

## EGCG 恢复 Sirt-1 拮抗高糖诱导的 PC12 细胞凋亡

袁 晖 朱明亮 闫国防

( 中国人民解放军第一六九医院 神经外科 湖南 衡阳 421000)

**【摘要】**目的: 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯( EGCG) 对高糖诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用及 Sirt-1 的介导机制。方法: CCK-8 法检测 PC12 细胞活力; ELISA 法检测 Bcl-2 的活性; 免疫荧光法检测 Caspase-3 在胞质的活性及胞核内 DAPI 的表达; WB 检测 Sirt-1 的表达。结果: 高浓度的葡萄糖( 15、30、45 mmol/L) 诱导了 PC12 细胞的损伤, 细胞活性较对照组分别下降了 14%、32% 及 57% , 凋亡保护蛋白 Bcl-2 的表达较对照组下降了 8%、30% 及 35%; EGCG( 10、20、40 μmol/L) 对高糖诱导的 PC12 细胞凋亡提供了保护作用, 细胞活性较高糖损伤组分别提升了 2%、20% 及 24% , Bcl-2 的表达提升了 10%、22% 和 25%; 阻断 Sirt-1 通路逆转了 EGCG 提供的保护作用, 同时加入阻断剂组的细胞活性较 EGCG 保护组下降了 8% , Bcl-2 的表达下降了 16%。结论: EGCG 通过恢复 Sirt-1 活性拮抗高糖诱导的 PC12 细胞的凋亡。

**【关键词】**高糖; 表没食子儿茶素没食子酸酯; Sirtuin1 基因; 细胞凋亡; PC12 细胞

**【中图分类号】**R 392.12; R 285 **【文献标志码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2019.01.004

## Epigallocatechin gallate antagonizing high glucose-induce apoptosis via regulating Sirt-1 expression in PC12 cells

YUAN Hui ZHU Mingliang YAN Guofang

Department of Neurosurgery ,The 169<sup>th</sup> Hospital of Chinese People’s Liberation Army ,Hengyan 421000 ,China

**【Abstract】Objective:** To observe the protective effect of epigallocatechin gallate( EGCG) on PC12 cells from high glucose-induced apoptosis by regulation of Sirt-1.**Methods:** CCK-8 assay was performed to detect PC12 cell viability.ELISA was used to determine Bcl-2 expression ,and immol/Lunofluorescence to detect the expression of Caspase-3 and DAPI.Western blotting was performed to determine Sirt-1 expression.**Results:** High-glucose dose( 15 ,30 and 45 mmol/L ,respectively) induced apoptosis of PC12 cells.The cell viability and Bcl-2 expression were reduced by 14% ,32% and 57%; and by 8% ,30% and 35% ,respectively ,compared to the control group.Contrarily ,EGCG in dose of 10 ,20 and 40 μmol/L was able to produce protective effects on PC12 cells ,leading to increased cell activity by 2% ,20% and 24%; and up-regulated Bcl-2 expression by 10% ,22% and 25% ,respectively ,as compared with the injury group.Blocking of Sirt-1 reversed the protective effect of EGCG ,and the cell viability and Bcl-2 expression were decreased by 8% and by 16% following treatment of blocking agent compared to EGCG protection group.**Conclusion:** EGCG can antagonize high glucose-induce apoptosis by up-regulating Sirt-1 in PC12 cells.

**【Key words】**high glucose; EGCG; Sirt-1; apoptosis; PC12 cells

高糖微环境会导致神经细胞的病理生理变化, 如自噬, 内质网应激<sup>[1]</sup>等, 诱导神经细胞凋亡, 导致神经系统中枢性及周围性病变, 危害人类的健康。表没食子儿茶素没食子酸酯( epigallocatechin gallate ,EGCG) 是绿茶中提取的多酚的活性成分, 对细胞具有保护作用, 如缓解氧化应激<sup>[2]</sup>, 抑制脂质聚集, 减轻自噬<sup>[3]</sup>等, 在神经系统化方面, 在促进神经

