文章编号:1000-5404(2009)02-0113-04

论著

白藜芦醇苷对体外缺血再灌注脑损伤中 NF-κB 的保护作用

徐 静,王兴勇,杨廷芳,胡语航,熊 燚,周海银,何 蓉 (重庆医科大学附属儿童医院急诊科,重庆 400014)

摘 要:目的 探讨体外缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I-R)脑损伤中 NF-κB 的表达及白藜芦醇苷(polydatin, PD)的保护作用。**方法** 将体外培养7 d的大鼠大脑皮层神经元分为3组:对照组、模型组和PD组。AO/EB及DAPI染色观察细胞凋亡的形态学变化,同时测定再灌注0、6、12、24、48 h细胞凋亡率、Bcl-2/Bax、NF-κB p65的动态变化。**结果** 模型组可见凋亡细胞的特征性变化;与对照组相比,模型组细胞凋亡率、NF-κB p65的表达量随再灌注时间的延长而明显增加($P<0.05$),24 h达高峰,随后渐降低,Bcl-2/Bax的高峰点位于6 h,之后降低($P<0.05$);PD组细胞凋亡率及NF-κB p65的表达量较模型组均明显降低($P<0.05$),Bcl-2/Bax值则明显升高($P<0.05$)。**结论** NF-κB p65的活化参与了体外I-R脑损伤的病理过程,PD可能通过抑制NF-κB p65的表达,上调Bcl-2/Bax值,阻止神经元凋亡,从而减轻I-R脑损伤。

关键词: 白藜芦醇苷;缺血再灌注;NF-κB p65;Bcl-2/Bax;凋亡
中图法分类号: R285.5;R741.05;R743.31 **文献标识码:** A

Protective effect of polydatin on NF-κB expression in rat cortical neurons during cerebral ischemia-reperfusion injury *in vitro*

XU Jing, WANG Xing-yong, YANG Ting-fang, HU Yu-hang, XIONG Yi, ZHOU Hai-yin, HE Rong (Department of Emergency, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To observe the expression of NF-κB and explore the effect of polydatin (PD) during ischemia-reperfusion (I-R) induced cortical neuron injury *in vitro*. **Methods** The cortical neurons from newborn SD rats cultured for 7 d were randomly divided into control group, model group and PD group. The morphological features of neuronal apoptosis were observed with AO/EB and DAPI staining. Apoptosis, Bcl-2/Bax, and the expressions of NF-κB p65 were determined 0, 6, 12, 24, 48 h after reperfusion. **Results** Typical morphological changes of neuronal apoptosis were observed in model group. The number of apoptotic cells and the expressions of NF-κB p65 increased with time prolongation after reperfusion ($P<0.05$), peaked 24 h after reperfusion, then decreased in model group compared with those in control group, while Bcl-2/Bax ratio peaked 6 h after reperfusion, then decreased ($P<0.05$). The number of apoptotic cells and the expressions of NF-κB p65 were decreased in PD group compared with those in model group with statistical significance ($P<0.05$), while Bcl-2/Bax ratio was increased ($P<0.05$). **Conclusion** The activation of NF-κB p65 participates in cerebral I-R injury. PD protects against *in vitro* I-R injury by decreasing neuron apoptosis that may be through suppressing NF-κB p65 activation and upregulating Bcl-2/Bax ratio.

