

槲皮素通过自噬途径减轻高糖致体外培养 RSC96 细胞的损伤

屈岭 梁晓春 顾蓓 张宏 石玥

【摘要】 目的 观察槲皮素对高浓度葡萄糖培养的大鼠雪旺细胞系细胞 (rat Schwann cell line, RSC96) 自噬、增殖活性和凋亡的影响。**方法** 高浓度葡萄糖 (125 mmol/L) 及槲皮素 (25 μ mol/L) 离体培养 RSC96 细胞, 作用 72 小时后, 噻唑基四唑 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 法检测细胞增殖活性, 原位末端标记法 [terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL] 评价凋亡, Western blot 法检测 caspase-9 活化的 P35 亚基、caspase-3 活化的 P20 亚基及自噬相关蛋白 Beclin1 的蛋白表达。**结果** 高糖抑制离体培养的 RSC96 细胞的增殖活性, 吸光度 (optical density, OD) 值降低, 凋亡率增加, P35 亚基、P20 亚基蛋白表达上调 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 槲皮素能够增加高糖培养 RSC96 细胞的增殖活性, 下调 P35、P20 蛋白表达及凋亡率 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。然而当自噬被抑制后, 槲皮素上述保护作用则被削弱, 细胞死亡增多 ($P < 0.01$)。**结论** 槲皮素通过增加自噬以促进 RSC96 细胞的增殖、减少凋亡, 从而减轻高浓度葡萄糖的损伤。

【关键词】 自噬; 凋亡; 槲皮素; 雪旺细胞; 高浓度葡萄糖

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.06.012

Quercetin decreased RSC96 cells apoptosis induced by high glucose and increased proliferation via the pathway of autophagy

QU Ling, LIANG Xiao-chun, GU Bei, et al. Department of Traditional Chinese Medicine, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

Corresponding author: LIANG Xiao-chun, E-mail: xcliang@vip.sina.com

【Abstract】 Objective To observe the protective effect of quercetin on the RSC96 cells cultured in high glucose in the aspects of autophagy, proliferation and apoptosis. **Methods** RSC96 cells were cultured with high glucose or quercetin media. The proliferation was detected by MTT method; the apoptosis was detected by TUNEL method; the expression of the activated subunit P35 of caspase-9 and the activated sub-

基金项目: 国家自然科学基金 (81403224); 北京市自然科学基金 (7132189); 北京协和医院科研基金 (2013-098)

作者单位: 100730 北京, 中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院中医科 (屈岭、梁晓春、石玥), 基础医学研究所细胞中心 (顾蓓、张宏)

作者简介: 屈岭 (1980 -), 博士, 主治医师。研究方向: 糖尿病及其慢性并发症的中西医诊治。E-mail: quling@pumch.cn

通讯作者: 梁晓春 (1956 -), 女, 硕士, 教授, 博士生导师。研究方向: 糖尿病及其慢性并发症的中西医诊治。E-mail: xcliang@vip.sina.com

unit P20 of caspase-3 were detected by Western blot method. **Results** The increased concentration of glucose lowered the proliferation of RSC96 cells and increased the apoptosis ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Quercetin significantly up-regulated the proliferation rate, and down-regulated the apoptosis by attenuated the high glucose-induced activation of caspase-3 and caspase-9 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Furthermore, inhibition of autophagy led to significantly attenuate the protective effect of quercetin ($P < 0.01$). **Conclusions** Quercetin decreased apoptosis and up-regulated proliferation on the RSC96 cells cultured in high glucose through the autophagy pathway.

