

基于 TRPV1/AMPK 通路探讨石榴皮总多酚对亚油酸诱导的人皮脂腺细胞脂质合成的影响

张 曦^{1,2}, 朱明芳^{1*}, 吴淑辉¹, 张娟娟¹, 郑慧娥¹, 王 云¹, 鞠 强³, Christos C. Zouboulis⁴

1. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005

2. 湖南工商大学体育与健康学院, 湖南 长沙 410205

3. 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海 200127

4. 德国勃兰登堡医学院 勃兰登堡健康科学学院 德绍城市医院, 德国 德绍 06847

摘要: 目的 探讨石榴皮总多酚 (pomegranate peel polyphenols, PPPs) 对亚油酸 (linoleic acid, LA) 诱导的永生化人皮脂腺 SZ95 细胞脂质合成的影响及其作用机制。方法 体外培养 SZ95 细胞, 运用 LA 诱导构建脂质过度合成模型, 采用 CCK-8 法检测不同质量浓度 PPPs 对 SZ95 细胞活力的影响; 尼罗红染色检测细胞脂质合成情况; qRT-PCR 检测瞬时受体电位香草酸亚型 1 (transient receptor potential vanilloid 1, *TRPV1*)、腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, *AMPK*) mRNA 表达; Western blotting 检测 TRPV1、AMPK、磷酸化 AMPK (phosphorylated AMPK, p-AMPK) 蛋白表达。采用 siRNA 进行细胞转染, 观察沉默 TRPV1 后 PPPs 对 LA 诱导的 SZ95 细胞脂质合成及 TRPV1/AMPK 通路的影响。结果 1.25、2.5、5 $\mu\text{g/mL}$ 的 PPPs 对 SZ95 细胞活性无明显影响, 且均可显著抑制 LA 诱导的脂质过度合成 ($P < 0.01$), 其中 5 $\mu\text{g/mL}$ PPPs 的抑制效应最为明显。与对照组比较, 模型组细胞脂质合成明显增加 ($P < 0.01$), *TRPV1*、*AMPK* mRNA 表达及 TRPV1、p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.01$); PPPs 对无 LA 诱导的 SZ95 细胞基础脂质合成无明显影响, TRPV1、AMPK mRNA 表达水平升高 ($P < 0.01$), 但 TRPV1、p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平差异无统计学意义。与模型组比较, PPPs 明显减少 LA 诱导下的 SZ95 细胞脂质合成 ($P < 0.01$), 明显提高 *TRPV1*、*AMPK* mRNA 表达及 TRPV1、p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。沉默 TRPV1 显著增加了 LA 诱导下的 SZ95 细胞脂质合成 ($P < 0.01$), 并显著减弱了 PPPs 对 SZ95 细胞脂质过度合成的抑制 ($P < 0.01$), 显著降低其 *TRPV1*、*AMPK* 的 mRNA 及 TRPV1、p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 PPPs 可有效抑制 LA 诱导的 SZ95 细胞脂质合成, 其作用机制可能与 TRPV1/AMPK 通路有关。

关键词: 石榴皮总多酚; 永生化人皮脂腺 SZ95 细胞; 脂质合成; 痤疮; 瞬时受体电位香草酸亚型 1; 腺苷酸活化蛋白激酶
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)14-4538-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.14.014

Effects of pomegranate peel polyphenols on linoleic acid-induced lipid synthesis in human sebocytes based on TRPV1/AMPK pathway

ZHANG Xi^{1,2}, ZHU Ming-fang¹, WU Shu-hui¹, ZHANG Juan-juan¹, ZHENG Hui-e¹, WANG Yun¹, JU Qiang³, Christos C. Zouboulis⁴

1. The Second Affiliated hospital of Hunan university of Chinese medicine, Changsha 410005, China

2. School of Physical Education and Health Promotion, Hunan University of Technology and Business, Changsha 410205, China

3. Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127, China

4. Staedtisches Klinikum Dessau, Brandenburg Medical School Theodore Fontane and Faculty of Health Sciences Brandenburg, Dessau 06847, Germany

收稿日期: 2023-03-14

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82174375); 湖南省中医药科研计划重点项目 (C2022026); 湖南省卫生健康委科研项目 (202202124772); 湖南省自然科学基金医药联合项目 (2023JJ60485); 血管生物学与转化医学湖南省重点实验室 (2023TP1018); 湖南省卫生健康委高层次人才学科带头人 (湘卫函[2023]78 号); 湖南省“十四五”第一批中医药领军人才培养对象 (湘中医药[2022]4 号); 湖南省研究生创新项目 (CX20200767)

作者简介: 张 曦, 博士, 研究方向为中医药防治皮肤病。E-mail: 520171570@qq.com

***通信作者:** 朱明芳, 博士, 教授, 研究方向为中医药防治皮肤病。E-mail: cszmf@163.com

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of pomegranate peel polyphenols (PPPs) on lipid synthesis induced by linoleic acid (LA) in human immortalized SZ95 sebocytes. **Methods** SZ95 sebocytes were cultured *in vitro* and lipid over-synthesis model were induced by LA. The effect of different concentrations of PPPs on viability of SZ95 sebocytes was measured by CCK-8 assay. Lipid content in cells was measured by Nile red staining. qRT-PCR was used to detect the mRNA expressions of transient receptor potential vanilloid 1 (*TRPV1*) and adenosine monophosphate-activated protein kinase (*AMPK*). Western blotting was used to detect the protein expressions of TRPV1, AMPK and phosphorylated AMPK (p-AMPK). Cells were transfected with siRNA to observe the effect of PPPs on LA induced lipid synthesis and TRPV1/AMPK pathway in SZ95 sebocytes after TRPV1 silencing. **Results** PPPs (1.25, 2.5 and 5 $\mu\text{g/mL}$) had no significant effect on the viability of SZ95 sebocytes but significantly inhibited LA-induced lipid over-synthesis ($P < 0.01$), and 5 $\mu\text{g/mL}$ of PPPs had the most obvious inhibitory effect. Compared with control group, the lipid synthesis of cells was significantly increased in model group ($P < 0.01$), mRNA expressions of *TRPV1* and *AMPK*, and protein expressions of TRPV1 and p-AMPK/AMPK were significantly decreased ($P < 0.01$). PPPs had no significant effect on the basal lipid synthesis of SZ95 sebocytes without LA induction, and the mRNA expression levels of *TRPV1* and *AMPK* were significantly increased ($P < 0.01$), but there was no significant difference in the protein expression levels of TRPV1 and p-AMPK/AMPK. Compared with model group, PPPs significantly reduced the LA induced lipid synthesis in SZ95 sebocytes ($P < 0.01$), and significantly increased mRNA expressions of *TRPV1* and *AMPK* and protein expressions of TRPV1 and p-AMPK/AMPK ($P < 0.05, 0.01$). Silencing TRPV1 significantly increased the LA induced lipid synthesis in SZ95 sebocytes ($P < 0.01$), significantly weakened the inhibition of PPPs on lipid over-synthesis in SZ95 sebocytes ($P < 0.01$), significantly decreased the mRNA expression levels of *TRPV1*, *AMPK* and protein expression levels of TRPV1 and p-AMPK/AMPK ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** PPPs can effectively inhibit LA-induced lipid synthesis in SZ95 sebocytes, and its mechanism may be related to TRPV1/AMPK pathway.

