DOI:10.16016/j.2097-0927.202209074

二氢杨梅素通过 SIRT3 调节 2 型糖尿病小鼠肠上皮屏障功能作用

岳 静,周 杰,荆金金,董 妞,刘明华,易 龙,糜漫天 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系营养与食品安全研究中心,重庆市医学营养研究中心,重庆市营养与食品安全重点实验室

[摘要] **目的** 研究二氢杨梅素(dihydromyricetin,DHM)对高脂饮食(high-fat diet,HFD)诱导 2 型糖尿病小鼠肠上皮屏障功能的作用,并揭示 SIRT3 在介导 DHM 改善肠上皮屏障中的作用机制。**方法** 选用 7 周龄的 SPF 级雄性野生型(WT)小鼠 18 只和 SIRT3 敲除(SIRT3 KO)小鼠 30 只,分别按随机数字表法分为对照组(NC)、高脂组(HFD)、高脂加二氢杨梅素组(HFD+DHM),定期监测动物体质量、摄食量。干预 12 周,检测小鼠肠道通透性。小鼠处死后,检测血清生化指标和 LPS 水平及肠道组织病理学。利用分离的小鼠小肠上皮细胞和 Caco-2 细胞系,通过 Western blot 检测紧密连接蛋白(ZO-1、Occludin)和 qRT-PCR 检测炎症因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)表达。进一步利用慢病毒(LV-SIRT3)感染 Caco-2 细胞敲降 SIRT3 表达,DHM 和 LPS 干预后检测相关炎症因子和紧密连接蛋白表达。**结果** HFD 诱导 WT 和 SIRT3 KO 小鼠体质量明显增加、糖脂代谢异常、肠道通透性增加、肠上皮结构改变(小肠隐窝深度和上皮绒毛长度减少)、肠上皮细胞紧密连接蛋白表达降低和炎症因子表达增加,且与 WT 小鼠相比,HFD 诱导的 SIRT3 KO 小鼠相关指标改变具有统计学意义($P<0.05$)。DHM 干预后 WT 小鼠上述检测指标改善具有统计学意义($P<0.05$),但 DHM 的作用在 SIRT3 KO 小鼠中不明显,差异无统计学意义($P>0.05$)。体外实验发现,在 LV-SIRT3 感染的 Caco-2 细胞中,DHM 对 LPS 诱导的炎症因子表达增加和紧密连接蛋白表达降低作用不明显,且差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** SIRT3 在 DHM 增加小肠上皮紧密连接蛋白表达、降低炎症因子表达、维持肠上皮屏障完整性和减少通透性、改善糖脂代谢和延缓 T2DM 发生中发挥重要作用。

[关键词] 二氢杨梅素;2 型糖尿病;肠上皮屏障;SIRT3;紧密连接蛋白

[中图法分类号] R285.5; R333.3; R587.1 [文献标志码] A

Dihydromyricetin regulates intestinal epithelial barrier function of type 2 diabetes mellitus mice through SIRT3

YUE Jing, ZHOU Jie, JING jinjin, DONG Niu, LIU Minghua, YI Long, MI Mantian Research Center for Nutrition and Food Safety, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, Chongqing Medical Nutrition Research Center, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of dihydromyricetin (DHM) on high-fat diet (HFD)-induced intestinal epithelial barrier function in mouse model of type 2 diabetes mellitus (T2DM), and to reveal the mechanism involved with SIRT3 in mediating DHM in the process. **Methods** Eighteen 7-week-old SPF male wild-type (WT) mice and 30 SIRT3 KO mice were randomly divided into the control group (NC), HFD group and HFD+DHM group, respectively. The intervention time was 12 weeks. The body weight and food intake of the animals were monitored regularly. At week 12 of intervention, intestinal permeability were tested. After the mice were sacrificed, serum biochemical indexes and LPS levels as well as the intestinal histopathology were detected and observed. The expression of tight junction proteins (ZO-1, Occludin) and inflammatory factors (TNF-α, IL-1β and IL-6) in the isolated small intestinal epithelial cells

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81973039)

[通信作者] 糜漫天,E-mail: mimt@sina.com

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

and Caco-2 cells were detected by qRT-PCR and Western blotting. Then the Caco-2 cells were further infected with lentivirus (LV-SIRT3) to knock down the SIRT3 expression, and the expression levels of above molecules were detected after DHM and LPS treatment. **Results** In the WT and SIRT3 KO mice, HFD induced a significant increased body weight, abnormal glucose level and lipid metabolism, increased intestinal permeability and obvious changes in intestinal epithelial structure (reduced small intestinal epithelium crypt depth and villi length), as well as decreased levels of tight junction proteins and elevated levels of inflammatory factors. Furthermore, the alterations induced by HFD in SIRT3 KO mice were more significant than those in WT mice ($P<0.05$). The administration of DHM notably ameliorated the associated changes induced by HFD in the WT mice ($P<0.05$) instead of the SIRT3 KO mice ($P>0.05$). In the LV-SIRT3-infected Caco-2 cells, DHM failed to inhibit LPS-induced enhanced expression of the inflammatory cytokines and decreased expression of the tight junction proteins ($P>0.05$). **Conclusion** SIRT3 plays an important role in DHM-induced increased expression of small intestinal epithelial tight junction proteins, reduced expression of the inflammatory factors, maintenance of the intestinal epithelial barrier integrity and permeability and improvement of glycolipid metabolism, and thus is beneficial to delay the development of T2DM.

[**Key words**] dihydromyricetin; type 2 diabetes mellitus; intestinal epithelial barrier; SIRT3; tight junction protein

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81973039). Corresponding author: MI Mantian, E-mail: mimt@sina.com

