

二氢杨梅素通过下调 JNK 信号拮抗高糖诱导的 PC12 细胞凋亡*

吕慧婕^{1)**} 朱贵梅^{1,2)**} 陈维昭³⁾ 何剑琴¹⁾ 杨丝丝¹⁾
张恺芳¹⁾ 奉水东⁴⁾ 凌宏艳^{1)***}

¹⁾ 南华大学生理学教研室, 衡阳 421001; ²⁾ 常德职业技术学院医学系, 常德 415003;

³⁾ 南华大学 2015 级卓越医生 1 班, 衡阳 421001; ⁴⁾ 南华大学社会医学与卫生管理教研室, 衡阳 421001)

摘要 本文探讨二氢杨梅素(dihydromyricetin, DHM)是否通过下调 JNK 信号拮抗高糖诱导的 PC12 细胞凋亡. 使用四甲基偶氮唑盐法(MTT)检测 PC12 细胞活力; 流式细胞仪检测 PC12 细胞早、晚期凋亡及死亡细胞率; Hoechst 33258 染色观察凋亡细胞核变化; 蛋白质印迹法(Western blotting)检测 PC12 细胞凋亡相关蛋白(Bax、Bcl-2、cleaved-Caspase-3)和 p-JNK 蛋白的表达. 结果发现, 不同浓度的葡萄糖(4.5、9.0、13.5、18.0 g/L)分别处理 PC12 细胞 24、48、72、96 h 后, 发现浓度为 13.5 g/L 的高糖处理 PC12 细胞 72 h 可明显改变细胞形态、降低细胞活力、增加细胞凋亡率, 同时促凋亡蛋白(Bax、Caspase-3)表达增加、抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低, 提示: 长时间高糖处理可诱导 PC12 细胞凋亡. DHM(15 μ mol/L)预处理能明显改善高糖诱导的 PC12 细胞凋亡, 降低高糖诱导的 PC12 细胞中 JNK 和 p-JNK 蛋白的表达; 进一步用 JNK 激动剂(茴香毒素)处理能取消 DHM 对高糖诱导 PC12 细胞凋亡的保护作用. 综上, 得出结论: DHM 通过下调 JNK 信号拮抗高糖诱导的 PC12 细胞凋亡.

关键词 二氢杨梅素, 高糖, PC12 细胞凋亡, JNK 信号

学科分类号 R587, R742

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0477

二氢杨梅素(dihydromyricetin, DHM)为一种含多酚羟基双氢黄酮类化合物, 由葡萄科植物藤茶中提取所得, 因而又名葡萄素^[1]. 文献报道 DHM 具有抗炎、抗氧化、抑制神经元损伤、保护中枢神经系统(central nervous system, CNS)的作用^[2]. 研究发现糖尿病状态下, c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)高表达, 且 JNK 可介导大鼠海马神经元的凋亡. 文献报道高糖高脂饮食所致的代谢异常及炎症的发生与 JNK 信号息息相关, 且 JNK 抑制剂能治疗中枢神经系统损伤^[3]. 另有文献报道, DHM 在改善小鼠肝细胞损伤^[4]、促进癌细胞凋亡^[5]等作用中都与 JNK 信号有关. 基于文献报道, 我们猜想 DHM 是否可通过抑制 JNK 信号拮抗高糖诱导的 PC12 神经细胞凋亡?

1 材料与方法

1.1 试剂

二氢杨梅素(DHM)、JNK 抑制剂(SP600125)和

茴香毒素购于美国 Sigma 公司; 四甲基偶氮唑盐(MTT)、抗 Bcl-2 和抗 Caspase-3 抗体购于上海碧云天生物有限公司; 抗 JNK、抗 p-JNK 和抗 β -actin 抗体购于 Abcam 公司; Hoechst 33258 染色液购于上海哈灵生物科技有限公司; Annexin-V 凋亡检测试剂盒购于中国杭州四季青有限公司.

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

将 PC12 细胞放于 H-DMEM+10%胎牛血清 + 1%青霉素 - 链霉素的培养基中进行培养, 在 37°C、含 5% CO₂ 的培养箱中孵育, 待细胞生长至 80%进

* 湖南省自然科学基金(2018JJ2347), 湖南教育厅基金(16C1411)和衡阳市科技局基金(2016KJ64)资助.

** 并列第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 0734-8281389, E-mail: linghongyan0203@126.com

收稿日期: 2017-12-31, 接受日期: 2018-03-21

行传代.

1.2.2 MTT 检测

将 PC12 细胞按 3×10^3 个接种于 96 孔板中, 每孔体积 100 μl . 至细胞生长单层铺满 96 孔平底板约 60% 时加入不同浓度的葡萄糖(4.5、9.0、13.5、18.0 g/L)分别处理 24、48、72、96 h 后弃培养液, 加入新鲜培养液 180 μl 置培养箱中孵育 0.5 h 后取出, 每孔加入 0.5% MTT 溶液 20 μl . 4 h 后终止培养, 然后把培养液倒尽吸干, 每孔加入 150 μl 二甲亚砜, 用锡箔纸包裹避光, 置摇床上低速振荡 15 min, 在酶标仪上选定 490 nm 波长, 测出各孔的吸光值(A 值).

1.2.3 Hoechst 染色法

分别用 HG, DHM(15 $\mu\text{mol/L}$), HG+DHM 处理 PC12 细胞 7 h, 在 24 孔板中均匀接种上述 3 组及正常对照组的 PC12 细胞, 用 PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次, 并置摇床上缓慢洗涤. 再加入 Hoechst 33258 染色液(每孔 100~200 μl), 用锡箔纸包裹避光, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中静置 15 min 左右. 再用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 3 min, 水分干后将 24 孔板放置荧光显微镜上进行拍片观察.

