24]。本研究结果显示, H₂O₂ 处理可导致细胞 ATP 含量显著降低; 而 SS-31 处理可阻止 H₂O₂ 导致的 ATP 降低。与此同时, SS-31 处理还可在一定程度上抑制 H₂O₂ 导致的细胞内线粒体膜电位降低。此外, 本研究还采用 DCFH-DA 荧光探针法检测了 H₂O₂ 处理后细胞内 ROS 含量。结果显示, H₂O₂ 处理可显著升高细胞内 ROS 含量, 但 SS-31 处理可显著降低细胞内 ROS 含量。以上结果共同证明了 SS-31 对 H₂O₂ 诱导 HEK293T 细胞线粒体功能紊乱具有改善

作用。

在蛋白印迹分析中, 我们发现, 与正常细胞相比, 衰老细胞中, 保护细胞的蛋白 Sirt1、Sirt6 蛋白表达降低, 而 p16、p21、p53 蛋白表达增加。

Sirt1 是一种 NAD⁺ 依赖性脱乙酰酶, 已被鉴定为长寿基因, 并通过调节细胞内靶标(如组蛋白、转录因子和许多其他衰老蛋白)在抗衰老中发挥关键作用^[25]。Sirt1 使衰老蛋白 p53 脱乙酰化以调节各种细胞类型的细胞周期、抗逆性和细胞衰老^[26]。SIRT1 被认为是一种抗衰老蛋白, 它的上调为不同生物

体的健康带来了益处^[27]。本研究结果发现, H₂O₂ 诱导 Sirt1 的下调, 使用 SS-31 处理后, 促进了 Sirt1 的表达。

已有研究表明, 细胞衰老与多个信号转导途径有关^[28]。其中, p53/p21 调控的信号通路扮演了重要角色^[29]。P53 的表达与机体衰老呈正相关^[30]。研究已证实, p53 的上调会降低细胞重编程效率, 导致细胞衰老与凋亡^[31]。本研究结果显示, P53/acetyl-P53 在 H₂O₂ 诱导的衰老细胞中表达增加, 而 SS-31 干预衰老细胞可使 P53 蛋白表达下调, 阻止蛋白 P53 的乙酰化, 表明 SS-31 可能延缓了 H₂O₂ 诱导的细胞衰老。众所周知, p21 是调节衰老的重要信号因子。本实验通过检测 P21 蛋白的表达, 观察 SS-31 对衰老细胞的影响。结果显示, H₂O₂ 诱导细胞衰老后 P21 表达增加, 而用 SS-31 干预衰老细胞可使 P21 蛋白表达下调。

综上所述, 本研究初步验证了 SS-31 不仅可以保护

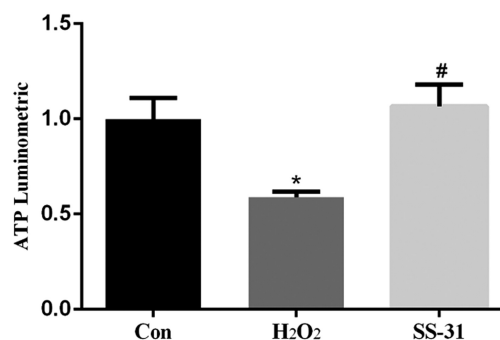


图 5 SS-31 对 H₂O₂ 损伤 HEK293T 细胞 ATP 的影响

Fig. 5 The effect of SS-31 on the ATP of HEK293T cells damaged by H₂O₂

* 表示对对照组比较 $P < 0.05$, # 表示模型组比较 $P < 0.05$

* Indicates the comparison of the control group $P < 0.05$,

indicates the comparison of the model group $P < 0.05$.