2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus,T2DM)已经成为影响人类健康的主要慢性疾病和重要公共卫生问题之一[1]。T2DM 发病机制复杂,主要表现为糖脂代谢紊乱、胰岛素抵抗等,膳食营养因素是 T2DM 发生的重要诱因。近年来研究发现,T2DM 的发生及胰岛素抵抗与肠源性慢性低度炎症密切相关[2]。多种因素可引起肠道屏障破坏,导致肠道菌群紊乱和革兰阴性菌增多[3-4],菌群通过肠屏障发生易位,革兰阴性菌外壁成分脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)可进入血液[5-6],导致机体慢性低度系统性炎症的发生,进而引起胰岛素抵抗[7]。肠道屏障是复杂的,其中肠上皮细胞层和外/内粘蛋白层构成的机械屏障,将肠黏膜与肠腔环境分离[8]。在肠道屏障中,肠上皮细胞形成选择性渗透屏障[2,9],其中紧密连接蛋白是该屏障关键组成元件[10]。沉默信息调节子(silent mating-type information regulation 2 homolog 3,SIRT3)是线粒体中的去乙酰化修饰酶,是调控线粒体代谢的关键"分子开关"。研究发现,高脂饮食(high-fat diet,HFD)会导致 SIRT3 表达抑制,进而导致线粒体蛋白乙酰化增加,引起线粒体功能障碍[11]。以 HFD 喂养的小鼠表现出肥胖、胰岛素抵抗和糖脂代谢紊乱,并增加线粒体蛋白的乙酰化和下调 SIRT3 的表达[12]。二氢杨梅素(dihydromyricetin,DHM)是一种黄酮类植物化学物,具有抗氧化、抗炎、调节糖脂代谢等多种生物学效应,对多种慢性代谢性疾病具有潜在的防治作用[13]。本实验室前期开展人群研究发现,DHM 能够有效改善 T2DM 患者的空腹血糖和胰岛素抵抗[14],实验研究也表明 DHM 能够作用于肝脏、骨骼肌等多种组织器官,但 DHM 改善 T2DM 的作用机制尚未完全阐明。本研究在前期研究基础上,采用 HFD 诱导 T2DM 小鼠模型、SIRT3 基因敲除小鼠模型及慢病毒感染等技术方法,深入研究 SIRT3 在 DHM 改善 T2DM 小鼠肠上皮屏障功能中的作用,为 T2DM 防治提供新的干预靶点,同时为 DHM 防治 T2DM 提供新的科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DHM(纯度≥99%)购自成都曼思特生物科技有限公司(A0049)。普通饲料(XTCON50H;碳水化合物:蛋白质:脂肪能量构成比为70%:20%:10%)、高脂饲料(XTHF45;碳水化合物:蛋白质:脂肪能量构成比为35%:20%:45%)购自江苏协同医药生物工程有限责任公司。异硫氰酸荧光素-葡聚糖(FITC-dextran-4 kDa)、LPS 购自美国 Sigma 公司,LPS 检测试剂盒购自重庆迪菲尼生物科技有限公司。DMEM 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)、青霉素、链霉素购自美国 Carlsbad 公司。D-Hanks、二硫苏糖醇(dithiothreitol,DTT)、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetra acetic,EDTA)、羟乙基哌嗪乙硫磺酸(hydroxyethyl piperazine ethanesulfonic acid,HEPES)购自上海碧云天生物技术有限公司。ZO-1、Occludin、Claudin、SIRT3 抗体购自美国 Abcam 公司,β-actin 抗体购自美国 Sigma 公司。

1.2 实验动物与分组

18 只 7 周龄雄性野生型(wide type,WT)129S1/

SvImJ 小鼠购自南京大学模式动物研究所,经本实验室保种繁殖,经基因鉴定后用于该研究,体质量(20±2)g。30 只 7 周龄雄性 SIRT3 基因敲除(SIRT3 knockout,SIRT3 KO)小鼠(129-SIRT3m1. 1Fwa/J)购自美国 Jackson 实验室,本实验室保种繁殖,经基因鉴定后用于该研究,体质量(20±2)g。WT 和 SIRT3 KO 小鼠饲养于陆军军医大学实验动物中心,室温(25±2)℃,12 h∶12 h 昼夜明暗交替,保持正常饮食、饮水及通风状态。本研究所有操作均符合陆军军医大学实验动物伦理相关规定。WT 小鼠和 SIRT3 KO 小鼠分别采取随机数字表法分成 3 组:对照组(NC)、高脂组(HFD)和高脂加二氢杨梅素组(HFD+DHM);WT 小鼠每组各 6 只,SIRT3 KO 小鼠每组各 10 只。NC 组给予普通饲料,HFD 组给予高脂饲料,HFD+DHM 组给予含质量比 0.6%DHM 的高脂饲料(相当于每天 300 mg/kg)。干预时间 12 周,每周监测小鼠体质量、摄食量、血糖,观察小鼠活动状态。

1.3 细胞培养

人结直肠腺癌细胞系 Caco-2 购自中国科学院上海细胞生物学研究所,用含有 10%的 FBS、1%的青霉素/链霉素的 DMEM 完全培养基,在 37 ℃、5% CO_2、100%饱和湿度条件下常规培养。

1.4 肠道通透性实验

干预至第 12 周,小鼠禁食 6 h 后,按照 600 mg/kg 灌胃 FITC-dextran-4 kDa。4 h 后从尾静脉采血,然后在 4 ℃、6 000 r/min 离心 10 min 分离血清,加入相同体积的 PBS 混匀。通过微孔板读数仪(美国 Molecular Device 公司)在 485 nm 发射波长和 535 nm 吸收波长下检测荧光强度,根据标准曲线计算出血清中 FITC-dextran-4 kDa 的含量,进行统计学分析。

1.5 血清生化指标测定

干预至第 12 周,小鼠麻醉后取眼眶血,置于室温下 2 h,然后在 4 ℃、3 000 r/min 条件下离心 15 min 分离血清,测定血清中葡萄糖(glucose,GLU)、总胆固醇(total cholesterol,T-CHOL)、甘油三酯(triglyceride,TG)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein,LDL-C)及高密度脂蛋白(high density lipoprotein,HDL-C)水平。

1.6 血清 LPS 水平检测

血液 LPS 水平通过 LPS 检测试剂盒进行评估。干预至 12 周,小鼠麻醉后取眼眶血,将小鼠血清样本收集到无热源的试管中,然后将鲎实验试剂加入血清中,通过微孔板读取仪(美国 Molecular Device 公司)在 545 nm 波长读取光密度值,并根据标准曲线计算血清 LPS 水平。

1.7 组织病理学检测

小鼠眼眶取血后,断颈处死,取小肠近端组织 2 cm,4%甲醛固定,常规石蜡包埋,制作石蜡切片(4 μm)。苏木精和伊红(hematoxylin eosin,HE)染色后,光学显微镜下观察,用 Image J 软件分析小肠绒毛长度和隐窝深度,并做统计学分析。

1.8 小鼠小肠上皮细胞分离

参考文献[15]分离小肠上皮细胞,取小鼠小肠组织,去除肠系膜、脂肪组织、淋巴结,沿纵轴方向剪开肠道,冰冷的 PBS 洗去内容物。放入 50 mL 的 EP 管中,用 20 mL 消化液(5%FBS+D-Hanks+1 mmol/L DTT+5 mmol/L EDTA + 10 mmol/L HEPES)在 37 ℃,210 r/min 下摇晃消化 20 min,收集上清液,再用 100 μmol/L过滤网过滤后收集细胞,2 000 r/min 离心 5 min,收集细胞沉淀,-80 ℃冻存,用于后续实验。

1.9 qRT-PCR 检测

取分离得到的小鼠小肠上皮细胞或 Caco-2 细胞加入 TRIzol(日本 TaKaRa 公司),分离总的 RNA,利用 NanoDrop One/OneC 微量核酸蛋白浓度测定仪检测各组样本 RNA 浓度。用 TaKaRa 反转录酶试剂盒,逆转录合成 cDNA。按照 SYBR Green Master Mix 说明书配制反应溶液,PCR 反应体系为 20 μL,采用 PCR 仪(CFX-96 realtime PCR system,Bio-Rad 公司)完成反应,测定基因 mRNA 的表达水平。以 β-actin 作为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列(5′→3′)	扩增长度/bp
HomoTNF-α	上游:AAGGACACCATGAGCACTGAAAGC 下游:AGGAAGGAGAAGAGGCTGAGGAAC	125
HomoIL-1β	上游:GCCAGTGAAATGATGGCTTATT 下游:AGGAGCACTTCATCTGTTTAGG	85
HomoIL-6	上游:CACTGGTCTTTTGGAGTTTGAG 下游:GGACTTTTGTACTCATCTGCAC	101
MusTNF-α	上游:AAGGACACCATGAGCACTGAAAGC 下游:AGGAAGGAGAAGAGGCTGAGGAAC	125
MusIL-1β	上游:GCCAGTGAAATGATGGCTTATT 下游:AGGAGCACTTCATCTGTTTAGG	51
MusIL-6	上游:CACTGGTCTTTTGGAGTTTGAG 下游:GGACTTTTGTACTCATCTGCAC	101
Musβ-actin	上游:CTACCTCATGAAGATCCTGACC 下游:CACAGCTTCTCTTTGATGTCAC	90
Homoβ-actin	上游:CAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAG 下游:CGCAACTAAGTCATAGTCCGCCTAG	90
HomoSIRT3	上游:GCCATTTTTGAACTCCCATTCT 下游:GGAGAAAGTAGTGAGTGACGTT	109

