

紫薯花青素通过调节p53-p21^{Waf1/Cip1}信号通路对辐射致造血干/祖细胞衰老的保护作用

陈彩云¹, 王若宇¹, 张家乐², 张怡明², 石塔拉¹, 宓伟^{1,*}

(1.滨州医学院公共卫生与管理学院, 山东 烟台 264003; 2.滨州医学院第二临床医学院, 山东 烟台 264003)

摘要:目的: 探讨紫薯花青素 (*Solanum tuberosum* anthocyanin, STA) 对辐射致造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSC)/造血祖细胞 (hematopoietic progenitor cell, HPC) 衰老起保护作用的分子机制。方法: 将C57BL/6小鼠随机分为对照组、模型组、STA治疗组和STA预防组, 利用X射线照射构建衰老细胞模型。给药后用血细胞分析仪检测各组小鼠血液指标; 免疫磁性分选法分离纯化各组小鼠Sca-1⁺HSC/HPC, 并用衰老相关 β -半乳糖苷酶 (senescence-associated β -galactosidase, SA- β -Gal) 染色试剂盒对其进行染色实验并计算各组阳性率; 利用HSC/HPC混合集落 (colony forming unit-mixture, CFU-Mix) 数评价各组细胞形成HSC/HPC集落能力与分化潜能; 流式细胞术分析细胞周期; 实时定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR) 检测p53和p21^{Waf1/Cip1} mRNA的表达; Western blot检测p53和p21^{Waf1/Cip1}蛋白的表达。结果: 与对照组相比, 模型组小鼠外周血指标红细胞、白细胞、血小板数均极显著降低 ($P < 0.01$), 衰老细胞阳性率极显著增加 ($P < 0.01$), Sca-1⁺HSC/HPC形成CFU-Mix的数量极显著减少 ($P < 0.01$), G0/G1期比例极显著升高 ($P < 0.01$), G2/M和S期比例极显著降低 ($P < 0.01$), p53和p21^{Waf1/Cip1} mRNA和蛋白的相对表达量极显著增加 ($P < 0.01$), STA治疗和STA预防均可分别显著和极显著恢复模型组小鼠以上指标, 其中STA预防效果更好。结论: STA可以通过调节p53-p21^{Waf1/Cip1}信号通路保护受到辐射的HSC/HPC。

关键词: 紫薯花青素; p53-p21^{Waf1/Cip1}信号通路; 辐射; 造血干/祖细胞; 衰老

Protective Effect of *Solanum tuberosum* Anthocyanin against Radiation-Induced Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Senescence via the p53-p21^{Waf1/Cip1} Pathway

CHEN Caiyun¹, WANG Ruoyu¹, ZHANG Jiale², ZHANG Yiming², SHI Tala¹, MI Wei^{1,*}

(1. School of Public Health and Management, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China;

2. The Second Medical College, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China)

Abstract: Objective: To investigate the molecular mechanism underlying the protective effect of *Solanum tuberosum* anthocyanin (STA) on radiation-induced hematopoietic stem/progenitor cell senescence. Methods: C57BL/6 mice were randomly divided into three groups: control, model, STA treatment and STA prevention, and the cell senescence model was constructed by X-ray irradiation. The hemogram of mice in each group were examined using a hematology analyzer after drug administration. Stem cell antigen 1 positive hematopoietic stem/progenitor cells (Sca-1⁺HSC/HPCs) were isolated and purified from each group by immunomagnetic cell sorting and were stained using a senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) kit to calculate the proportion of SA- β -Gal positive cells. The number of mixed lineage colony forming unit (CFU-Mix) was used to evaluate the colony-forming capacity and differentiation potential of hematopoietic stem/progenitor cells. Cell cycle was analyzed by flow cytometry. The mRNA and protein expression of p53 and p21^{Waf1/Cip1} were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) and Western blot. Results: The numbers of red blood cells (RBCs), white blood cells (WBCs) and platelets in the peripheral blood were significantly lower in the model group than in the control group ($P < 0.01$). In addition, compared with the control group, the proportion of SA- β -Gal positive cells significantly

收稿日期: 2022-10-09

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81302426; 81902161); 山东省高等学校科技计划项目 (J17KA224); 山东省医药卫生科技发展计划项目 (202212020325; 202012020832)

第一作者简介: 陈彩云 (1984—) (ORCID: 0000-0002-8348-0841), 女, 实验师, 硕士, 主要从事药物成分与疾病研究。

E-mail: 444629987@qq.com

*通信作者简介: 宓伟 (1978—) (ORCID: 0000-0002-4856-6877), 男, 副教授, 硕士, 主要从事植物成分与慢性病研究。

E-mail: miweinew@163.com

increased ($P < 0.01$), the number of CFU-Mix significantly fell ($P < 0.01$), the proportion of G0/G1 phase cells significantly increased, the proportions of G2/M and S phase cells significantly dropped ($P < 0.01$), and the relative mRNA and protein expression levels of p53 and p21^{Waf1/Cip1} significantly increased in the model group ($P < 0.01$). STA could significantly restore the above parameters of mice in the model group irrespective of whether it was administered before or after X-ray radiation, with more pronounced effect being observed in the former case. Conclusion: STA can protect hematopoietic stem/progenitor cells against radiation by regulating the p53-p21^{Waf1/Cip1} pathway.

