

芍药苷干预施万细胞外泌体对背根神经元细胞凋亡的作用

韩 朔 李 潇 杨鑫伟 朱茹悦 朱晏伯 许利平

摘要 目的 探讨芍药苷(paeoniflorin,PF)干预高糖环境施万细胞(Schwann cell,SCs)外泌体(exosomes,EXOs)对背根神经节神经元(dorsal root ganglion neurons, DRGn)细胞凋亡的影响。**方法** 取高糖环境SCs,培养24h,透射电镜观察EXOs的形态,蛋白印迹法(Western blot)鉴定EXOs特异性标志蛋白和氧化应激的蛋白表达;将SCs来源的EXOs与DRGn共培养24h,激光共聚焦显微镜观察DRGn摄取SCs来源EXOs的情况,Western blot法检测DRGn中影响细胞凋亡蛋白的表达水平。**结果** EXOs形态为双层膜囊泡结构,直径在40~100nm;EXOs中标记蛋白CD63表达证实了EXOs特异性;EXOs中氧化应激蛋白表达升高,尤其是PF干预SCs来源EXOs中Nrf2、HO-1的表达升高更明显;SCs来源EXOs被DRGn摄取,分布于DRGn细胞核周围;经PF干预SCs来源EXOs影响DRGn促凋亡蛋白GADD153和Bax表达显著降低,抗凋亡蛋白Bcl-2表达明显增加。**结论** PF通过SCs EXOs携带氧化应激信息,影响DRGn中促凋亡蛋白表达减少,抗凋亡蛋白表达增加,从而减轻DRGn细胞凋亡,有利于改善糖尿病周围神经病变。

关键词 芍药苷 施万细胞 外泌体 背根神经节神经元 细胞凋亡

中图分类号 R285.5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.11.011

Effect of Paeoniflorin on Apoptosis of Dorsal Root Neurons Induced by Schwann Cell Exosomes. Han Shuo, Li Xiao, Yang Xinwei, et al. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University and Beijing Key Lab of TCM Collateral Disease Theory Research. Beijing 100069, China

Abstract Objective To investigate the effect of paeoniflorin on apoptosis of dorsal root neurons induced by Schwann cell exosomes in high glucose concentration. **Methods** High glucose environment SCs, after 24 hours of culture, the morphology of exosomes was observed by transmission electron microscope. The expression levels of specific marker proteins and oxidative stress proteins were identified by Western blot, after the SCs source exosomes were incubated with DRGn for 24 hours, the expression level of apoptosis protein in DRGn was detected by Western blot. **Results** Under transmission electron microscope, the exosomes were bilayer membrane vesicles with diameters between 40-100nm, and the marker proteins CD9 confirmed the specificity of EXOs. The expression of oxidative stress protein in EXOs increased, especially when PF interfered with the expression of Nrf2 and HO-1 in SCs-derived EXOs, indicating that oxidative stress was initiated. SCs-derived EXOs was absorbed by DRGn and distributed around the nucleus of DRGn. The expression of pro-apoptotic protein GADD153 and Bax was significantly decreased and the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 was significantly increased in DRGn treated with SCs-derived EXOs treated by PF. **Conclusion** PF carries oxidative stress information through SCs EXOs, which reduces the expression of pro-apoptotic proteins and increases the expression of anti-apoptotic proteins in DRGn, thus reduces the apoptosis of DRGn cells, which is beneficial to the improvement of diabetic peripheral neuropathy.

Key words Paeoniflorin; Schwann cells; Exosome; Dorsal root ganglion neurons; Apoptosis

施万细胞(Schwann cell,SCs)是周围神经系统中特有的神经胶质细胞,对周围神经损伤的修复发挥着重要作用,是糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral

neuropathy,DPN)中的主要靶细胞^[1,2]。近年来研究发现,2型糖尿病患者血液中外泌体(exosomes,EXOs)能够诱导氧化应激,导致细胞凋亡,SCs分泌的EXOs装载和传递信号分子,能够影响神经元细胞的结构和功能^[3,4]。氧化应激是DPN的主要发病机制,有研究发现,EXOs所携带的核转录因子E2相关因子2(nuclear factor elyroid-derived factor 2-related factor,Nrf2)等蛋白含量发生改变,加重氧化应激,进

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81873125,81704014,81473642)