Key words: polidatin; ischemia-reperfusion; NF-κB p65; Bcl-2/Bax; apoptosis

急性脑缺血缺氧是常见的中枢神经系统损伤的病因,尽管临床采取降颅压等对症支持治疗,使脑缺血缺氧得以缓解,血氧重新灌注,但仍有部分患儿留有神经系统后遗症,严重威胁儿童的健康及生存质量[1]。缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I-R)脑损伤过程中有细胞凋亡的参与;凋亡相关基因(如Bcl-2、Bax)的表达对于细胞凋亡的发生、发展具有重要的调节作用;核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)是一种多效可诱导的核转录因子,能调节多种基因的表达和细胞因子的产生,与炎症反应、凋亡关系密切。然而I-R脑损伤中NF-κB是促进还是抑制神经元凋亡?NF-κB与凋亡相关基因表达的关系如何?目前尚不清楚。白藜芦

基金项目: 国家自然科学基金(30772362);重庆市自然科学基金(2005BB5228)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772362) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2005BB5228)
作者简介: 徐 静,女,辽宁省丹东市人,硕士,医师,主要从事MODS的基础与临床方面的研究。电话:(028)89860150, E-mail: xujingwws@126.com
通信作者: 王兴勇, E-mail: wxy9918@vip.sina.com
收稿日期: 2008-04-03;**修回日期:** 2008-04-30

醇苷(polydatin, PD)具有纠正自由基代谢紊乱、抗血栓、抗感染、保护受损脏器功能的作用。本实验通过建立体外大鼠大脑皮层神经元 I-R 损伤模型,观察 PD 对 I-R 神经元 NF-κB p65、Bcl-2/Bax 表达的影响,探讨其对 I-R 损伤神经元的影响机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂及仪器

出生 24 h 内的清洁级 SD 大鼠,体质量 10 ~ 20 g,雌雄不拘(重庆医科大学实验动物中心),PD(南方医科大学化学教研室),NF-κB、Bcl-2、Bax、NSE 单抗、DAB 显色试剂盒(美国 Santa Cruz 公司),SABC 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物技术有限公司),DMEM/F12 培养基、N2 添加剂(美国 Gibco 公司)。

1.2 大脑皮层神经元培养及鉴定

1.2.1 神经元原代培养 清洁级新生 SD 大鼠消毒后,断头取大脑皮层组织,剪碎,加入终浓度为 0.125% 胰酶,置 37 ℃、5% CO_2 孵箱中消化 15 min,完全培养基(含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基)终止消化,200 目不锈钢筛网过滤后离心(1 000 r/min,10 min),弃上清,制成细胞悬液,血球计数板计数,以 1×10^6 ml^{-1} 细胞数种植于预先包被过多聚赖氨酸盖玻片的 6 孔板内,置 37 ℃、5% CO_2 孵箱培养;24 h 后将培养基全部换成含 2% B27 的无血清培养基,以后隔 2 d 用无血清培养基半量换液 1 次,每天在倒置相差显微镜下观察细胞生长情况。

1.2.2 神经元鉴定及纯度计算 取培养 7 d 的细胞爬片,预冷纯丙酮固定 15 min,PBS 洗 5 min × 3 次,加封闭液 30 min 后,换兔抗大鼠神经元特异性烯醇化酶(NSE)单克隆抗体(1∶100),4 ℃过夜,PBS 洗 5 min × 3 次,加生物素化山羊抗兔 IgG(1∶100),37 ℃ 30 min,PBS 洗 5 min × 3 次,SABC-Cy3(1∶100),37 ℃避光 30 min,PBS 洗 5 min × 3 次,加 1 μg/ml DAPI 室温避光 10 min,PBS 洗 5 min × 3 次,晾干,50% 缓冲甘油封片。阴性对照:PBS 代替 NSE,余步骤同上。荧光显微镜下观察 NSE 表达阳性的神经元,计算每个视野中阳性细胞所占比例,即神经元纯度。

1.3 实验分组及模型建立

将培养 7 d 的神经元分为 3 组:对照组、模型组和 PD 组。模型组用含 2 mmol/L $Na_2S_2O_4$ 的 DMEM/F12 培养基处理细胞爬片[1](体外缺血过程)15 min,PBS 洗 2 次,1/2 原液 + 1/2 无血清培养基继续培养(再灌注过程)0、6、12、24、48 h;对照组用 DMEM/F12 培养基处理细胞爬片 15 min,余同模型组;PD 组在用 $Na_2S_2O_4$ 处理前 24 h、处理中、处理后均加入 0.06% PD(终浓度为 150 mg/L),余同模型组。