Keywords: *Solanum tuberosum* anthocyanin; p53-p21^{Waf1/Cip1} pathway; radiation; hematopoietic stem/progenitor cell; senescence
DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221009-068

中图分类号: R151.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 01-0131-06

引文格式:

陈彩云, 王若宇, 张家乐, 等. 紫薯花青素通过调节p53-p21^{Waf1/Cip1}信号通路对辐射致造血干/祖细胞衰老的保护作用[J]. 食品科学, 2023, 44(21): 131-136. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221009-068. <http://www.spkx.net.cn>

CHEN Caiyun, WANG Ruoyu, ZHANG Jiale, et al. Protective effect of *Solanum tuberosum* anthocyanin against radiation-induced hematopoietic stem/progenitor cell senescence via the p53-p21^{Waf1/Cip1} pathway[J]. Food Science, 2023, 44(21): 131-136. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221009-068. <http://www.spkx.net.cn>

据第7次全国人口普查结果显示,截至2021年5月我国60岁以上的老年人口已达到2.64亿,占总人口比重的18.7%,人口老龄化进一步加剧,探寻延缓衰老的天然植物药已成为研究者关注的热点^[1]。造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)是更新能力强并能分化为各系造血祖细胞(hematopoietic progenitor cell, HPC)的原始造血细胞, HSC衰老与机体衰老以及老年人多种慢性病密切相关^[2-4]。在电离辐射等应激状态下,活性氧(reactive oxygen species, ROS)在细胞内产生量增多,可能通过激活p53-p21^{Waf1/Cip1}通路、Wnt/ β -catenin通路、p38-AMP活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)通路、p16-Rb通路和磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase/mammalian target of rapamycin, PI3K/AKT/mTOR)通路等多条信号通路,导致HSC的DNA损伤,阻碍正常细胞周期而使细胞阻滞于G1期,导致细胞衰老,但具体的分子机制仍不明确^[5-9]。

紫薯富含锌、硒等微量元素和花青素类成分^[10]。紫薯花青素(*Solanum tuberosum* anthocyanin, STA)是一种具有C6-C3-C6结构的类黄酮化合物,可以作为原料生产食品的着色剂,亦是一种强效抗氧化剂,具有抗肿瘤、抗辐射、抗衰老、降血脂等多种药用功能^[11-14]。STA与其他来源花青素相比,耐热性好、稳定性强、机体利用率高,在食品、药品、保健品和化妆品等领域更具有开发价值。研究显示,辐射造成HSC的DNA损伤后,共济失调毛细血管扩张突变(ataxia telangiectasia mutated, ATM)和ATM与Rad3相关(ATM and Rad3 related, ATR)激酶会被激活并聚集于DNA损伤部位,使H2A组蛋白变异体(H2AX)磷酸化从而激活p53,活化的p53通过抑制p21的表达、下调细胞周期蛋白依赖性激酶2

(cyclin-dependent kinase 2, CDK2), 阻滞细胞周期在G1期,造成HSC衰老,导致机体细胞衰老加速^[15-16]。本实验旨在探讨STA对辐射致造血干/祖细胞衰老保护作用的分子机制,为探寻延缓HSC衰老和机体衰老的天然植物药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物、材料与试剂

清洁级C57BL/6小鼠,雄性,6~8周龄,体质量24~28 g,由滨州医学院实验动物中心提供,动物生产许可证号:SCXK(鲁)2020-0012。在无特定病原体的条件下常规喂养小鼠,适应性喂养1周后用于实验。本研究得到滨州医学院动物伦理学委员会的批准,批准号为SCK(鲁)2021-0018。

STA(聚合度 $\geq 99\%$) 杭州绿盛生物技术有限公司;伊思柯夫改良培养基(Iscove's modified Dubecco's medium, IMDM)、马血清(horse serum, HS)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) 武汉普诺赛生命科技有限公司;TRIzol、SYBR Green I染料 日本TaKaRa公司;实时定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)试剂、PCR引物美国Invitrogen公司;Anti-Sca-1⁺ Micro Bead Kit 美国Miltenyi公司;衰老相关 β -半乳糖苷酶(senescence-associated β -galactosidase, SA- β -Gal)染色试剂盒美国Cell Signaling公司;重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte macrophage colony stimulating factor, rhGM-CSF)、重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rhEPO) 上海普欣生物技术有限公司;Ficoll分离液、蛋白裂解液、