Key words: pomegranate peel polyphenols; human immortalized SZ95 sebocytes; lipid synthesis; acne; transient receptor potential vanilloid 1; adenosine monophosphate-activated protein kinase

痤疮是发生于人类毛囊皮脂腺的慢性炎症性皮肤病,以粉刺、丘疹、脓疱、结节及囊肿为主要表现。皮脂腺大量分泌脂质是痤疮发生发展的必要前提,可进一步致角质化异常、微生物增殖、诱发炎症等,产生炎症级联反应,加重痤疮表现^[1-4]。目前,痤疮发病率与疾病负担位居全球皮肤病第 2 位^[5],也是我国就诊率最高的皮肤病,截面统计发病率高达 8.1%^[6-7],造成了较大的个人及社会负担。但治疗痤疮的一线药物及光电疗法多具有明确不良反应、费用昂贵等问题,因此,越来越多国内外学者致力于中草药及其有效成分在痤疮治疗及调节皮脂方面的研究与开发^[8]。

石榴皮为石榴科植物石榴 *Punica granatum* L. 的干燥果皮,性温,味酸、涩,归大肠经,除涩肠止泻外,还具有调血脂、治瘤疮等功效^[9]。石榴皮总多酚是石榴皮中多酚类物质总称,包括鞣花酸、安石榴苷、安石榴林等活性成分,结构稳定,生物利用度高,具有抗炎、抑菌、抗病毒、抗氧化、促进皮肤愈合、改善糖脂代谢紊乱等多重药理功效^[10-12]。现代研究表明石榴皮提取物具有抑制脂肪酶活性及抗角质形成细胞增殖的作用^[13]。同时,本课题组前期动物实验结果表明石榴皮总多酚具有抑制皮脂腺增生、抗角化、抗炎、抑菌等多重抗痤疮作用,提

出石榴皮总多酚在治疗痤疮方面具有良好的作用效果及研究前景^[14-22]。但痤疮作为人类特有的皮脂腺疾病,动物模型无法完全模拟其生理病理变化,石榴皮总多酚是否影响人皮脂腺细胞脂质合成及其作用机制尚不明确。

瞬时受体电位香草酸亚型 1 (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1) 在人类皮脂腺细胞原位表达,能选择性地抑制永生化人皮脂腺 SZ95 细胞增殖,减少花生四烯酸诱导的脂质合成,在人类皮脂代谢中具有重要作用^[23]。腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 参与多种脂质的合成、氧化、分解等代谢过程,是调控脂质代谢的关键通路蛋白^[24]。研究报道,TRPV1 可通过激活 AMPK 抑制肝脏脂肪蓄积、参与葡萄糖等生物能量代谢,被认为是 AMPK 调控脂质等活动的关键上游靶点^[25-32],而 TRPV1 在人类皮脂代谢中是否通过 AMPK 抑制皮脂合成及石榴皮总多酚是否通过 TRPV1/AMPK 通路发挥抑制皮脂作用尚不明确。因此,本研究采用亚油酸诱导 SZ95 细胞模拟痤疮皮脂过度合成状态,探讨石榴皮总多酚是否通过激活 TRPV1/AMPK 抑制 SZ95 细胞脂质合成,以期石榴皮总多酚治疗痤疮的研究与推广提供理论及实验依据。

1 材料

1.1 细胞

SZ95 细胞由德国勃兰登堡医学院 Christos C. Zouboulis 教授馈赠(国际专利号 WO0046353)。

1.2 药品与试剂

石榴皮总多酚(批号 C0322107106, 质量分数 $\geq 70\%$)购自陕西开普勒生物科技有限公司; Sebomed 基础培养基(批号 F8205)、 CaCl_2 (批号 C5670)、亚油酸(批号 L1012)购自美国 Sigma 公司; 胎牛血清(批号 10270-106)、人表皮生长因子(批号 PHG0311)、Opti-MEM 培养基(批号 31985-062)购自美国 Gibco 公司; 青链霉素混合液(批号 P1400)、PBS(批号 P1010)、0.25%胰蛋白酶(批号 T1350)、CCK-8(批号 CA1210)、尼罗红(批号 N8440)、二乙酸荧光素(FDA, 批号 F804)、抗荧光衰减封片剂(含 DAPI, 批号 S2110)、dNTP Mix (10 mmol/L, 批号 PC2200)、Triton X-100(批号 T8210)、DNase/RNase-Free Water(批号 R1600)购自北京索莱宝科技有限公司; Lipofectamine[®] RNAiMAX(批号 13778030)购自美国 Invitrogen 公司; Trizol(批号 15596026)购自美国 Ambion 公司; 反转录试剂盒(批号 RR047A)购自日本 Takara 公司; TRPV1 抗体(批号 GTX10296)购自美国 GeneTex 公司; AMPK 抗体(批号 5831T)、磷酸化 AMPK(phosphorylated AMPK, p-AMPK)抗体(批号 2535T)购自美国 CST 公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 PAB36269)购自武汉贝茵莱生物科技有限公司; 山羊抗兔二抗(批号 SA00001-2)购自美国 Proteintech 公司。

1.3 仪器

311 型 CO_2 恒温培养箱、F3 型移液器(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); DMIL LED 型倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司); EnSpire 型全功能微孔板检测仪(美国 PerkinElmer 公司); Icen-24R 型高速冷冻离心机(杭州奥盛仪器有限公司); CFX-Connect 96 型荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); DYY-6C 型电泳仪、DYCZ-24DN 型电泳槽、DYCZ-40D 型转膜仪(北京六一生物科技有限公司); ChemiScope 6100 型化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 药物储存液配制

石榴皮总多酚溶解于二甲基亚砜(dimethyl

sulfoxide, DMSO)中, 制成质量浓度为 5 mg/mL 的储存液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 分装保存, 实验时用 Sebomed 基础培养基稀释至相应质量浓度。亚油酸溶解于 DMSO, 制成浓度为 0.1 mol/L 的溶液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 分装保存, 实验时用 Sebomed 基础培养基稀释为 0.1 mmol/L。

2.2 细胞培养及模型建立

SZ95 细胞在添加 10%胎牛血清、5 $\mu\text{g/L}$ 表皮生长因子、1%青链霉素混合液、1 mmol/L CaCl_2 的 Sebomed 基础培养基中培养, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中。待 SZ95 细胞生长至融合度 70%~80% 后进行实验, 对照组加入 0.1% DMSO, 模型组加入 0.1 mmol/L 亚油酸诱导构建脂质过度合成模型, 其余细胞按照分组情况分别加入相应药物^[33]。