1.4 神经元存活率

用 0.4% 台盼蓝浸染 3 组神经元 5 min 后,在倒置相差显微镜下观察并计数神经元中蓝染及未蓝染的细胞数,计算神经元存活率。

1.5 AO/EB 及 DAPI 染色

分别取上述 3 组细胞爬片,PBS 洗 2 次,前者加 0.01% AO/EB 染液,后者纯丙酮固定 15 min 后,加 0.001% DAPI 染液作用 10 min,分别封片,荧光显微镜下观察。

1.6 TUNEL 检测原位细胞凋亡

取上述 3 组细胞爬片,4% 多聚甲醛固定 60 min, 3% H_2O_2-甲醇封闭 10 min,PBS 洗 5 min × 3 次;0.1% Triton X-100/柠檬酸盐缓冲液 4 ℃ 2 min,TUNEL 反应混合液,37 ℃ 60 min;荧光显微镜下可见点状绿色荧光;PBS 冲洗,加辣根过氧化物酶(POD),37 ℃ 60 min;PBS 洗 5 min × 3 次;加 DAB 显色剂,镜下控制显色时间;苏木精复染、水洗、晾干,中性树胶封片,计算机图像分析、计数(阴性对照:用标记液代替 TUNEL 反应混合液,余步骤同上)。

1.7 免疫细胞化学检测 Bcl-2、Bax、NF-κB p65 的表达

取上述 3 组细胞爬片,预冷纯丙酮 15 min,3% H_2O_2-甲醇封闭 30 min;加小鼠抗大鼠 Bcl-2、Bax 、NF-κB p65 单抗(1∶100),4 ℃过夜;PBS 洗 5 min × 3 次;加山羊抗小鼠 IgG 抗体(1∶100),37 ℃ 30 min;PBS 洗 5 min × 3 次;DAB 显色,镜下控制反应时间,充分水洗;干燥后中性树胶封片,计算机图像分析、计数并检测阳性细胞平均光密度值(AOD)。

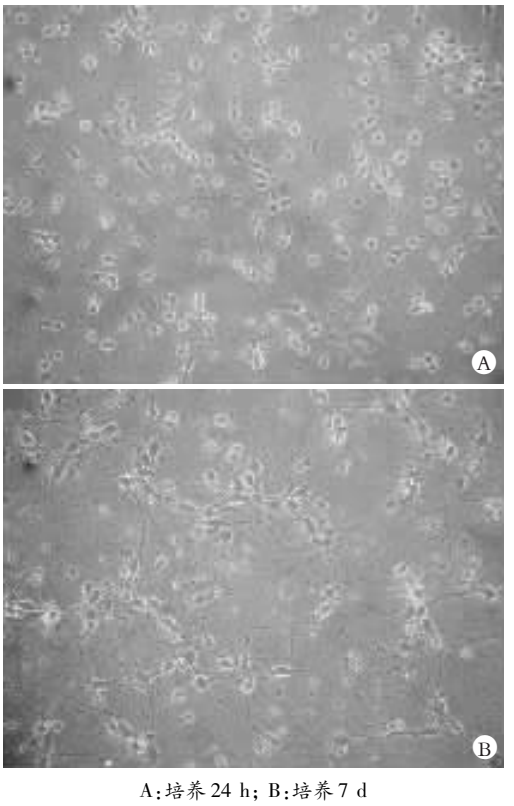
1.8 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用回归分析、相关性分析、方差分析、t 检验,以 SAS 8.0 统计软件处理。