【Keywords】 Autophagy; Apoptosis; Quercetin; Schwann cell; High glucose

糖尿病周围神经病变发病机制尚未阐明,尚缺乏有效治疗手段^[1-2]。槲皮素广泛存在于多种中药和食物中,具有抗氧化、清除自由基等作用。有学者发现槲皮素可增加被高浓度葡萄糖所抑制的神经细胞的增殖活性,减少氧化应激损伤,并可通过诱导自噬而减少凋亡^[3-5]。本研究通过离体实验观察了槲皮素对高浓度葡萄糖培养雪旺细胞中增殖活性、凋亡与自噬变化规律的影响,来了解槲皮素是否通过自噬—凋亡途径对糖尿病周围神经病变起到防治作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 大鼠雪旺细胞系细胞 (rat Schwann cell line, RSC96), 一种永生化的大鼠雪旺细胞, 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.1.2 药品试剂 槲皮素、噻唑基四唑 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、3-甲基嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA) (Sigma, 美国); 改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modification of Eagle's medium, DMEM) (Gibco, 美国); 兔抗大鼠 caspase-3 多克隆抗体、兔抗大鼠 caspase-9 多克隆抗体 (Santa Cruz, 美国); 原位末端标记法 (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 试剂盒 (Roche, 美国)。

1.1.3 实验仪器 CO₂ 培养箱 (Forma 3111, 美国); 高速低温离心机 (ALC PK121R, 美国); 倒置相差显微镜 (Olympus CKX31SF, 日本); 激光扫描共聚焦显微镜 (LEICA TCS SP2SE, 德国); 透射电子显微镜 (JEM 1010, 日本)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 复苏 RSC96 细胞, 加入 DMEM 培养基、胎牛血清 (10%)、谷氨酰胺 (终浓度 4 mmol/L)、丙酮酸钠 (终浓度 1 mmol/L)、HEPES (终浓度 12.5 mmol/L), 2~3 天换液 1 次。

1.2.2 TUNEL 检测 作用 72 小时后, 4% 多聚甲醛固定样本 1 小时 (室温下); 0.1% TritonX-100 孵育 3 分钟; 阳性对照组: 滴加脱氧核糖核酸酶 I 后, 室温下孵育 10 分钟, 滴加 TUNEL 反应液, 阴性对照组滴加试剂 2, 避光, 37℃, 湿盒中孵育 60 分钟; 滴加转换剂 50 μL, 37℃, 湿盒中孵育 30 分钟, 滴加显色剂, 1~2 分钟, 滴加苏木素染色, 盐酸酒精分化液分化, 封片。各组在 ×400 倍视野下, 随机选取 10 个视野。应用 IPP 6.0 软件计算凋亡细胞占有核细胞的百分比。重复 2 次。

1.2.3 MTT 比色法 加入不同条件 72 小时后检测。取 96 孔板, 弃培养基, 加入 10% MTT 200 μL/孔于 37℃ 孵育 2~4 小时后, 吸出培养液, 加入二甲亚砜 200 μL/孔, 室温静置 30 分钟至 1 小时于酶标分析仪检测吸光度 (optical density, OD) 值, 检测波长 570 nm。每次重复 5 孔, 重复 3 次。

1.2.4 Western Blot 加入不同条件 72 小时后检测。各组细胞标本加入裂解液进行匀浆, 离心取上清液, 测定蛋白浓度, 将含有 50 μg 蛋白的上清液用电泳分离, 并转移到硝酸纤维素膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T 中和硝酸纤维素膜降低非特异性结合。一抗孵育, 冲洗后再用二抗孵育, 采用 ECL 试剂盒检测。条带用 Gel-Pro 图像分析系统扫描定量。重复 3 次。

1.3 统计学处理

数据录入和处理均采用 SPSS 19.0 统计软件包, 分析前采用 One Sample Kolmogorov-Smirnov Z test 检验数据是否符合正态分布, 符合正态分布的数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述, 多组独立样本比较采用单因素方差分析, 细胞增殖活性 OD 值方差齐, 采用 Bonferroni 法, 凋亡率、P35/β-actin、P20/β-actin 及 Beclin1/β-actin 方差不齐, 采用 Dunnett's T3 法。各种检验的显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 高浓度葡萄糖抑制 RSC96 细胞增殖活性