BCA蛋白浓度测定试剂盒、增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂盒 北京普莱基因科技有限公司; MiniMACS磁珠分选系统 德国Miltenyi Biotech公司; 小鼠干细胞集落形成混合培养基 美国Stem Cell公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体、p53、p21^{Waf1/Cip1} 一抗、二抗IgG 英国Abcam公司; 总RNA提取试剂盒、SYBR green试剂盒 上海翌圣生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

qPCR仪 澳大利亚Corbett公司; HB-7021血细胞分析仪 日本优瑞特公司; FACSCalibur流式细胞仪 美国Becton Dickinson公司; 凝胶成像分析系统 美国Alpha Innotech公司; 倒置显微镜、BX-26荧光显微镜 日本Olympus公司; 直线加速器 英国飞利浦公司。

1.3 方法

1.3.1 实验分组和给药

C57BL/6小鼠随机分为对照组、模型组、STA治疗组和STA预防组, 每组30只。模型组和STA治疗组小鼠用直线加速器全身一次性照射X射线, 照射剂量57.28 cGy/min, 照射总剂量6.5 Gy, 距离为75 cm, 照射面积为20 cm×20 cm^[17]。STA治疗组照射后皮内注射STA 60 mg/(kg $m_b \cdot d$), 连续给药7 d, 模型组于照射后皮内注射等剂量生理盐水连续7 d。STA预防组于照射前皮内注射STA 60 mg/(kg $m_b \cdot d$), 连续给药7 d, 照射后继续利用STA等剂量皮内注射7 d, 对照组处理同模型组, 但不进行照射。

1.3.2 血液指标测定

给药结束后, 各组小鼠取眼球血, 用血细胞分析仪检测外周血中红细胞 (red blood cell, RBC)、白细胞 (white blood cell, WBC) 和血小板 (platelet, PLT) 的数量。

1.3.3 SA- β -Gal染色实验

参照免疫磁性分选法^[18]分离纯化各组小鼠Sca-1⁺ HSC/HPC, 按照SA- β -Gal染色试剂盒说明书对小鼠Sca-1⁺ HSC/HPC进行染色, 倒置显微镜下选择6个视野, 以观察400个细胞为标准, 计算阳性细胞百分率。

1.3.4 造血干/祖细胞混合集落数的检测

收集各组小鼠Sca-1⁺ HSC/HPC, 依次加入 1×10^{-4} mol/L的2-巯基乙醇, 2.7 g/100 mL甲基纤维素, HS、rhGM-CSF、rhEPO各5 mL, 共2 mL, 充分混匀后接种于96孔板, 在37 °C、5% CO₂的培养箱培养7 d, 显微镜下放大200倍观察造血干/祖细胞混合集落 (colony forming unit-mixture, CFU-Mix) 数, 并以此评价各组细胞形成造血祖细胞集落能力^[19]。

1.3.5 流式细胞术分析细胞周期

用体积分数70%冰乙醇溶液将收集的各组小鼠

Sca-1⁺ HSC/HPC固定过夜, 加入100 μ L 60 U/mg牛胰核糖核酸酶溶液, 37 °C孵育30 min, 碘化丙啶染色30 min, 流式细胞术检测各组细胞周期情况。

1.3.6 qPCR检测p53和p21^{Waf1/Cip1} mRNA的表达量

收集各组Sca-1⁺ HSC/HPC, 用TRIzol裂解液提取各组细胞总RNA, 将其反转录为cDNA, 反转录条件: 42 °C 30 min、99 °C 5 min、5 °C 5 min。以反转录的cDNA为模板, 扩增p53和p21^{Waf1/Cip1}, 以GAPDH为内参。扩增条件: 94 °C 4 min、94 °C 20 s、60 °C 30 s、72 °C 30 s, 35个循环。通过熔解曲线分析产物的特异性, Quantity One软件分析基因条带光密度值并计算与内参的比值, 以此作为基因表达量。自行设计的引物序列见表1。

表1 本研究所用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')	长度/bp
p53	ATTGCTAACCGGAGCCAGCA	GCCATGCCGTCCGAAGTCGCAC	286
p21 ^{Waf1/Cip1}	GTTAACGCTGCCATGCAAGTC	AAATCCGGCCATGCTGCGGACTG	220
GAPDH	TCAGCCGTACGTGTCCATGTA	GGCTACGTAACGTCATCGTC	526