1.2.4 Annexin V/PI 染色检测细胞凋亡

将 PC12 在不同葡萄糖浓度 (4.5、9.0、13.5、18.0 g/L) 下培养 72 h, 收集细胞, 获得样品. 将样品 1 000 r/min, 离心 5 min, 弃上清, 用 PBS 磷酸平衡液轻轻重悬细胞然后计数. 再取 5~10 万个重悬的细胞, 在 1 000 r/min 的离心机中离心 5 min, 弃上清, 加入 195 μl Annexin V-FITC 结合液并且轻轻地重悬细胞. 接着加入 5 μl Annexin V-FITC, 铝箔纸避光 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境孵育 15 min. 再加 5 μl 碘化丙啶染色液, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内避光孵育 5 min, 同时用没加 Annexin V-FITC 和 PI 的一管作为阴性对照组, 最后进行流式细胞仪检测. 接着将 PC12 细胞分为 4 组培养 72 h, 分别是对照组(4.5 g/L 葡萄糖)、HG 组(13.5 g/L 葡萄糖)、DHM(15 $\mu\text{mol/L}$), HG + DHM 组, 然后收集细胞, 按同样的步骤进行流式细胞仪检测细胞凋亡.

1.2.5 蛋白质免疫印迹法

提取各组细胞蛋白进行蛋白质定量后, 取蛋白质样品 30 μl 进行 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭、加入抗 Bax、Bcl-2 及 cleaved Caspase-3 抗体孵育, 洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的二抗、孵育、

充分洗涤后与电化学发光 (electro-chemiluminescence, ECL) 化学发光试剂反应, 曝光后扫描, 用图像分析.

1.3 统计学分析

用专业软件 SPSS 20.0 进行统计, 所有实验数据用单因素方差分析 (ANOVA)、两两比较 (LSD-L), 用平均数 \pm 标准误差 ($\bar{x} \pm s$) 表示.

2 结 果

2.1 高糖诱导 PC12 细胞凋亡

经 MTT 法检测结果分析细胞活力, 显示: 同一处理浓度下, 随着时间的延长(24、48、72 h), 细胞活力逐渐增加且 72 h 时较显著, 96 h 后无明显变化, 而在相同培养时间的情况下, 处理浓度越高细胞活力各不一样, 24 h 内各处理浓度对细胞活力影响不大, 48 h 后较高浓度处理的细胞活力呈下降趋势, 72 h 后显著性下降且 13.5 g/L 时开始明显下降(图 1). 流式细胞仪检测结果显示, 随着葡萄糖浓度的增加, PC12 细胞早期和晚期凋亡的比率依次增高, 13.5 和 18 g/L 葡萄糖浓度的凋亡率和对对照组相比有显著性差异, 且葡萄糖浓度为 18 g/L 时细胞坏死比例明显增加(图 2). 蛋白质印迹法 (Western blotting) 结果显示: 随着葡萄糖浓度的增加, 细胞内促凋亡蛋白 Bax 的表达明显升高, 而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达明显降低(图 3). 以上结果表明, 高糖能够诱导 PC12 细胞凋亡.

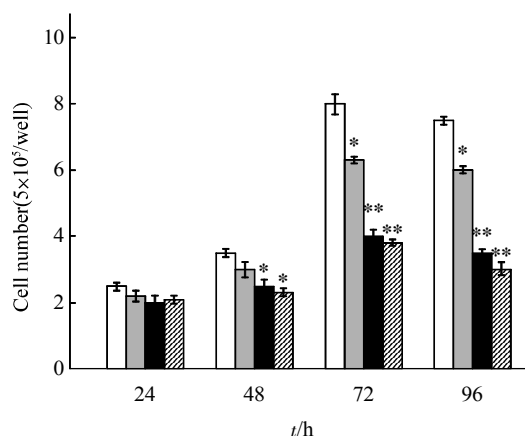


Fig. 1 Effects of high glucose(HG) on the viability of PC12 cells ($\bar{x} \pm s$, n=3)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs control group. □ : 4.5 g/L(Control); ■ : 9.0 g/L; ■ : 13.5 g/L; ▨ : 18.0 g/L.