2.3 siRNA 细胞转染

将生长状态良好的 SZ95 细胞以 4×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 24 h 后细胞融合度达到 70%左右时进行转染操作。转染时取 100 pmol siRNA 稀释于 250 μL Opti-MEM 中, 混匀孵育后加入已混匀孵育的含 5 μL Lipofectamine[®] RNAiMAX 的 250 μL Opti-MEM 中, 混匀孵育 20 min。将 500 μL 复合物加到含有细胞和新鲜培养基的培养板孔中转染 4 h, 更换新鲜培养基后培养 48 h。由广州市锐博生物科技有限公司设计 3 组 TRPV1-siRNA 序列(siRNA-1: 5'-TGACGAGCA-TGTACAATGA-3', siRNA-2: 5'-CCCGATAGCTCCT-ACAACA-3', siRNA-3: 5'-TGGAGACTATTTCCGA-GTT-3')。不同 siRNA 序列转染 SZ95 细胞后通过 qRT-PCR 及 Western blotting 检测转染后 TRPV1 mRNA 及蛋白表达情况, 确定最终使用的 siRNA 序列。

2.4 CCK-8 法检测细胞活力

将生长状态良好的 SZ95 细胞以 3×10^3 个/孔接种于 96 孔板中, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养过夜, 细胞贴壁后, 每孔加入新鲜配制的不同质量浓度石榴皮总多酚溶液(参考文献报道^[13,34-35], 设置梯度质量浓度 1.25、2.5、5、10、20、40、80 $\mu\text{g/mL}$), 并设置对照组及仅有培养基无细胞的调零组, 分别培养 12、24、48 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱孵育 2 h 后, 采用酶标仪测定 450 nm 处各孔的吸光度(A)值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}})$$

2.5 细胞分组

设置对照组、模型组(0.1 mmol/L 亚油酸)和石榴皮总多酚(1.25、2.5、5 $\mu\text{g/mL}$)组, 检测不同质量浓度的石榴皮总多酚对亚油酸诱导的 SZ95 细

胞脂质合成及 TRPV1/AMPK 通路的影响。

设置对照组、石榴皮总多酚 (5 $\mu\text{g/mL}$) 组、模型组 (0.1 mmol/L 亚油酸) 和亚油酸 (0.1 mmol/L) + 石榴皮总多酚 (5 $\mu\text{g/mL}$) 组, 检测石榴皮总多酚对 SZ95 细胞基础脂质合成及亚油酸诱导的脂质合成的影响, 以及对 TRPV1/AMPK 通路的作用。

设置 NC-siRNA + 亚油酸组 (转染阴性对照 siRNA 后给予 0.1 mmol/L 亚油酸)、TRPV1-siRNA + 亚油酸组 (转染特异性 TRPV1-siRNA 后给予 0.1 mmol/L 亚油酸)、NC-siRNA + 亚油酸 + 石榴皮总多酚组 (转染阴性对照 siRNA 后给予 0.1 mmol/L 亚油酸 + 5 $\mu\text{g/mL}$ 石榴皮总多酚)、TRPV1-siRNA + 亚油酸 + 石榴皮总多酚组 (转染特异性 TRPV1-siRNA 后给予 0.1 mmol/L 亚油酸 + 5 $\mu\text{g/mL}$ 石榴皮总多酚), 进一步观察石榴皮总多酚是否通过靶向调节 TRPV1 调控 AMPK 磷酸化影响 SZ95 细胞脂质合成。

2.6 尼罗红荧光染色法检测细胞脂质合成情况

将生长状态良好的 SZ95 细胞以 2×10^4 个/孔接种于适用 24 孔板的爬片, 次日根据分组加入不同刺激物, 孵育 48 h 后弃去上清, 4% 多聚甲醛室温固定, 每孔加入 10 $\mu\text{g/mL}$ 尼罗红染料, 加入 0.5% Triton X-100, 室温避光孵育 5 min 后滴加抗含 DAPI 的荧光衰减封片剂, 盖玻片封片。荧光显微镜下观察并采集图像, 尼罗红激发波长 485 nm, 发射波长 565 nm; DAPI 激发波长 358 nm, 发射波长 461 nm^[33]。

将生长状态良好的 SZ95 细胞以 3×10^3 个/孔接种于黑色底透型 96 孔板中, 次日根据分组加入不同刺激物, 培养 48 h 后弃上清, 每孔加入 10 $\mu\text{g/mL}$ 尼罗红染料, 另设相应孔加入 15 $\mu\text{g/mL}$ FDA 染料。通过全功能微孔板检测仪检测, 尼罗红激发波长 485 nm, 发射波长 565 nm; FDA 激发波长 494 nm, 发射波长 523 nm。脂质合成结果用尼罗红和 FDA 的 A 比值确定。

细胞内脂质合成率 = $A_{\text{实验组比值}} / A_{\text{对照组比值}}$

2.7 qRT-PCR 检测 TRPV1 和 AMPK mRNA 表达

收集细胞加入 Trizol 提取总 RNA, 使用反转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA, 进行 PCR 扩增, 检测各组细胞目的基因 mRNA 表达水平。检测反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 25 s, 循环 40 次。以 $\beta\text{-actin}$ 为内参, 目的基因 mRNA 相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示。引物由武汉天一华煜基因科技有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'-3')	长度/bp
TRPV1	F: CTTGTTCGGGTTTCCAC R: TTGAGCAGGAGGATGTAGGT	270
AMPK	F: CAAGGGCACGCCATACC R: GATTCTTCCTTCGTACACGCA	201
GAPDH	F: GGGAAACTGTGGCGTGAT R: GAGTGGGTGTCGCTGTTGA	299

2.8 Western blotting 检测 TRPV1、AMPK 和 p-AMPK 蛋白表达

收集细胞, 每 1×10^6 个细胞加入 200 μL 含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 充分裂解、离心、取上清, BCA 法测定蛋白浓度。调整蛋白浓度, 加入蛋白上样缓冲液, 煮沸变性, 电泳, 转膜, 封闭。分别加入 TRPV1 (1:1000)、AMPK (1:1000)、p-AMPK (1:1000) 及 $\beta\text{-actin}$ (1:5000) 抗体孵育过夜, 洗膜 3 次; 加入二抗 (1:6000) 室温孵育 1 h, 洗膜 3 次, 采用化学发光系统 ECL 试剂盒显影成像。