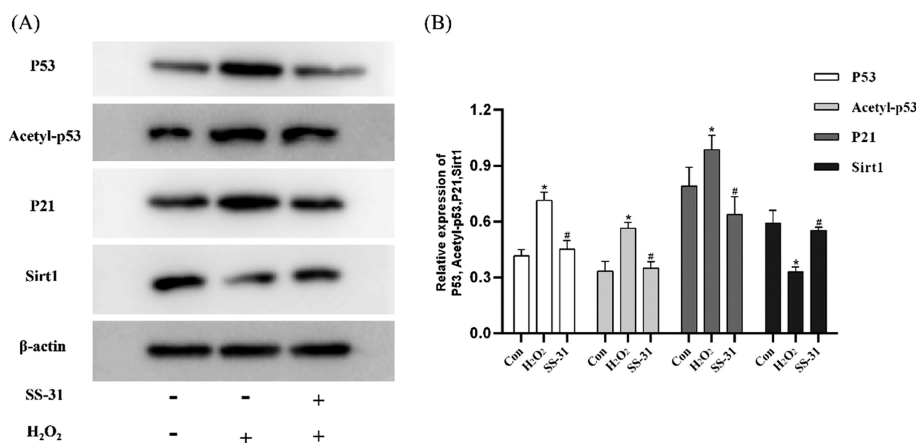


图 6 SS-31 对 H₂O₂ 诱导的 HEK293T 细胞衰老相关蛋白 P53、Acetyl-p53、P21、Sirt1 表达的影响

注: (A): Western blotting 检测 P53、Acetyl-p53、P21、Sirt1 蛋白表达; (B): Image J 定量分析 P53、Acetyl-p53、P21、Sirt1 蛋白相对表达量; 与对照组比较, $*P < 0.05$; 与模型组比较, $*P < 0.05$ 。

Fig. 6 The effect of SS-31 on the expression of senescence-related proteins P53, Acetyl-p53, P21, Sirt1 in HEK293T cells induced by H₂O₂

(A) Western blotting detects the expression of P53, Acetyl-p53, P21, Sirt1 protein; (B) Image J quantitative analysis of the relative expression of P53, Acetyl-p53, P21, Sirt1 protein. Compared with the control group, $*P < 0.05$; Compared with the model group Comparison, $*P < 0.05$.

HEK293T 细胞免受氧化应激, 还可以减少 HEK293T 细胞中氧化应激诱导的衰老。提示 SS-31 在线粒体功能障碍与衰老的预防和治疗中存在潜在的应用价值。然而, SS-31 调控 HEK293T 细胞衰老的复杂机制及其在体内的作用尚需深入探讨, 以利于其能更好地应用到治疗中。

参考文献(References)

- [1] Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D, et al. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(2): 75-95
- [2] Yu B, Ma J, Li J, et al. Mitochondrial phosphatase PGAM5 modulates cellular senescence by regulating mitochondrial dynamics [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2549
- [3] Vitorcelli S, Passos J F. Reactive Oxygen Species Detection in Senescent Cells[J]. Methods Mol Biol, 2019, 1896: 21-29
- [4] Picca A, Lezza A, Leeuwenburgh C, et al. Fueling Inflamm-Aging through Mitochondrial Dysfunction: Mechanisms and Molecular Targets[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(5): 933
- [5] Passos J F, Nelson G, Wang C, et al. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence [J]. Mol Syst Biol, 2010, 6: 347
- [6] Studencka M, Schaber J. Senoptosis: non-lethal DNA cleavage as a route to deep senescence[J]. Oncotarget, 2017, 8(19): 30656-30671
- [7] Jones D P. Redox theory of aging[J]. Redox Biol, 2015, 5: 71-79
- [8] Zhao W, Xu Z, Cao J, et al. Elamipretide (SS-31) improves mitochondrial dysfunction, synaptic and memory impairment induced by lipopolysaccharide in mice [J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 230
- [9] Escribano-Lopez I, Diaz-Morales N, Iannantuoni F, et al. The mitochondrial antioxidant SS-31 increases SIRT1 levels and ameliorates inflammation, oxidative stress and leukocyte-endothelium interactions in type 2 diabetes[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 15862
- [10] Mo Y, Deng S, Zhang L, et al. SS-31 reduces inflammation and oxidative stress through the inhibition of Fis1 expression in