在培养基中加入不同浓度的葡萄糖, 分为正常

表 1 不同时间不同浓度葡萄糖对 OD 值的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	0h	6h	24h	48h	72h
Con	0.109 ± 0.009	0.107 ± 0.008	0.254 ± 0.073	0.369 ± 0.052	0.934 ± 0.078
G50	0.112 ± 0.010	0.109 ± 0.008	0.268 ± 0.070	0.360 ± 0.035	0.906 ± 0.049
G75	0.110 ± 0.005	0.103 ± 0.007	0.290 ± 0.049	0.366 ± 0.022	0.915 ± 0.051
G100	0.109 ± 0.006	0.098 ± 0.010	0.295 ± 0.015	0.327 ± 0.029	0.835 ± 0.040 ^a
G125	0.117 ± 0.012	0.108 ± 0.014	0.295 ± 0.047	0.323 ± 0.011	0.776 ± 0.073 ^b

注:与 Con 组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ 。

对照(Con)组、G50 组(葡萄糖终浓度为 50 mmol/L)、G75 组(葡萄糖终浓度为 75 mmol/L)、G100 组(葡萄糖终浓度为 100 mmol/L)及 G125 组(葡萄糖终浓度为 125 mmol/L)。各组 OD 值随着时间延长而升高。72 小时后检测,G100 组与 G125 组 OD 值较 Con 组明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。提示高浓度葡萄糖可抑制 RSC96 细胞增殖活性,见表 1。

2.2 槲皮素减轻高糖对 RSC96 细胞增殖活性的抑制

在终浓度 125 mmol/L 的葡萄糖培养基中加入不同浓度的槲皮素。实验分为 Con 组、高糖(Glu)组、Q10 组(Que 终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$)、Q25 组(Que 终浓度 25 $\mu\text{mol/L}$)、Q50 组(Que 终浓度 50 $\mu\text{mol/L}$)、Q100 组(Que 终浓度 100 $\mu\text{mol/L}$)及 Q200 组(Que 终浓度 200 $\mu\text{mol/L}$)。作用 72 小时后,各治疗组 OD 值均较 Con 组降低,除 Q10 及 Q25 组外,均具有统计学意义($P < 0.01$);Q10 及 Q25 组与 Con 组无明显差异($P > 0.05$)。Q10 与 Q25 组 OD 值较 Glu 组明显升高($P < 0.01$),Q100 与 Q200 组 OD 值较 Glu 组显著降低($P < 0.01$),Q50 组与 Glu 组之间比较无明显差异($P > 0.05$,表 2)。提示槲皮素对高糖培养的 RSC96 细胞的增殖活性呈双向调节作用。低浓度槲皮素可促进

高糖培养 RSC96 细胞的增殖活性,而高浓度槲皮素则抑制高糖培养 RSC96 细胞的增殖活性。

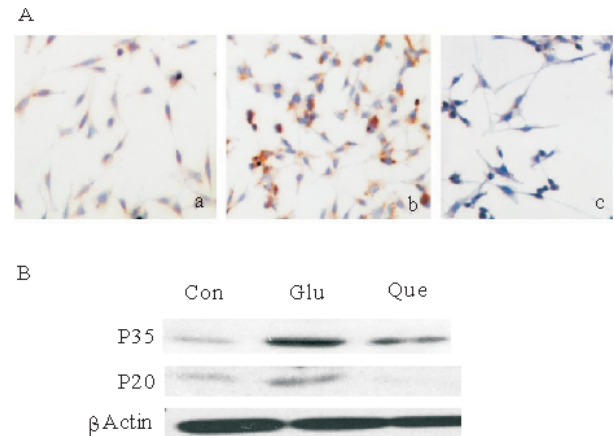
2.3 低浓度槲皮素减少高浓度葡萄糖所致 RSC96 细胞的凋亡

结果显示 Glu 组凋亡率较 Con 组明显升高($P < 0.01$),Que 组(终浓度 25 $\mu\text{mol/L}$)较 Glu 组明显减少($P < 0.01$),与 Con 组比较无明显差异($P > 0.05$,图 1A、表 3)。进一步通过 Western blot 法检测 caspase-9 活化的 P35 亚基和 caspase-3 活化的 P20 亚基的表达(图 1B、表 3)。结果 Glu 组 P35 亚基表达较 Con 组明显增加($P < 0.01$);Que 组活化的 P35 亚基表达较 Glu 组减少($P < 0.05$),与 Con 组比较无统计学差异($P > 0.05$)。Glu 组 P20 亚基表达较 Con 组增加($P < 0.01$),Que 组 P20 亚基表达较 Glu 组减少($P < 0.01$),与 Con 组比较无统计学差异($P > 0.05$)。提示低浓度槲皮素可减少高浓度葡萄糖所致 RSC96 细胞的凋亡。