作者单位:100069 首都医科大学中医药学院、中医络病研究北京重点实验室

通讯作者:许利平,电子邮箱:xulp@ccmu.edu.cn

而影响背根神经节神经元(dorsal root ganglion neurons, DRGn)^[5]。SCs分泌的EXO是否通过传递氧化应激信号影响DRGn尚不清楚。本研究通过高糖环境诱发的施万细胞氧化应激,观察芍药苷(paeoniflorin, PF)对SCs分泌的EXO对DRGn的作用,探讨PF的作用机制。

材料与amp;方法

1. 实验材料:(1)细胞:施万细胞株RSC96 CRL-2765,购自美国模式培养物集存库。培养基为含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基,培养条件为37℃、5%CO₂。(2)动物:5~7天龄新生SD乳鼠,雌雄不限,购自北京维通利华实验动物技术公司,实验动物许可证号:SCXK(京)2016-0006,实验单位使用许可编号:SYXK(京)2018-0003。(3)试剂:Rabbit anti-beta III Tubulin(ab18027)、Rabbit anti-Heme Oxygenase 1(ab68477)、Rabbit anti-CD63(ab217345)、Rabbit anti-p75 NGF(ab8874)、Rabbit Anti-Flotillin 1(ab41927)均购自英国Abcam公司。anti-Bax(sc-7480)、anti-Bcl-2(sc-7382)、anti-Caspase 3(sc-56053)、anti-GADD153(sc-7351)均购自美国Santa Cruz公司。芍药苷(110736-201035,纯度96.5%)购自中国药品生物制品检定所。(4)实验仪器:超速离心机(美国Beckman公司,L-80XP),激光共聚焦显微镜(德国Leica公司,TCS SP8),透射电子显微镜(日本Hitachi公司,HD7700)。

2. SCs细胞分组:将SCs分为空白对照组(25mmol/L葡萄糖DMEM+10%FBS)、模型对照组(150mmol/L葡萄糖DMEM+10%FBS)、PF1低剂量组(150mmol/L葡萄糖DMEM+10%FBS+1μmol/L PF)、PF10中剂量组(150mmol/L葡萄糖DMEM+10%FBS+10μmol/L PF)和PF100高剂量组(150mmol/L葡萄糖DMEM+10%FBS+100μmol/L PF),培养24h后收集上清液备用。其中,细胞培养所用FBS采用超速离心法(100000×g,12h)去除EXO后经0.22μm滤膜过滤。

3. SCs来源EXO的提取:SCs分组培养24h后取细胞上清液,按照300×g离心10min、2000×g离心10min、10000×g离心30min的步骤弃沉淀收集上清液,采用超速离心法100000×g离心70min,沉淀用PBS重悬浮后100000×g离心70min,沉淀部分即为EXO。

4. DRGn培养及分组:采用双酶消化法分离培养DRGn。取5~7天的新生SD乳鼠,处死后于体视镜

下取椎间孔内DRGn,放入双酶消化体系(胰酶:胶原酶=5:1)中于37℃水浴孵育1h,离心后将DRGn接种于培养皿中。模型组DRGn均给予50mmol/L葡萄糖。将DRGn分为6组,即空白对照组(DRGn完全培养基)、模型+空白外泌体组(模型组DRGn+空白对照组SCs EXOs)、模型组(模型组DRGn+模型对照组SCs EXOs)、PF1低剂量组(模型组DRGn+PF低剂量组SCs EXOs)、PF10中剂量组(模型组DRGn+PF中剂量组SCs EXOs)和PF100高剂量组(模型组DRGn+PF高剂量组SCs EXOs),培养24h后检测相关指标变化。

5. SCs来源EXO的形态观察:取超速离心法提取的EXO,加入戊二醛于4℃保存,送至首都医科大学医学实验与测试中心形态学研究测试室制备电镜样本,使用Hitachi7700透射电子显微镜观察EXO形态。

6. SCs来源EXO的内化实验:取EXO与2μl PKH26染料,分别加入0.25ml Diluent C中,将二者合并混匀后常温避光孵育4min。混合液转移到离心管中,加入完全培养基中止染色,100000×g离心70min清除多余染料,沉淀部分即为标记完成的EXO。将DRGn接种到腔室载玻片中,加入标记后的EXO培养18h后,4%多聚甲醛固定10min,进行DAPI细胞核染色、封片后采用激光共聚焦法观察EXO内化情况。

