Журнал «Воспаления» (© 2012)
DOI: 10.1007/s10753-012-9516-8

Полидатин, натуральный прекурсор ресвератрола, вызывает выработку β-дефензина и снижает воспалительный ответ

Giampietro Ravagnan,[1] Anna De Filippis,[2] Maria Cartenì,[3] Salvatore De Maria,[1] Valentina Cozza,[4] Marcella Petrazzuolo,[2] Maria Antonietta Tufano,[2,5] Giovanna Donnarumma[2]

Аннотация – Хорошо известно, что человеческие кератиноциты вырабатывают анти-микробный пептид β-дефензин 2. Его выработка усиливается патогенными микроорганизмами или другими стрессогенными факторами окружающей среды. В этом исследовании мы оценивали действие ресвератрола (полифенола, содержащегося в нескольких пищевых продуктах и в том числе в семечках винограда) и его натурального прекурсора полидатина на человеческие кератиноциты, подвергающиеся тепловому стрессу. Путем применения полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой и иммуносорбентного анализа с ферментной меткой, мы продемонстрировали, что ресвератрол, используемый в сочетании с полидатином, способен модулировать интерлейкины IL-6, IL-8 и снижать экспрессию гена фактора некроза опухолей альфа. Кроме того, наши данные показывают, что ресвератрол и полидатин повышают экспрессию гена протеина теплового шока (Hsp 70B′. (Протеины Hsp играют важную роль в цитопротекции и восстановлении клеток и тканей). Следует заметить, что полидатин при использовании его как отдельно, так и в сочетании с ресвератролом повышает выработку β-дефензина 2 в человеческом организме. Полученные результаты показывают способность полидатина и ресвератрола усиливать цитопротекторный ответ на стрессовые условия и указывают на то, что их можно использовать в косметических или фармацевтических препаратах

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ресвератрол, полидатин, HaCat

Ravagnan Giampietro and De Filippis Anna contributed equally to this work.
1 GLURES, Academic SPIN-OFF, Ca' Foscari University of Venice, Venice, Italy
2 Section of Microbiology and Clinical Microbiology, Department of Experimental Medicine, Second University of Naples (SUN), via Luigi de Crecchio n° 7, 80138 Naples, Italy
3 Section of Biotechnology, Department of Experimental Medicine, Second University of Naples, Naples, Italy
4 Department of Mathematics and Statistics, University Study of Naples "Federico II", Naples, Italy
5 To whom correspondence should be addressed at Section of Microbiology and Clinical Microbiology, Department of Experimental Medicine, Second University of Naples (SUN), via Luigi de Crecchio n° 7, 80138 Naples, Italy. E-mail: mariaan.tufano@unina2.it

ВВЕДЕНИЕ

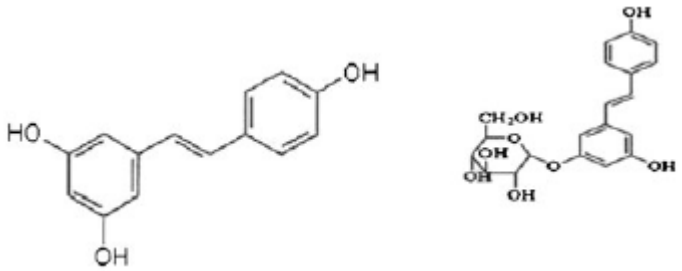
Человеческий эпидермис представляет собой первый защитный барьер, встающий на пути стрессогенных факторов окружающей среды. Кератиноциты, основная составляющая эпидермиса, не только создают физический барьер для микробных патогенов, но также играют активную роль в ответных реакциях, обусловленных врождённым иммунитетом [1]. Распознавание патогенов клетками-носителями врожденного иммунитета опосредуется рецепторами распознавания комбинаций. Последние распознают сохраненные в памяти клеток молекулярные комбинации, связанные с патогенами. Одной из крупных групп рецепторов, распознающих комбинации, являются толл-подобные рецепторы (TLRs), которые передают сигналы, приводящие в активированных B-клетках (NF-κB) к активации ядерного фактора каппа – усилителя легкой цепи каппа. А это приводит к индукции нескольких про-воспалительных цитокинов, хемокинов [2, 3] и анти-микробных пептидов, а также к повышенной выработке адгезии и способствующих этому эффекту молекул, вовлеченных в реакции врожденного и приобретенного иммунитета [4].
Анти-микробные пептиды, вырабатываемые кератиноцитами, среди которых выделяется семейство β-дефензинов, вносят свой вклад в механизм защиты организма хозяина от бактериальных, грибковых и вирусных инфекций, переносимых любыми путями от насекомых к человеку [5].

Они представляют первую линию защитной системы, которая постоянно присуща организму, но которая может быть усилена в случае воспаленной или поврежденной кожи, т.е. в тех случаях, которые меняют защитные функции кожи. Более того, цитокины, выработанные в коже, сильно влияют на экспрессию протеина теплового шока (Hsp), высоко консервативного протеина, имеющего функцию защиты от последующих клеточных повреждений [6]. Этот протеин имеет постоянную экспрессию в специфических клетках кожи, таких как кератиноциты в эпидермисе. Он создает естественный барьер, защищающий от потенциальных стрессогенных факторов окружающей среды. Протеин Hsp70B′, принадлежащий к семейству протеинов Hsp, вырабатывается исключительно под действием стресса и отсутствует в не подвергающихся стрессу клетках.

Ресвератрол (3,4′,5,-тригидрокси-транс-стильбен) (Рис. 1) – это естественный вырабатывающийся в живых организмах полифенол. Особенно в большом количестве он обнаруживается в кожице винограда, орехах, гранатах и в растении из семейства гречишных Poligonum cuspidatum. Была выдвинута гипотеза, что ресвератрол вносит свой вклад в способность богатой полифенолами средиземноморской диеты сокращать заболеваемость такими связанными с возрастом заболеваниями, как ишемическая болезнь сердца, рак и деменция [7, 8].