- lipopolysaccharide-stimulated microglia [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 520(1): 171-178
- [11] Wang Z, Wei D, Xiao H. Methods of cellular senescence induction using oxidative stress[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1048: 135-144
- [12] Li R L, Lu Z Y, Huang J J, et al. SIRT1720, a SIRT1 specific activator, protected H₂O₂-induced senescent endothelium [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(7): 2876-2888
- [13] Li J, Chen X, Xiao W, et al. Mitochondria-targeted antioxidant peptide SS31 attenuates high glucose-induced injury on human retinal endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 404(1): 349-356
- [14] Yang D Q, Zuo Q N, Wang T, et al. Mitochondrial-Targeting Antioxidant SS-31 Suppresses Airway Inflammation and Oxidative Stress Induced by Cigarette Smoke [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6644238
- [15] Kulkarni A S, Gubbi S, Barzilai N. Benefits of Metformin in Attenuating the Hallmarks of Aging[J]. *Cell Metab*, 2020, 32(1): 15-30
- [16] Zhang R, Krigman J, Luo H, et al. Mitophagy in cardiovascular homeostasis[J]. *Mech Ageing Dev*, 2020, 188: 111245
- [17] Jiang L, Zhou S, Zhang X, et al. Mitochondrion-specific dendritic lipopeptide liposomes for targeted sub-cellular delivery [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2390
- [18] Chavez J D, Tang X, Campbell M D, et al. Mitochondrial protein interaction landscape of SS-31 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(26): 15363-15373
- [19] Szeto H H, Birk A V. Serendipity and the discovery of novel compounds that restore mitochondrial plasticity [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2014, 96(6): 672-683
- [20] Szeto H H. First-in-class cardiolipin-protective compound as a therapeutic agent to restore mitochondrial bioenergetics [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(8): 2029-2050
- [21] Ding X W, Robinson M, Li R, et al. Mitochondrial dysfunction and beneficial effects of mitochondria-targeted small peptide SS-31 in Diabetes Mellitus and Alzheimer's disease [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 171: 105783
- [22] Escribano-Lopez I, Diaz-Morales N, Iannantuoni F, et al. The mitochondrial antioxidant SS-31 increases SIRT1 levels and ameliorates inflammation, oxidative stress and leukocyte-endothelium interactions in type 2 diabetes[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 15862
- [23] Lee B Y, Han J A, Im J S, et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase [J]. *Aging Cell*, 2006, 5(2): 187-195
- [24] Lin X, Dai Y, Tong X, et al. Excessive oxidative stress in cumulus granulosa cells induced cell senescence contributes to endometriosis-associated infertility[J]. *Redox Biol*, 2020, 30: 101431
- [25] Brooks C L, Gu W. How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer?[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(2): 123-128
- [26] Kida Y, Goligorsky M S. Sirtuins, Cell Senescence, and Vascular Aging[J]. *Can J Cardiol*, 2016, 32(5): 634-641
- [27] Chang H C, Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2014, 25(3): 138-145
- [28] Tominaga K, Suzuki H I. TGF- β Signaling in Cellular Senescence and Aging-Related Pathology[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20): 5002
- [29] Hafner A, Bulyk M L, Jambhekar A, et al. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(4): 199-210
- [30] Mijit M, Caracciolo V, Melillo A, et al. Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(3): 420
- [31] Fujita K. p53 Isoforms in Cellular Senescence-and Ageing-Associated Biological and Physiological Functions [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23): 6023

(上接第 1805 页)

- [22] He Z, Yan H, Zeng W, et al. Tumor microenvironment-responsive multifunctional nanoplatfrom based on MnFe₂O₄-PEG for enhanced magnetic resonance imaging-guided hypoxic cancer radiotherapy [J]. *J Mater Chem B*, 2021, 9(6): 1625-1637
- [23] Xie J, Shen Z, Anraku Y, et al. Nanomaterial-based blood-brain-barrier (BBB) crossing strategies [J]. *Biomaterials*, 2019, 224: 119491
- [24] Cuggino JC, Blanco ERO, Gugliotta LM, et al. Crossing biological barriers with nanogels to improve drug delivery performance [J]. *J Control Release*, 2019, 307: 221-246
- [25] Sun WJ, Zhang JL, Zhang CC, et al. Construction of Hybrid Alginate Nanogels Loaded with Manganese Oxide Nanoparticles for Enhanced Tumor Magnetic Resonance Imaging [J]. *Acs Macro Lett*, 2018, 7(2): 137-142
- [26] Zhang C, Gau E, Sun W, et al. Influence of size, crosslinking degree and surface structure of poly(N-vinylcaprolactam)-based microgels on their penetration into multicellular tumor spheroids [J]. *Biomater Sci*, 2019, 7(11): 4738-4747
- [27] Meng DF, Guo LL, Peng LX, et al. Antioxidants suppress radiation-induced apoptosis via inhibiting MAPK pathway in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 527(3): 770-777
- [28] Hou L, Tian C, Yan Y, et al. Manganese-Based Nanoactivator Optimizes Cancer Immunotherapy via Enhancing Innate Immunity [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(4): 3927-3940
- [29] Liu Q, Chen F, Hou L, et al. Nanocarrier-Mediated Chemo-Immunotherapy Arrested Cancer Progression and Induced Tumor Dormancy in Desmoplastic Melanoma [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(8): 7812-7825
- [30] Deng L, Liang H, Xu M, et al. STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors [J]. *Immunity*, 2014, 41(5): 843-852