细胞修复, 抗炎等方面具有积极的作用。

Sirt-1 是依赖于 NAD<sup>+</sup>的组蛋白去乙酰化酶, 在生物体中广泛存在并调节细胞的存活。Nagar 等发现 Sirt-1 能够介导因氧化应激引起的细胞损伤的保护作用<sup>[4]</sup>; 在神经研究方面, Sirt-1 能够介导缺血再灌注脑损伤的神经保护作用<sup>[5]</sup>, 因此, 我们联想到, EGCG 发挥对神经细胞凋亡的保护作用, Sirt-1 是否

收稿日期: 2018-01-22

作者简介: 袁 晖( 1981-) 男, 主治医师, ( 电话) 15873432575 ( 电子信箱) 2515629805@qq.com。

参与其中。我们实验发现,EGCG对高糖诱导的神经细胞的损伤提供了一定的保护作用,Sirt-1介导其中。这些研究结果为糖尿病神经细胞损伤的药物研究提供了思路,现报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 细胞培养方法 PC12细胞的培养使用DMEM(Hyclone)培养基加入10%胎牛血清(Gibico),于27℃,5%CO<sub>2</sub>恒温培养箱中孵育维持。取对数期细胞根据实验需要种植于6、24及96孔的实验板(Corning)中进行培养、观察及提取蛋白。

1.2 Cell Counting Kit-8(CCK-8)检测PC12细胞的活性 取对数期细胞种植于96孔板,待细胞密度约75%时加入相应浓度的药物处理细胞,每一浓度至少3个实验样本,孵育24h后,试验孔内加入10 μL的CCK-8试剂(Solarbio),孵育2h,使用酶标检测仪450 nm观察OD数值,并统计分析。

1.3 ELISA法检测Bcl-2的表达活性 取对数期细胞加入对应浓度的药物处理细胞24h,提取细胞蛋白并定量。按照ELISA试剂盒(Invitrogen)中的说明书配置试剂:以每孔100 μL将细胞蛋白加入酶标板内,覆膜于摇床上室温进行3h孵育,除去酶标板内液体使用1×洗涤液清洗2次,每孔加入1×活性液200 μL,酶标检测仪450 nm观察OD数值,并统计分析。

1.4 免疫荧光检测细胞胞质Caspase-3及胞核DAPI的表达 对数期细胞种植于24孔板,待细胞密度约75%时加入对应浓度的药物,孵育24h,PBS清洗1次,冰甲醇固定10 min。加入Caspase-3一抗(Abcam),室温孵育1h;PBS清洗2次,加入荧光二抗(Solarbio)室温避光孵育1h;PBST清洗1次,加入DAPI,室温孵育2 min。荧光显微镜10×40倍率观察并拍照。

1.5 Western-Blot法检测Sirt-1的表达 取对数期细胞加入对应浓度的药物处理24h,提取细胞蛋白并定量。使用凝胶进行蛋白电泳,PVDF膜采用半干法转膜30 min;TBST加入5%脱脂奶粉常温封闭2h,加入Sirt-1一抗(Abcam)封闭孵育12h,TBST清洗3次,加入二抗(Cell Signaling)摇床孵育2h,TBST清洗3次后使用成像仪显影。