1.10 Western blot 检测

取分离得到的小鼠小肠上皮细胞或 Caco-2 细胞,用蛋白裂解液提取总蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白上样量每组 40 μg,在 10%的 SDS-PAGE 中电泳 1.5 h,电泳后将蛋白转移到 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶封闭 1 h 后,分别加入 β-actin 抗体(1∶1 000 稀释)、ZO-1 抗体(1∶1 000 稀释)、Occludin 抗体(1∶1 000 稀释)、Claudin 抗体(1∶1 000 稀释)和 SIRT3 抗体(1∶1 000 稀释)4 ℃孵育过夜,然后在室温下用辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的二抗孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,然后显影曝光。利用 Image J 软件分析蛋白表达水平,并根据内参蛋白 β-actin 计算蛋白相对表达量。

1.11 慢病毒感染及细胞处理

3 种敲降 SIRT3 的慢病毒(LV-SIRT3;编号 LV-SIRT3-40、LV-SIRT3-41、LV-SIRT3-42)及阴性对照病毒(LV-control)购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司。待 CaCO-2 细胞生长至融合度为 50%时,弃掉上清液,按感染复数(multiplicity of infection,MOI)= 10 分别加入 LV-SIRT3 和 LV-control,同时加入 Polybrene(2 μg/mL)及感染增强液,转染 12 h 后给细胞换液,继续培养 12 h 后在荧光显微镜下观察感染效率。收集细胞,提取细胞总 RNA 和蛋白,通过 qRT-PCR 和 Western blot 验证 SIRT3 的敲降效果。取敲降效果最佳的慢病毒感染细胞进行培养,48 h 后再加入嘌呤霉素筛选稳定感染的 Caco-2 细胞。LV-SIRT3 和 LV-control 感染细胞各分为 4 组:NC 组、LPS 组、LPS+DHM 组和 DHM 组,NC 组用正常培养基培养,LPS 组用 1 μg/mL 的 LPS 处理细胞 24 h,LPS+DHM 组先用 20 μmol/L 的 DHM 处理细胞 24 h 后再用 1 μg/mL LPS 处理 24 h,DHM 组用 20 μmol/L DHM 处理 24 h。各组处理后开展相关指标检测。

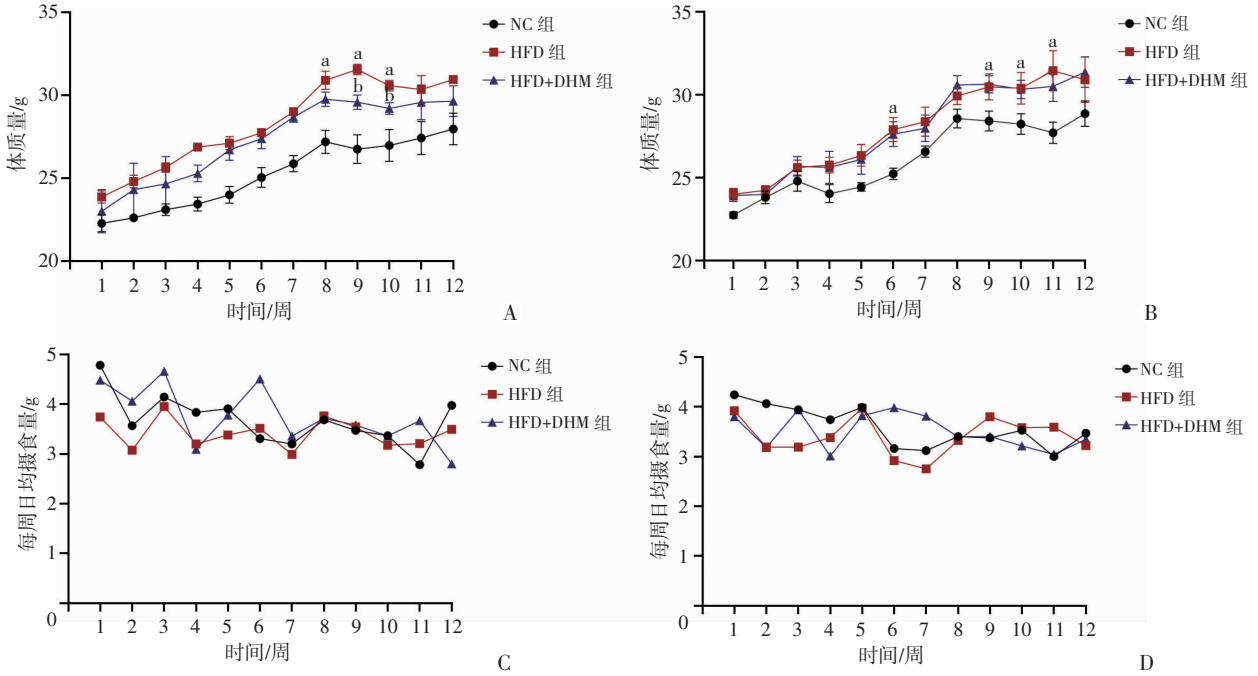
1.12 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,多组间比较采用单因素方差分析,两组数据比较采用 LSD 法检验,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DHM 对小鼠体质量和摄食量的影响

如图 1A 所示,WT 小鼠 HFD 组体质量从第 8 周开始明显高于 NC 组($P<0.05$),而 DHM 干预后能明显减少 HFD 诱导的小鼠体质量增加($P<0.05$)。如图 1B 所示,SIRT3 KO 小鼠 HFD 组体质量从第 6 周开始明显高于 NC 组($P<0.05$),但 DHM 干预后对 HFD 诱导的 SIRT3 KO 小鼠体质量增加无显著影响($P>0.05$)。为了确定各组小鼠的体质量变化是否与摄食量有关,本实验在干预的 12 周期间,每周日均测量小鼠摄食量,图 1C 和 1D 是小鼠 12 周日均摄食量监测图,结果表明 WT、SIRT3 KO 小鼠各组平均摄食量差异无统计学意义($P>0.05$)。