表 2 不同浓度槲皮素对高糖培养 RSC96 细胞 OD 值的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值
Con	0.983 ± 0.133 ^a
Glu	0.560 ± 0.06 ^b
Q10	0.828 ± 0.080 ^a
Q25	0.821 ± 0.069 ^a
Q50	0.551 ± 0.199 ^b
Q100	0.168 ± 0.02 ^{ab}
Q200	0.083 ± 0.005 ^{ab}

注:与 Glu 组比较^a $P < 0.01$;与 Con 组比较^b $P < 0.01$ 。



A TUNEL 法检测凋亡,a:Con 组,b:Glu 组,c:Que 组($\times 400$ 倍)
B Western blot 法检测 caspase-9 活化的 P35 亚基和 caspase-3 活化的 P20 亚基的表达

图 1 槲皮素对高糖培养 RSC96 凋亡的影响

表 3 槲皮素对高糖培养 RSC96 凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡率(%)	P35/ β -actin	P20/ β -actin
Con	8.45 \pm 3.88 ^b	0.13 \pm 0.02 ^b	0.09 \pm 0.06 ^b
Glu	23.61 \pm 7.57	1.40 \pm 0.19	0.35 \pm 0.08
Que	10.99 \pm 4.03 ^b	0.73 \pm 0.37 ^a	0.04 \pm 0.04 ^b

注:与 Glu 组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ 。

2.4 抑制自噬削弱槲皮素对高糖培养 RSC96 细胞增殖的促进作用

加入自噬抑制剂 3-MA,其中 M0 组(不加入 3-MA)、M1 组(3-MA 终浓度 1 mmol/L)、M2 组(3-MA 终浓度 2 mmol/L)、M5 组(3-MA 终浓度 5 mmol/L)及 M10 组(3-MA 终浓度 10 mmol/L)。作用 72 小时后以 MTT 法检测细胞增殖活性。结果显示,与各组未加 3-MA 时比较,除了加入 1 mmol/L 的 3-MA 外,随着 3-MA 浓度的提高,各组 OD 值明显降低($P < 0.01$)。当加入 1 mmol/L 的 3-MA 时,Glu 组和 Que 组 OD 值均较 Con 组明显减低($P < 0.01$),而 Que 组和 Glu 组相比较,两组 OD 值无明显差异($P > 0.05$)。当加入 2 mmol/L 及以上浓度的 3-MA 时,三组间 OD 值比较均无明显差异($P > 0.05$)。抑制自噬后槲皮素促进高糖培养 RSC96 细胞增殖活性的保护作用随之消失,提示槲皮素的促增殖作用与自噬途径相关,见表 4。

表 4 自噬对高糖培养 RSC96 增殖的影响(OD, $\bar{x} \pm s$)

组别	Con	Glu	Que
M0	0.983 \pm 0.133 ^a	0.560 \pm 0.062 ^b	0.821 \pm 0.069 ^{ab}
M1	0.800 \pm 0.097	0.619 \pm 0.071 ^b	0.557 \pm 0.118 ^{bc}
M2	0.332 \pm 0.061 ^c	0.329 \pm 0.025 ^c	0.370 \pm 0.060 ^c
M5	0.115 \pm 0.009 ^c	0.116 \pm 0.015 ^c	0.097 \pm 0.011 ^c
M10	0.100 \pm 0.018 ^c	0.092 \pm 0.012 ^c	0.089 \pm 0.010 ^c