1.3.7 Western blot检测p53和p21^{Waf1/Cip1} 蛋白的表达

收集各组Sca-1⁺ HSC/HPC, 用BCA法检测RIPA裂解液提取的蛋白浓度。在提取蛋白液中加入质量分数6%蛋白上样缓冲液, 沸水变性5 min, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 后湿移至聚偏二氟乙烯膜上, 37 °C封闭2 h, 依次加入p53和p21^{Waf1/Cip1} 一抗4 °C过夜, 漂洗后加辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温反应2 h, 滴加ECL发光试剂进行检测, 凝胶成像曝光后观察比较。

1.4 数据处理与分析

采用SPSS 23.0软件进行数据处理与分析, 结果用平均值±标准差表示, 两组间比较采用*t*检验, 多组间采用单因素方差分析, 有统计学意义的再采用两两比较的*q*检验, 检验水平为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 STA对辐射小鼠外周血的影响

由表2可知, 模型组小鼠于外周血RBC、WBC、PLT数均极显著低于对照组 ($P<0.01$); 与模型组相比, STA治疗组和预防组小鼠外周血RBC、WBC、PLT数显著或极显著增加 ($P<0.05$, $P<0.01$), 且STA预防组小鼠外周血各指标恢复好于效果STA治疗组, 表现为以上指标显著高于SAT治疗组 ($P<0.05$), 且更接近对照组。

表2 STA对辐射小鼠外周血象的影响 (n=6)

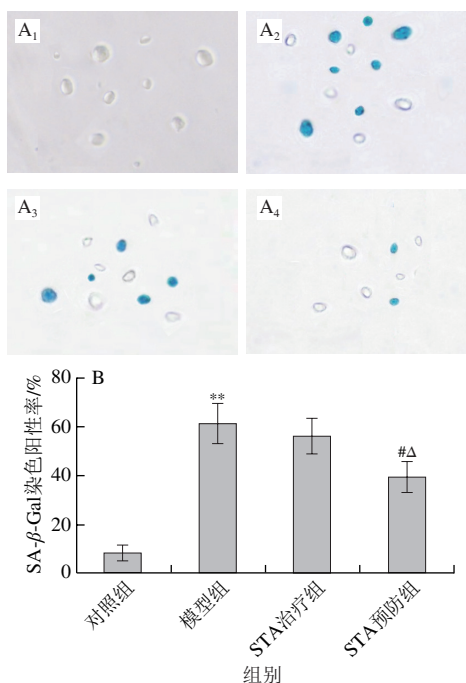
Table 2 Effect of STA on peripheral hemogram of radiated mice (n=6)

组别	RBC数/ (10^{12} 个/L)	WBC数/ (10^9 个/L)	PLT数/ (10^9 个/L)
对照组	12.08±2.12	9.52±1.34	988.64±65.87
模型组	4.65±0.56**	1.39±0.31**	452.34±56.12**
STA治疗组	6.51±0.87 [#]	2.98±0.64 [#]	597.31±68.21 [#]
STA预防组	8.27±1.05 ^{##Δ}	4.59±0.74 ^{##Δ}	624.56±88.54 ^{##Δ}

注: **与对照组相比差异极显著 ($P<0.01$); #与模型组相比差异显著 ($P<0.05$); ##与模型组相比差异极显著 ($P<0.01$); Δ与STA治疗组相比差异显著 ($P<0.05$)。表3同。

2.2 各组小鼠Sca-1⁺ HSC/HPC SA-β-Gal染色阳性率结果

由图1可知, SA-β-Gal染色液染色后, 小鼠Sca-1⁺ HSC/HPC的衰老细胞胞质内见蓝色颗粒则呈阳性, 细胞呈空泡状为阴性。模型组细胞阳性率极显著高于对照组 ($P<0.01$), 与模型组比较, STA预防组细胞阳性率显著降低 ($P<0.05$), 且STA预防组细胞阳性率低于STA治疗组 ($P<0.05$)。

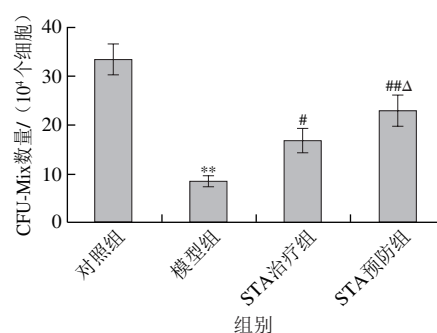


A. SA-β-Gal染色后Sca-1⁺ HSC/HPC在倒置显微镜下的观察图, 放大200倍; 下标1.对照组; 下标2.模型组; 下标3. STA治疗组; 下标4. STA预防组。B. 各组SA-β-Gal染色阳性率。**与对照组相比差异极显著 ($P<0.01$); #与模型组相比差异显著 ($P<0.05$); Δ与STA治疗组相比差异显著 ($P<0.05$)。下同。