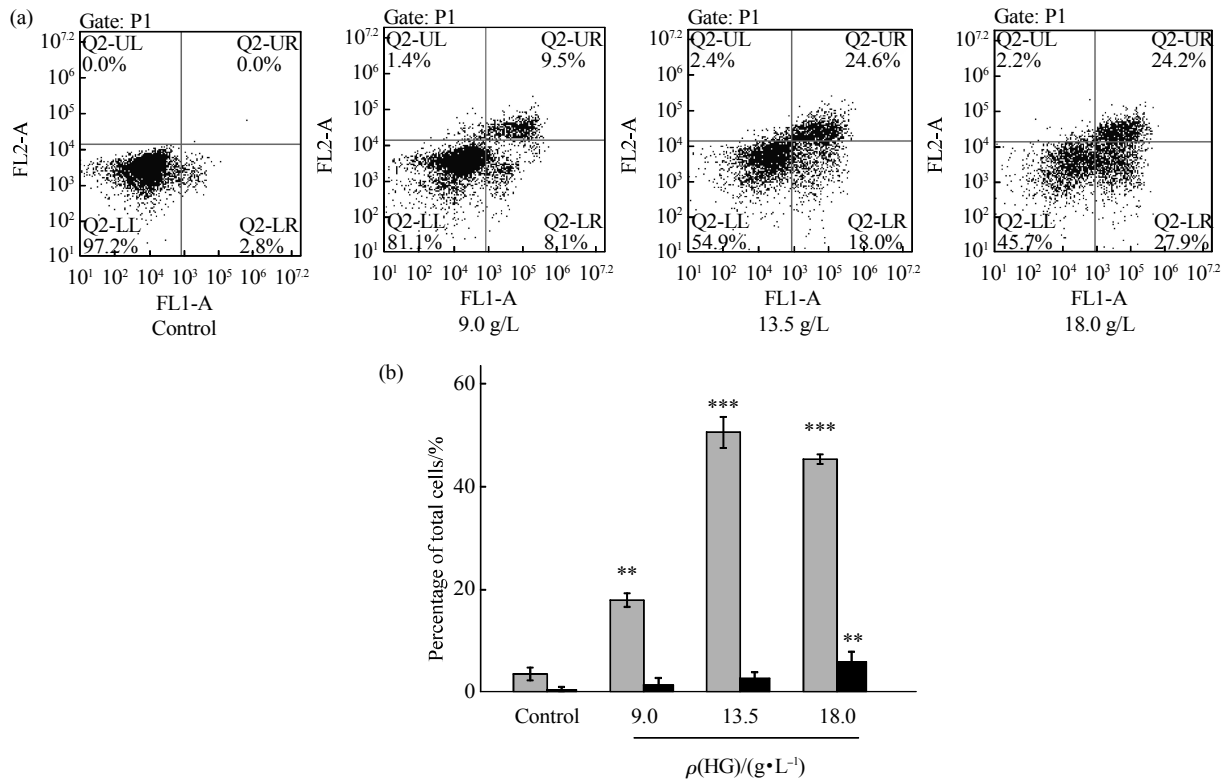


Fig. 2 High glucose induced cell apoptosis of PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Cells were double stained with Annexin V-FITC/PI and apoptosis rates were analyzed using flow cytometry (a). The top experimental results of the percentage of total apoptotic cells were quantitative analyzed (b). Annexin V (+)/PI (-) to detect early apoptosis and Annexin V (+)/PI (+) to detect late apoptosis. Representative images were shown, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$, vs control group. □: Apoptosis(early+late); ■: Necrosis.

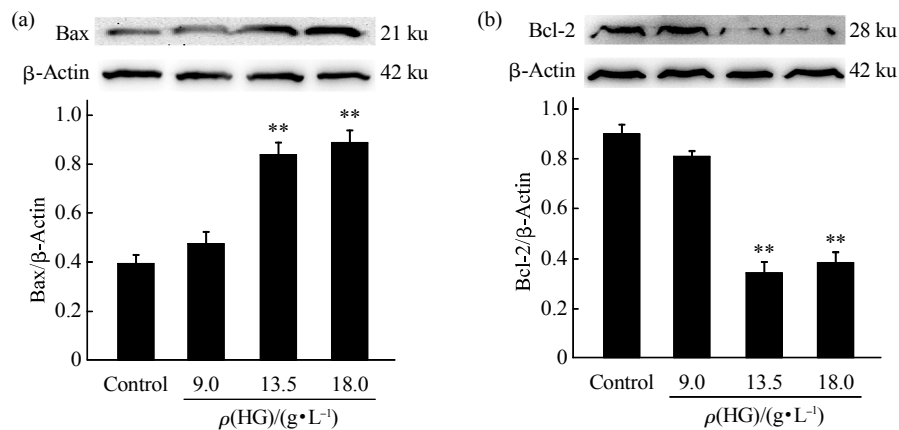


Fig. 3 Effects of high glucose on the expressions of Bax and Bcl-2 protein in PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

The expressions of Bax (a) and Bcl-2 (b) protein were detected by Western blotting using anti-Bax antibody and anti-Bcl-2 antibody, respectively. And β -actin was used as an internal control. Representative images and quantitative results were shown. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs control group.

2.2 二氢杨梅素拮抗高糖诱导的 PC12 细胞凋亡

分别用浓度为 5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ 的 DHM 处理高糖诱导的 PC12 细胞. 结果表明, DHM 能够逆转高糖诱导所造成的 PC12 细胞活力下降(图 4). Hoechst 33258 染色显示: 与对照组相比, HG 组细

胞出现明显的凋亡特征, 如细胞核浓缩、染色质凝聚和多个染色质片段, 而 HG+DHM 组细胞凋亡显著降低(图 5). Annexin V-FITC/PI 流式检测仪显示: 与正常对照组比较, HG 组凋亡率显著增高; DHM 可显著降低高糖诱导的 PC12 凋亡, DHM 组

与正常组比较无统计学意义, 说明 DHM 对 PC12 并不产生影响(图 6)。蛋白质印迹法(Western blotting)结果显示: 用 DHM 预处理之后, 与高糖组相比较, DHM+HG 组细胞内促凋亡蛋白 Bax 的表达有所降低(图 7a), 而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达却显著性升高(图 7b), 提示 DHM 能拮抗高糖诱导的 PC12 细胞凋亡。

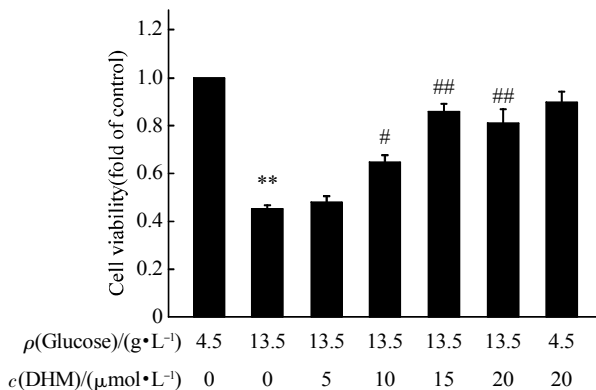


Fig. 4 Effects of DHM on the viability of PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Values are normalized to the mean of the control group (100%).** $P < 0.01$, vs control group. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, vs HG group.