2 结果

2.1 神经元形态学观察

在倒置相差显微镜下,刚种植的神经元呈圆形,透亮,体积小,单个均匀分布。2 h 后部分细胞贴壁,呈圆形或椭圆形,胞体发亮,周边可见光晕。24 h 后细胞贴壁完全,生长旺盛,大部分细胞伸出突起,但突起间连接尚少。培养 2 ~ 3 d 后,胞体变大,突起增粗伸长,以双极为主,相互连接成稀疏网络。培养 7 d 后,神经元进一步增大,胞体丰满且光晕明显,立体感强,多呈纺锤形、三角形、椭圆形,突起增多伸长且分支增多,形成致密网络。见图 1。

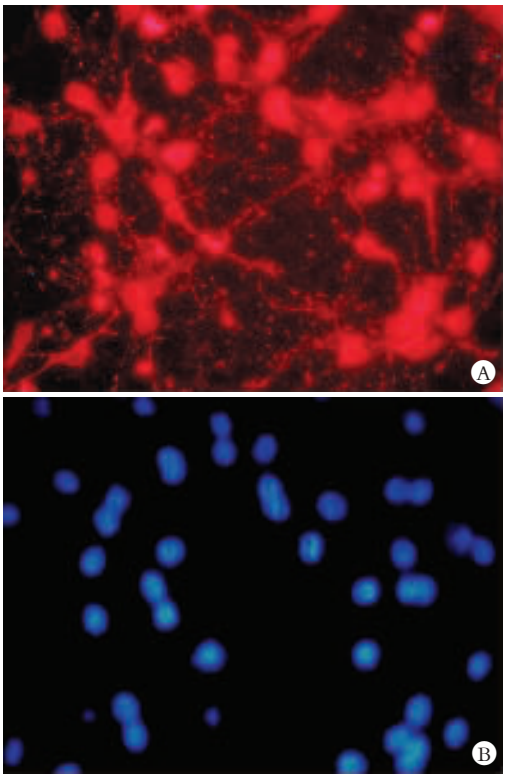


A:培养 24 h; B:培养 7 d

图 1 原代培养的大鼠大脑皮层神经元 (倒置相差显微镜 ×200)

2.2　神经元鉴定及纯度测定

NSE 免疫表达主要存在于神经元细胞质中,非神经元无表达。在荧光显微镜下,用 WG 系统检测 Cy3 标记的 NSE,显示细胞质内为明亮的红色丝状或粒状沉积物。用 WU 系统检测 DAPI 标记的细胞核显示呈明亮的蓝紫色。见图 2。计算阳性神经元纯度平均达 93% 以上,达到实验要求。



A: Cy3 标记的 NSE; B:与 A 同一视野下 DAPI 标记的细胞核

图 2　培养 7 d 的皮层神经元 NSE 免疫荧光检测　(荧光显微镜 ×400)

2.3　台盼蓝染色结果

台盼蓝可将死细胞染为蓝色,活细胞不着色。光镜下细胞计数结果显示模型组死亡细胞不到 3%,PD 组、对照组未见明显阳性细胞。

2.4　凋亡形态学结果

2.4.1　AO/EB 染色结果　　对照组:细胞质呈红色荧光,核大,呈均匀黄绿色荧光,核膜完整光滑,突起粗长,细胞间连接呈网状。模型组及 PD 干预组:部分细胞胞体缩小,突起回缩或断裂,细胞核固缩。有些细胞可见核染色质呈黄绿色,浓聚在核膜内侧,细胞膜呈泡状膨出及凋亡小体。见图 3。

2.4.2　DAPI 染色结果　　对照组细胞核呈蓝紫色、圆形或椭圆形,核膜光滑;模型组可见核膜对称性丧失、核碎裂等。

2.5　体外 I-R 脑损伤及干预后 NF-κB p65、Bcl-2/Bax 及凋亡率的动态变化

NF-κB p65 阳性显色为棕黄色,对照组仅有微量表达,一直存在于细胞质内无明显移位。模型组 NF-κB p65 表达较对照组增加($P<0.05$,0 h 除外),且随再灌注时间的延长而明显增加,24 h 达高峰,48 h 出现降低趋势,24 ~ 48 h 向细胞核移位明显。与模型组比较,PD 组 NF-κB p65 表达减少($P<0.05$)。见表 1。