图1 各组小鼠Sca-1⁺ HSC/HPC SA-β-Gal染色结果 (n=6)Fig. 1 SA-β-Gal staining of Sca-1⁺ HSC/HPC in mice from each group (n=6)

2.3 STA对小鼠Sca-1⁺ HSC/HPC形成CFU-Mix能力的影响

由图2可知, 模型组Sca-1⁺ HSC/HPC形成的CFU-Mix数与对照组相比极显著减少 ($P<0.01$)。与模型组比较, STA治疗组和STA预防组形成的CFU-Mix数分别显著和极显著升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), 且STA预防组形成的CFU-Mix数显著高于STA治疗组 ($P<0.05$)。



##与模型组相比差异极显著 ($P<0.01$)。

图2 各组小鼠Sca-1⁺ HSC/HPC形成的CFU-Mix数 (n=6)Fig. 2 Number of CFU-Mix of Sca-1⁺ HSC/HPC in mice from each group (n=6)

2.4 STA对小鼠Sca-1⁺ HSC/HPC的细胞周期分布的影响

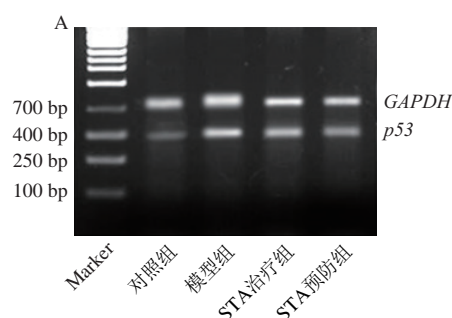
由表3可知, 与对照组相比, 模型组G0/G1期细胞比例极显著增高, G2/M和S期比例极显著降低 ($P<0.01$)。与模型组相比, STA治疗组和STA预防组G0/G1期细胞比例分别显著和极显著降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), G2/M和S期比例分别显著和极显著升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), 且STA预防组与STA治疗组相比各细胞周期分布亦有显著差异 ($P<0.05$)。

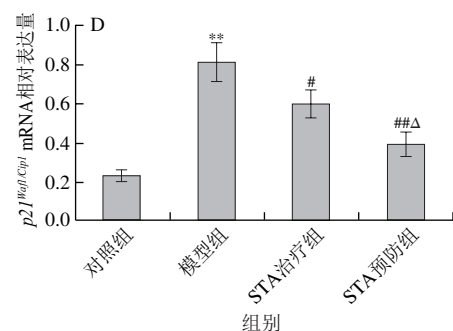
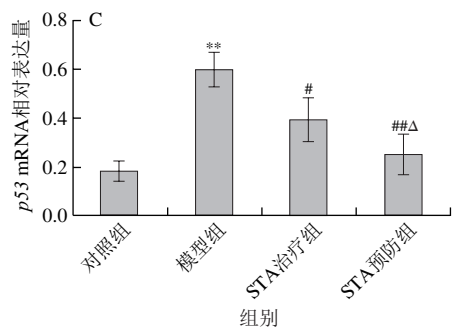
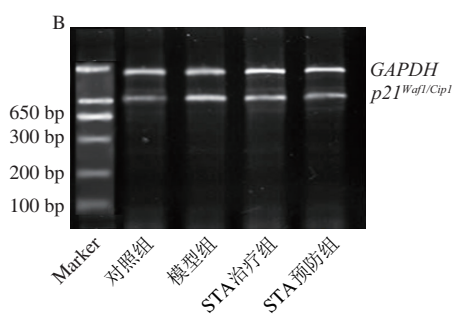
表3 STA对Sca-1⁺ HSC/HPC细胞周期分布的影响 (n=6)Table 3 Effect of STA on cell cycle distribution of Sca-1⁺ HSC/HPC (n=6)

组别	G0/G1	G2/M	S期
对照组	71.42±5.62	8.21±1.25	20.37±2.87
模型组	87.37±6.21**	3.98±0.78**	8.65±1.22**
STA治疗组	82.29±4.29 [#]	6.05±1.67 [#]	11.66±1.67 [#]
STA预防组	75.48±3.48 ^{##Δ}	7.98±2.01 ^{##Δ}	16.54±1.98 ^{##Δ}

2.5 STA对小鼠Sca-1⁺ HSC/HPC的p53和p21^{Waf1/Cip1} mRNA表达的影响

由图3可知, 模型组p53和p21^{Waf1/Cip1} mRNA的相对表达量极显著高于对照组 ($P<0.01$), 与模型组相比, STA治疗组和STA预防组的p53和p21^{Waf1/Cip1} mRNA的相对表达量分别显著和极显著降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 且STA预防组显著低于STA治疗组 ($P<0.05$)。