В поддержку этой гипотезы следует сказать, что ресвератрол обнаруживает широкий ряд благоприятных эффектов, включая защитные свойства для сердечнососудистой и нервной системы, анти-микробное и хемопревентивное действие. Было показано, что ресвератрол снижает выработку воздействующих на кровеносные сосуды пептидов, таких как эндотелины, сдерживает окисленные липопротеины низкой плотности и циклооксигеназу, препятствует выведению и нейротоксичности бета-амилоида, модулирует апоптические сигнальные пути и активирует сиртуин и протеинкиназу, активированную AMP, которая, как полагают, играет свою роль в эффекте продления жизни при ограничении калорий [9].

В последнее время было обнаружено, что в виноградном соке и в растении из семейства гречишных P. cuspidatum средняя концентрация пицеида (ресвератрол-3-O-β-моно-D-глюкозид, полидатин), глюкозидной формы ресвератрола, в семь раз больше, чем концентрация ресвератрола [10, 11], а это, вероятно, форма ресвератрола, наиболее обильно представленная в природе [12]. Этот пицеид имеет глюкозидную группу, связанную в позиции C-3 и заменяющую одну гидроксильную группу (Рис. 1). Эта замена приводит к конформационным изменениям молекулы и приводит к изменениям биологических свойств. Пицеид, более устойчивый к ферментативному окислению, чем ресвератрол, растворяется в воде и в отличие от ресвератрола, который проникает в клетку пассивно, он поступает в клетку в результате действия активного механизма, в котором используются носители глюкозы [10]. В ряде исследований поддерживается гипотеза о том, что пицеид может иметь био-медицинские свойства, аналогичные свойствам вышеупомянутого ресвератрола: он может оказывать противораковое действие и препятствовать слипанию кровяных пластинок и окислению LDL [13].



Ресвератрол Полидатин

Рис. 1. Химическая структура ресвератрола и полидатина

Более того, недавнее исследование, выполненное на человеческих периферийных мононуклеарах периферической крови, продемонстрировало способность этих полифенольных соединений снижать выработку интерлейкина IL-17. [14].

В данном исследовании мы изучали действие ресвератрола и полидатина на человеческие кератиноциты, подвергающиеся тепловому стрессу (HaCat). В этой статье мы демонстрируем, что ресвератрол и полидатин снижают воспалительный ответ подвергающихся тепловому стрессу клеток HaCat и усиливают цитопротекторный ответ в человеческом организме путем индукции пептида β-дефензина 2 (HBD-2) и протеина Hsp70B′.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Химические вещества

Натуральные ресвератрол и полидатин были выделены из растительных экстрактов и любезно предоставлены итальянским фондом Fondazione Edmund Mach, Istituto Agrario di San Michele all'Adige (ISMA), Italy. Чистота обоих соединений, протестированная методами HPLC-MS, ультрафиолетовым излучением и MNR, была выше, чем 99 % (метод был запатентован и описан в EP2087894A1) [15, 16]. Ресвератрол и полидатин были растворены в этаноле в 100 миллимолей исходного раствора. Все исходные растворы хранились при температуре −80 °C и были растворены в культуральной среде непосредственно перед использованием.

Тест на МТТ-пролиферацию клеток

Приблизительно 3×103 клеток HaCat было высеяно в 96-луночные планшеты в культуральную среду в конечном объёме 100 мл при температуре 37 °C и в присутствии 5 % CO_2. Была использована модифицированная по способу Дульбекко среда Игла (DMEM). Спустя 24 часа клетки были обработаны различными концентрациями ресвератрола, полидатина и сочетания ресвератрола и полидатина (5.5, 11, 22, 44 и 88 μM). Спустя 24 часа после обработки, среду удалили, и в каждую лунку добавили по 30 μл вещества МТТ: 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромид (компания Sigma-Aldrich, город Сент-Люис, штат Миссури, США) в концентрации 0,5 мг/мл. Затем последовала инкубация в течение часов при температуре 37 °C. Соединение МТТ (компании Sigma-Aldrich) – это тетразолиевая соль, которая может расщепляться активными митохондриями жизнеспособных клеток, в результате чего формируется фиолетовый формазановый продукт, количество которого можно измерить методами колориметрии.
Затем сформировавшийся фиолетовый формазан растворяли в 150 μл DMSO/на лунку. Абсорбция записывалась на частоте 560 нм при проведении ферментного иммуносорбентного теста (ELISA) с помощью планшет-ридера (лаборатории Bio-Rad Laboratories, город Эркюль, штат Калифорния, США).

Культура клеток и обработка

Клеточные линии HaCat (спонтанно ставшие бессмертными, не опухолевого характера) выращивались в среде DMEM с добавлением 10 % сыворотки крови эмбриона теленка (Лаборатории Gibco Laboratories, город Гранд Айленд, штат Нью-Йорк, США), пенициллина (50 ед/μл), стрептомицина (50 μг/л) и 2 миллимолей L-глютамина. Что касается обработки: 3×105 клеток были помещены в 6-луночные планшеты (с диаметром 35 миллимолей) с наличием в них по 2 мл полной среды. Они прошли предварительную инкубацию в течение 24 часов при температуре 37 °C с добавлением ресвератрола (44 μM), полидатина (44 μM) и комбинации ресвератрола+полидатина. В конце периода инкубации клетки подвергались тепловому шоку в течение 40 минут при температуре 42 °C.

Полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой

Анализ

Полная РНК, изолированная с помощью «Набора выделения РНК высокой чистоты» (Roche Diagnostics, Milan, Italy) из 1×106 клеток HaCat, была расшифрована с помощью обратной транскриптазы (Expand Reverse Transcriptase, Roche Diagnostics) при температуре 42 °C; транскрипция продолжалась в течение 45 минут в соответствии с инструкциями производителя.
Два микролитра комплиментарной ДНК были амплифицированы (усилены) в реакционной смеси, содержащей 10 миллимолей трис–HCl (pH 8.3), 1.5 миллимолей $MgCl_2$, 50 миллимолей