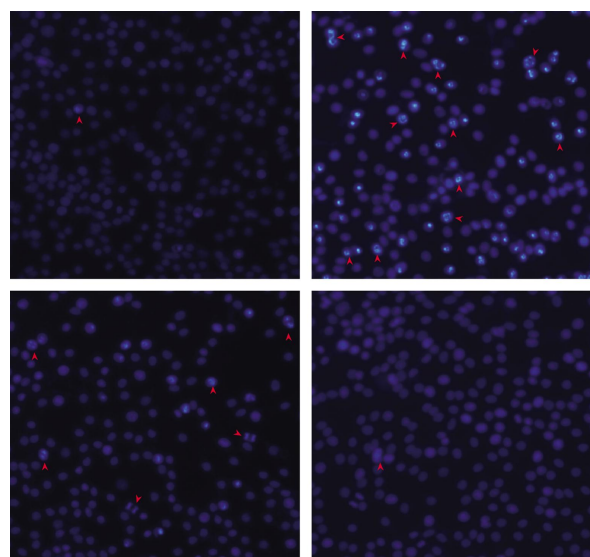


Fig. 5 Hoechst 33258 staining (200x)

The nuclear morphology of cell stained with hoechst 33258 was displayed by fluorescence microscopy (200 ×). Cells with brightly fluorescent and fragmented nuclei represent apoptotic cells. Arrows show various forms of nuclei.

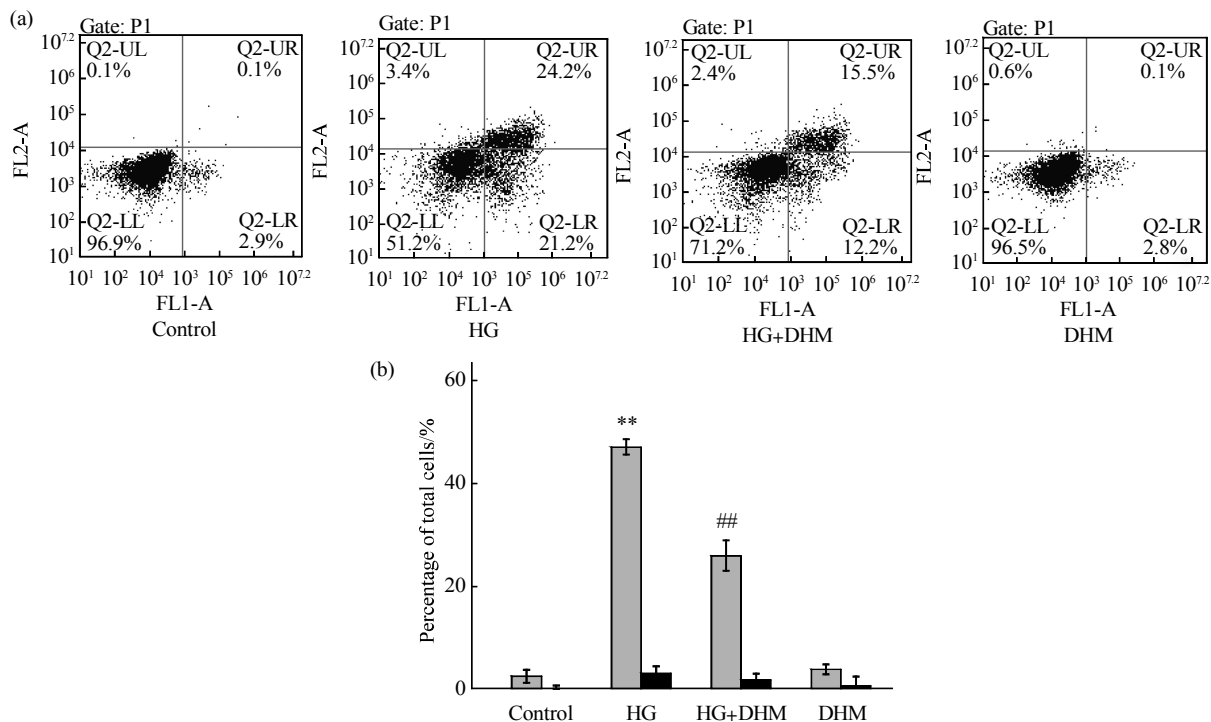


Fig. 6 Effects of DHM on HG-induced PC12 cell apoptosis ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Detection of apoptosis rates by flow cytometry after annexin V-FITC/PI staining (a). The top experimental results were quantitative analyzed for the percentage of total apoptotic cells (b). Annexin V (+)/PI (-) to detect early apoptosis and Annexin V (+)/PI (+) to detect late apoptosis. Representative images were shown. Data were based on at least 3 independent experiments, and values are the $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, vs control group; ## $P < 0.01$ vs HG group. ■: Apoptosis(early+late); ■: Necrosis.