1.6 统计分析 采用SPSS 18.0进行统计分析,数

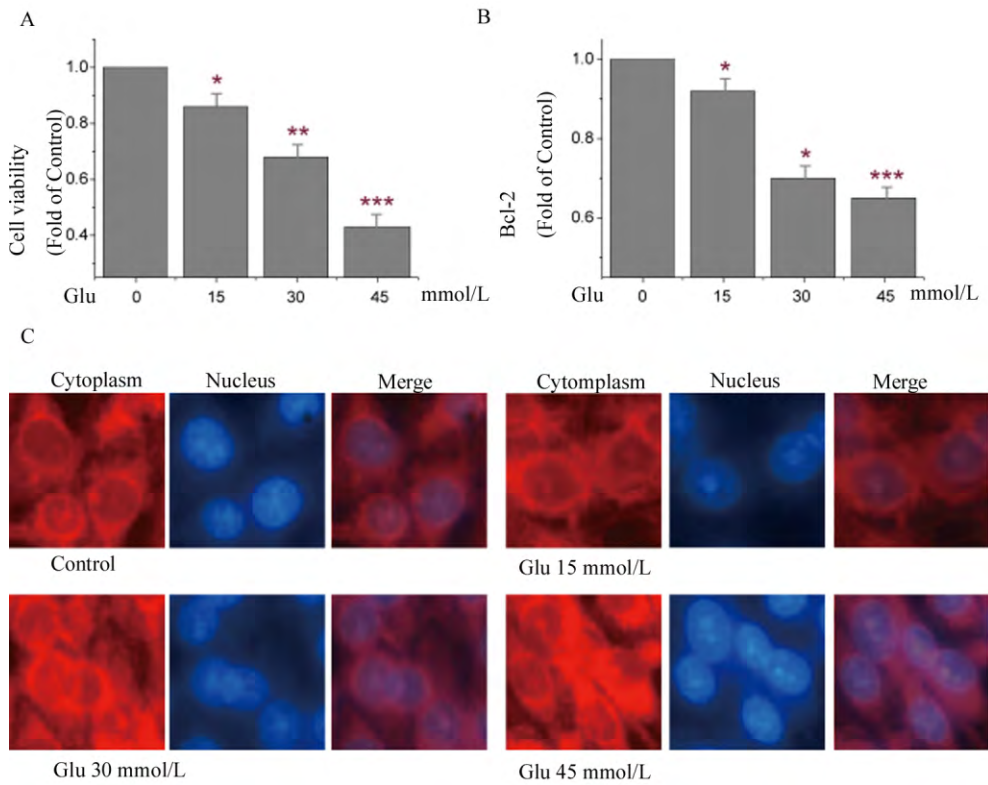
据采用平均数±标准差表示,组间差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA)中的最小显著差异检验(LSD-test), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 高浓度葡萄糖诱导PC12细胞的凋亡 使用不同浓度的葡萄糖(15、30、45 mmol/L)处理PC12细胞24h,结果发现,PC12细胞的活性随葡萄糖给予浓度的递增而下降(图1A, $F=2.36$ , $P<0.05$ ),较对照组分别下降了14%、32%及57%;使用ELISA法检测了Bcl-2的表达,由图1B可见,具有抑制凋亡作用的Bcl-2蛋白的表达呈现了同样的趋势(图1B, $F=11.05$ , $P<0.05$ ),较对照组分别下降了8%、30%及35%;为了更直观地观察细胞凋亡的发生,我们采用免疫荧光观察细胞质中凋亡蛋白家族的成员Cleaved-Caspase3的表达活性,由图1C中红色荧光染色的Cleaved-Caspase3可以观察到,葡萄糖处理后的PC12细胞的胞质中,红色荧光聚集密度较对照组有明显增加,与处理浓度呈现一定的相关性。此外,我们使用DAPI对细胞核进行了染色,葡萄糖损伤组的荧光强度增高,以上表明,高浓度葡萄糖对PC12细胞造成了明确的损伤。