2.9 统计学分析

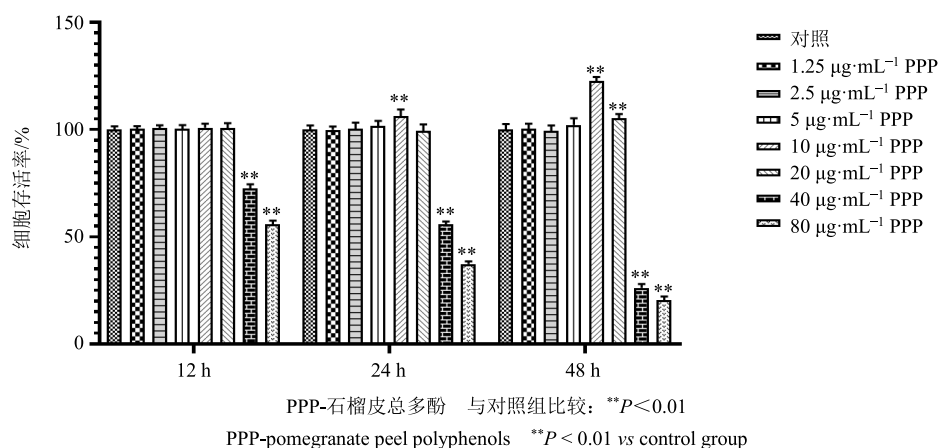
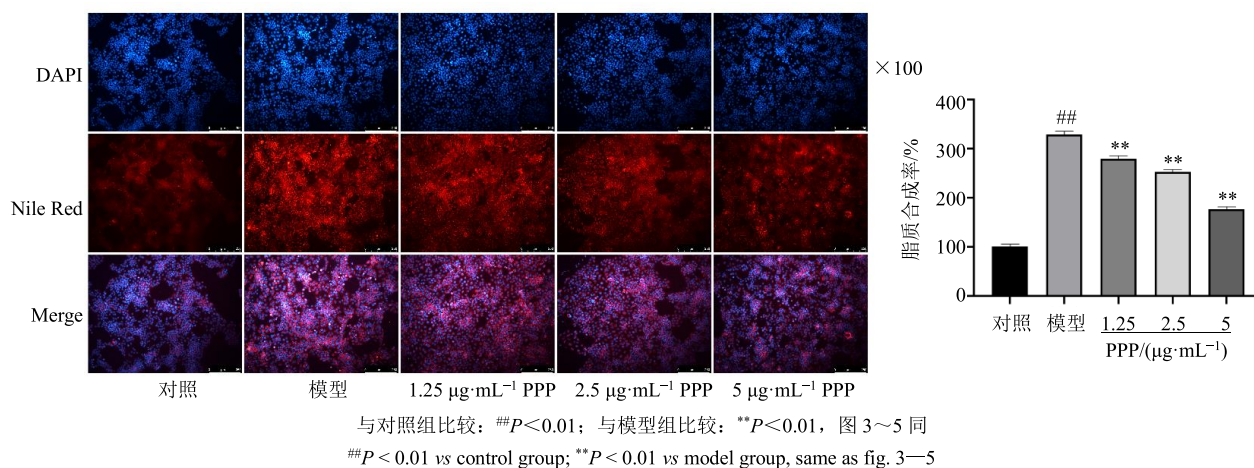
使用 SPSS 22.0 软件进行数据处理分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 满足方差齐性则采用单因素方差分析及 LSD- t 检验比较组间差异。

3 结果

3.1 石榴皮总多酚质量浓度筛选

3.1.1 不同质量浓度的石榴皮总多酚对 SZ95 细胞活力的影响 如图 1 所示, 与对照组比较, 经 1.25、2.5、5 $\mu\text{g/mL}$ 石榴皮总多酚处理 12、24、48 h 后的 SZ95 细胞活性均无明显变化; 10 $\mu\text{g/mL}$ 石榴皮总多酚处理 24、48 h 及 20 $\mu\text{g/mL}$ 石榴皮总多酚处理 48 h 后一定程度上促进了 SZ95 细胞增殖 ($P < 0.01$); 40、80 $\mu\text{g/mL}$ 石榴皮总多酚处理 12、24、48 h 后均明显抑制了 SZ95 细胞活性 ($P < 0.01$)。因此, 选取对 SZ95 细胞活性无影响的 1.25、2.5、5 $\mu\text{g/mL}$ 石榴皮总多酚进行后续实验。

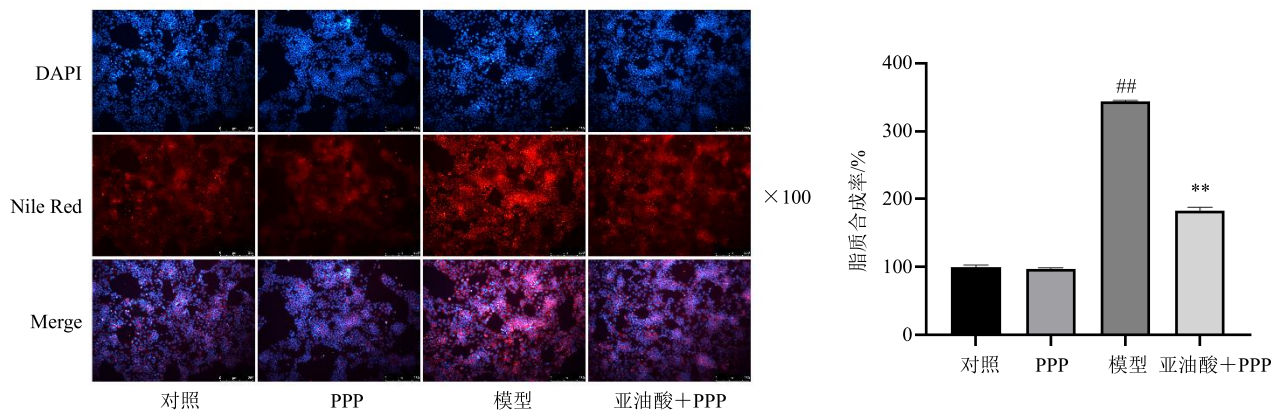
3.1.2 不同质量浓度的石榴皮总多酚对亚油酸诱导的 SZ95 细胞脂质合成的影响 如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组尼罗红染色荧光强度显著增强, 脂质合成率显著增加 ($P < 0.01$), 即亚油酸的诱导明显增加了 SZ95 细胞的脂质合成; 与模型组比较, 石榴皮总多酚 (1.25、2.5、5 $\mu\text{g/mL}$) 组尼罗红荧光强度均明显减弱, 脂质合成率均显著降低 ($P < 0.01$), 即上述质量浓度石榴皮总多酚均减少了亚油酸诱导的 SZ95 细胞脂质合成, 其中以 5 $\mu\text{g/mL}$ 石

图 1 不同质量浓度的石榴皮总多酚对 SZ95 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)Fig. 1 Effect of different concentrations of pomegranate peel polyphenols on viability of SZ95 sebocytes ($\bar{x} \pm s, n = 9$)图 2 不同质量浓度的石榴皮总多酚对亚油酸诱导的 SZ95 细胞脂质合成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)Fig. 2 Effect of different concentrations of pomegranate peel polyphenols on lipid synthesis in linoleic acid-induced SZ95 sebocytes ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

石榴皮总多酚组的荧光强度最低, 脂质合成率最小, 即抑制脂质合成效应最为明显, 因此选择 $5 \mu\text{g/mL}$ 石榴皮总多酚为后续实验质量浓度。

3.2 石榴皮总多酚对亚油酸诱导下 SZ95 细胞的影响

3.2.1 石榴皮总多酚对 SZ95 细胞基础脂质合成及亚油酸诱导下脂质合成的影响 如图 3 所示, 与对

图 3 石榴皮总多酚对 SZ95 细胞基础脂质合成及亚油酸诱导下脂质合成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)Fig. 3 Effect of pomegranate peel polyphenols on basal and linoleic acid-induced lipid synthesis in SZ95 sebocytes ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