KCl, 200 μM dNTP и 2.5 единиц ДНК-полимеразы Taq (Roche Diagnostics) в конечном объеме 50 μл. Для ко-амплификации фрагментов TLR-2, TLR-4, IL-8, IL-6, фактора некроза опухолей-альфа (TNF-α), HBD-2 и протеина Hsp70B′, проводилась реакция ПЦРв присутствии 0.5 μM смысловых и анти-смысловых праймеров TLR-2, TLR-4, IL-8, IL-6, TNF-α, HBD-2 и Hsp70B′ и 0.05 μM смысловых и анти-смысловых праймеров глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH) или β- актина. Условия и размер продуктов приведены в таблице 1. Эта реакция происходила в термоблоке для проведения реакций с ДНК (Mastercycler gradient, Eppendorf, Milan, Italy). Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (RT-PCR) на основе β-актина была выполнена на мРНК для подтверждения того, что мРНК подходят для анализа RTPCR. Продукты реакции ПЦР анализировались путем электрофореза на 1.8 %-ном агарозном гелевом субстрате (Eppendorf, Milan, Italy) в буфере Трис–Борат-EDTA (Fluka, BioChemiKa, Switzerland). Денситометрический анализ агарозного геля, окрашенного бромидом этидия, выполнялся с помощью программного приложения NIH image V1.6. Соотношение между выходом каждого амплифицированного продукта и выходом ко-амплифицированного соединения внутреннего контроля позволил получать относительные оценки уровней мРНК в анализируемом образце. Для внутреннего контроля (GAPDH или β-actin) служил активный ген, чей продукт ПЦР не перекрывался исследуемым геном.

Тест ELISA для HBD-2

Полу-конфлюэнтные (наполовину сливающиеся) клетки HaCat были или обработаны или нет ресвератролом, полидатином и ресвератролом+полидатином и оставлены на период 24 часа. Центрифугированием были получены клеточные супернатанты (надосадочные жидкости). Они были исследованы на обнаружение дефензина HBD-2 путем применения теста ELISA (Phoenix Pharmaceuticals, Inc). езультаты выражены в пикограммах на миллилитр культуральной среды.

Экстрагирование протеинов и анализ «вестерн-блоттинг»

Приблизительно 4×105 клеток HaCat были обработаны или нет ресвератролом, полидатином и ресвератролом+полидатином и оставлены на период 24 часа. Клетки соскоблили и развели в 1 мл физиологического раствора с фосфатным буфером (PBS), и сгусток клеток гомогенизировали в 300 μл ледяного буфера (50 миллимолей HEPES при pH=7.5, 150 миллимолей NaCl, 1 % глицерин, 1 % тринитротолуол, 1.5 миллимолей $MgCl_2$ и 5 миллимолей EGTA). К нему добавили 20 миллимолей пирофосфата натрия, 40 μг/мл апротинина, 4 миллимолей PMSF, 10 миллимолей ортованадата натрия и 25 миллимолей NaF. Все экстракты были очищены путем центрифугирования в течение 30 минут при температуре 4 °C на частоте 10 000 об/мин и проанализированы на содержание протеина методом Брэдфорда. Пятьдесят микрограмм протеина из каждого клеточного лизата были отделены с помощью электрофореза в 10 % SDS- полиакриломидном геле и перенесены на нитроцеллюлозные мембраны. Фильтры были окрашены 10%-ным красителем понсо S, который воздействовал на них в течение 2 минут. Это было сделано, чтобы проверить равномерность нагрузки и эффективность переноса. Пятна были зафиксированы на ночь 5 % -ным нежирным сухим молоком. Затем они были инкубированы с кроличьими поликлональными антителами к человеческому TLR-2 (H-175) и к человеческому TLR-4 (H-80) (10 μг/мл; Santa Cruz Biotechnology), кроличьими поликлональными антителами к IL-6 (Santa Cruz, CA), к IL-8 (Chemicon, Temecula, CA), к Hsp70B′ (Stressgen, Biotechonologies) и мышиными поликлональными антителами к TNF-α (Santa Cruz). Антитела были взяты в количестве 1 μг/мл в TBS (150 миллимолей NaCl, 20 миллимолей Трис–HCl при pH=8). Инкубация происходила в течение 2 часов при комнатной температуре. После промывания 0.1 %-ным твин-20 PBS, этот фильтр был инкубирован с конъюгированными с пероксидазой антикроличьими иммоглобулинами в отношении 1:2,500 (Santa Cruz) и антимышиным иммуноглобулином в отношении 1:2,500. Инкубация проводилась в течение 1 часа при температуре 22 °C. Было проведено тщательное промывание образцов и выполнен их анализ с помощью системы усиленной хемилюминесценции (Amersham, Little Chalfont, UK). Загрузка протеинов проверялась путем взятия новой пробы с мембран с помощью α-тубулина, чтобы показать, что уровни протеина не изменились.

Таблица 1. Смысловые и антисмысловые последовательности человеческих праймеров и ожидаемый выход продуктов реакции ПЦР (bp)

Ген	Смысловые и антисмысловые последовательности	Условия	bp
IL-6	5′-ATg AAC TCC TTC ACA AgC gC-3′	30 циклов при 95 °C 30 сек	628
	5′-gAA gAg CCC TCA ggC Tgg ACT g-3′	при 55 °C 71 сек и 72 °C 142 сек	
IL-8	5′-ATg ACT TCC AAg CTg gCC gTg-3′	30 циклов при 94 °C 60 сек	297
	5′-TgA ATT CTC AgC CCT CAA AAA CTT CTC	при 55 °C 60 сек и 72 °C 60 сек	
TNF-α	5′-gAg CAC TgA AAg CAT gAT CCg-3′	33 циклов при 94 °C 60 сек	682
	5′-AAA gTA gAC CTg CCC AgA CTC gg-3′	при 60 °C 60 сек и 72 °C 60 сек	
HBD-2	5′-CCA gCC ATC AgC CAT gAg ggT-3′	33 циклов при 94 °C 60 сек	200
	5′-ggA gCC CTT TCT gAA TCC gCA-3′	при 63 °C 60 сек и 72 °C 60 сек	
TLR-2	5′-gCC AAA gTC TTg ATT gAT Tgg-3′	32 циклов при 95 °C 45 сек	347
	5′ TTg AAg TTC TCC AgC TCC Tg-3′	при 54 °C 45 сек и 72 °C 60 сек	
TLR-4	5′-gAA ATg gAg gCA CCC CTT C-3′	32 циклов при 95 °C for 45 сек	628
	5′-Tgg ATA CgT TTC CTT ATA Ag-3′	при 54 °C 45 сек и 72 °C 60 сек	
HSP-70	5′-ctc caG cat ccG aca aGa Agc-3′	33 циклов при 94 °C for 30 сек	234
	5′-acG GtG ttG Tgg ggg TTC Agg-3′	при 63 °C 30 сек и 72 °C 30 сек	