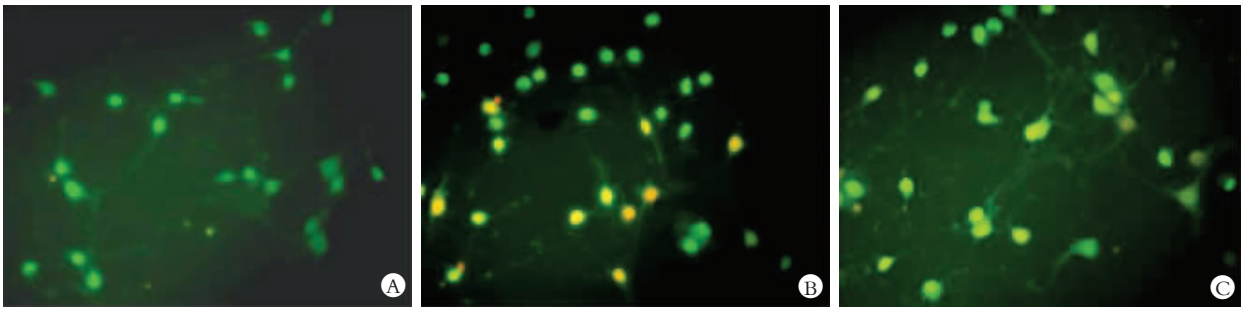
表 1　体外 I-R 脑损伤及干预后 NF-κB p65、Bcl-2/Bax 及凋亡的动态变化与比较

组别		NF-κB p65 (AOD 值)	Bcl-2/Bax (AOD 值)	神经元凋亡率(%)
对照组	0 h	30.056 0 ± 10.179 0	1.601 2 ± 0.317 3	5.250 0 ± 0.353 6
	6 h	30.272 0 ± 8.184 0	0.740 6 ± 0.041 8	5.250 0 ± 1.060 7
	12 h	19.793 0 ± 4.736 0	0.730 3 ± 0.166 3	5.750 0 ± 0.353 6
	24 h	53.500 0 ± 28.457 0	0.345 9 ± 0.070 2	6.250 0 ± 0.353 6
	48 h	25.026 0 ± 8.969 0	0.295 0 ± 0.004 0	7.500 0 ± 0.707 1
模型组	0 h	30.068 0 ± 5.878 6	0.188 4 ± 0.002 3	7.166 7 ± 1.755 9
	6 h	44.625 0 ± 4.809 1[a]	0.301 1 ± 0.026 7[a]	12.625 0 ± 3.250 0[a]
	12 h	63.608 0 ± 10.353 0[a]	0.135 7 ± 0.004 4[a]	21.600 0 ± 3.895 5[a]
	24 h	81.093 0 ± 17.280 0[a]	0.087 6 ± 0.001 8[a]	30.600 0 ± 3.698 0[a]
	48 h	67.693 0 ± 14.193 0[a]	0.099 9 ± 0.004 0[a]	27.125 0 ± 5.391 0[a]
PD 组	0 h	16.422 0 ± 2.343 0[b]	0.670 9 ± 0.088 3[b]	6.500 0 ± 1.322 9
	6 h	31.987 0 ± 6.641 0[b]	1.750 2 ± 0.479 3[b]	7.775 0 ± 1.808 1[b]
	12 h	37.652 0 ± 5.934 0[b]	0.711 2 ± 0.110 0[b]	16.500 0 ± 2.179 4[b]
	24 h	46.308 0 ± 8.500 5[b]	0.419 9 ± 0.153 7[b]	24.600 0 ± 4.615 2[b]
	48 h	38.173 0 ± 3.905 8[b]	0.395 4 ± 0.132 3[b]	17.333 0 ± 2.021 0[b]

a: $P<0.05$,与对照组比较,b: $P<0.05$,与模型组比较

Bcl-2 阳性产物主要位于细胞质,细胞核偶有表达,Bax 阳性细胞在细胞质、细胞核均着色。Bcl-2/Bax 值在再灌注 6 h 达高峰,之后逐渐下降,PD 组 Bcl-2/Bax 值高于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