照组比较, 石榴皮总多酚处理下 SZ95 细胞红色荧光强度无明显差异, 提示石榴皮总多酚对 SZ95 细胞基础脂质合成无明显影响; 模型组 SZ95 细胞荧光强度明显增强, 脂质合成率显著增加 ($P<0.01$), 即亚油酸诱导下 SZ95 细胞脂质合成明显增加。与模型组比较, 亚油酸+石榴皮总多酚组荧光强度明显减弱, 脂质合成率显著减少 ($P<0.01$), 即石榴皮总多酚明显减少了亚油酸诱导下的 SZ95 细胞脂质合成。表明石榴皮总多酚可抑制亚油酸诱导下的脂质过度合成, 且不影响无亚油酸诱导的 SZ95 细胞基础脂质合成。

3.2.2 石榴皮总多酚对 SZ95 细胞 TRPV1/AMPK 通路的影响 如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组 *TRPV1* 和 *AMPK* mRNA 表达水平均显著降低 ($P<0.01$), *TRPV1* 和 p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01); 石榴皮总多酚组 *TRPV1* 和 *AMPK* mRNA 表达水平均显著升高 ($P<0.01$), *TRPV1* 和 p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平有升高趋势, 但差异无统计学意义。与模型组比较, 亚油酸+石榴皮总多酚组 *TRPV1* 和 *AMPK* mRNA 表达水平均显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), *TRPV1* 和 p-AMPK/

AMPK 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.05$)。各组间 AMPK 表达差异无统计学意义。提示亚油酸可能通过抑制 TRPV1 及 AMPK 磷酸化诱导 SZ95 细胞脂质过度合成, 而石榴皮总多酚可能通过激活 TRPV1 及磷酸化 AMPK 抑制亚油酸诱导下的 SZ95 细胞脂质合成。

3.3 沉默 TRPV1 后石榴皮总多酚对亚油酸诱导的 SZ95 细胞的影响

3.3.1 不同 siRNA 序列转染 SZ95 细胞对 *TRPV1* mRNA 及蛋白表达的影响 如图 5 所示, 与对照组比较, NC-siRNA 组 *TRPV1* mRNA 及蛋白表达差异无统计学意义, siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3 组 *TRPV1* mRNA 表达和蛋白表达均明显降低 ($P<0.01$), 其中 siRNA-1 组 *TRPV1* mRNA 及蛋白表达水平最低, 提示 siRNA-1 沉默效果较好, 因此选择 siRNA-1 用于后续实验。

3.3.2 沉默 TRPV1 后石榴皮总多酚对亚油酸诱导的 SZ95 细胞脂质合成的影响 如图 6 所示, 与 NC-siRNA+亚油酸组比较, *TRPV1*-siRNA+亚油酸组尼罗红染色荧光强度增强, 脂质合成率增加 ($P<0.01$), 即沉默 TRPV1 增加了亚油酸诱导下 SZ95 细

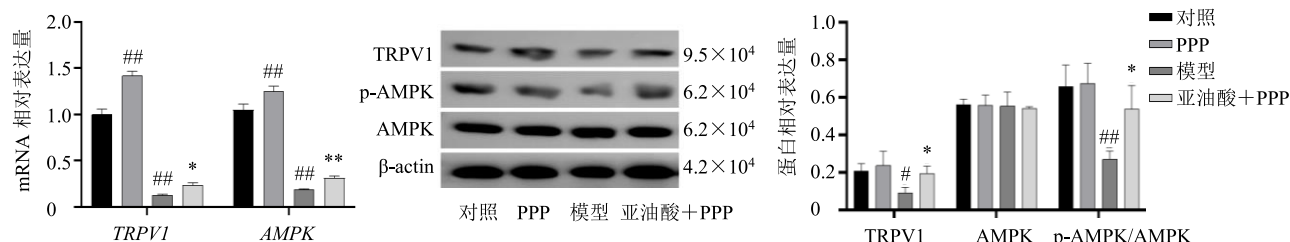
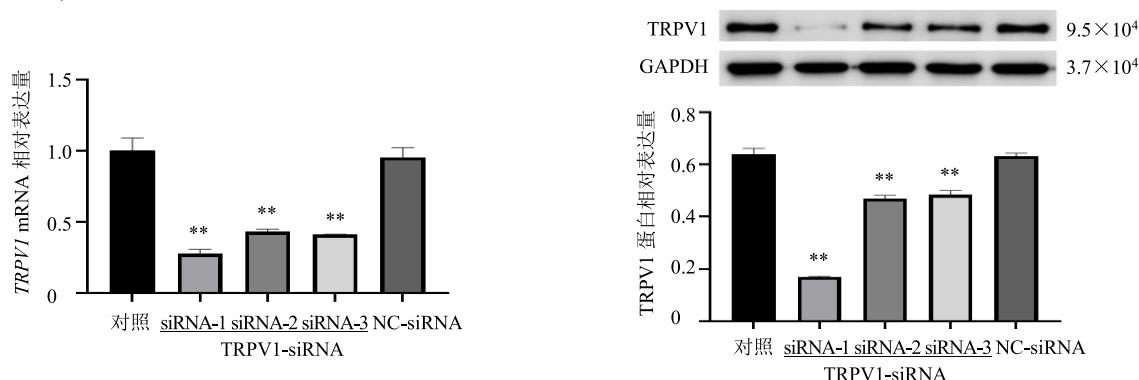


图 4 石榴皮总多酚对 SZ95 细胞 *TRPV1*、*AMPK* mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 4 Effect of pomegranate peel polyphenols on *TRPV1* and *AMPK* mRNA and protein expressions in SZ95 sebocytes ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

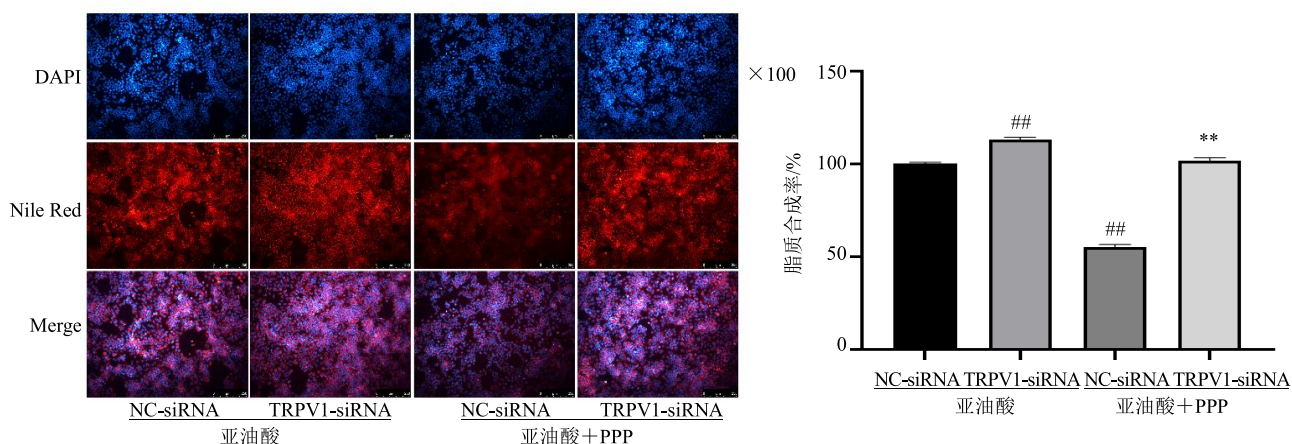


与 NC-siRNA 组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs NC-siRNA group