Статистический анализ

Все эксперименты были проведены с тремя веществами (ресвератрол - 44 μM, полидатин - 44 μM и сочетание ресвератрола и полидатина - 44 μM) с, по крайней мере, тремя повторениями для каждой группы. Все эксперименты были проведены также на клетках, подвергнутых тепловому стрессу. Значения вероятности P, как правило, попадали в интервал между 0.01 и 0.03, что подтверждает статистическую значимость результатов ($P<0.05$). Три экспериментальные группы сравнивались с контрольной группой с помощью однофакторного анализа повторных измерений. Сравнение групп по полученным результатам было проведено с помощью теста Стьюдента-Ньюмана-Кейлса.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ресвератрол и Полидатин не влияют на жизнеспособность клеток HaCat

Чтобы оценить действие ресвератрола и полидатина на жизнеспособность клеток HaCat был проведен анализ MTT, и клетки HaCat были обработаны различными концентрациями (5.5, 11, 22, 44 и 88 μM). Как показано на Рис. 2, ресвератрол и полидатин не влияли на жизнеспособность клеток HaCat ни в одной из использованных концентраций. В нашей экспериментальной модели мы использовали клетки HaCat, подвергнутые тепловому стрессу, с последующей активацией воспалительных цитокинов. Лучшей концентрацией, при которой ресвератрол и полидатин индуцировали анти-воспалительный ответ, была концентрация 44 μM (данные не показаны).

Сочетание ресвератрола с полидатином вызывает повышенную экспрессию рецептора TLR-2 в клетках HaCat, подвергнутых тепловому стрессу

Чтобы оценить, могут ли ресвератрол и полидатин изменять экспрессию рецепторов TLR, экспрессия TLR-2 и TLR-4 была исследована методом RT-PCR на клетках HaCat, одни из которых были подвергнуты тепловому стрессу, а другие нет,. Обработка клеток в течение 24 часов с помощью 44 μM ресвератрола и полидатина, используемых по отдельности или в сочетании, не изменяло экспрессию рецепторов TLR у клеток HaCat (Рис. 3a, b). Когда клетки подвергались тепловому стрессу, была продемонстрирована значительная индукция экспрессии мРНК рецепторов TLR-2 (Рис. 3a), а экспрессия рецептора TLR-4 не изменялась (Рис. 3b). Интересно, что когда клетки предварительно обрабатывали ресвератролом или полидатином, а затем подвергали тепловому стрессу, более сильная экспрессия рецептора TLR-2 наблюдалась

при использовании сочетания веществ. Те же отдельно используемые молекулы были не способны индуцировать экспрессию рецептора TLR-2 в клетках, подвергнутых тепловому стрессу в контрольном эксперименте. Для подтверждения полученных результатов был проведен «вестерн-блоттинг» (Рис. 3c).

Ресвератрол и полидатин снижают выработку про-воспалительных цитокинов IL-6, IL-8 и TNF-α

Для оценки способности ресвератрола и полидатина изменять про-воспалительный ответ, была проанализирована активированная тепловым стрессом экспрессия про-воспалительных цитокинов IL-6, IL-8 и TNF-α.

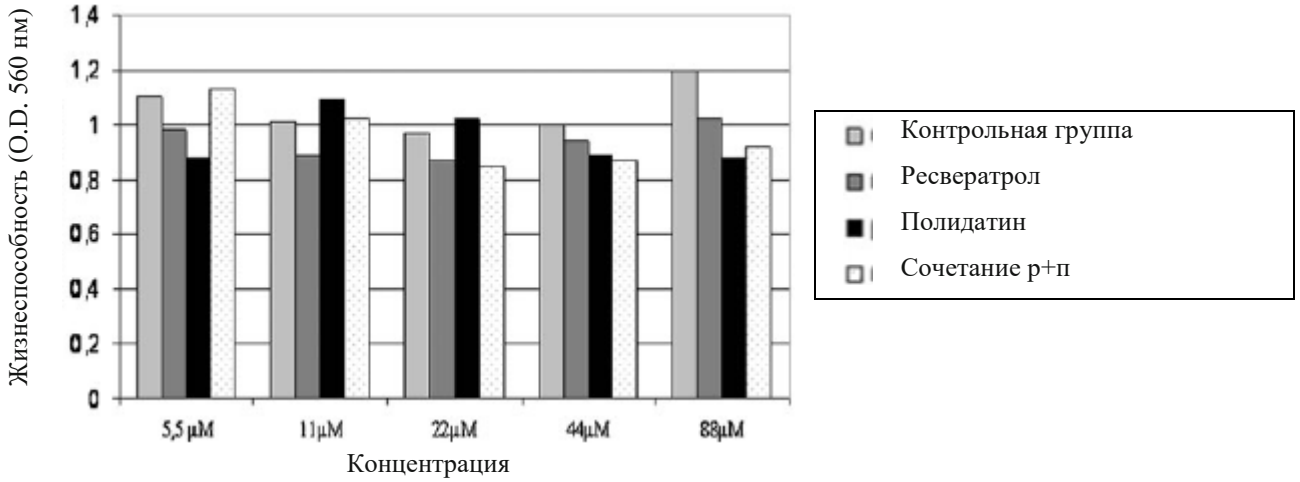


Рис. 2. Воздействие ресвератрола и полидатина на пролиферацию клеток HaCat

В клетках HaCat не наблюдалась экспрессия этих цитокинов, и ресвератрол и полидатин, ни по отдельности, ни в сочетании не индуцировали их экспрессии (Рис. 4). Как показано на Рис. 4a–c, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat обнаружили высокие уровни экспрессии протеинов TNF-α, IL-6 и IL-8. Когда клетки HaCat были предварительно обработаны 44 μM ресвератрола and полидатина, действовавших на них в течение 24 часов, как по отдельности, так и в сочетании, а затем подвергнуты тепловому стрессу, экспрессия протеинов TNF-α, IL-6 и IL-8 снижалась (Рис. 4a–c). В частности, комбинация обеих молекул была способна сильно снизить экспрессию SU-cited цитокинов, причем лучший эффект был получен по IL-6, чья экспрессия была полностью сведена на нет. Эти результаты были подкреплены оценкой протеинов (Рис. 4d).