TUNEL 阳性细胞核复染呈深棕黑色,对照组在 24 h 仅有少量凋亡细胞;模型组阳性细胞较对照组增多($P<0.05$),在再灌注 6 h 开始逐渐升高,24 h 达高峰;PD 组阳性细胞较模型组明显下降($P<0.05$,0 h 除外)。见表 1。



A:对照组;B:模型组;C:PD 组

图 3　培养 7 d 的皮层神经元 AO/EB 检测凋亡细胞形态学改变　(荧光显微镜 ×400)

2.6 Bcl-2/Bax 与凋亡的相关性及 NF-κB p65 与 Bcl-2/Bax 的相关性分析

模型组 6 h 时，Bcl-2/Bax 与凋亡呈明显的负相关（$r = -0.936\ 0$，$P < 0.01$）；NF-κB p65 与 Bcl-2/Bax 亦呈明显的负相关（$r = -0.910\ 0$，$P < 0.05$）。

3 讨论

3.1 神经元培养及纯化

神经细胞是构成神经系统的基本结构和功能单位，虽然各脑区的功能不同，高等动物和低等动物神经系统的复杂程度也不同，但构成神经组织的基本单位——神经元的一些基本特征却十分相似，因此利用体外培养的大鼠大脑皮层神经元，进行神经元有关方面的研究是切实可行的。我们将 Dichter[2] 的培养方法加以改进，在接种 24 h 后将完全培养基换为含 2% B27 的无血清培养基，分离纯化神经元，使其纯度达 93% 以上，从而使实验的均一性得以保证。

3.2 体外模型的建立与评价

制备体外神经元 I-R 模型为观察单一 I-R 损伤对神经元的作用、揭示该损伤的病理生理机制、判断新药物的疗效提供了可靠的实验基础。$Na_2S_2O_4$ 是一种氧清除剂，能迅速清除融合在培养基中的氧，不损伤细胞膜，且溶液的 pH 值无变化[1]；同时本实验方法经济实用、操作简单、重复性好、结果稳定。本实验建模后从细胞的存活率、细胞及细胞核的形态、TUNEL 检测凋亡上证明了本法的可行性及可靠性。

3.3 NF-κB 与 I-R 脑损伤的发生机制

NF-κB 作为一种重要的多向转录调节蛋白，参与了细胞激酶、趋化因子、生长因子、细胞黏附因子及早期反应蛋白基因的转录。中枢神经系统尤其是大脑皮层神经元内含有高结构型活性的 NF-κB，这些 NF-κB 参与了代谢活跃的神经元抗氧化应激系统的调节[3]。神经元胞体、突触以及突触后致密层均存在可诱导型的 NF-κB，这些 NF-κB 可作为信使将突触信号传递到核内[4]。许多研究均证实了 I-R 脑损伤后有 NF-κB 表达的增加[5] 及 Bc1-2、Bax 表达的变化。Bc1-2 和 Bax 分别是 Bc1-2 家族中最具代表性的抑制凋亡和促进凋亡蛋白。Bc1-2 可能通过调节 Mit 膜通道的通透性来稳定 Mit，阻止 Mit 释放 Cyt C 等凋亡相关蛋白，抑制凋亡发生；Bax 可能破坏 Mit 膜的稳定性，促进凋亡[6]。有研究证实 NF-κB 的活化可增加全脑缺血模型的神经元凋亡[7]。本实验观察到再灌注不同时间点 NF-κB 的表达与神经元凋亡，在发生的时间及数量上有一致性，通过 NF-κB 与 Bcl-2/Bax 的相关性分析结果显示：随 NF-κB 表达的增加，Bcl-2/Bax 值明显减少，提示 NF-κB 激活可促进 I-R 损伤后神经元凋亡。