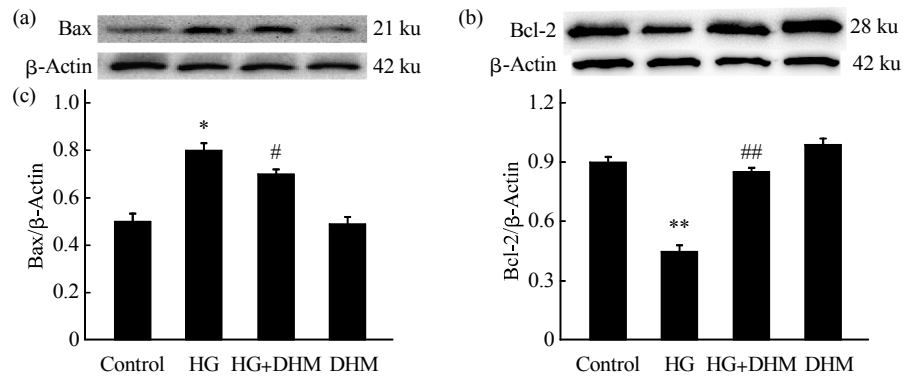


Fig. 7 Effects of DHM on HG-induced protein expression in PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

The Bax(a) and Bcl-2(b) expression in the PC12 cells and the statistic results were shown. The top experimental results were quantitative analyzed for the ratio of Bax and Bcl-2(c). Results presented are the ($\bar{x} \pm s$) from at least 3 independent experiments and representative images were shown. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs HG group.

2.3 DHM 对高糖诱导 PC12 凋亡的保护作用机制

利用 JNK 抑制剂(SP600125)预处理高糖诱导的 PC12 细胞, 通过蛋白质印迹法(Western blotting)检测蛋白质的表达, 结果显示: 与正常组相比, HG 组 Bax、c-caspase-3、p-JNK 蛋白的表达显著

增高, 当用 SP600125 预处理 HG 组后, Bax、c-caspase-3、p-JNK 蛋白的表达量出现逆转, 反而降低近乎达到正常水平, 而用 SP600125 处理正常细胞无明显变化(图 8), 提示 JNK 参与了高糖诱导的 PC12 细胞凋亡. 为了进一步探讨 DHM 对高糖

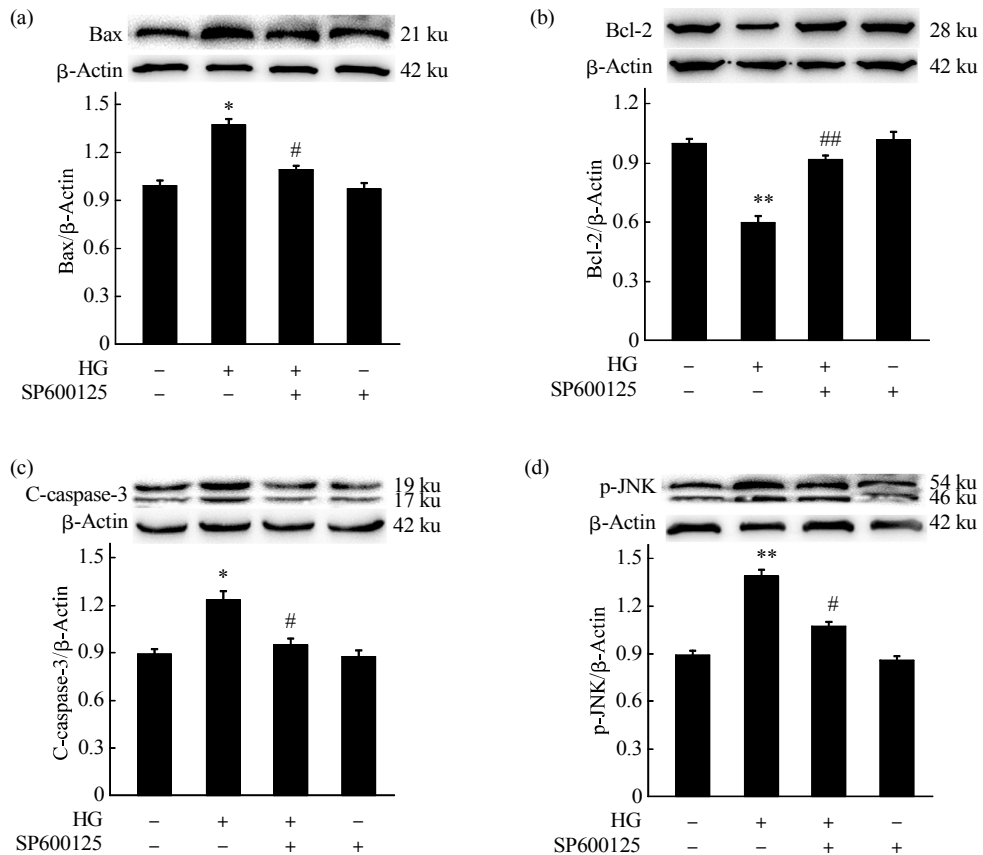


Fig. 8 Effects of SP600125 (an inhibitor of JNK) on HG-induced apoptosis of PC12 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

The expressions of Bax(a), Bcl-2(b), c-caspase-3(c) and p-JNK(d) proteins were detected by Western blotting using anti-Bax antibody, anti-Bcl-2 antibody, anti-c-caspase-3 antibody and anti-p-JNK antibody respectively. And β-actin was used as an internal control. Representative images and quantitative results were shown. Data were based on at least 3 independent experiments, and values are the mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs HG group.