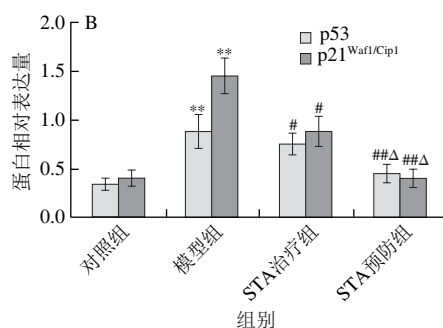
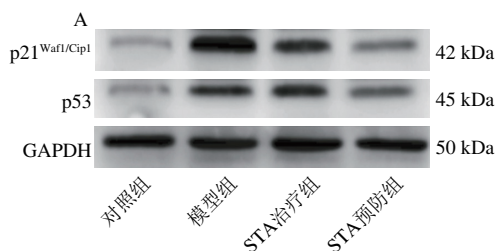
A. p53 mRNA 灰度图; B. p21^{Waf1/Cip1} mRNA 灰度图; C. p53 mRNA 相对表达量; D. p21^{Waf1/Cip1} mRNA 相对表达量。

图3 STA对小鼠Sca-1⁺ HSC/HPC p53、p21^{Waf1/Cip1} mRNA表达的影响 (n=6)

Fig. 3 Effect of STA on mRNA expression of p53 and p21^{Waf1/Cip1} in Sca-1⁺ HSC/HPC in mice (n=6)

2.6 STA对小鼠Sca-1⁺ HSC/HPC的p53和p21^{Waf1/Cip1}蛋白表达的影响

由图4可知, 模型组p53和p21^{Waf1/Cip1}蛋白的相对表达量极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 与模型组相比, STA治疗组和STA预防组p53和p21^{Waf1/Cip1}蛋白的相对表达量分别显著和极显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且STA预防组显著低于STA治疗组 ($P < 0.05$)。



A. 各组p53和p21^{Waf1/Cip1}蛋白灰度图; B. 各组p53和p21^{Waf1/Cip1}蛋白相对表达量。

图4 STA对Sca-1⁺ HSC/HPC的p53和p21^{Waf1/Cip1}蛋白表达的影响 (n=6)
Fig. 4 Effect of STA on protein expression of p53 and p21^{Waf1/Cip1} in Sca-1⁺ HSC/HPC in mice (n=6)

3 讨论

在临床放射治疗的过程中辐射损伤可导致机体组织和器官损伤, 尤其对造血干细胞的破坏最为严重, 可抑制HSC的增殖并诱导机体衰老速度加快^[20]。寻找通过经典信号通路抑制HSC衰老的天然植物靶向药从而延缓细胞衰老和机体衰老具有重要的临床意义^[21-23]。本研究采用辐射导致小鼠Sca-1⁺ HSC/HPC衰老模型来研究STA的体外抗衰老作用, 结果表明STA对Sca-1⁺ HSC/HPC的衰老有明显的治疗和预防效果, 并且STA预防Sca-1⁺ HSC/HPC衰老的效果更明显。

影响细胞衰老的环境因素通过基因调控使细胞周期停滞是细胞衰老的机制之一, 现代药理研究发现, STA是紫薯具有延缓衰老功能的植物活性成分, 能延长老年大鼠生存时间^[24-27]。本实验研究表明, 模型组小鼠于辐照后外周血RBC、WBC、PLT数均极显著降低 ($P < 0.01$), 辐射后小鼠的造血能力明显下降, 利用SA-β-Gal试剂盒染色后小鼠Sca-1⁺ HSC/HPC中的衰老细胞胞质内见蓝色颗粒, 衰老细胞数极显著增多 ($P < 0.01$), 衰老导致HSC/HPC分化潜能受损, 因此形成的CFU-Mix数极显著下降 ($P < 0.01$)。由于辐射导致衰老的HSC/HPC基因合成能力下降使其细胞分化停滞在G0/G1期不能进入S期, 而STA可提升辐射后小鼠Sca-1⁺ HSC/HPC分化增殖能力, 降低辐射导致的HSC/HPC衰老作用。在细胞衰老的调控网络中, p53-p21^{Waf1/Cip1}分子信号通路是HSC衰老的关键路径, p53基因是一种细胞生长周期中的负调控因子, 可使细胞周期停滞在G1期而不进入S期^[28-32]。HSC/HPC受到辐射损伤后, 其ROS产生量增加, 模型组p53和p21^{Waf1/Cip1} mRNA和蛋白的相对表达量极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 说明辐射损伤可通过上调p53-p21^{Waf1/Cip1}信号通路导致造血干/祖细胞衰老加速。STA除了发挥抗氧化作用, 还会抑制ATR激酶聚集于DNA的损伤部位, 避免损伤部位的组蛋白变异体磷酸