a:$P<0.05$,同种属小鼠的 HFD 组与 NC 组比较;b:$P<0.05$,同种属小鼠 HFD+DHM 组与 HFD 组比较

A:WT 小鼠体质量变化;B:SIRT3 KO 小鼠体质量变化;C:WT 小鼠 12 周日均摄食量变化;D:SIRT3 KO 小鼠 12 周日均摄食量变化

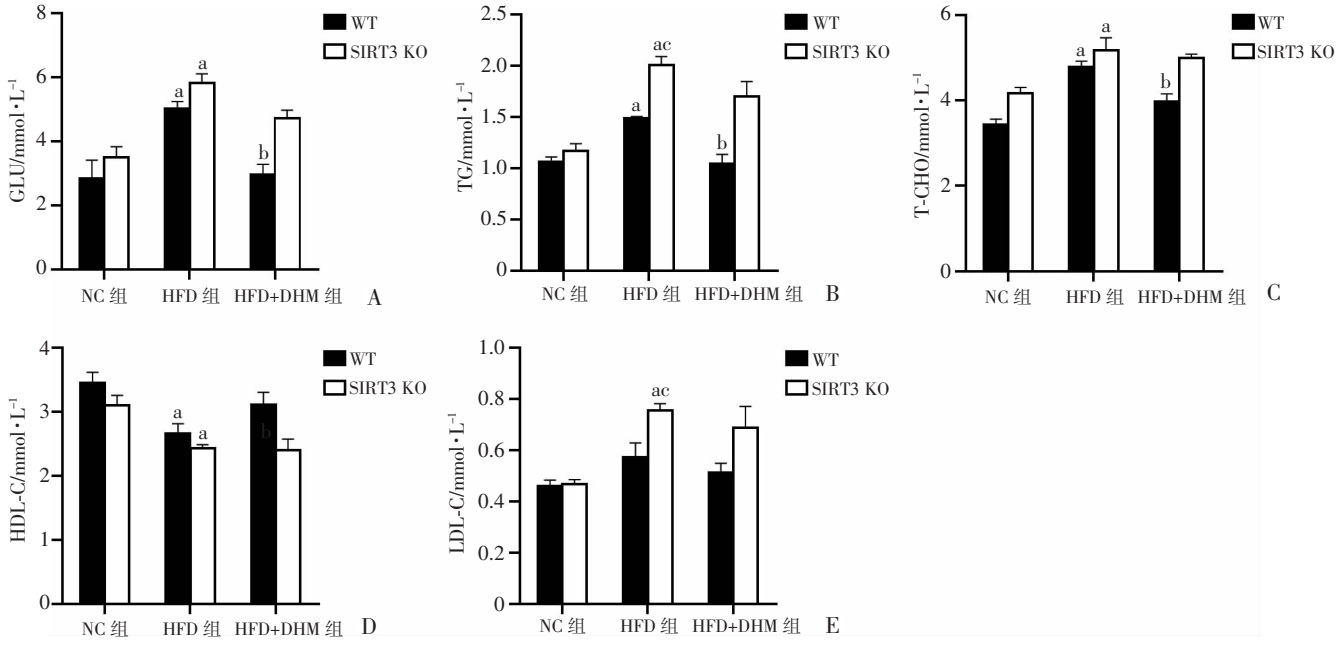
图 1 DHM 对小鼠体质量和摄食量的影响

2.2 DHM 对小鼠糖脂代谢的影响

通过检测小鼠血清中 GLU、TG、T-CHOL、HDL-C 及 LDL-C 含量,观察 DHM 对小鼠糖脂代谢的影响。如图 2A~E,结果显示,WT 小鼠 HFD 组 GLU(图 2A)、TG(图 2B)、T-CHOL(图 2C)明显高于 NC 组($P<0.05$),HDL-C(图 2D)明显低于 NC 组($P<0.05$),LDL-C(图 2C)差异无统计学意义($P>0.05$),而 DHM 干预后能够明显抑制 HFD 诱导的 GLU、TG、T-CHOL 升高。在 SIRT3 KO 小鼠中,HFD 干预后 GLU(图 2A)、LDL-C(图 2E)明显高于 NC 组($P<0.05$),HDL-C(图 2D)明显低于 NC 组($P<0.05$),但 DHM 干预后对 HFD 诱导的上述指标变化无显著影响。HFD 干预的 SIRT3 KO 小鼠的 TG、LDL-C 明显高于 WT 小鼠($P<0.05$),其余指标差异无统计学意义($P>0.05$),表明 SIRT3 敲除后 HFD 更容易诱导小鼠代谢异常。结果表明,DHM 可显著改善 HFD 诱导的 WT 小鼠糖脂代谢,但在 SIRT3 KO 小鼠该作用不明显,提示 SIRT3 可能在 DHM 改善高脂饮食诱导小鼠糖脂代谢异常中起重要作用。