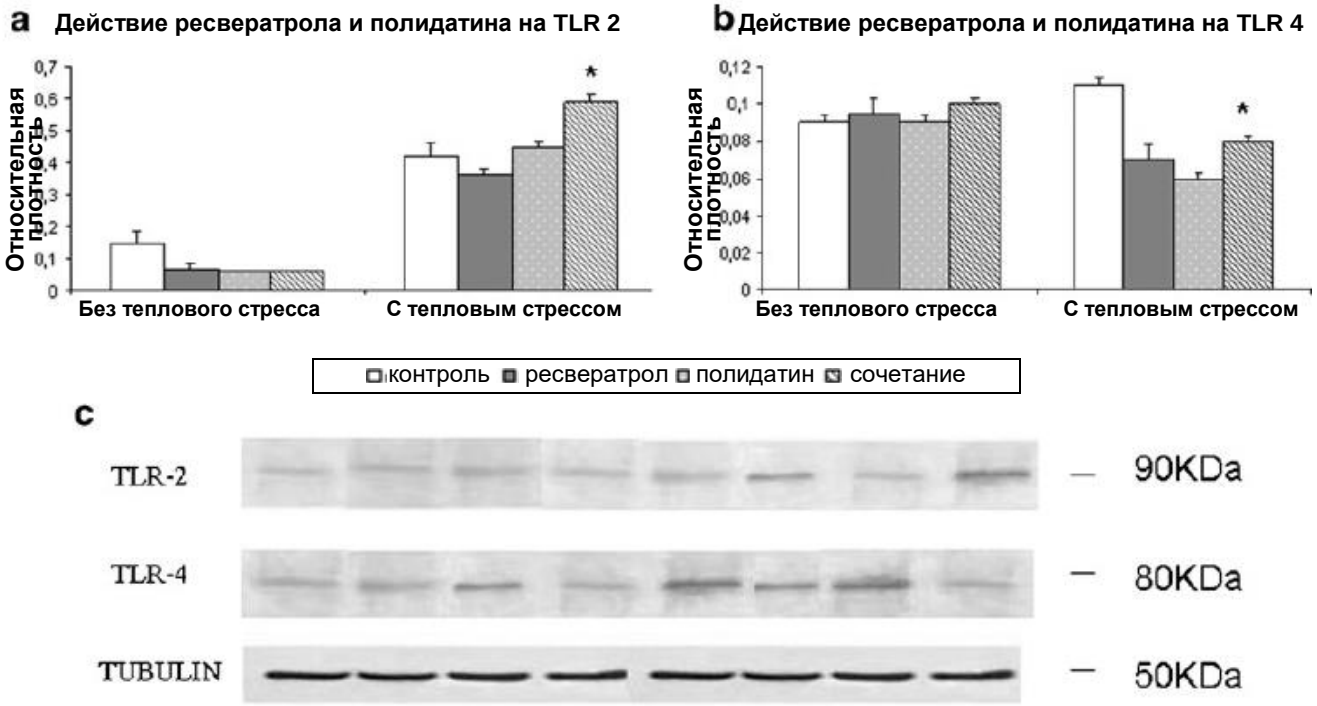


Рис. 3. Действие ресвератрола и полидатина on экспрессию мРНК TLR-2 и TLR-4 и анализ «вестерн блоттинг» на подвергнутых тепловому стрессу клетках HaCat.
Анализ RT-PCR с применением специфических праймеров для TLR-2 (a) и TLR-4 (b).
1, необработанные клетки HaCat (контрольные образцы); 2, клетки HaCat, обработанные 44 μM ресвератрола; 3, клетки HaCat , обработанные 44 μM полидатина; 4, клетки HaCat , обработанные сочетанием ресвератрола и полидатина; 5, не обработанные и подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat; 6, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat, обработанные ресвератролом; 7, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat, обработанные полидатином; и 8, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat, обработанные сочетанием ресвератрола и полидатина.
c Анализ «вестерн-блоттинг» с антителами к TLR-2 и соответственно TLR-4.
1. необработанные клетки HaCat (контрольные образцы); 2, клетки HaCat обработанные 44 μM ресвератрола; 3, клетки HaCat, обработанные 44 μM полидатина; 4, клетки HaCat, обработанные сочетанием ресвератрола и олидатина; 5, необработанные подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat; 6, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat, обработанные ресвератролом; 7, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat, обработанные полидатином; и 8, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat, обработанные сочетанием ресвератрола и полидатина.
Эти данные показывают результаты выборок по трем экспериментам ±SD.
*P<0.05, есть существенное отличие по сравнению с контрольными образцами.