化,从而抑制p53和p21^{Waf1/Cip1}的表达,促进Sca-1⁺ HSC/HPC细胞周期由G1期进入S期,保护造血干细胞的正常生理功能。

本实验利用辐照X射线制备小鼠衰老细胞模型,通过血液指标检测、SA- β -Gal染色、CFU-Mix检测、流式细胞术分析细胞周期、qPCR检测mRNA表达和Western blot检测蛋白表达,进一步分析STA治疗和预防辐射致造血干/祖细胞衰老的保护机制,结果表明STA可以通过下调p53-p21^{Waf1/Cip1}信号通路保护受到辐射的HSC/HPC,且预防效果优于治疗效果,本研究可为利用食品活性成分干预HSC衰老提供一定的思路。

参考文献:

- [1] 江炎骏,周晓津.我国第七次人口普查之省市人口总量数据质量分析[J].重庆工商大学学报(社会科学版),2022,39(1):114-127. DOI:10.3969/j.issn.1672-0598.2022.01.010.
- [2] ELAINE D, ANNA B. Blood development: hematopoietic stem cell dependence and independence[J]. Cell Stem Cell, 2018, 22(5): 639-651. DOI:10.1016/j.stem.2018.04.015.
- [3] HÖFER T, RODEWALD H R. Differentiation-based model of hematopoietic stem cell functions and lineage pathways[J]. Blood, 2018, 132(11): 1106-1113. DOI:10.1182/blood-2018-03-791517.
- [4] DE KRUIJF E F M, FIBBE W E, VAN PEL M. Cytokine-induced hematopoietic stem and progenitor cell mobilization: unraveling interactions between stem cells and their niche[J]. Annals of New York Academy of Sciences, 2020, 1466(1): 24-38. DOI:10.1111/nyas.14059.
- [5] HILL R, MADUREIRA P A, WAISMAN D M, et al. Retraction: DNA-PKCS binding to p53 on the p21^{Waf1/Cip1} promoter blocks transcription resulting in cell death[J]. Oncotarget, 2019, 10(53): 5572. DOI:10.18632/oncotarget.27213.
- [6] HE S, TANG S. WNT/ β -catenin signaling in the development of liver cancers[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 132(9): 110851. DOI:10.1016/j.biopha.2020.110851.
- [7] HERZIG S, SHAW R J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2018, 19(2): 121-135. DOI:10.1038/nrm.2017.95.
- [8] CHEN L, YANG R, QIAO W, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D exerts an antiaging role by activation of Nrf2-antioxidant signaling and inactivation of p16/p53-senescence signaling[J]. Aging Cell, 2019, 18(3): e12951. DOI:10.1111/acel.12951.
- [9] XU F, NA L, LI Y, et al. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathways in neurodegenerative diseases and tumours[J]. Cell Biosciences, 2020, 10(1): 54. DOI:10.1186/s13578-020-00416-0.
- [10] 伍子涵,王莹,李泉岑.紫薯花青素研究进展[J].现代食品,2021(3):15-17. DOI:10.16736/j.cnki.cn41-1434/ts.2021.03.006.
- [11] 罗春丽,王林,李杏,等.紫薯花青素体外抗氧化及对H₂O₂诱导HepG2细胞氧化损失的保护作用[J].食品科学,2015,36(17):225-230. DOI:10.7506/spkx.1002-6630-201517042.
- [12] 宓伟,韩富磊,梁洁,等.紫薯花青素减轻高脂饲料联合四氯化碳诱导大鼠脂肪性肝炎[J].卫生研究,47(4):517-524. DOI:10.19813/j.cnki.weishengyanjiu.2018.04.001.
- [13] SUN W, MA Z, CHEN H, et al. MYB gene family in potato (*Solanum tuberosum* L.): genome-wide identification of hormone-responsive reveals their potential functions in growth and development[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(19): 4847. DOI:10.3390/ijms20194847.
- [14] SUBBAN P, PRAKASH S, BOOTBOOL M A, et al. Functional analysis of MYB alleles from *Solanum chilense* and *Solanum lycopersicum* in controlling anthocyanin levels in heterologous tobacco plants[J]. Physiology Plant, 2021, 172(3): 1630-1640. DOI:10.1111/ppl.13356.
- [15] MA M, RODRIGUEZ A, SUGIMOTO K. Activation of ATR-related protein kinase upon DNA damage recognition[J]. Current Genetics, 2020, 66(2): 327-333. DOI:10.1007/s00294-019-01039-w.
- [16] MATOS D A, ZHANG J M, OUYANG J, et al. ATR protects the genome against R loops through a MUS81-triggered feedback loop[J]. Molecular Cell, 2020, 77(3): 514-527. DOI:10.1016/j.molcel.2019.10.010.
- [17] MENOLFI D, ZHA S. ATM, ATR and DNA-PKcs kinases-the lessons from the mouse models: inhibition \neq deletion[J]. Cell Biosciences, 2020, 29(10): 8. DOI:10.1186/s13578-020-0376-x.