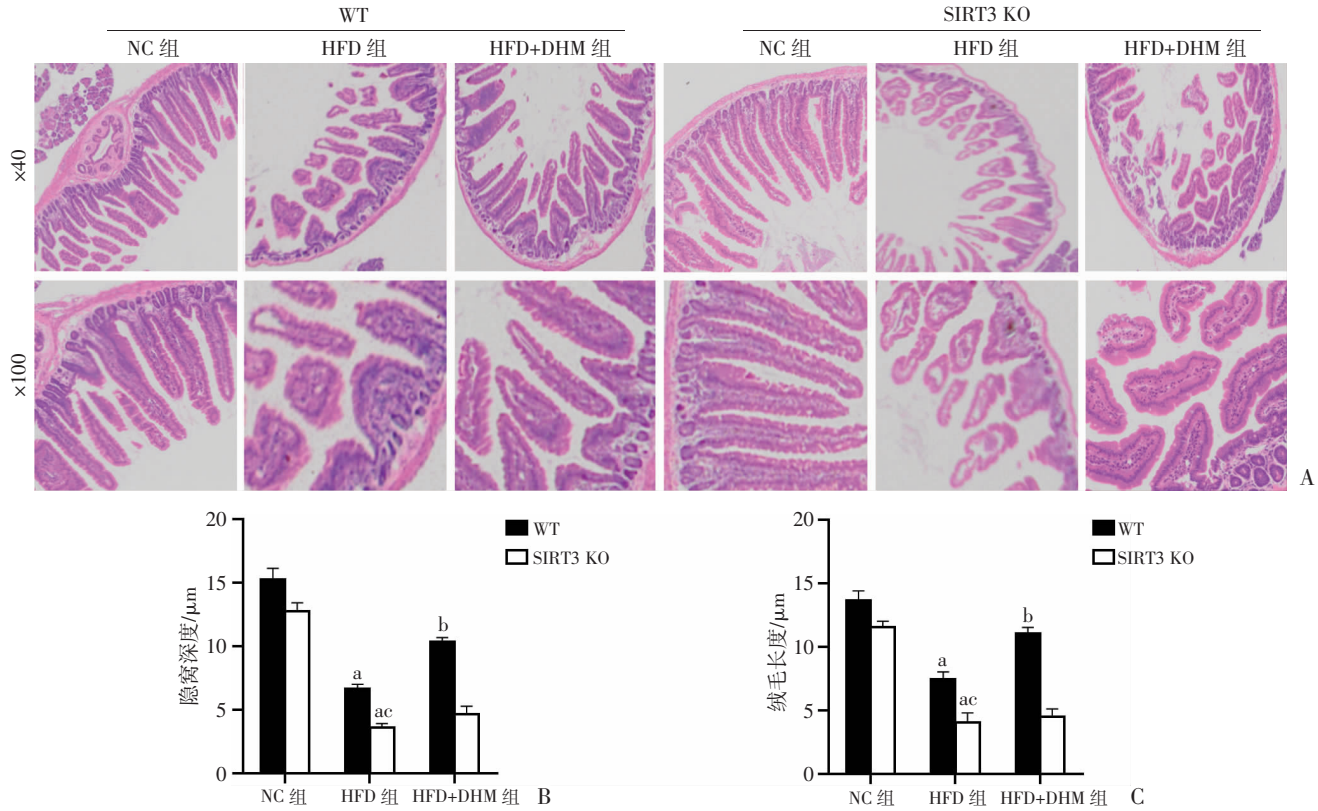
2.3 DHM 通过 SIRT3 改善小鼠肠上皮结构

为进一步明确 DHM 改善小鼠糖脂代谢异常是否与其调节肠屏障有关,小鼠处死后观察小肠上皮结构改变。如图 3A~C 所示,在 WT、SIRT3 KO 小鼠中,NC 组小鼠肠上皮组织结构完整,黏膜层未见明显损伤,绒毛长度及隐窝深度正常,上皮细胞排列紧密;HFD 组小鼠小肠上皮可见明显绒毛变短,并伴有少量绒毛脱落,隐窝深度变浅。在 DHM 干预后,WT 小鼠显著增加了小肠上皮隐窝深度和小肠上皮绒毛长度($P<0.05$),但这种效应在 SIRT3 KO 小鼠中不明显($P>0.05$)。HFD 干预的 SIRT3 KO 小鼠的小肠上皮隐窝深度、上皮绒毛长度明显低于 WT 小鼠($P<0.05$),表明 SIRT3 敲除后 HFD 更容易诱导小鼠肠上皮结构损伤。NC 组小鼠肠道组织黏膜下层无炎性细胞浸润,黏膜层及黏膜下层细胞排列整齐。HFD 组有大量炎性细胞呈弥漫性浸润、聚集,黏膜表面出现缺损。DHM 干预后,WT 小鼠肠上皮损伤明显改善,但在 SIRT3 KO 小鼠中的作用不明显。结果表明,DHM 可显著改善 HFD 诱导的小鼠肠上皮结构改变,但在 SIRT3 KO 小鼠中该作用不明显,提示 SIRT3 可能在 DHM 改善高脂饮食诱导小鼠肠上皮结构改变中起重要作用。



a:$P<0.05$,与同种属小鼠 NC 组比较;b:$P<0.05$,与同种属小鼠 HFD 组比较;c:$P<0.05$,与 HFD 组 WT 小鼠比较
A:小鼠血清葡萄糖;B:小鼠血清甘油三酯;C:小鼠血清总胆固醇;D:小鼠血清高密度脂蛋白;E:小鼠血清低密度脂蛋白

图 2 DHM 对小鼠糖脂代谢的影响

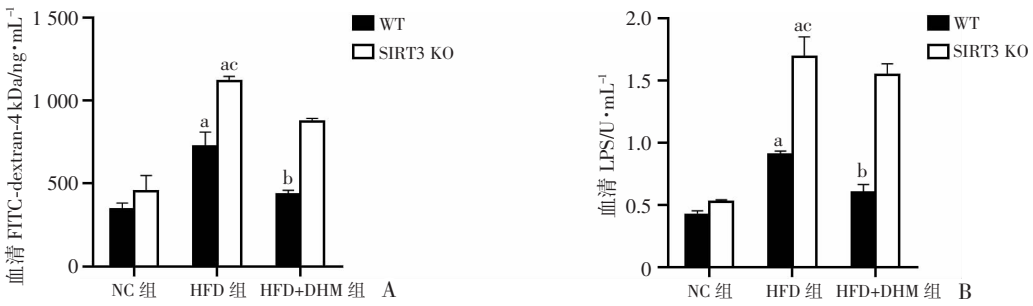


a:$P<0.05$,与同种属小鼠 NC 组比较;b:$P<0.05$,与同种属小鼠 HFD 组比较;c:$P<0.05$,与 HFD 组 WT 小鼠比较
A:小肠组织 HE 染色;B:小肠上皮隐窝的深度;C:小肠上皮绒毛长度

图 3 DHM 对小鼠肠上皮结构的影响

2.4 DHM 通过 SIRT3 改善小鼠肠道通透性

图 4A 所示,在 WT 和 SIRT3 KO 小鼠中,HFD 干预后血清中 FITC-dextran-4 kDa 的相对含量均显著高于相应的 NC 组($P<0.05$)。DHM 干预后,在 WT 小鼠中能够显著减少血清 FITC-dextran-4 kDa 含量($P<0.05$),但这种效应在 SIRT3 KO 小鼠中不明显。进一步检测肠道通透性变化和各组小鼠血液血清中 LPS 含量,如图 4B 所示,在 WT 和 SIRT3 KO 小鼠中均发现 HFD 组与相应 NC 组比较,其血清中 LPS 的含量显著增加($P<0.05$);而在 WT 小鼠中发现,DHM 可有效减少血清 LPS 的含量($P<0.05$),但该作用在 SIRT3 KO 小鼠中不明显。HFD 干预的 SIRT3 KO 小鼠的血清 FITC-dextran-4 kDa、LPS 含量显著高于 WT 小鼠($P<0.05$),表明 SIRT3 敲除后 HFD 更容易诱导小鼠肠通透性增加。结果表明,DHM 能够减少 HFD 诱导的小鼠肠道通透性增加及 LPS 入血增多,但在 SIRT3 KO 小鼠中该作用不明显,提示 SIRT3 可能在 DHM 抑制高脂饮食诱导肠屏障通透性增加中起重要作用。



a:$P<0.05$,与同种属小鼠 NC 组比较;b:$P<0.05$,与同种属小鼠 HFD 组比较;c:$P<0.05$,与 HFD 组 WT 小鼠比较
A:血清 FITC-dextran-4 kDa 含量;B:血清 LPS 含量

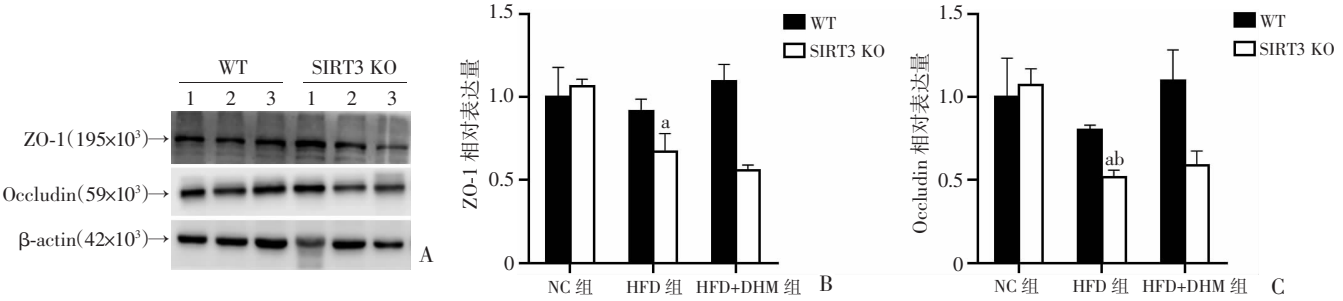
图 4 DHM 对小鼠肠道通透性的影响

2.5 DHM 通过 SIRT3 增加小鼠小肠上皮细胞紧密连接蛋白表达

小鼠肠上皮紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 的表达水平可以作为评价小鼠肠道机械屏障损伤的重要指标。如图 5 所示,取分离的小肠上皮细胞,检测发现 HFD 干预后 ZO-1 的蛋白表达水平明显低于 NC 组($P<0.05$),但在 DHM 干预后可明显抑制 HFD 诱导的 ZO-1 和 Occludin 的蛋白表达水平的降低($P<0.05$)。在 SIRT3 KO 小鼠中,HFD 组 ZO-1 和 Occludin 的蛋白表达水平明显低于 NC 组($P<0.05$),但 DHM 干预后对 HFD 诱导的 ZO-1 和 Occludin 表达改变无明显影响($P>0.05$)。HFD 干预的 SIRT3 KO 小鼠的 Occludin 蛋白表达水平显著低于 WT 小鼠($P<0.05$),表明 SIRT3 敲除后 HFD 更容易诱导小鼠肠上皮完整性破坏。结果表明,DHM 能够抑制高脂饮食诱导的小肠上皮细胞紧密连接蛋白表达水平降低,但在 SIRT3 KO 小鼠中该作用不明显,提示 SIRT3 可能在 DHM 增加高脂饮食诱导小鼠肠上皮屏障完整性中起重要作用。