图 5 不同 siRNA 序列转染 SZ95 细胞对 *TRPV1* mRNA 及蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Effect of different siRNA sequences transfection on *TRPV1* mRNA and protein expressions in SZ95 sebocytes ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与 NC-siRNA+亚油酸组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与 NC-siRNA+亚油酸+石榴皮总多酚组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 图 7 同

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs NC-siRNA + linoleic acid group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs NC-siRNA + linoleic acid + pomegranate peel polyphenols group, same as fig. 7

图 6 TRPV1-siRNA 对石榴皮总多酚作用下亚油酸诱导的 SZ95 细胞脂质合成的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Fig. 6 Effect of TRPV1-siRNA on linoleic acid-induced lipid synthesis in SZ95 sebocytes under pomegranate peel polyphenols treatment ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

胞脂质合成; NC-siRNA+亚油酸+石榴皮总多酚组荧光强度明显减弱, 脂质合成率显著减少 ($P < 0.01$), 即石榴皮总多酚在未沉默 TRPV1 情况下可抑制亚油酸诱导的 SZ95 细胞脂质合成; 与 NC-siRNA+亚油酸+石榴皮总多酚组比较, TRPV1-siRNA+亚油酸+石榴皮总多酚组尼罗红染色荧光强度明显增强, 脂质合成率显著增加 ($P < 0.01$); 而与 TRPV1-siRNA+亚油酸组比较, TRPV1-siRNA+亚油酸+石榴皮总多酚组尼罗红染色荧光强度及

脂质合成率无明显差异, 提示石榴皮总多酚至少部分依赖于激活 TRPV1 以抑制亚油酸诱导下的皮脂合成。

3.3.3 沉默 TRPV1 后石榴皮总多酚对亚油酸诱导的 SZ95 细胞 TRPV1/AMPK 通路的影响 如图 7 所示, 与 NC-siRNA+亚油酸组比较, TRPV1-siRNA+亚油酸组 *TRPV1*、*AMPK* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), TRPV1、p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); NC-siRNA+亚油

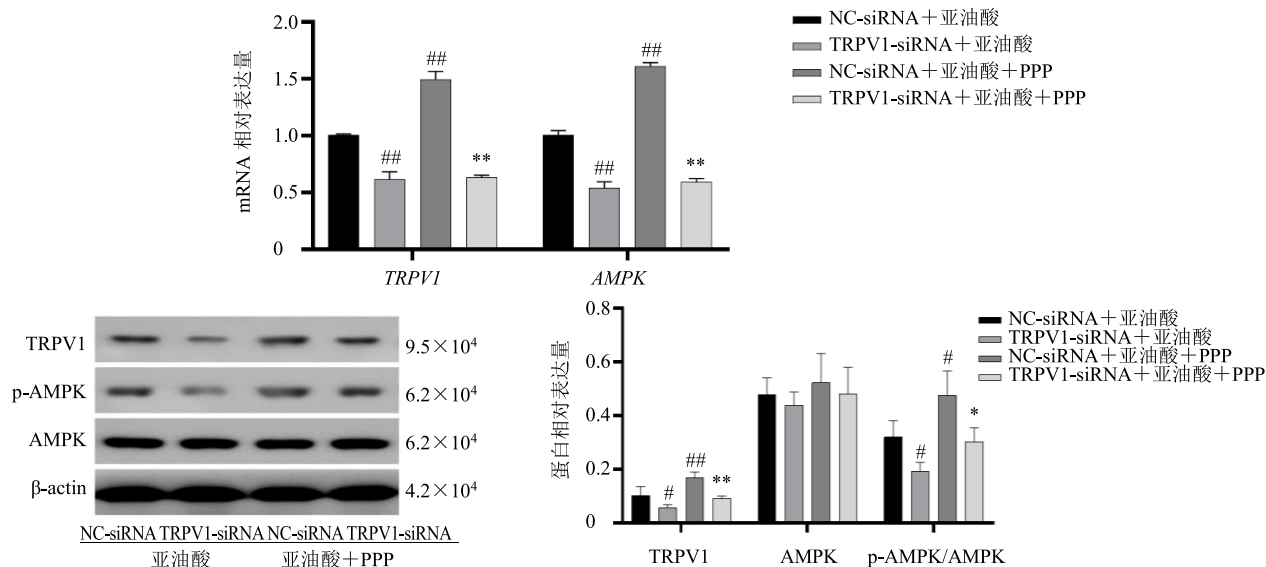


图 7 TRPV1-siRNA 对石榴皮总多酚作用下亚油酸诱导的 SZ95 细胞 *TRPV1*、*AMPK* mRNA 及蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7 Effect of TRPV1-siRNA on *TRPV1* and *AMPK* mRNA and protein expressions induced by linoleic acid in SZ95 sebocytes under pomegranate peel polyphenols treatment ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

酸+石榴皮总多酚组 *TRPV1*、*AMPK* mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.01$), *TRPV1* 和 p-*AMPK*/*AMPK* 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。与 NC-siRNA+亚油酸+石榴皮总多酚组比较, *TRPV1*-siRNA+亚油酸+石榴皮总多酚组 *TRPV1*、*AMPK* mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.01$), *TRPV1*、p-*AMPK*/*AMPK* 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。而与 *TRPV1*-siRNA+亚油酸组比较, *TRPV1*-siRNA+亚油酸+石榴皮总多酚组 *TRPV1*、*AMPK* mRNA 及 *TRPV1*、p-*AMPK*/*AMPK* 蛋白表达无明显差异。各组间 *AMPK* 表达差异无统计学意义。提示沉默 *TRPV1* 显著抑制 *AMPK* 磷酸化从而诱导 SZ95 细胞脂质过度合成, 而石榴皮总多酚抑制亚油酸诱导下脂质合成的作用可能依赖于靶向调节 *TRPV1* 调控下游 *AMPK*。

4 讨论

人类皮脂主要通过皮脂腺中的皮脂腺细胞全浆分泌, 生理状态下具有滋润皮肤、抗紫外线损伤等皮肤屏障功能^[36], 皮脂缺乏可导致皮肤干燥、氧化损伤等皮肤屏障受损表现, 而皮脂大量合成、皮脂成分改变等皮脂代谢紊乱将导致痤疮等皮脂腺相关疾病的发生^[37]。因此, 药物治疗痤疮应在抑制皮脂过度合成的同时避免影响生理状态下的脂质合成, 以维持皮脂稳态及正常的皮肤屏障功能。课题组前期于临床中发现石榴皮组方外敷治疗痤疮具有控油保湿的功效^[38], 之后针对石榴皮有效部位石榴皮总多酚进行了系列基础研究, 发现石榴皮总多酚具有抑制金黄地鼠皮脂腺斑增生的作用^[17], 但动物模型不具备人类皮脂腺生理病理特点, 永生生化人皮脂腺细胞 SZ95 具有正常皮脂腺细胞的生理病理特征, 是目前国际上皮脂腺相关研究最主要的细胞工具, 故本研究运用 SZ95 细胞模拟痤疮皮脂过度合成状态, 进一步探究石榴皮总多酚抗痤疮的作用及机制。