7. Western blot法检测蛋白表达:(1)取SCs来源EXO,BCA法进行蛋白定量,SDS-PAGE电泳后转膜,5%脱脂奶粉室温孵育1h后用CD63抗体(稀释度均为1:2000)Nrf2与HO-1抗体(稀释度为1:500)4℃孵育过夜。次日用二抗室温孵育1h后,加入ECL发光液进行曝光显影。应用Image J软件针对蛋白条带进行分析,获得灰度值以反映蛋白含量。(2)收集分组培养24h后的DRGn,提取细胞总蛋白,BCA法检测蛋白浓度后检测DRGn中GADD153、Bcl-2、Bax(稀释度为1:500)的表达。应用Image J进行分析获得灰度值,以β-actin为内参,计算相对蛋白含量。

8. 统计学方法:采用SPSS 19.0统计学软件对数据进行统计分析。分析前检验数据是否服从正态分布,符合正态分布的数据采用均数±标准误(Mean±S.E)描述。多组独立样本比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐性(equal variances assumed)条件下,选择最小显著性差异(least significant

difference, *LSD*) 分析, 方差不齐性 (equal variances not assumed) 条件下, 选择 *Tampane's T2* 分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. SCs 来源 EXOs 的鉴定: 透射电镜法观察 SCs 来源 EXOs 的形态, 如图 1A 所示, 观察到 EXOs 直径

定位在 30 ~ 100nm, 呈圆形囊泡状, 具有双层膜结构。Western blot 法检测结果表明 (图 1B), 外泌体标志蛋白 CD63 在空白对照组以及模型对照组中均有表达, 模型对照组蛋白表达较空白对照组明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

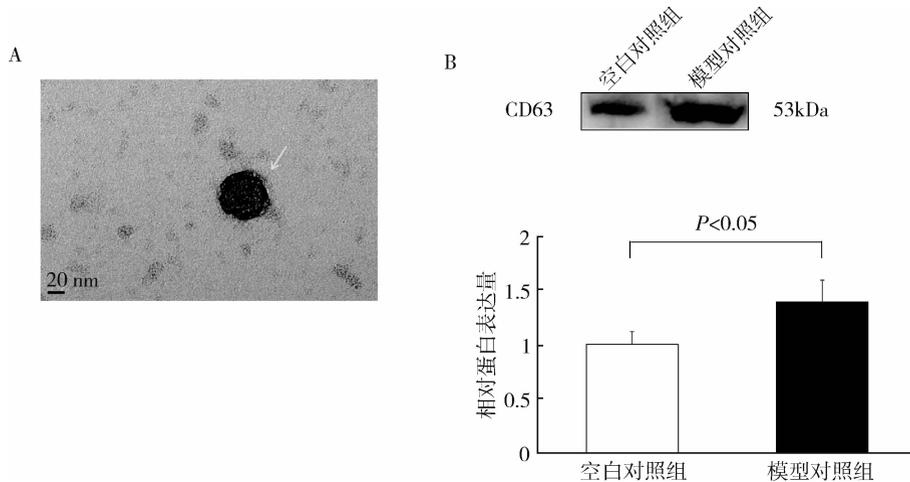


图 1 SCs 来源 EXOs 的鉴定

A. 透射电镜法观察外泌体形态 ($\times 40000$); 黄色箭头指向 EXOs 的双层膜状结构; B. 外泌体表面特异性蛋白的表达。 $n = 4$

2. SCs 来源 EXOs 中氧化应激相关蛋白表达: 与空白对照组比较, 模型对照组 Nrf2、HO-1 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), PF 各组 Nrf2、HO-1 蛋白表达明显升高 ($P < 0.01$); 与模型对照组比较, PF10 中剂量组、PF100 高剂量组 Nrf2 蛋白表达明显升高 ($P <$

0.01), PF1 低剂量组、PF10 中剂量组的 HO-1 蛋白表达升高 ($P < 0.01, n = 4$), 差异有统计学意义。PF 能增加高糖环境下 SCs 来源 EXOs 中抗氧化应激蛋白 Nrf2 以及 HO-1 的表达 (图 2)。