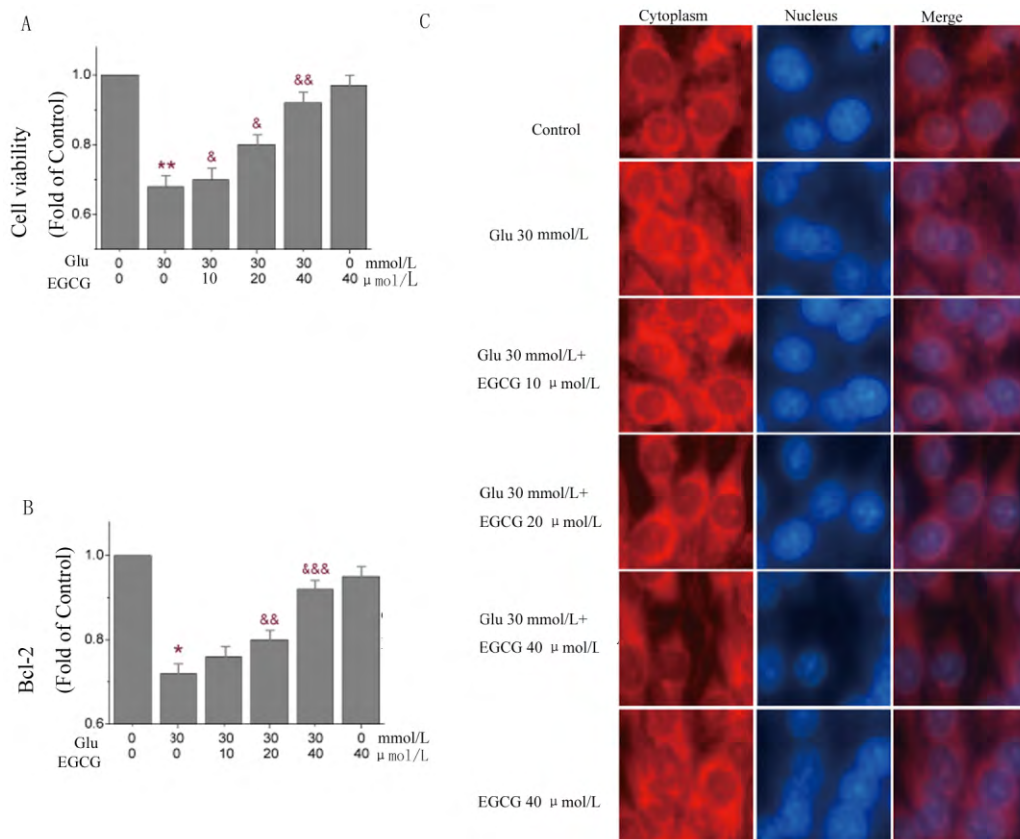
2.2 EGCG保护高糖诱导的PC12细胞的凋亡 与葡萄糖30 mmol/L损伤组相比,加入EGCG(10、20、40 μmol/L)对细胞活力提升具有积极的作用,细胞活性较损伤组分别提升了2%、20%及24%,细胞活力的提升率与EGCG浓度呈现正相关(图2A, $F=1.98$ , $P<0.05$ ),而单独使用EGCG对PC12细胞活力无明显影响;加入EGCG处理后,Bcl-2的表达分别提升了10%、22%和25%,20 μmol/L浓度以上的EGCG对Bcl-2的表达具有明确的统计学意义(图2B, $F=23.67$ , $P<0.01$ );由图2C可以观察到,胞质中红色荧光染色的Cleaved-Caspase3在加入EGCG保护组中的荧光强度和密度,相比较损伤组有一定程度的减弱。以上结果表明,EGCG对高糖诱导的细胞损伤具有保护作用。

2.3 EGCG拮抗高糖对Sirt-1表达的抑制 与对照组相比,葡萄糖损伤组抑制了Sirt-1的表达,加入EGCG后则一定程度恢复了Sirt-1的表达,单独使用EGCG则对Sirt-1表达影响的差异无统计学意义(图3, $F=14.71$ , $P<0.01$ )。



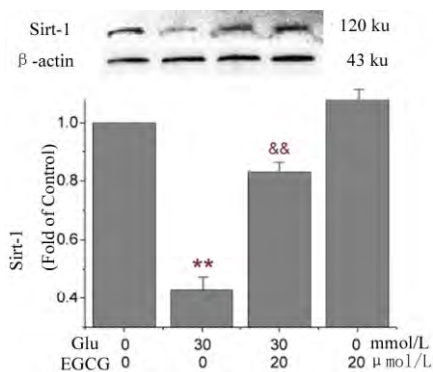
A.CCK-8 检测 PC12 细胞活力; B.ELISA 法检测 Bcl-2 的表达; C.免疫荧光观察胞核内 Cleaved-Caspase3 表达活性 观察胞核中 DAPI 的表达。  
\*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  *vs.* 对照组。