3.4 PD 在 I-R 脑损伤中的保护机制

I-R 脑损伤中存在凋亡机制，且 NF-κB 的活化促进了凋亡过程的发生，因此如能进行有效药物干预，抑制 NF-κB 的活化，或许能在不可逆损伤发生前，使细胞存活，减轻 I-R 脑损伤。已发现多种因素可诱导中枢神经系统 NF-κB 的活化。PD 是从我国传统中药虎杖根茎中提取的纯品，是白藜芦醇与葡萄糖结合的产物，具有清除自由基、抗感染、改善微循环、促进组织修复的作用。PD 保护 I-R 脑损伤的机制与以下有关：PD 通过其抗自由基作用而间接抑制 NF-κB 的活化，进而上调 Bcl-2/Bax 值，减少凋亡的发生；PD 作为一种强有力的自由基清除剂，能直接抑制自由基介导的炎症及凋亡损伤；PD 有免疫调节作用，能抑制过度激活的炎症细胞，维持促炎因子与抗炎因子的平衡；PD 可能抑制磷脂酶 A 激活，进而抑制神经元内 Ca^{2+} 浓度升高，保护受损神经元[8,9]。本实验显示 PD 组在再灌注 0～48 h，Bcl-2/Bax 值均高于模型组（$P < 0.05$），同时伴有凋亡细胞数的明显减少（$P < 0.05$），推测 PD 保护 I-R 脑损伤的可能机制是通过抑制 NF-κB p65 的活化，上调 Bcl-2/Bax 值，从而减少神经元凋亡的发生。

参考文献：

[1] 许蜀闽，王培勇，马红英. 连二亚硫酸钠在建立培养细胞的无氧环境中的应用[J]. 第三军医大学学报，2005，27(4)：359－360.

[2] Dichter M A. Rat cortical neurons in cell culture: culture methods, cell morphology, electrophysiology, and synapse formation[J]. Brain Res, 1978, 149(2): 279－293.

[3] Song Y S, Lee Y S, Narasimhan P, *et al*. Reduced oxidative stress promotes NF-kappaB-mediated neuroprotective gene expression after transient focal cerebral ischemia: lymphocytotrophic cytokines and anti-apoptotic factors[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2007, 27(4): 764－775.

[4] O'Mahony A, Raber J, Montano M, *et al*. NF-kappaB/Rel regulates inhibitory and excitatory neuronal function and synaptic plasticity[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(19): 7283－7298.

[5] Khan M, Elango C, Ansari M A, *et al*. Caffeic acid phenethyl ester reduces neurovascular inflammation and protects rat brain following transient focal cerebral ischemia[J]. J Neurochem, 2007, 102(2): 365－377.

[6] Obame F N, Zini R, Souktani R, *et al*. Peripheral benzodiazepine receptor-induced myocardial protection is mediated by inhibition of mitochondrial membrane permeabilization[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2007, 323(1): 336－345.

[7] Schwaninger M, Inta I, Herrmann O. NF-kappaB signalling in cerebral ischaemia[J]. Biochem Soc Trans, 2006, 34(Pt 6): 1291－1294.

[8] 王兴勇，李晓文，卢仲毅，等. 磷脂酶 A2 激活在急性缺血性脑损伤中的作用机制及尼莫地平的保护作用[J]. 中华小儿外科杂志，2004，25(4)：353－355.

[9] 陈媛媛，王兴勇，胡语航，等. 白藜芦醇苷对缺血再灌注脑损伤大鼠神经细胞凋亡的影响[J]. 重庆医科大学学报，2007，32(11)：1147－1149，1153.

（编辑 王小寒）