诱导 PC12 凋亡的保护作用是否通过 JNK 信号, 我们采用 JNK 激动剂(茴香毒素 250 $\mu\text{g/L}$)预处理 PC12, 接着用 DHM 和高糖处理细胞, 结果发现: DHM 能降低高糖诱导的 PC12 细胞 Bax、c-caspase-3 和 p-JNK 的表达、升高 Bcl-2 表达, 而茴香毒素能逆转 DHM+HG 处理的 PC12 细胞上述

蛋白质的表达. 与正常组相比, 茴香毒素组细胞内的 Bax、c-caspase-3 和 p-JNK 的表达增加, bcl-2 表达降低, 而使用 DHM 加茴香毒素处理正常细胞, 上述蛋白质表达无显著变化(图 9). 以上结果共表明, 激活 JNK 信号可拮抗 DHM 对高糖诱导 PC12 凋亡的改善作用.

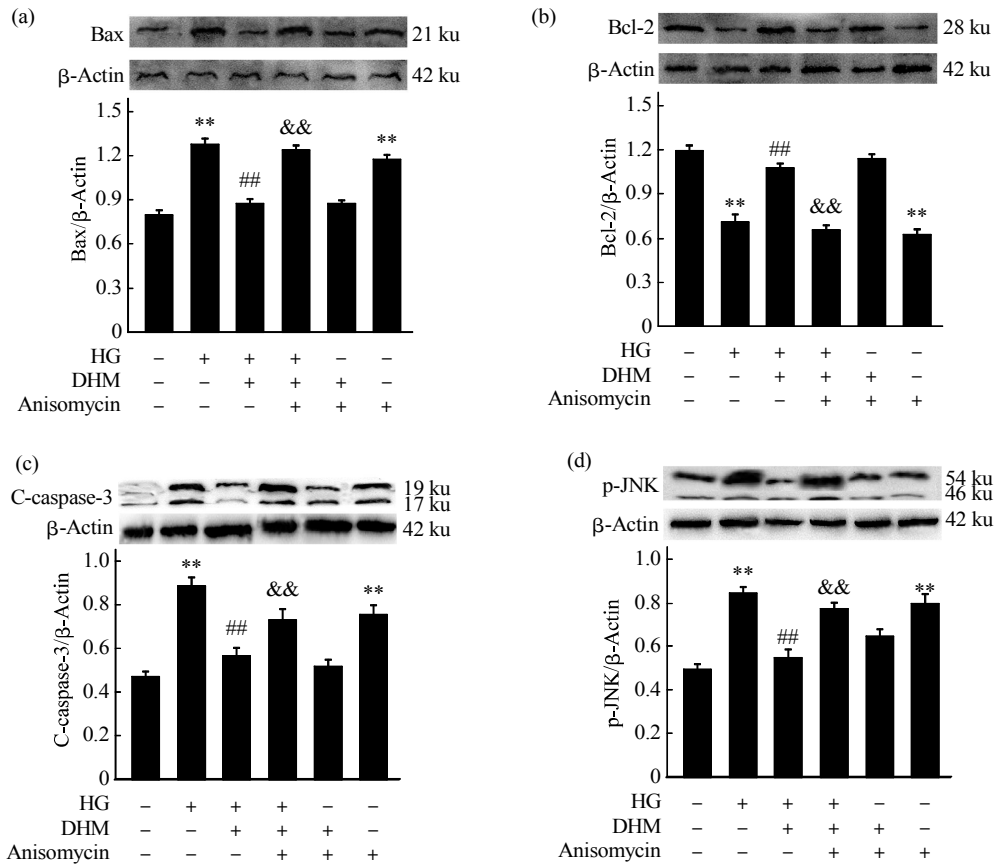


Fig. 9 Effects of Anisomycin (JNK agonist) on DHM improves HG-induced apoptosis in PC12 cells ($\bar{x} \pm s$, n=3)

The expressions of Bax (a), Bcl-2 (b), c-caspase-3 (c) and p-JNK (d) proteins by Western blotting using anti-Bax antibody, anti-Bcl-2 antibody, anti-c-caspase-3 antibody and anti-p-JNK antibody respectively. Representative images were shown, presented data from at least 3 independent experiments and values are the $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs HG-treated alone group; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$ vs co-treated with DHM and HG group.

3 讨 论

糖尿病神经病变是糖尿病中最常见最复杂的慢性并发症之一^[6], 死亡率和致残率不断增加, 而且发病机制并不明确. 因此, 研究高糖对神经系统损伤机制及其防治措施刻不容缓. 二氢杨梅素作为一种传统的中草药提取物, 具有多种药理学作用, 以往大量文献证实了它降糖^[7]、降脂^[8]、抗肿瘤^[9-10]等作用. 本课题组前期实验已经证实了 DHM 能够改

善 STZ+高糖高脂诱导的 2 型糖尿病模型小鼠的认知功能障碍. 前期的工作基础是从动物水平验证二氢杨梅素对高糖引起的认知功能障碍的改善作用, 现在我们进一步从细胞水平出发, 采用不同浓度的葡萄糖(4.5、9、13.5、18 g/L)处理 PC12 细胞时间为 24、48、72、96 h 后, 发现在相同浓度下, 随着时间的延长细胞活力逐渐增加且 72 h 时显著性增加, 96 h 后无明显变化, 而当细胞培养时间相同时, 处理浓度不同, 细胞活力各不一样, 24 h 后变

化无差异、48 h 后随着浓度增加细胞活力开始出现下降趋势并逐渐明显, 且浓度为 13.5 g/L 时便出现显著下降, 因此 13.5 g/L、72 h 为高糖最佳处理条件. 流式细胞仪检测结果显示, 高糖诱导 PC12 细胞凋亡. 且蛋白质印迹实验表明高糖能够增加 PC12 细胞内 Bax 的表达, 降低 Bcl-2 的表达, 提示: 高糖能够诱导 PC12 细胞凋亡.