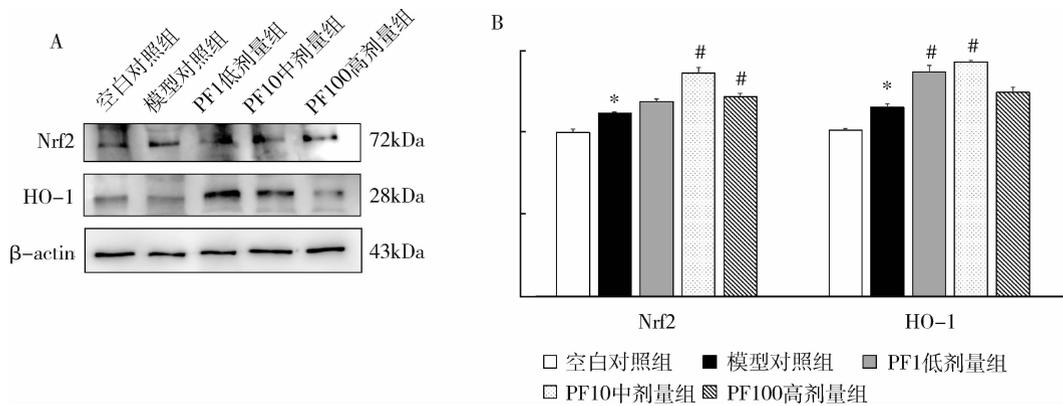


图 2 SCs 来源 EXOs 中 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平

A. Western blot 法检测图像; B. 蛋白表达水平, $n = 4$, 与空白对照组比较, $* P < 0.01$; 与模型对照组比较, $# P < 0.01$

3. SCs 来源 EXOs 的内化实验: SCs 分泌 EXOs 作用于受体 DRGn。激光共聚焦显微镜下, 观察到绿色部分为 DRGn 细胞骨架, SCs 来源 EXOs 被 PKH26 标记呈现红色荧光, 位于 DRGn 细胞的胞质内, 分布于蓝色的 DRGn 细胞核周围, 证明 DRGn 能够摄取 SCs

来源 EXOs。

4. 各组 EXOs 干预后 DRGn 中细胞凋亡相关蛋白表达: 与空白对照组比较, 模型对照组促凋亡蛋白 GADD153 和 Bax 蛋白表达明显升高 ($P < 0.01$), 抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$); 与

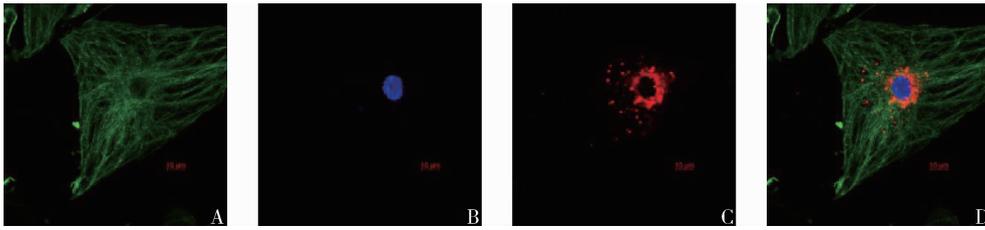


图3 DRGn 内化 SCs 来源 EXOs(× 1000)

A. β -tubulin 染色; B. DAPI 染色; C. PKH26 染色; D. 合并后图像

模型对照组比较, PF 各剂量组促凋亡蛋白 GADD153 和 Bax 显著降低 ($P < 0.01$), 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达