图1 高浓度葡萄糖诱导 PC12 细胞的凋亡



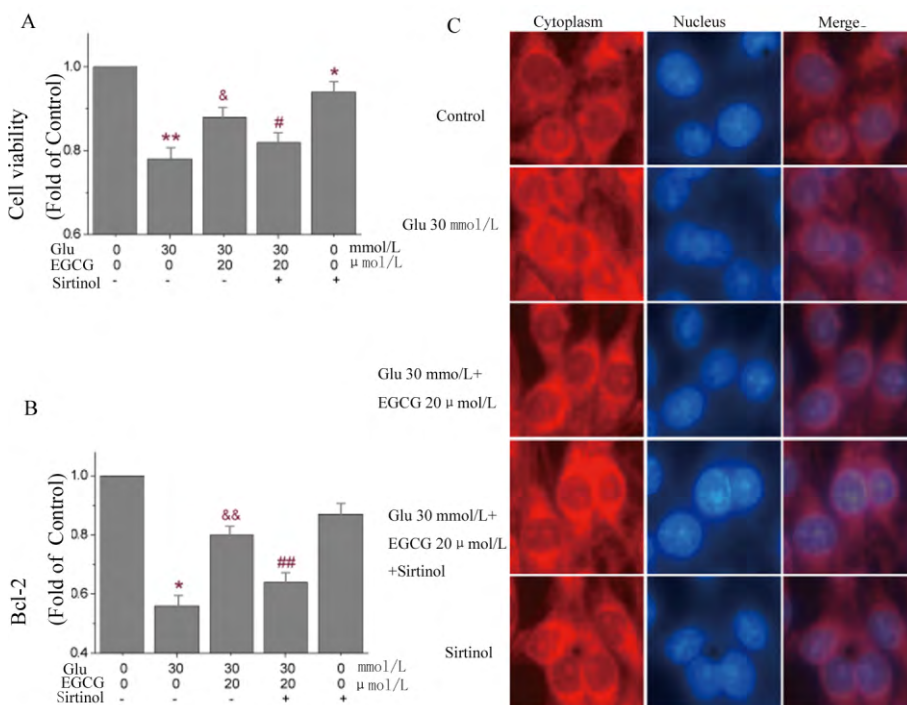
A.CCK-8 检测 PC12 细胞活力; B.ELISA 法检测 Bcl-2 的表达; C.免疫荧光观察胞核内 Cleaved-Caspase3 表达活性 观察胞核中 DAPI 的表达。  
\*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.01$  *vs.* 对照组; &&& $P < 0.001$  && $P < 0.01$  & $P < 0.05$  *vs.* 葡萄糖损伤组( Glu 30 mmol/L)。

图2 EGCG 保护高糖诱导的 PC12 细胞的凋亡



Western-Blot 法检测 Sirt-1 的表达, \*\* $P < 0.01$   $\mu$ s. 对照组; && $P < 0.01$   $\mu$ s. 葡萄糖损伤组( Glu 30 mmol/L)。

图 3 EGCG 拮抗高糖对 Sirt-1 表达的抑制



A.CCK-8 检测 PC12 细胞活力; B.ELISA 法检测 Bcl-2 的表达; C.免疫荧光观察胞核内 Cleaved-Caspase3 表达活性 观察胞核中 DAPI 的表达。 \*\* $P < 0.001$  \*  $P < 0.01$   $\mu$ s. 对照组; && $P < 0.01$  & $P < 0.05$   $\mu$ s. 葡萄糖损伤组( Glu 30 mmol/L); ## $P < 0.01$  # $P < 0.05$   $\mu$ s. EGCG 保护组( Glu 30 mmol/L+ EGCG 20  $\mu$ mol/L)。