本研究采用的诱导剂亚油酸为 ω -6 不饱和脂肪酸, 在体内与相应受体结合后将诱导皮脂腺细胞终末分化以促进皮脂合成, 是模拟痤疮皮脂过度合成状态常用的诱导剂之一^[39]。通过 CCK-8 初步筛选出对 SZ95 细胞活性无影响的 1.25、2.5、5 μ g/mL 石榴皮总多酚进行干预后, 尼罗红荧光染色结果显示亚油酸的诱导明显增加了 SZ95 细胞的脂质合成, 1.25、2.5、5 μ g/mL 石榴皮总多酚均可抑制亚油酸诱导的 SZ95 脂质过度合成, 其中 5 μ g/mL 石榴皮总多酚抑制效应最明显, 且对无亚油酸诱导的 SZ95

细胞基础脂质合成无明显影响, 一定程度上说明石榴皮总多酚可抑制 SZ95 细胞脂质过度合成, 而不影响生理状态下的脂质合成需求。

TRPV1 是细胞膜上的阳离子通道蛋白, 当其被激活时, 以 Ca^{2+} 为主的阳离子通过 *TRPV1* 进出细胞产生一系列生理、病理反应, 与瘙痒、疼痛等皮肤、黏膜浅感觉密切相关。研究发现, *TRPV1* 特异性免疫信号在分化程度较高的皮脂腺细胞上更为突出, 激活 *TRPV1* 可减少花生四烯酸诱导的皮脂过度合成^[23,40], 且细胞内 Ca^{2+} 水平显著影响 SZ95 细胞形态及数量, Ca^{2+} 螯合显著促进皮脂腺分化^[41]。同时, 研究发现激活 *TRPV1* 可通过增加细胞内 Ca^{2+} 浓度, 活化 *AMPK* 上游激酶钙调蛋白激酶激酶 2 (calcium/calmodulin dependent protein kinase kinase 2, CaMKK2), 从而磷酸化 *AMPK* α 亚基上的苏氨酸 172 位点 (T172), 启动一系列下游反应, 参与调节脂质合成、分泌等代谢过程。课题组前期研究发现石榴皮总多酚通过 *AMPK* 信号通路抑制金黄地鼠皮脂腺斑增生, 本研究 qRT-PCR 及 Western blotting 结果显示, 亚油酸诱导下的 SZ95 细胞 *TRPV1*、*AMPK* mRNA 及 *TRPV1*、p-*AMPK*/*AMPK* 蛋白表达水平均明显降低; 经石榴皮总多酚干预后, 显著提高了在亚油酸诱导下降低的 *TRPV1*、*AMPK* mRNA 及 *TRPV1*、p-*AMPK*/*AMPK* 蛋白表达, 说明石榴皮总多酚抑制 SZ95 细胞脂质过度合成的机制可能与激活 *TRPV1*/*AMPK* 有关。为明确这一结论, 本研究进一步转染 siRNA 沉默 *TRPV1* 后发现, SZ95 细胞脂质合成明显增加, *TRPV1*、*AMPK* mRNA 及 *TRPV1*、p-*AMPK*/*AMPK* 蛋白表达水平均明显降低, 说明靶向沉默 *TRPV1* 抑制 *AMPK* 表达, 进一步增加亚油酸诱导的 SZ95 细胞脂质合成; 而沉默 *TRPV1* 后石榴皮总多酚对脂质合成的抑制效应亦明显减弱, *TRPV1*、*AMPK* mRNA 及 *TRPV1*、p-*AMPK*/*AMPK* 蛋白表达水平明显降低, 说明石榴皮总多酚抑制亚油酸诱导下 SZ95 细胞脂质合成的作用部分依赖于靶向调节 *TRPV1* 激活 *AMPK* 产生。

综上, 石榴皮总多酚能够抑制亚油酸诱导下的脂质过度合成, 并且不影响 SZ95 细胞生理状态下的基础脂质合成, 调节脂质稳态。*TRPV1*/*AMPK* 可能是治疗痤疮的创新性通路, 而石榴皮总多酚抑制 SZ95 细胞脂质过度合成的作用至少部分依赖于 *TRPV1*/*AMPK* 信号通路。本实验仍存在局限, CCK-8 多次重复结果显示 10、20 μ g/mL 石榴皮总多酚随