近些年, 传统中药的研究和发展成为各界关注的热点. 二氢杨梅素(dihydromyricetin, DHM)是一种天然药草藤茶的提取物, 其主要活性成分为双氢黄酮类化合物. 它有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等药理作用^[11], 特别是抗氧化作用. DHM 通过抑制自由基的形成, 减少氧化应激诱导的细胞或组织损伤. 很多疾病的发生和发展均可因氧化应激损伤而导致, 氧化应激的增强最终会导致神经元凋亡/死亡的发生^[12-14]. 已有研究表明 DHM 可改善阿尔茨海默病大鼠的认知功能障碍, 改善高糖导致的学习和记忆缺陷^[15-16]. 我们课题组的前期工作已经从动物水平证实: 二氢杨梅素对 STZ 诱导的 2 型糖尿病小鼠认知功能有一定改善作用. 因此, 本实验进一步从细胞水平上探究 DHM 是否能够抑制高糖诱导的神经细胞凋亡并探究其作用机制. 我们采用 4 个不同浓度的 DHM(5、10、15、20 $\mu\text{mol/l}$)预处理高糖诱导过的 PC12 细胞 72 h, 结果显示, DHM 能够逆转高糖诱导的 PC12 细胞活力下降; Hoechst 33258 染色和流式细胞仪检测结果显示: 与正常对照组相比较 HG 组细胞凋亡明显升高; 与 HG 组相比较, HG+DHM 组细胞凋亡显著下降. 提示: DHM 可拮抗高糖诱导的 PC12 细胞凋亡.

文献报道称, 高糖诱导炎症及心肌细胞凋亡^[17]、高糖诱导肾系膜细胞增殖^[18]等均与 JNK 途径相关, 也有研究提示 JNK 介导小胶质细胞的炎症反应和凋亡^[19]. 因此, 我们推测 JNK 信号参与了高糖诱导的 PC12 细胞凋亡. 为此, 本实验通过蛋白质印迹法检测, 证实 JNK 参与了高糖诱导的细胞凋亡. 既然 JNK 参与了高糖诱导的 PC12 凋亡, 且已经证实 DHM 对高糖诱导 PC12 细胞凋亡具有保护作用, 那么 DHM 的这一保护作用是否是通过调节 JNK 信号实现的呢? 根据已有文献查实, 茴香毒素能够激活 JNK 信号^[20], 于是我们采用 250 $\mu\text{g/L}$ 的茴香毒素预处理 PC12 细胞, 接着用 DHM 和高糖诱导细胞, 发现茴香毒素可有效抑制 DHM 对高糖诱导的 PC12 细胞凋亡的保护作用, 提示 DHM 通过下调 JNK 信号拮抗高糖诱导 PC12 的凋亡.

综上所述, 我们证实 DHM 可通过下调 JNK 信号拮抗高糖诱导的 PC12 凋亡, 为 DHM 改善神经细胞损伤提供了新的途径和策略, 为神经系统相关疾病带来新的希望和新的治疗方案.

参 考 文 献

- [1] 董倩倩, 陈立峰. 二氢杨梅素药理研究进展. 中南药学, 2005, 3(5): 295-298
Dong Q Q, Chen L F. *Control South Pharmacy*, 2005, 3 (5): 295-298
- [2] 任兆翔, 赵亚飞, 曹 廷, 等. 二氢杨梅素通过抑制 GSK-3 β 活性改善 MPTP 诱导的小鼠帕金森症状及神经元损伤. 2016, 16(3) 135-139
Ren Z X, Zhao Y F, Cao T, *et al.* 2016, 16(3)135-139
- [3] Zeldis J B, Faleck H, Manning D. JNK Inhibitors for Treatment of Cns Injury: CA, CA2588558A1P.2006
- [4] Xie J, Liu J, Chen T M, *et al.* Dihydromyricetin alleviates carbon tetrachloride-induced acute liver injury *via* JNK-dependent mechanism in mice. *World Journal of Gastroenterology*, 2015, 21(18): 5473-5481
- [5] Kao S J, Lee W J, Chien M H, *et al.* Suppression of reactive oxygen species-mediated ERK and JNK activation sensitizes dihydromyricetin-induced mitochondrial apoptosis in human non-small cell lung cancer. *Environmental Toxicology*, 2017, 32(4) 426-438
- [6] Edwards J L, Vincent A M, Cheng H T, *et al.* Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacology & Therapeutics*, 2008, 120(1):1-34.
- [7] 卢 威, 秦晓改, 王跃虎, 等. 二氢杨梅素对四氧嘧啶性糖尿病小鼠的降糖作用研究. 中药药理与临床, 2011, 27(4): 15-17
Lu W, Qin X G, Wang Y H, *et al.* *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2011, 27(4): 15-17
- [8] 陈玉琼, 倪德江, 程倩, 等. 藤茶总黄酮及二氢杨梅素降血脂作用研究. 茶叶科学, 2007, 27(3): 221-225
Chen Y Q, Ni D J, Cheng Q, *et al.* *Journal of Tea Science*, 2007, 27(3): 221-225
- [9] Yang X M, Wang X H, Chen L F, *et al.* Effects of dihydromyricetin on tumor necrosis factor and NF-kappaB p65 of RAU rats. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2012, 37(17): 2612-2617
- [10] Fan T F, Wu T F, Bu L L, *et al.* Dihydromyricetin promotes autophagy and apoptosis through ROS-STAT3 signaling in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 2016, 7 (37): 59691-59703
- [11] 侯小龙, 王文清, 施春阳, 等. 二氢杨梅素药理作用研究进展. 中草药, 2015, 46(4): 603-609
Hou X L, Wang W Q, Shi C Y, *et al.* *Chinese Traditonal and Herbal Drugs*, 2015, 46(4): 603-609
- [12] Xia J, Guo S, Fang T, *et al.* Dihydromyricetin induces autophagy in HepG2 cells involved in inhibition of mTOR and regulating its upstream pathways. *Food & Chemical Toxicology*, 2014, 66 (4): 7-13