- [18] 李渊,周玥,王亚平,等.人参皂苷Rg₃基于SIRT6/NF- κ B信号通路对辐射致造血干/祖细胞衰老的保护作用[J].中草药,48(21):4497-4501. DOI:10.7501/j.issn.0253-2670.2017.21.021.
- [19] 张琛,孙可,耿珊,等.辐射损伤导致造血干/祖细胞衰老的机理研究[J].细胞与分子免疫学杂志,2013,29(3):233-246. DOI:10.13423/j.cnki.cjcmi.006728.
- [20] MORGANTI C, ITO K. Mitochondrial contributions to hematopoietic stem cell aging[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(20): 11117. DOI:10.3390/ijms222011117.
- [21] FISCHER M, QUAAS M, STEINER L, et al. The p53-p21-DREAM-CDE/CHR pathway regulates G2M cell cycle genes[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(1): 164-174. DOI:10.1093/nar/gkv927.
- [22] VALLÉE A, LECARPENTIER Y. Crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the canonical WNT/ β -catenin pathway in chronic inflammation and oxidative stress during carcinogenesis[J]. Front Immunology, 2018, 23(9): 745. DOI:10.3389/fimmu.2018.00745.
- [23] KEPPLER-NOREUIL K M, PARKER V E, DARLING T N, et al. Somatic overgrowth disorders of the PI3K/AKT/mTOR pathway & therapeutic strategies[J]. American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars Medical Genetics, 2016, 172(4): 402-421. DOI:10.1002/ajmg.c.31531.
- [24] DIEP T, POOK C, YOO M. Phenolic and anthocyanin compounds and antioxidant activity of tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.). antioxidants[J]. Molecules, 2020, 9(2): 169. DOI:10.3390/antiox9020169.
- [25] TOMINAGA-WADA R, MASAKANE A, WADA T. Effect of phosphate deficiency-induced anthocyanin accumulation on the expression of *Solanum lycopersicum* GLABRA3 (SIGL3) in tomato[J]. Plant Signaling Behavior, 2018, 13(6): e1477907. DOI:10.1080/15592324.2018.1477907.
- [26] STRYGINA K V, KOCHETOV A V, KHLESTKINA E K. Genetic control of anthocyanin pigmentation of potato tissues[J]. BMC Genetics, 2019, 20(Suppl 1): 27. DOI:10.1186/s12863-019-0728-x.
- [27] D'AMELIA V, AVERSAO R, RUGGIERO A, et al. Subfunctionalization of duplicate MYB genes in *Solanum commersonii* generated the cold-induced ScAN2 and the anthocyanin regulator ScAN1[J]. Plant Cell Environment, 2018, 41(5): 1038-1051. DOI:10.1111/pce.12966.
- [28] YANG Z, SUN H, MA W, et al. Down-regulation of Polo-like kinase 4 (PLK4) induces G1 arrest via activation of the p38/p53/p21 signaling pathway in bladder cancer[J]. FEBS Open Biology, 2021, 11(9): 2631-2646. DOI:10.1002/2211-5463.13262.
- [29] CHEN C C, CHEN J, WANG W L, et al. Inhibition of the P53/P21 pathway attenuates the effects of senescent nucleus pulposus cell-derived exosomes on the senescence of nucleus pulposus cells[J]. Orthopaedic Surgery, 2021, 13(2): 583-591. DOI:10.1111/os.12886.
- [30] BAEK S Y, HWANG U W, SUK H Y, et al. Hemistepsin A inhibits cell proliferation and induces G0/G1-phase arrest, cellular senescence and apoptosis via the AMPK and p53/p21 signals in human hepatocellular carcinoma[J]. Biomolecules, 2020, 10(5): 713. DOI:10.3390/biom10050713.
- [31] LIU H, LUO Q, CUI H, et al. Sodium fluoride causes hepatocellular S-phase arrest by activating ATM-p53-p21 and ATR-Chk1-Cdc25A pathways in mice[J]. Oncotarget, 2017, 9(4): 4318-4337. DOI:10.18632/oncotarget.23093.
- [32] ROMANOVA L Y, MUSHINSKI F, KOVALCHUK A L. Transcriptional activation of p21^{Waf1} contributes to suppression of HR by p53 in response to replication arrest induced by camptothecin[J]. Oncotarget, 2018, 39(9): 25427-25440. DOI:10.18632/oncotarget.25172.