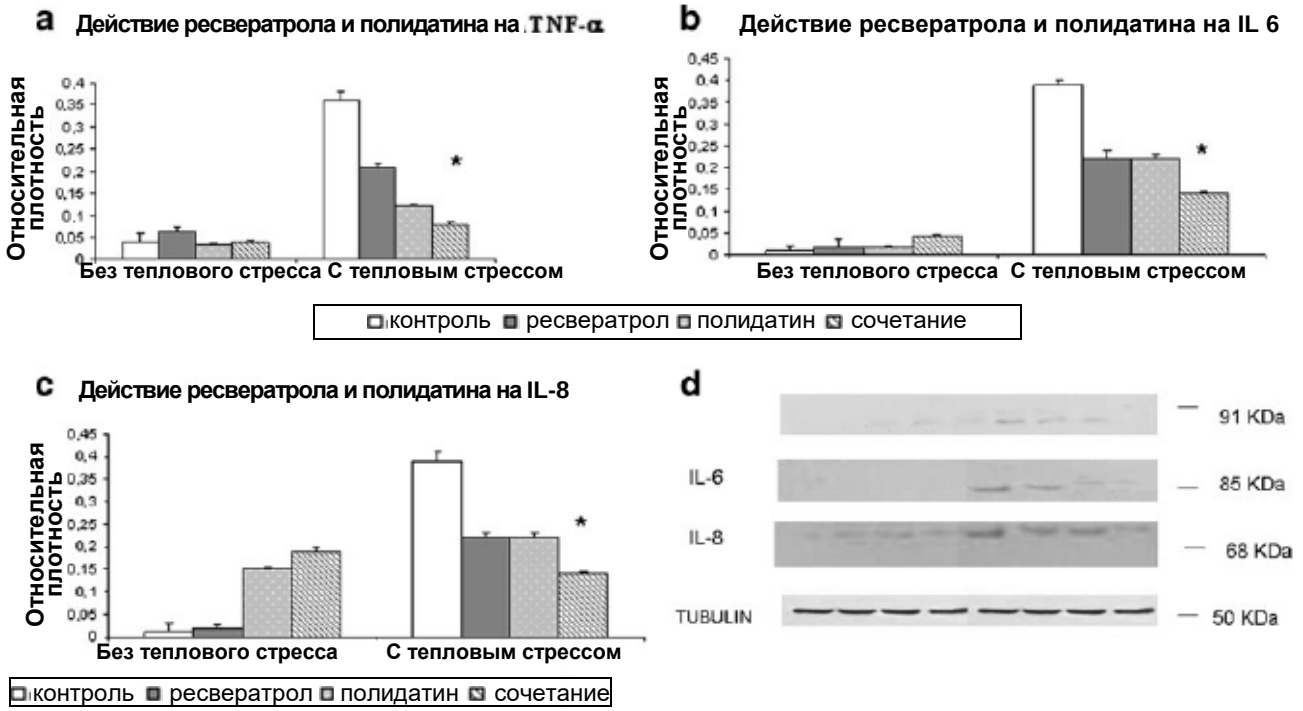


Рис. 4. Действие ресвератрола и полидатина на экспрессию мРНК гена протеина TNF-α, IL-6 и IL-8 и анализ «вестерн-блоттинг» подвергнутых тепловому стрессу клеток HaCat..
Анализ RT-PCR с применением специфических праймеров для TNF-α (a), IL-6 (b) и IL-8 (c).
1, необработанные клетки HaCat (контрольные образцы); 2, клетки HaCat, обработанные 44 μM ресвератрола; 3, клетки HaCat , обработанные 44 μM полидатина; 4, клетки HaCat , обработанные сочетанием ресвератрола и полидатина; 5, не обработанные и подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat; 6, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat, обработанные ресвератролом; 7, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat, обработанные полидатином; и 8, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat, обработанные сочетанием ресвератрола и полидатина.
d Анализ «вестерн-блоттинг» с антителами к TNF-α, к IL-6 и соответственно к IL-8.
1. необработанные клетки HaCat (контрольные образцы); 2, клетки HaCat обработанные 44 μM ресвератрола; 3, клетки HaCat, обработанные 44 μM полидатина; 4, клетки HaCat, обработанные сочетанием ресвератрола и олидатина; 5, необработанные подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat; 6, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat, обработанные ресвератролом; 7, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat, обработанные полидатином; и 8, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat, обработанные сочетанием ресвератрола и полидатина.
Эти данные показывают результаты выборок по трем экспериментам ±SD.
*P<0.05, есть существенное отличие по сравнению с контрольными образцами.

Сочетание ресвератрола и полидатина индуцирует ответ в виде выработки дефензина HBD-2 в подвергнутых тепловому стрессу клетках HaCat.
Чтобы продемонстрировать, способны ли ресвератрол и полидатин индуцировать выработку HBD-2, клетки HaCat предварительно обрабатывались исследуемыми молекулами, по отдельности или в сочетании в течение 24 часов, а затем они были подвергнуты тепловому стрессу. Как показано на Рис. 5a, тепловой стресс не индуцирует экспрессию HBD-2, в то время как полидатин (как отдельно, так и в сочетании с ресвератролом индуцирует экспрессию HBD-2 в подвергнутых тепловому стрессу клетках HaCat. В отличие от полидатина ресвератрол не способен давать те же самые эффекты. Мы также протестировали выработку HBD-2 в среде клеток, подвергнутых тепловому стрессу. Как демонстрируют результаты теста ELISA (Рис. 5b), сочетание ресвератрола с полидатином индуцирует значительную выработку HBD-2 (191 нг/мл) по сравнению с контрольными образцами, подвергнутыми тепловому стрессу (9 нг/мл).

Сочетание ресвератрол+полидатин повышает экспрессию протеина Hsp70B′
Чтобы проанализировать цитозащитное действие ресвератрола и/или полидатина, клетки HaCat инкубировались в течение 24 часов с ресвератролом, полидатином и их сочетанием, а затем их подвергали тепловому стрессу. Как показано на Рис. 6a, тепловой стресс индуцировал более высокую экспрессию Hsp70B′ в необработанных клетках по сравнению с клетками, не подвергавшимися тепловому стрессу. Когда клетки предварительно инкубировали с использованием сочетания ресвератрола и полидатина, а затем подвергали действию теплового стресса, наблюдалось более сильное повышение экспрессии Hsp70B′.
Эти данные были подтверждены анализом «вестерн-блоттинг» (Рис. 6b).

ОБСУЖДЕНИЕ

Анти-микробные пептиды, которые синтезируются в коже и в местах микробной колонизации, создают растворимый барьер, который действует как препятствие на пути распространения инфекции. В случае инфицирования или повреждения экспрессия анти-микробных пептидов в коже повышается из-за повышенного синтеза кератиноцитов и появления продуктов дегрануляции затронутых нейтрофилов.