明显升高 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义 (图 4)。

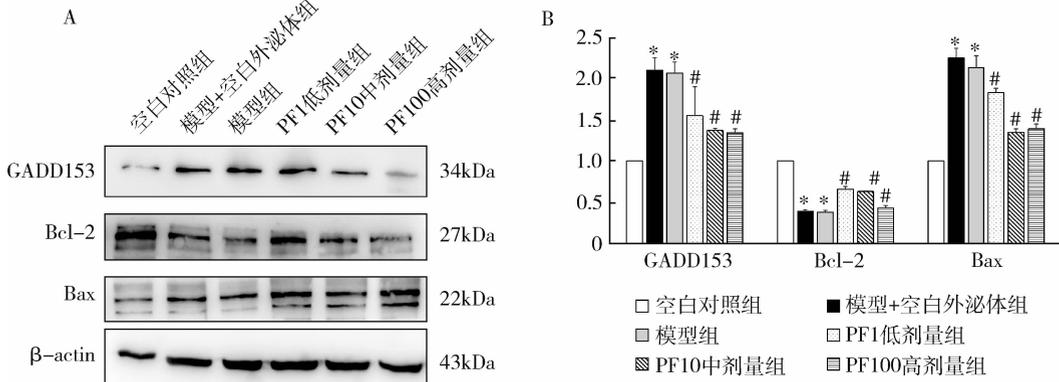


图4 DRGn 中 GADD153、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达水平

A. Western blot 图像; B. 蛋白表达水平, $n = 4$ 。与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型对照组比较, # $P < 0.01$

讨 论

EXOs 是一种分子直径为 40 ~ 100nm 的亚细胞双层膜囊泡^[6]。EXOs 表面的四跨膜蛋白超家族如 CD9、CD63 和 CD81, 常作为 EXOs 的特异性标志物。EXOs 既可以通过质膜受体直接激活受体细胞, 也可以通过转运蛋白质、mRNA、miRNA 甚至细胞器进入受体细胞内, 同时通过携带处于不同病理状态下的细胞所含有的特异性物质, 从而在生理学和病理学上都发挥着重要作用^[7,8]。EXOs 介导的细胞间交流主要有 3 种形式, 即表面信号分子的直接作用、膜融合时 RNAs 的直接调节以及生物活性成分的细胞外释放^[9]。本实验中 SCs 释放到培养基中的 EXOs 含有 Nrf2、HO-1。从差速离心技术获取的 EXOs, 采用 Western blot 法对 EXOs 特异性标志蛋白 CD63 进行验证, 证实了从 SCs 培养上清中分离得到的 EXOs 特异性, 高糖环境下比空白对照组 EXOs 分泌更多的 CD63。电子显微镜观察到囊泡的直径呈 40 ~ 100nm 和双层膜结构, 证实了分离的 EXOs 的大小范围和形态。

SCs 可以通过分泌 EXOs 影响 DRG 的轴突生

长^[10]。糖尿病长期的高糖环境可以改变 SCs 来源 EXOs 内物质组成, 被 DRGn 摄取后发生神经元细胞凋亡^[11,12]。受体细胞摄取 EXOs 可通过内吞作用、简单融合和 EXOs 表面配体作用^[13]。EXOs 携带的货物分子直接影响受体细胞功能^[14]。有研究表明 DRGn 的轴突内化 SCs 来源于 EXOs, 促进其在损伤后的再生^[15]。DRGn 细胞凋亡与缺失是 DPN 发病机制中的重要环节^[10]。SCs 与 DRGn 密切相关, SCs 来源的 EXOs 可以被周围神经轴突内化, 促进神经生长, 而高糖环境下 SCs 分泌的 EXOs, 携带氧化应激信息, 内化入 DRGn, 影响了 DRGn 的轴突生长^[16]。

氧化应激是 DPN 的主要发病机制, 持续的高糖刺激产生大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 损伤抗氧化系统, 进而导致氧化应激的发生^[17]。Nrf2 能够通过调节多种抗氧化蛋白、解毒酶和外源转运蛋白的表达, 维持细胞内环境稳定, 是机体抵抗氧化应激的重要防御性传导蛋白^[18]。氧化应激发生时, Nrf2 被丝氨酸激酶磷酸化, 引起 Keap1 和 Nrf2 解离, Nrf2 激活进入细胞核, 激活下游基因血红素单加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HO-1) 的表达, 抵抗 ROS

对细胞的侵害^[19]。ROS的堆积导致抗氧化应激信号通路受到抑制,刺激Bax流入线粒体,抑制Bcl-2蛋白的表达,同时直接激活半胱氨酸蛋白酶家族蛋白caspase-3表达,引发神经元细胞凋亡^[20]。

PF为毛茛科植物芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)或川赤芍(*P. veitchii* Lynch)的主要有效成分和指标性成分^[21]。体内实验证明,PF能够抗自由基损伤。体外细胞实验认为,PF能够明显减弱H₂O₂对细胞内ROS浓度和线粒体跨膜电位的影响,从而减轻细胞凋亡^[22]。本研究结果显示,PF干预SCs分泌的EXOs,携带抗氧化应激防御分子Nrf2、HO-1,通过受体细胞DRGn内化,影响高糖环境下DRGn凋亡蛋白的表达,降低DRGn中促凋亡蛋白GADD153和Bax的表达,增加抗凋亡蛋白Bcl-2蛋白的表达水平,从而丰富其细胞防御机制,以减轻自身的氧化应激状态所致的细胞损伤,发挥抗细胞凋亡作用,保护DRGn,改善DPN。