着干预时间延长显著促进细胞增殖,而质量浓度达到 40 $\mu\text{g/mL}$ 时显著抑制细胞活性,呈先促进后抑制表现,其具体机制值得进一步探究,后续也将进行石榴皮总多酚与一线药物的效用及安全性比较,深入研究石榴皮总多酚对 TRPV1/AMPK 通路的具体调控机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zouboulis C C. Endocrinology and immunology of acne: Two sides of the same coin [J]. *Exp Dermatol*, 2020, 29(9): 840-859.
- [2] Biagi L G, Sañudo A, Bagatin E. Severe acne and metabolic syndrome: A possible correlation [J]. *Dermatology*, 2019, 235(6): 456-462.
- [3] Melnik B C. Acne vulgaris: The metabolic syndrome of the pilosebaceous follicle [J]. *Clin Dermatol*, 2018, 36(1): 29-40.
- [4] Clayton R W, Göbel K, Niessen C M, et al. Homeostasis of the sebaceous gland and mechanisms of acne pathogenesis [J]. *Br J Dermatol*, 2019, 181(4): 677-690.
- [5] Chen H, Zhang T C, Yin X L, et al. Magnitude and temporal trend of acne vulgaris burden in 204 countries and territories from 1990 to 2019: An analysis from the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *Br J Dermatol*, 2022, 186(4): 673-683.
- [6] Shen Y W, Wang T L, Zhou C, et al. Prevalence of acne vulgaris in Chinese adolescents and adults: A community-based study of 17, 345 subjects in six cities [J]. *Acta Derm Venereol*, 2012, 92(1): 40-44.
- [7] He Z H, Marrone G, Ou A H, et al. Factors affecting health-related quality of life in patients with skin disease: Cross-sectional results from 8, 789 patients with 16 skin diseases [J]. *Health Qual Life Outcomes*, 2020, 18(1): 298.
- [8] Soleymani S, Farzaei M H, Zargaran A, et al. Promising plant-derived secondary metabolites for treatment of acne vulgaris: A mechanistic review [J]. *Arch Dermatol Res*, 2020, 312(1): 5-23.
- [9] Xiang Q W, Li M F, Wen J Y, et al. The bioactivity and applications of pomegranate peel extract: A review [J]. *J Food Biochem*, 2022, 46(7): e14105.
- [10] Les F, Arbonés-Mainar J M, Valero M S, et al. Pomegranate polyphenols and urolithin A inhibit α -glucosidase, dipeptidyl peptidase-4, lipase, triglyceride accumulation and adipogenesis related genes in 3T3-L1 adipocyte-like cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 220: 67-74.
- [11] AlMatar M, Islam M R, Albarri O, et al. Pomegranate as a possible treatment in reducing risk of developing wound healing, obesity, neurodegenerative disorders, and diabetes mellitus [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2018, 18(6): 507-526.
- [12] 唐荣, 魏欣, 马江, 等. 基于 CiteSpace 科学知识图谱分析石榴皮研究现状及热点 [J]. *中草药*, 2023, 54(12): 3949-3961.
- [13] Lee C J, Chen L G, Liang W L, et al. Multiple activities of *Punica granatum* linne against acne *Vulgaris* [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(1): 141.
- [14] 吴淑辉, 朱明芳, 魏露, 等. 石榴皮多酚对金黄地鼠皮脂腺斑及 AKT/Sox9 信号通路的影响 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2021, 54(8): 705-708.
- [15] 高凡, 朱明芳, 杨逸璇, 等. 石榴皮多酚乳膏抑制 NLRP3 炎性小体抗炎抗痤疮的机制研究 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2021, 41(7): 1003-1009.
- [16] 魏露, 朱明芳, 吴淑辉, 等. 石榴皮多酚乳膏对金黄地鼠皮脂腺斑组织中 AMPK/ACC-1 信号通路的影响 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2020, 40(10): 1221-1225.
- [17] 魏露, 吴淑辉, 张曦, 等. 石榴皮多酚乳膏对金黄地鼠皮脂腺斑 LXR α /SREBP-1 信号通路的影响 [J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2020, 34(10): 1134-1138.
- [18] 杨逸璇, 朱明芳, 王峰, 等. 石榴皮多酚软膏通过介导 TGF- β /Smad 信号通路以抗痤疮瘢痕形成的机制研究 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2019, 39(5): 596-599.
- [19] 胡彬, 杨逸璇, 杨婉婷, 等. 不同浓度的石榴皮多酚软膏对兔耳粉刺模型组织病理形态学的影响 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2018, 38(4): 397-401.
- [20] 张晓玲, 朱明芳, 杨柳, 等. 石榴皮多酚对痤疮丙酸杆菌体外抑菌活性的研究 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2015, 35(9): 23-25.
- [21] 魏露, 吴淑辉, 张曦, 等. 石榴皮活性成分治疗痤疮作用机制的网络药理学预测及实验研究 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2021, 23(4): 1129-1136.
- [22] 吴淑辉, 朱明芳, 魏露, 等. 石榴皮多酚对大鼠耳廓痤疮模型 mTOR/HIF-1 α /ROR γ t 信号通路的影响 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2022, 55(6): 511-516.
- [23] Tóth BI, Géczy T, Griger Z, et al. Transient receptor potential vanilloid-1 signaling as a regulator of human sebocyte biology [J]. *J Invest Dermatol*, 2009, 129(2): 329-339.
- [24] Wang Q, Liu S D, Zhai A H, et al. AMPK-mediated regulation of lipid metabolism by phosphorylation [J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(7): 985-993.
- [25] Li M, Zhang CS, Zong Y, et al. Transient receptor potential V channels are essential for glucose sensing by aldolase and AMPK [J]. *Cell Metab*, 2019, 30(3): 508-524.
- [26] Wu R Y, Jian T, Ding X Q, et al. Total sesquiterpene glycosides from loquat leaves ameliorate HFD-induced

- insulin resistance by modulating IRS-1/GLUT4, TRPV1, and SIRT6/Nrf2 signaling pathways [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 4706410.
- [27] Gao P, Jiang Y L, Wu H, *et al*. Inhibition of mitochondrial calcium overload by SIRT3 prevents obesity- or age-related whitening of brown adipose tissue [J]. *Diabetes*, 2020, 69(2): 165-180.
- [28] Huang T T, Chen X L, Chen D W, *et al*. Eugenol promotes appetite through TRP channels mediated-CaMKK2/AMPK signaling pathway [J]. *Phytother Res*, 2023, doi: 10.1002/ptr.7768.
- [29] Jiang Y G, Feng C X, Shi Y H, *et al*. Eugenol improves high-fat diet/streptomycin-induced type 2 diabetes mellitus (T2DM) mice muscle dysfunction by alleviating inflammation and increasing muscle glucose uptake [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 1039753.
- [30] Panchal S K, Bliss E, Brown L. Capsaicin in metabolic syndrome [J]. *Nutrients*, 2018, 10(5): 630.
- [31] Maiese K. Warming up to new possibilities with the capsaicin receptor TRPV1: MTOR, AMPK, and erythropoietin [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2017, 14(2): 184-189.
- [32] Wei J Y, Lin J Z, Zhang J H, *et al*. TRPV1 activation mitigates hypoxic injury in mouse cardiomyocytes by inducing autophagy through the AMPK signaling pathway [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 318(5): C1018-C1029.
- [33] Wei Z, Chen G, Hu T, *et al*. Resveratrol ameliorates lipid accumulation and inflammation in human SZ95 sebocytes via the AMPK signaling pathways *in vitro* [J]. *J Dermatol Sci*, 2021, 103(3): 156-166.
- [34] Sorrenti V, Randazzo C L, Caggia C, *et al*. Beneficial effects of pomegranate peel extract and probiotics on pre-adipocyte differentiation [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 660.
- [35] Zhao W, Li J, He X, *et al*. *In vitro* steatosis hepatic cell model to compare the lipid-lowering effects of pomegranate peel polyphenols with several other plant polyphenols as well as its related cholesterol efflux mechanisms [J]. *Toxicol Rep*, 2014, 1: 945-954.
- [36] Schneider M R, Paus R. Sebocytes, multifaceted epithelial cells: Lipid production and holocrine secretion [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(2): 181-185.
- [37] 许文君, 陈园园, 陈田, 等. 皮肤脂质及其与皮肤健康的关系 [J]. *中国美容医学*, 2021, 30(7): 168-171.
- [38] 陶梦颖, 王峰, 杨婉婷, 等. 朱明芳运用中药水面膜治疗痤疮经验 [J]. *湖南中医杂志*, 2018, 34(5): 51-52.
- [39] Kim S Y, Hyun M Y, Go K C, *et al*. Resveratrol exerts growth inhibitory effects on human SZ95 sebocytes through the inactivation of the PI3K/Akt pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(4): 1042-1050.
- [40] Bodó E, Kovács I, Telek A, *et al*. Vanilloid receptor-1 (VR1) is widely expressed on various epithelial and mesenchymal cell types of human skin [J]. *J Invest Dermatol*, 2004, 123(2): 410-413.
- [41] Zouboulis C C, Seltmann H, Abdel-Naser M B, *et al*. Effects of extracellular calcium and 1,25 dihydroxyvitamin D₃ on sebaceous gland cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Acta Derm Venereol*, 2017, 97(3): 313-320.

[责任编辑 李亚楠]