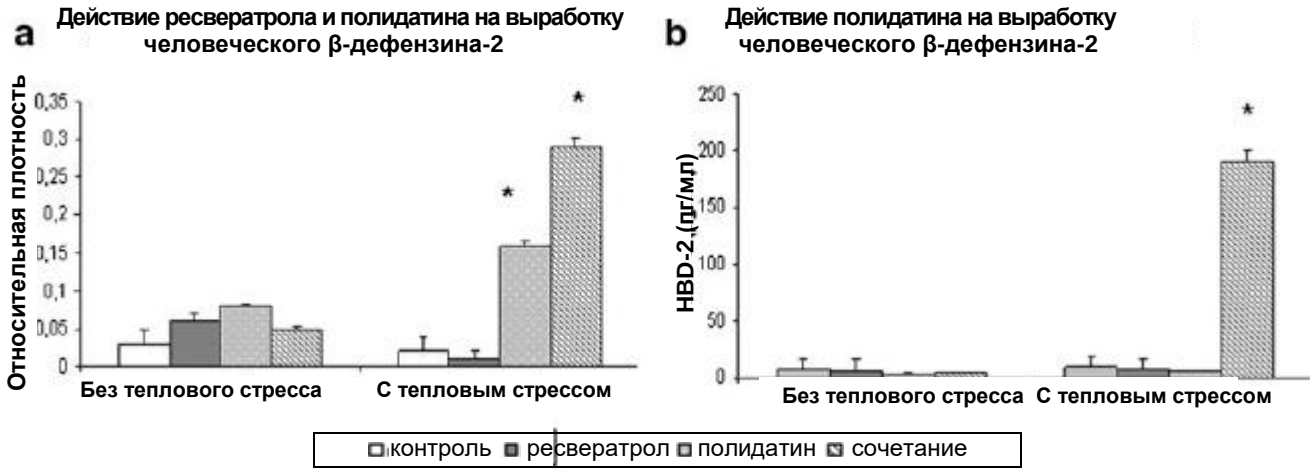


Рис. 5. Действие ресвератрола и полидатина на экспрессию мРНК гена человеческого β дефензина-2 (HBD-2) и его выработка в подвергнутых тепловому стрессу клетках HaCat.
Реакция RT-PCR с применением специфических праймеров для h-BD2 (a).
1, необработанные клетки HaCat (контрольные образцы); 2, клетки HaCat, обработанные 44 μM ресвератрола; 3, клетки HaCat , обработанные 44 μM полидатина; 4, клетки HaCat , обработанные сочетанием ресвератрола и полидатина; 5, не обработанные и подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat; 6, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat, обработанные ресвератролом; 7, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat, обработанные полидатином; и 8, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat, обработанные сочетанием ресвератрола и полидатина.
b Выработка HDB-2 в клетках HaCat в культуральной среде.
Тест ELISA.
1. необработанные клетки HaCat (контрольные образцы); 2, клетки HaCat обработанные 44 μM ресвератрола; 3, клетки HaCat, обработанные 44 μM полидатина; 4, клетки HaCat, обработанные сочетанием ресвератрола и олидатина; 5, необработанные подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat; 6, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat, обработанные ресвератролом; 7, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat, обработанные полидатином; и 8, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat, обработанные сочетанием ресвератрола и полидатина.
Эти данные показывают результаты выборок по трем экспериментам ±SD.
*P<0.05, есть существенное отличие по сравнению с контрольными образцами.

Дефензин HBD-2, условно говоря, отсутствует в нормальной коже, и для его экспрессии в клетках HaCat требуется стимуляция кожными патогенами или другими стрессогенными факторами окружающей среды [17].