2.6 DHM 通过 SIRT3 降低小鼠肠上皮细胞炎症因子表达

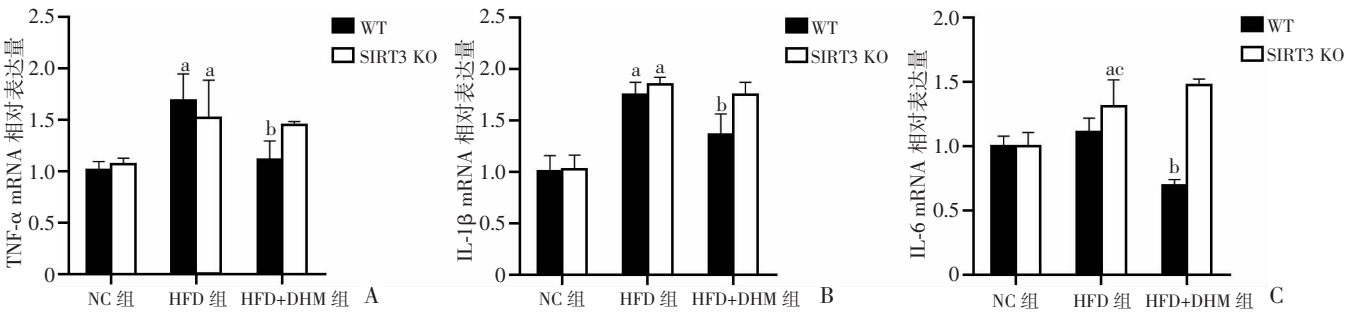
取分离的小鼠小肠上皮细胞,检测炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 进行 qRT-PCR 检测,如图 6 所示,结果发现,在 WT 和 SIRT3 KO 小鼠中,HFD 组与 NC 组相比肠上皮细胞中促炎因子 TNF-α(图 6A)、IL-1β(图 6B)、IL-6(图 6C)mRNA 表达水平显著增加($P<0.05$)。在 DHM 干预后,WT 小鼠此指标显著下降($P<0.05$),但这种效应在 SIRT3 KO 小鼠中不明显($P>0.05$)。HFD 干预的 SIRT3 KO 小鼠的 IL-6 mRNA 表达水平显著高于 WT 小鼠($P<0.05$),表明 SIRT3 敲除后 HFD 更容易诱导小鼠肠上皮炎症。结果表明,DHM 能够降低高脂饮食诱导的小肠上皮细胞炎症因子表达,但在 SIRT3 KO 小鼠中该作用不明显,提示 SIRT3 可能在 DHM 改善高脂饮食诱导小鼠肠上皮炎症中起重要作用。



a:$P<0.05$,与同种属小鼠 NC 组比较;b:$P<0.05$,与 HFD 组 WT 小鼠比较

A:Western blot 检测 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达 1:NC 组;2:HFD 组;3:HFD+DHM 组;B:ZO-1 蛋白相对表达量;C:Occludin 蛋白相对表达量

图 5 DHM 对小鼠小肠上皮细胞紧密连接蛋白表达的影响



a:$P<0.05$,与同种属小鼠 NC 组比较;b:$P<0.05$,与同种属小鼠 HFD 组比较;c:$P<0.05$,与 HFD 组 WT 小鼠比较

A:TNF-α mRNA 相对表达量;B:IL-1β mRNA 相对表达量; C:IL-6 mRNA 相对表达量

图 6 DHM 对小鼠小肠上皮细胞炎症因子表达的影响

2.7　DHM 通过 SIRT3 增加 Caco-2 细胞紧密连接蛋白表达

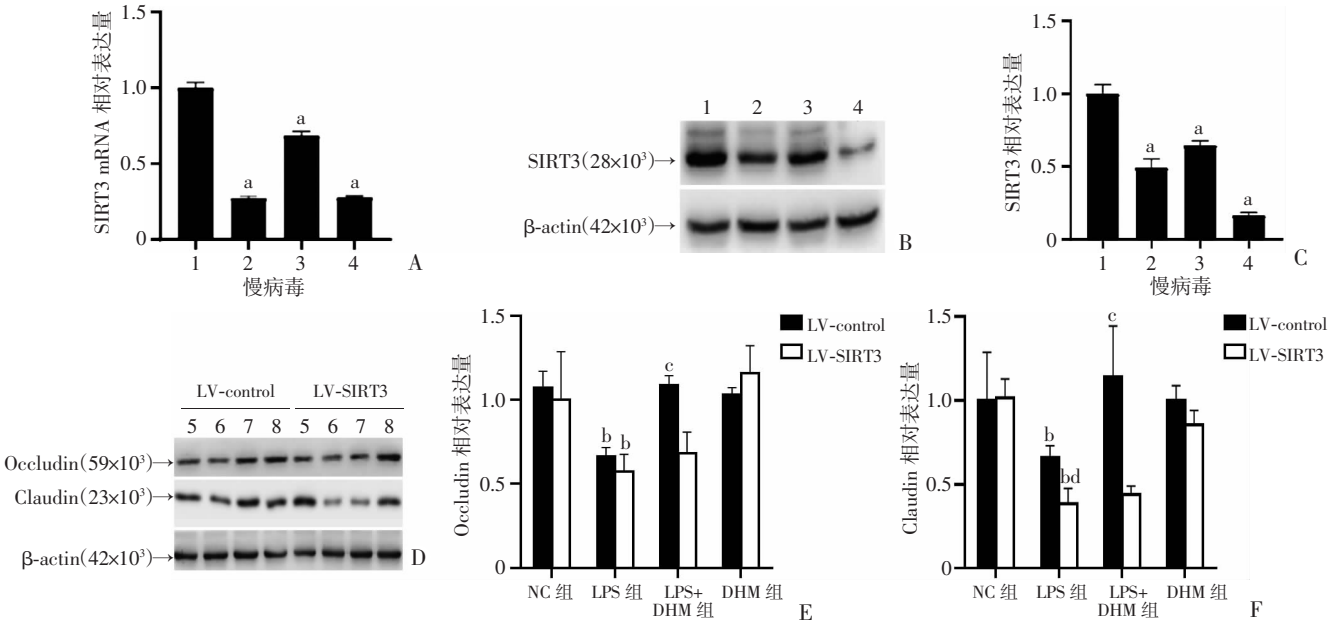
利用 3 种慢病毒(LV-SIRT3)分别感染 Caco-2 细胞。如图 7A～C 所示,LV-SIRT3-42 对 SIRT3 敲降效果总体上最佳,因此选择该病毒进行后续实验。利用 LV-SIRT3 和 LV-control 稳定感染的 Caco-2 细胞系进行 DHM 和 LPS 干预,通过 Western blot 法检测细胞紧密连接蛋白表达。如图 7D～F 所示,LV-control 感染细胞中,LPS 组与 NC 组相比紧密连接蛋白 Occludin、Claudin 的表达水平明显降低($P<0.05$),但在 DHM 干预后被显著抑制($P<0.05$)。在 LV-SIRT3 感染细胞中,LPS 处理导致 Occludin、Claudin 的表达水平明显降低($P<0.05$),但 DHM 干预后无明显作用($P>0.05$)。此外,LPS 处理的 LV-SIRT3 慢病毒感染细胞中的 Claudin 蛋白表达明显低于 LV-control 慢病毒感染细胞($P<0.05$),表明 SIRT3 敲降后 LPS 调肠上皮细胞中紧密连接蛋白表达的作用更加明显。结果表明,DHM 可通过 SIRT3 增加 Caco-2 细胞紧密连接蛋白表达。