- [13] Hou X, Tong Q, Wang W, *et al.* Dihydromyricetin protects endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress damage by regulating mitochondrial pathways. *Life Sciences*, 2015, **130**(1): 38–46
- [14] Sun C, Wang D, Zheng W. Hydrogen peroxide attenuates the prosurvival signaling of insulin-like growth factor-1 through two pathways. *Neuroreport*, 2012, **23**(13): 768–773
- [15] Liang J, Lópezvaldés H E, Martí nezcoria H, *et al.* Dihydromyricetin ameliorates behavioral deficits and reverses neuropathology of transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Neurochemical Research*, 2014, **39**(7): 1171–1181
- [16] Peng L, Dan Z, Chen K, *et al.* Dihydromyricetin improves hypobaric hypoxia-induced memory impairment *via* modulation of SIRT3 signaling. *Molecular Neurobiology*, 2015, **53**(10): 1–13
- [17] Pan Y, Wang Y, Zhao Y, *et al.* Inhibition of JNK phosphorylation by a novel curcumin analog prevents high glucose-induced inflammation and apoptosis in cardiomyocytes and the development of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*, 2014, **63**(10): 3497–3511
- [18] Zhang L, Pang S, Deng B, *et al.* High glucose induces renal mesangial cell proliferation and fibronectin expression through JNK/NF- κ B/NADPH oxidase/ROS pathway, which is inhibited by resveratrol. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2012, **44**(44): 629–638
- [19] Mao J, Yang J, Zhang Y, *et al.* Arsenic trioxide mediates HAPI microglia inflammatory response and subsequent neuron apoptosis through p38/JNK MAPK/STAT3 pathway. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 2016, **303**(3): 79–89
- [20] Curtin J F, Cotter T G. Anisomycin activates JNK and sensitises DU 145 prostate carcinoma cells to Fas mediated apoptosis. *British Journal of Cancer*, 2002, **87**(10): 1188–1194

Dihydromyricetin Inhibits High Glucose Induced PC12 Cells Apoptosis by Down-regulating JNK Pathway*

LÜ Hui-Jie^{1)**}, ZHU Ze-Mei^{1,2)**}, CHEN Wei-Zhao³⁾, HE Jian-Qin¹⁾, YANG Si-Si¹⁾,
ZHANG Kai-Fang¹⁾, FENG Shui-Dong⁴⁾, LING Hong-Yan^{1)***}

¹⁾ Department of Physiology, University of South China, Hengyang 421001, China;

²⁾ Department of Medicine, Changde Vocational Technical College, Changde 415003, China;

³⁾ Class 1 of 2015 Excellent Doctor, University of South China, Hengyang 421001, China;

⁴⁾ Department of Social Medicine and Health Management, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract To investigate whether dihydromyricetin(DHM)inhibits high glucose induced PC12 cell apoptosis by downregulating JNK signaling. The cell viabilities of PC12 cells were assessed by MTT assay. The apoptotic rates of PC12 cells were measured after Annexin-V/PI (propidium iodide) staining by flow cytometry (FCM). Hoechst 33258 staining was used to detect the morphology of apoptotic PC12 cells. The expression of apoptosis-related proteins (Bax, Bcl-2, cleaved-Caspase-3) and the level of p-JNK in PC12 cells were detected by Western blotting assay. After PC12 cells were treated with different concentrations of glucose (4.5, 9, 13.5, 18 g/L) at 24, 48, 72 and 96 h respectively, the results showed that 13.5 g/L high glucose treatment for 72 h could significantly change the cell morphology, reduce cell viability, increase the apoptosis rate, at the same time, the expression of pro-apoptotic protein (Bax, Caspase-3) was increased and anti-apoptotic protein Bcl-2 was decreased, indicating that long-term high glucose treatment induced PC12 cell apoptosis. However, pretreatment with DHM (15 μ mol/l) could significantly improve high glucose induced PC12 cell apoptosis and decrease the expression of JNK and p-JNK high glucose induced PC12 cell. Further treatment with JNK agonists (Anisomycin), which could eliminate the protective effect of DHM on apoptosis induced by high glucose in PC12 cells. In conclusion, DHM antagonizes high glucose-induced PC12 cell apoptosis by down-regulating JNK signaling.

Key words dihydromyricetin, high glucose, PC12 cell apoptosis, JNK signal

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0477

* This work was supported by grants from Hunan Provincial Natural Science Foundation (2018JJ2347) , Hunan Education Department Foundation (16C1411) and Hengyang Municipal Bureau of Science and Technology Foundation(2016KJ64).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-734-8281389, E-mail: linghongyan0203@126.com

Received: December 31, 2017 Accepted: March 21, 2018