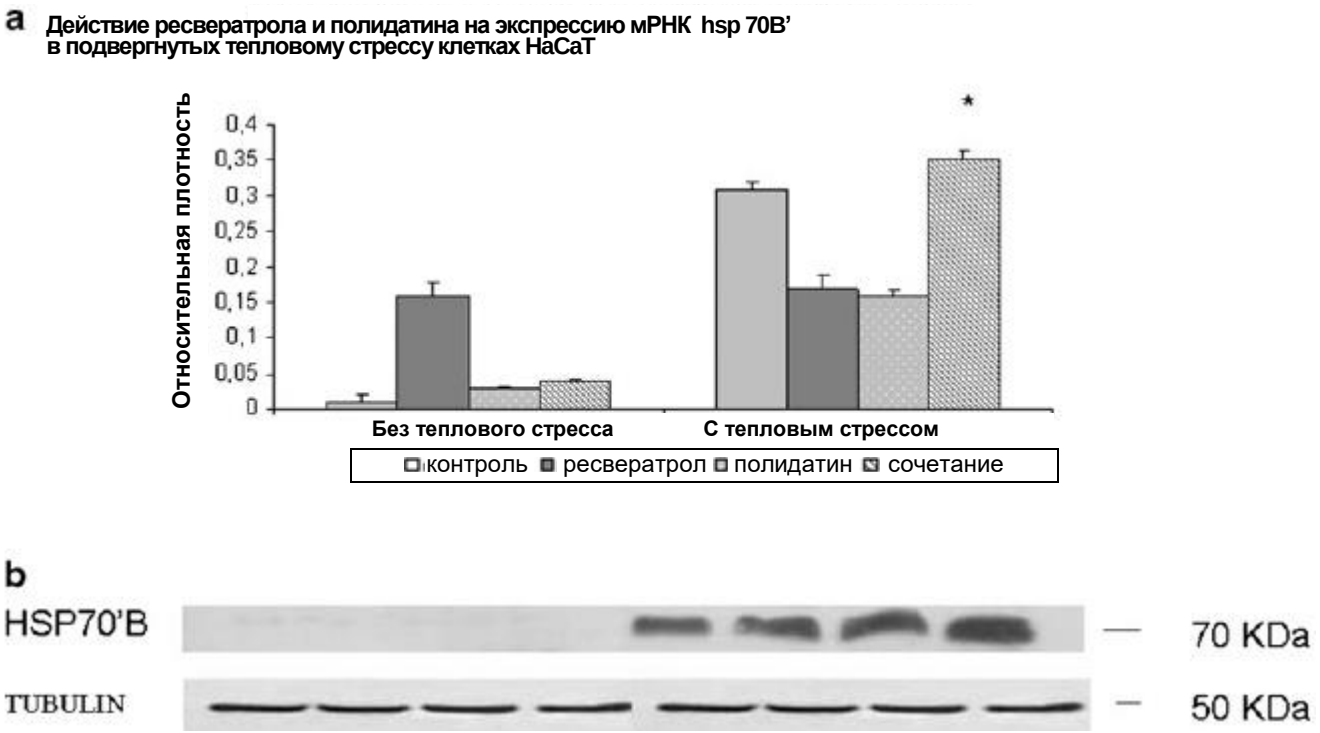


Рис. 6. Действие ресвератрола и полидатина на экспрессию мРНК гена протеина Hsp70B′ и анализ «вестерн-блоттинг» подвергнутых тепловому стрессу клеток HaCat.
Анализ реакции RT-PCR с применением специфических праймеров для протеина Hsp70B′.
1, необработанные клетки HaCat (контрольные образцы); 2, клетки HaCat, обработанные 44 μM ресвератрола; 3, клетки HaCat , обработанные 44 μM полидатина; 4, клетки HaCat , обработанные сочетанием ресвератрола и полидатина; 5, не обработанные и подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat; 6, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat, обработанные ресвератролом; 7, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat, обработанные полидатином; и 8, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat, обработанные сочетанием ресвератрола и полидатина.
b Анализ «вестерн-блоттинг» с антителами к -Hsp70B′.
1. необработанные клетки HaCat (контрольные образцы); 2, клетки HaCat обработанные 44 μM ресвератрола; 3, клетки HaCat, обработанные 44 μM полидатина; 4, клетки HaCat, обработанные сочетанием ресвератрола и олидатина; 5, необработанные подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat; 6, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat, обработанные ресвератролом; 7, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat, обработанные полидатином; и 8, подвергнутые тепловому стрессу клетки HaCat, обработанные сочетанием ресвератрола и полидатина.
Эти данные показывают результаты выборок по трем экспериментам ±SD.
*P<0.05, есть существенное отличие по сравнению с контрольными образцами.

В последние годы также было продемонстрировано, что дефензины проявляют дополнительную биологическую активность, видимо, не связанную с их анти- микробным действием [18]. В нескольких исследованиях уже указывалось, что дефензины HBD являются потенциальными модуляторами воспаления из-за их действия на полиморфно-ядерный (PMN) апоптоз.
Авторы Nagaoka et al. (2008) продемонстрировали, что дефензины HDB потенциально могут подавлять PMN-апоптоз и продлевать жизнь клеток, поэтому они вносят вклад в защиту от внешних неблагоприятных факторов [19]. В данном исследовании мы оценили способность ресвератрола и его пицеида полидатина индуцировать выработку и экспрессию дефензина HBD-2 в подвергнутых тепловому стрессу клетках HaCat. Наши результаты показали, что полидатин индуцирует экспрессию HBD-2 в подвергнутых тепловому стрессу кератиноцитах, и его действие в значительной мере усиливается сочетанным использованием полидатина и ресвератрола. Кроме того, экспрессия рецептора TLR-2 также повышалась при обработке ресвератролом и полидатином, а экспрессия TLR-4 не изменялась.
Следующие важные свидетельства продемонстрировали тесную связь между β-дефензинами и рецепторами TLR: несколько типов эпителиальных клеток, включая кератиноциты, реагируют на внешние стимулы путем индуцирования TLR-2 или TLR-4 повышают экспрессию дефензина HBD-2 [20, 21]. Тепловой стресс может вызвать в клетках изменения, связанные в основном с повреждением протеинов. Для восстановления клеточного гомеостаза может быть активирован некий механизм клеточной защиты, включающий индукцию экспрессии различных веществ и в том числе протеина Hsp [22]. Hsp играет важную роль в клеточной защите и восстановлении клеток после стресса и травм [23]. Как и ожидалось, в нашей экспериментальной модели после применения теплового стресса была индуцирована выработка Hsp70B′. Когда клетки HaCat обрабатывали ресвератролом и полидатином, а потом подвергали тепловому стрессу, наблюдалась заметная повышенная экспрессия протеина Hsp70B′ по сравнению с контрольными образцами, также подвергнутыми тепловому стрессу. Более того, обработка клеток ресвератролом и полидатином, будь то по отдельности или в сочетании, сильно снижает про-воспалительный ответ подвергнутых тепловому стрессу клеток HaCat. Наши результаты согласуются с недавними сообщениями в литературе, демонстрирующими, что ресвератрол блокирует индуцированную TNF-α активацию фактора NF-κB, фактора транскрипции, сильно связанного с воспалительными заболеваниями. Это может указывать на возможный механизм действия ресвератрола [24]. Кроме того, наши результаты иллюстрируют, что активность ресвератрола повышается в присутствии его натурального пицеида полидатина, вещества, образующегося в живой природе, которое может предоставлять защиту клеткам от повреждений кожи.
Сообщаемые здесь результаты подчеркивают способность полидатина, также и в его сочетании с ресвератролом, усиливать выработку анти-микробного пептида HBD-2 и снижать экспрессию про-воспалительных цитокинов. Сочетание обоих веществ также предотвращает повреждение

клеток путем поддержания повышенного уровня протеина Hsp70B′. Клетки кожи также оснащены изощренной системой выработки антиоксидантных веществ и энзимов, которые поддерживают баланс между окислительным стрессом и актиоксидантной защитой и предохраняют клетки от повреждений, вызываемых окислительным стрессом [25]. Мощным фактором окислительного стресса является солнечный свет с его ультрафиолетовым излучением А (УФА) [26]. Эти излучения усиливают повреждение кожи путем повреждения клеточных протеинов, липидов и сахаридов. В последние годы пришли сообщения, что ресвератрол предотвращает окислительный стресс, вызываемый излучением УФА [27, 28]. Liu et al. сообщили, что ресвератрол защищает клетки HaCat от повреждения из-за окислительного стресса, вызванного излучением УФА, путем снижения выработки экспрессии гена Keap1. [29]. Тем не менее, в нашей системе механизм действия ресвератрола и полидатина еще понятен не до конца. Нужно дополнительное исследование для определения молекулярного механизма действия ресвератрола и полидатина на нашу экспериментальную модель.

Наши результаты, возможно, прокладывают дорогу рациональному использованию сочетания ресвератрола и полидатина в дерматологических косметических или фармацевтических препаратах. Таким образом, эти молекулы, если использовать их в сочетании, могут активировать цитопротекторный ответ и защищать кожу от повреждений, вызванных патогенными микроорганизмами или иными стрессогенными факторами окружающей среды.

ПРИЗНАТЕЛЬНОСТЬ

This work was supported by grants from GLURES, s.r.l. Academic SPIN-OFF Ca’ Foscari University of Venice, Italy.

ЛИТЕРАТУРА