2.8　DHM 通过 SIRT3 减少 Caco-2 细胞炎症因子表达

利用 LV-SIRT3 和 LV-control 稳定感染的 Caco-2 细胞系进行 DHM 和 LPS 干预,qRT-PCR 法检测炎症因子 TNF-α、IL-6 、IL-1β mRNA 表达。如图 8A～C 所示,在 LV-control,LV-SIRT3 感染 Caco-2 细胞中,LPS 处理后 TNF-α、IL-6 、IL-1β mRNA 表达水平显著高于 NC 组($P<0.05$)。DHM 干预后,LV-control 组此指标显著降低($P<0.05$)。但在 LV-SIRT3 感染 Caco-2 细胞中 DHM 的此效应不显著($P>0.05$)。此外,LPS 处理的 LV-SIRT3 慢病毒感染细胞中的 IL-6、IL-1β mRNA 表达明显高于 LV-control 慢病毒感染细胞($P<0.05$),表明 SIRT3 敲降后 LPS 上调肠上皮细胞中炎症因子表达的作用更加明显。结果表明,DHM 可通过 SIRT3 减少 LPS 诱导的 Caco-2 细胞炎症因子表达。

3　讨论

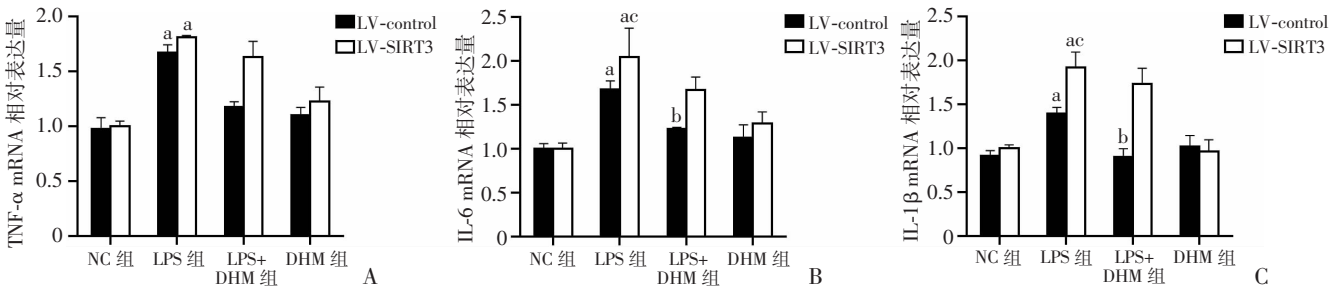
随着经济水平的提高和生活方式的显著改变,包括 T2DM 在内的多种慢性代谢性疾病发病率和患病率都在逐年增加。根据 WHO 统计资料表明,我国 T2DM 患病人数已占全球近 30%,总体患病率已达 14.92%。T2DM 已经成为影响我国居民健康的重要公共卫生问题之一。膳食因素与 T2DM 发生密切相关,高能量、高脂肪等膳食因素是 T2DM 发生的重要诱因,合理营养始终是 T2DM 防治的主要手段。近年来,植物性食物健康功效及其作用机制的研究已经成为营养学领域研究的热点,一些植物化学物具有抗氧化、调节糖脂代谢



1:LV-control;2:LV-SIRT3-40;3:LV-SIRT3-41;4:LV-SIRT3-42;5:NC 组;6:LPS 组;7:LPS+DHM 组;8:DHM 组;a:$P<0.05$,与 LV-control 比较;b:$P<0.05$,与同一慢病毒感染的 NC 组比较;c:$P<0.05$,与同一慢病毒感染的 LPS 组比较;d:$P<0.05$,与 LPS 组 LV-control 比较

A:qRT-PCR 检测 SIRT3 mRNA 相对表达量;B:Western blot 检测 SIRT3 蛋白表达;C:SIRT3 蛋白相对表达量;D:Western blot 检测 Occludin 和 Claudin 蛋白表达;E:Occludin 蛋白相对表达量;F:Claudin 蛋白相对表达量

图 7　DHM 通过 SIRT3 增加 Caco-2 细胞紧密连接蛋白表达



a:$P<0.05$,与同一慢病毒感染的 NC 组比较;b:$P<0.05$,与同一慢病毒感染的 LPS 组比较;c:$P<0.05$,与 LPS 组 LV-control 比较

A:TNF-α mRNA 相对表达量;B:IL-6 mRNA 相对表达量;C:IL-1β mRNA 相对表达量

图 8 DHM 通过 SIRT3 减少 LPS 诱导的 Caco-2 细胞炎症因子表达

等功效,对 T2DM 具有潜在的防治作用。二氢杨梅素(DHM)是一种黄酮类化合物,又称蛇葡萄素(Ampelopsin),广泛存在于葡萄科、杨梅科、大戟科等天然植物中,尤其以显齿蛇葡萄属(*Ampelopsis grossedentata*,俗称"藤茶")含量最高,可占其干质量的30%左右,研究发现,DHM 对多种慢性代谢性疾病具有潜在的防治作用。本实验室前期针对 T2DM 的一项随机、双盲人群干预试验研究发现,藤茶干预(10 g/d,每克含 970 mg DHM)1 个月后,可以显著降低空腹血糖、糖化白蛋白、血清胱抑素 C、视黄醇结合蛋白[3]。动物实验研究发现,DHM 可以显著降低糖尿病大鼠的空腹血糖,具有调节代谢,改善骨骼肌胰岛素抵抗效应[16]。本研究也证实,DHM 干预后能够显著改善高脂饮食诱导小鼠的糖脂代谢,增强糖耐量和胰岛素耐量敏感性。