图 4 Sirt-1 阻断剂 Sirtinol 逆转了 EGCG 对 PC12 细胞的保护作用

### 3 讨论

相关实验证实,持续的高糖微环境会导致神经细胞的凋亡,出现一系列神经细胞损伤引起的并发症,危害人们的健康及生存质量。因此寻求高糖环境下神经细胞的保护作用并改善损伤显得尤为重要。为此,我们通过实验发现:EGCG 对高糖诱导的神经细胞损伤提供了较为积极的保护作用,Sirt-1 介导了这种保护作用。

EGCG 是绿茶多酚的活性成分,既往研究表明其具有强大的抗氧化作用<sup>[2]</sup>,保护细胞的 DNA 免受损害,同时在心脑血管、神经保护方面发挥了积极的

2.4 Sirt-1 阻断剂 Sirtinol 逆转了 EGCG 对 PC12 细胞的保护作用 通过预实验发现浓度为 15  $\mu$ mol/L 的 Sirtinol 在不明显损伤细胞的同时能对 Sirt-1 发挥较好的阻断作用。由图 4 可以得知,加入 Sirtinol 与 EGCG 同时处理组的细胞活性较 EGCG 保护组下降了 8% ( $F = 1.59$ ,  $P < 0.05$ ),Bcl-2 的表达下降了 16% ( $F = 37.96$ ,  $P < 0.01$ ); Cleaved-Caspase3 在胞质中的荧光强度也出现了对应的增高,提示 Sirt-1 介导了 EGCG 对 PC12 细胞的保护作用。

作用 机制涉及抗氧化应激,抑制内质网应激<sup>[1]</sup>等;此外,还有研究表明,EGCG 具有抗病毒<sup>[6]</sup>、抗炎、抑制肿瘤<sup>[7]</sup>等功效,机制涉及抑制肿瘤相关酶的活性从而抑制增殖,诱导癌细胞凋亡等。

为明确高糖微环境对神经细胞的损伤及 EGCG 提供的保护作用,我们使用 PC12 细胞模拟神经细胞,PC12 来源于小鼠嗜铬细胞瘤,具有类神经细胞的生物特性及分泌能力,是神经病理生理研究公认的理想实验对象<sup>[8]</sup>。我们采用不同浓度的葡萄糖(15、30、45 mmol/L)处理 PC12 细胞,通过检测细胞活力,凋亡保护蛋白 Bcl-2 的表达客观评估细胞

的存活情况; Caspase3 在胞质内被磷酸化,活化后的 Caspase3 通过对 DNA 修复酶的剪切启动细胞的凋亡程序,是公认为评估凋亡的可靠指标<sup>[9]</sup>,我们采用免疫荧光法分别标记胞质内活化的 Caspase3 以及胞核内 DAPI 的表达,以直观地感受细胞凋亡发生时,凋亡相关指标的表达强度。结果表明高糖微环境诱导了神经细胞的凋亡。接下来,我们通过加入 EGCG,并与损伤组相比较来评估其提供的神经细胞保护作用,同样通过检测凋亡相关指标,我们发现 EGCG 对高糖诱导的神经细胞凋亡提供了较为可观的保护作用,与我们的预期相一致。

此外,我们进一步探讨了 Sirt-1 在细胞保护中的介导作用。Sirt-1 被许多科学家称为“长寿基因”,正是由于其参与了细胞的分化、代谢,进而调节细胞寿命,并决定了细胞的存活<sup>[10]</sup>。有研究证实: Sirt-1 在许多神经退行性变中扮演了保护者的角色<sup>[11]</sup>。在我们的实验中,我们发现 EGCG 不仅具有提升 Sirt-1 的表达、逆转高糖对 Sirt-1 的抑制作用,而且使用 Sirt-1 特异性阻滞剂 Sirtinol 后,EGCG 的保护作用被逆转,这些都表明, Sirt-1 介导了 EGCG 对 PC12 细胞的保护作用。此外,单独使用 Sirtinol 对细胞活力也产生了轻微的抑制作用,具有统计学意义,提示 Sirt-1 可能还通过其他通路介导和发挥了细胞的保护作用。然而,EGCG 对高糖诱导的神经细胞的损伤的更深入的机制,以及其他应激及保护方面的研究仍需进一步探索。