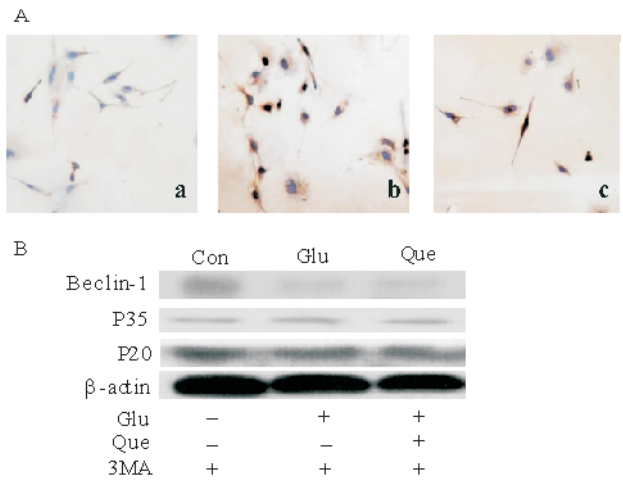
注:与相同 3-MA 浓度条件下的 Glu 组比较,^a $P < 0.01$;与相同 3-MA 浓度条件下的 Con 组比较,^b $P < 0.01$;与各自组未加入 3-MA 时比较,^c $P < 0.01$ 。

表 5 自噬对高糖培养 RSC96 凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡率(%)	P35/ β -actin	P20/ β -actin	Beclin1/ β -actin
Con	25.35 \pm 20.61	0.07 \pm 0.08	0.53 \pm 0.31	0.07 \pm 0.04
Glu	46.78 \pm 37.62	0.06 \pm 0.07	0.83 \pm 0.57	0.03 \pm 0.01
Que	39.97 \pm 30.98	0.06 \pm 0.07	0.71 \pm 0.45	0.02 \pm 0.01

2.5 抑制自噬削弱槲皮素减少高糖培养 RSC96 细胞凋亡的作用

加入 10 mmol/L 的 3-MA 后光学显微镜可见各组 RSC96 细胞数量均明显减少,胞体肿胀明显,所剩细胞胞核多呈染色阳性表现;半定量分析,各组间凋亡率比较无明显差异($P > 0.05$,图 2A,表 5)。加入 1 mmol/L 的 3-MA 后,自噬相关蛋白 Beclin1、P35 亚基和 P20 亚基的表达在三组间比较无明显差异($P > 0.05$,图 2B,表 5)。提示槲皮素减轻高糖培养 RSC96 细胞凋亡的作用可能与自噬有关。



A TUNEL 法检测凋亡,a:Con 组,b:Glu 组,c:Que 组($\times 400$ 倍)
B Western blot 法检测 Beclin1、P35、P20 的表达

图 2 自噬对高糖培养 RSC96 凋亡的影响

3 讨论

槲皮素广泛存在于中药和食物中,具有抗氧化应激损伤、抗癌、抗炎、降糖、降压、免疫调节等多种保护作用。糖尿病周围神经病变尚缺乏有效治疗手段,有学者发现槲皮素可减少高浓度葡萄糖对神经细胞增殖活性的抑制,减少氧化应激损伤,并可通过诱导自噬而减少凋亡^[3-5]。本研究通过离体培养 RSC96 细胞作为模型进一步探讨槲皮素在高浓度葡萄糖致雪旺细胞损伤中的保护作用机制。

本实验首先采用 MTT 法检测细胞增殖活性,结果发现随着葡萄糖浓度的提高,RSC96 细胞增殖活性降低。此与既往在高浓度葡萄糖环境下原代培养雪旺细胞的研究结果相似^[6-8],进而检测了不同浓度的槲皮素对高浓度葡萄糖培养的 RSC96 细胞增殖活性的影响,结果提示槲皮素对细胞增殖活性具有双向作用,即低浓度的槲皮素可减轻高浓度葡萄糖对雪旺细胞增殖活性的抑制作用;与之相反,高浓度的槲皮素则加剧了高浓度葡萄糖对雪旺细胞增殖活性的抑制作用。