参考文献

- Guo T, Zhang L, Xiao H, *et al.* Ezrin interacts with L-periaxin by the "head to head and tail to tail" mode and influences the location of L-periaxin in schwann cell RSC96[J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2020, 1864(4): 129520
- Colombo A, Hsia HE, Wang M, *et al.* Non-cell-autonomous function of DR6 in schwann cell proliferation[J]. *Embo J*, 2018, 37(7): e97390
- Kamalden TA, Macgregor-Das AM, Kannan SM, *et al.* Exosomal microRNA-15a transfer from the pancreas augments diabetic complications by inducing oxidative stress[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 27(13): 913-930
- Ching RC, Wiberg M, Kingham PJ. Schwann cell-like differentiated adipose stem cells promote neurite outgrowth via secreted exosomes and RNA transfer[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 266
- Zheng J, Yu L, Chen W, *et al.* Circulating exosomal microRNAs reveal the mechanism of fructus meliae toosendan-induced liver injury in mice[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 2832
- 张宁, 张荣佳, 孙学军. 外泌体在中枢神经系统疾病中的研究进展[J]. *第二军医大学学报*, 2016, 37(12): 1524-1527
- 王永强, 王焯, 王蕾. 外泌体在中枢神经系统疾病中的研究进展[J]. *中华神经医学杂志*, 2016, 15(5): 519-523
- Ching RC, Kingham PJ. The role of exosomes in peripheral nerve regeneration[J]. *中国神经再生研究: 英文版*, 2015, 10(5): 743-747
- 刘儒涛, 王世伟, 刘晶. 细胞间信息交流的新载体——外泌体[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2013, 8: 35-43
- Jia L, Chopp M, Wang L, *et al.* Exosomes derived from high-glucose-stimulated schwann cells promote development of diabetic peripheral neuropathy[J]. *FASEB J*, 2018, 32(12): fj201800597R
- Wang L, Chopp M, Szalad A, *et al.* The role of miR-146a in dorsal root ganglia neurons of experimental diabetic peripheral neuropathy[J]. *Neuroscience*, 2013, 259(4): 155-163
- Li W, Suwanwela NC, Patumraj S. Curcumin by down-regulating NF- κ B and elevating Nrf2, reduces brain edema and neurological dysfunction after cerebral I/R[J]. *Microvasc Res*, 2016, 106: 117-127
- Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, *et al.* Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes[J]. *Blood*, 2012, 119(3): 756-766
- Mohammed SZ, Lea L, Dessie SW, *et al.* Cellular and exosome mediated molecular defense mechanism in bovine granulosa cells exposed to oxidative stress[J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187569
- Jia L, Chopp M, Wang L, *et al.* Exosomes derived from high-glucose-stimulated schwann cells promote development of diabetic peripheral neuropathy[J]. *FASEB J*, 2018, 32(12): fj201800597R
- Tang W, Chen X, Liu H, *et al.* Expression of Nrf2 promotes schwann cell-mediated sciatic nerve recovery in diabetic peripheral neuropathy[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(5): 1879-1894
- Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on Cell Death 2018[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(3): 486-541
- Shen Y, Zhang ZJ, Zhu MD, *et al.* Exogenous induction of HO-1 alleviates vincristine-induced neuropathic pain by reducing spinal glial activation in mice[J]. *Neurobiol Dis*, 2015, 79: 100-110
- 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
- Filadi R, Theurey P, Pizzo P. The endoplasmic reticulum-mitochondria coupling in health and disease: molecules, functions and significance[J]. *Cell Calcium*, 2017, 62: 1-15
- Ma Z, Chu L, Liu H, *et al.* Beneficial effects of paeoniflorin on non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in rats[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 44819
- Zhai A, Zhang Z, Kong X. Paeoniflorin alleviates H₂O₂-induced oxidative injury through down-regulation of microRNA-135a in HT-22 cells[J]. *Neurochem Res*, 2019, 44(12): 2821-2831

(收稿日期: 2020-05-21)

(修回日期: 2020-06-03)