通过实验,我们证实 EGCG 能够通过 Sirt-1 的介导从而提供对高糖诱导的 PC12 细胞的保护作用,这为高糖诱导的神经系统病变提供了新的思路。基于我们的研究,运用 EGCG 为神经病变提供保护或许是新的策略与方法,也为神经系统病变的治疗提供了新的视角。

**【参考文献】**

[1] XIANG C ,XIAO X ,JIANG B ,et al.Epigallocatechin3gallate protects from high glucose induced podocyte apoptosis via suppressing endoplasmic reticulum stress [J]. Molecular Medicine Reports ,

2017 ( 6) : 1791-2997.  
 [2] OTHMAN AI ,EL-SAWI MR ,EL-MISSIRY MA ,et al.Epigallocatechin-3-gallate protects against diabetic cardiomyopathy through modulating the cardiometabolic risk factors ,oxidative stress ,inflammol/Lation ,cell death and fibrosis in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats [J].Biomedicine & Pharmacotherapy ,2017 ( 94) : 362-373.  
 [3] TAKAHASHI H ,SUZUKI Y ,MOHAMED JS ,et al.Epigallocatechin-3-gallate increases autophagy signaling in resting and unloaded plantaris muscles but selectively suppresses autophagy protein abundance in reloaded muscles of aged rats [J].Experimental Gerontology ,2017( 92) : 56-66.  
 [4] NAGAR H ,JUNG SB ,RYU MJ ,et al.CR6-interacting factor 1 deficiency impairs vascular function by inhibiting the sirt1-endothelial nitric oxide synthase pathway [J].Antioxidants & Redox Signaling ,2017 27( 4) : 234-249.  
 [5] LU H ,WANG B.SIRT1 exerts neuroprotective effects by attenuating cerebral ischemia/reperfusion-induced injury via targeting p53/microRNA-22 [J]. International Journal of Molecular Medicine ,2017 39( 1) : 208-216.  
 [6] VAZQUEZ-CALVO A ,JIMENEZ DE OYA N ,MARTIN-ACEBES MA ,et al.Antiviral properties of the natural polyphenols delphinidin and epigallocatechin gallate against the flaviviruses west nile virus [J].Zika Virus and Dengue Virus.Frontiers in Microbiology , 2017( 8) : 1314.  
 [7] HALLMAN K ,ALECK K ,QUIGLEY M ,et al.The regulation of steroid receptors by epigallocatechin-3-gallate in breast cancer cells [J].Breast Cancer ( Dove Medical Press) ,2017( 9) : 365-373.  
 [8] DE LOS RIOS C ,CANO-ABAD MF ,VILLARROYA M ,et al.Chromaffin cells as a model to evaluate mechanisms of cell death and neuroprotective compounds [J].Pflugers Archiv: European Journal of Physiology ,2018 470( 1) : 187-198.  
 [9] SAVITSKAYA MA ,ONISHCHENK GE.Mechanisms of Apoptosis [J].Biochemistry Biokhimiia ,2015 80( 11) : 1393-1405.  
 [10] RAHMAN M ,HALADE GV ,BHATTACHARYA A ,et al.The fat-1 transgene in mice increases antioxidant potential ,reduces pro-inflammatory/Latory cytokine levels ,and enhances PPAR-gammol/La and SIRT-1 expression on a calorie restricted diet [J].Oxidative Medicine and Cellular Longevity ,2009 2( 5) : 307-316.  
 [11] SCHEIBYE-KNUDSEN M.Neurodegeneration in accelerated aging [J].Danish Medical Journal ,2016 ( 11) : 63.