高浓度葡萄糖对雪旺细胞的损伤作用还体现在增加原代培养雪旺细胞的凋亡方面^[6, 9-11],有文献报道槲皮素可通过诱导自噬而减少凋亡^[3-5]。因此,本研究观察了低浓度槲皮素对高糖环境下 RSC96 细胞凋亡的影响,结果表明高浓度葡萄糖可增加细胞凋亡,低浓度槲皮素则可减少高糖条件下细胞的凋亡。

Becn1 基因也称 becn1 基因,参与自噬体形成的启动过程,可对细胞自噬活性进行动态监测和判断^[12]。3-甲基腺嘌呤(3-MA)是目前最常用的自噬抑制剂^[13]。笔者发现加入 3-MA 后各组 RSC96 细胞增殖活性降低,槲皮素改善高糖培养细胞增殖的作用消失。同时,当自噬被抑制后各组细胞数量稀少,细胞死亡增多,槲皮素抗凋亡的作用也随之消失。以上结果不但提示低浓度槲皮素缓解高糖培养致 RSC96 细胞增殖活性减低的作用可能与自噬途径有关,而且表明自噬途径可能也参与了低浓度槲皮素抗凋亡的调节。

综上所述,笔者认为,槲皮素可能通过自噬途径增加高糖培养雪旺细胞的增殖活性、减少细胞凋亡。但是现有研究尚不能完全揭示自噬的分子机制、信号转导途径及其在高糖毒性中具体的病理生理学作

用。在今后的工作中可进一步通过在体研究印证自噬对糖尿病周围神经病变的影响及槲皮素的保护作用。

参 考 文 献

- [1] 张翔,梁晓春. 补肾活血法治疗糖尿病周围神经病变的研究进展[J]. 环球中医药,2014,7(6):492-496.
- [2] 孙朦朦,刘苇苇,倪青,等. 单味中药治疗糖尿病周围神经病变研究进展[J]. 环球中医药,2013,6(2):143-146.
- [3] Shi Y, Liang XC, Zhang H, et al. Quercetin protects rat dorsal root ganglion neurons against high glucose-induced injury in vitro through Nrf-2/HO-1 activation and NF- κ B inhibition[J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34(9):1140-1148.
- [4] Wang K, Liu R, Li J, et al. Quercetin induces protective autophagy in gastric cancer cells; involvement of Akt-mTOR and hypoxia-induced factor 1 α -mediated signaling[J]. Autophagy, 2011, 7(9):966-978.
- [5] Harris CS, Asim M, Saleem A, et al. Characterizing the cytoprotective activity of *Sarracenia purpurea* L., a medicinal plant that inhibits glucotoxicity in PC12 cells[J]. BMC Complement Altern Med, 2012, (12):245.
- [6] Sun LQ, Chen YY, Wang X, et al. The protective effect of alpha lipoic acid on Schwann cells exposed to constant or intermittent high glucose[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 84(7):961-973.
- [7] Qu L, Liang XC, Zhang H, et al. Effect of Jinmaitong with Medicated Serum on Proliferation of Rat Schwann Cells Cultured in High Glucose Medium[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2008, 14(4):293-297.
- [8] Qu L, Liang X, Gu B, et al. Quercetin alleviates high glucose-induced Schwann cell damage by autophagy[J]. Neural Regen Res, 2014, 9(12):1195-1203.
- [9] Sun LQ, Xue B, Li XJ, et al. Inhibitory effects of salvianolic acid B on apoptosis of Schwann cells and its mechanism induced by intermittent high glucose[J]. Life Sci, 2012;90(3-4):99-108.
- [10] Sun LQ, Zhao J, Zhang TT, et al. Protective effects of Salvianolic acid B on Schwann cells apoptosis induced by high glucose[J]. Neurochem Res, 2012, 37(5):996-1010.
- [11] 朴元林,梁晓春,赵丽,等. 筋脉通含药血清对高糖培养施万细胞 8-羟基脱氧鸟苷和活化的 caspase-3 表达的影响[J]. 医学研究杂志, 2011, 40(10):35-39.
- [12] Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy[J]. Autophagy, 2012, 8(4):445-544.
- [13] Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy[J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(9):814-822.

(收稿日期:2015-01-26)

(本文编辑:董历华)