T2DM 发生机制复杂,近年来研究发现,机体慢性低度系统性炎症导致的外周组织胰岛素抵抗是 T2DM 发生的重要机制。肠道是人体内部和外部环境之间联系的重要器官,肠道屏障功能下降引起的肠源性内毒素易位是机体慢性低度炎症的始动环节,并进一步导致代谢性内毒素血症及外周组织的胰岛素抵抗,促进 T2DM 发生。肠道中有多种物质,包括营养素及其代谢物、毒素、肠道菌群等,肠屏障是隔绝肠腔内容物与机体的重要结构,是机体精细选择进入体内成分及抵御有害物质侵袭的重要屏障。肠屏障主要包括机械屏障、生物屏障、化学屏障及免疫屏障,其中肠上皮细胞组成的机械屏障是机体发挥主动防御和效应功能的第一道防线。肠上皮屏障主要由肠上皮细胞、细胞间连接复合物(如紧密连接蛋白)组成,肠上皮细胞损伤或紧密连接被破坏都可能导致肠道通透性增加。在代谢异常或相关饮食因素诱导下,肠道菌群紊乱,革兰阴性菌增多,肠黏膜屏障功能下降导致肠道通透性增加,引起革兰阴性菌 LPS 入血,形成"代谢性内毒性血症"。本研究发现,高脂饮食能够导致肠上皮结构改变、通透性增加、肠紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 表达下降及肠屏障完整破坏性,LPS 入血增加,但在 DHM 干预后能够明显改善,提示 DHM 改善 T2DM 的作用可能与其改善肠上皮屏障功能有关。

SIRT3 是沉默信息调节子(silence information regulator 2,Sir2)家族成员,也是线粒体内重要的去乙酰化酶,能够调节线粒体电子传递链酶复合体、脂肪酸β氧化、三羧酸循环、酮体生成等多个生化代谢途径,是线粒体能量代谢的"分子开关",并与 T2DM 等慢性代谢性疾病密切相关,但 SIRT3 是否参与了 DHM 对肠上皮屏障功能的调节尚不清楚。本实验研究表明,HFD 显著降低紧密连接蛋白的表达水平,增加肠上皮细胞炎症因子表达,而 DHM 干预后能够显著改善。在葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎小鼠模型中,DHM 也被证明可以减轻结肠炎症、肠屏障破坏和结肠炎症状。为明确 SIRT3 在 DHM 调控肠上皮功能中的作用,本研究采用慢病毒感染方法敲减 Caco-2 细胞中 SIRT3,构建 LV-SIRT3 感染细胞系。研究发现,在 LPS 干预后细胞紧密连接蛋白 Occludin、Claudin 表达显著降低,同时 TNF-α、IL-6、IL-1β 等炎症因子 mRNA 表达显著升高,但 DHM 处理后对相关紧密连接蛋白和炎症因子表达水平无明显影响,提示 SIRT3 在 DHM 调节肠上皮细胞紧密连接蛋白和炎症因子表达中起关键作用。

综上,本研究通过 HFD 诱导 T2DM 模型、SIRT3 基因敲除小鼠模型和慢病毒感染方法,发现 SIRT3 在介导 DHM 改善肠上皮屏障功能中可能发挥重要作

用。但 DHM 是通过何种途径调控 SIRT3 表达或活性,进而影响其对肠上皮细胞相关基因表达及肠屏障功能维持,还需要进一步深入研究。本研究为 T2DM 防治提供了新的干预靶点,同时为通过膳食营养途径利用 DHM 防治 T2DM 提供了新的科学依据。

参考文献:

[1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版)[J]. 中国实用内科杂志, 2018,38(4):292-344.
Diabetes Branch of Chinese Medical Association. Guidelines for the prevention and control of type 2 diabetes in China (2017 Edition)[J]. Chin J Pract Intern Med, 2018, 38(4):292-344.

[2] THAISS C A, LEVY M, GROSHEVA I, *et al*. Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection[J]. Science, 2018, 359(6382): 1376-1383. DOI:10.1126/science.aar3318.

[3] RAN L, WANG X L, LANG H D, *et al*. Ampelopsis grossedentata supplementation effectively ameliorates the glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Eur J Clin Nutr, 2019, 73(5): 776-782. DOI:10.1038/s41430-018-0282-z.

[4] PASINI E, CORSETTI G, ASSANELLI D, *et al*. Effects of chronic exercise on gut microbiota and intestinal barrier in human with type 2 diabetes[J]. Minerva Med, 2019, 110(1): 3-11. DOI:10.23736/s0026-4806.18.05589-1.

[5] GHOSH S S, WANG J, YANNIE P J, *et al*. Intestinal barrier dysfunction, LPS translocation, and disease development[J]. J Endocr Soc, 2020, 4(2): bvz039. DOI:10.1210/jendso/bvz039.

[6] CAO S, ZHANG Q, WANG C, *et al*. LPS challenge increased intestinal permeability, disrupted mitochondrial function and triggered mitophagy of piglets[J]. Innate Immun, 2018, 24(4): 221-230. DOI:10.1177/1753425918769372.

[7] ROHM T V, MEIER D T, OLEFSKY J M, *et al*. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders[J]. Immunity, 2022, 55(1): 31-55. DOI:10.1016/j.immuni.2021.12.013.

[8] MARTIN A, DEVKOTA S. Hold the door: role of the gut barrier in diabetes[J]. Cell Metab, 2018, 27(5): 949-951. DOI:10.1016/j.cmet.2018.04.017.

[9] VAN HUL M, GEURTS L, PLOVIER H, *et al*. Reduced obesity, diabetes, and steatosis upon cinnamon and grape pomace are associated with changes in gut microbiota and markers of gut barrier[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2018, 314(4): E334-E352. DOI: 10.1152/ajpendo.00107.2017.

[10] ROHR M W, NARASIMHULU C A, RUDESKI-ROHR T A, *et al*. Negative effects of a high-fat diet on intestinal permeability: a review[J]. Adv Nutr, 2020, 11(1): 77-91. DOI:10.1093/advances/nmz061.

[11] ZHOU J, HOU P, YAO Y, *et al*. Dihydromyricetin improves high-fat diet-induced hyperglycemia through ILC3 activation *via* a SIRT3-dependent mechanism[J]. Mol Nutr Food Res, 2022, 66(16): e2101093. DOI:10.1002/mnfr.202101093.

[12] CHEN M, HUI S, LANG H, *et al*. SIRT3 deficiency promotes high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in correlation with impaired intestinal permeability through gut microbial dysbiosis[J]. Mol Nutr Food Res, 2019, 63(4): e1800612. DOI:10.1002/mnfr.201800612.

[13] LI H L, LI Q S, LIU Z W, *et al*. The versatile effects of dihydromyricetin in health[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 1053617. DOI:10.1155/2017/1053617.

[14] LE L, JIANG B P, WAN W T, *et al*. Metabolomics reveals the protective of dihydromyricetin on glucose homeostasis by enhancing insulin sensitivity[J]. Sci Rep, 2016, 6: 36184. DOI:10.1038/srep36184.

[15] CAMPBELL C F. Isolation and culture of mouse intestinal cells[J]. Methods Mol Biol, 2010, 633: 197-206. DOI:10.1007/978-1-59745-019-5_14.

[16] LIU L, WAN J, LANG H D, *et al*. Dihydromyricetin delays the onset of hyperglycemia and ameliorates insulin resistance without excessive weight gain in Zucker diabetic fatty rats[J]. Mol Cell Endocrinol, 2017, 439: 105-115. DOI:10.1016/j.mce.2016.10.028.

(**收稿**:2022-09-08;**修回**:2022-11-08)

(编辑 邓强庭)