基础研究 文章编号：0253-3626（2011）07-0917-04

芍药苷对胆红素诱导海马神经元凋亡及核因子-κB活性的影响

朱叶芳[1]，党姗姗[1]，汤 磊[2]，华子瑜[1]

（1. 重庆医科大学附属儿童医院新生儿诊治中心、儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室，重庆 400014；
2. 重庆医科大学附属儿童医院重症医学科，重庆 400014）

【摘 要】目的：探讨芍药苷（Paeoniflorin，PF）对胆红素诱导原代培养大鼠海马神经元凋亡和核因子-κB（Nuclear factor-κB，NF-κB）活性的影响。方法：取胎龄 17~19 d 胎鼠的海马神经元进行细胞培养，于原代培养第 7 天加入不同浓度（1、2.5、5 μg/ml）PF 预处理 24 h 后，加入胆红素（10 μg/ml）。经 MTT 法测定海马神经元细胞活力，筛选出 PF 预处理的适当剂量；进而采用 Annexin V-FITC/PI 双染色法观察此剂量 PF（2.5 μg/ml）对胆红素诱导神经元凋亡形态和凋亡率的影响，并采用免疫细胞化学法检测胆红素作用后不同时间（3、6、12、24 h）神经元内 NF-κB 蛋白表达的变化。结果：与胆红素组比较，PF（2.5 μg/ml）预处理可显著降低海马神经元凋亡率（$P<0.05$）；胆红素诱导海马神经元 NF-κB 活化（$P<0.05$），3~6 h 达高峰（$P<0.05$）；2.5 μg/ml PF 可抑制胆红素作用 3~6 h 引起的 NF-κB 活化（$P<0.05$）。结论：采用 2.5 μg/ml PF 预干预 24 h 可抑制胆红素诱导的海马神经元凋亡，可能与抑制胆红素诱导的神经元 NF-κB 早期（3~6 h）活化有关。

【关键词】芍药苷；胆红素；海马神经元；凋亡；核因子-κB

【中国图书分类法分类号】R722 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-12-13

Effects of paeoniflorin on bilirubin-induced apoptosis and NF-κB activity of hippocampal neurons

ZHU Ye-fang, DANG Shan-shan, TANG Lei, HUA Zi-yu

(1. Department of Neonatology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorder;
2. Department of Severe Medicine, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To observe the effects of paeoniflorin (PF) on bilirubin-induced apoptosis and NF-κB of hippocampal neurons. *Methods*: Primary cultures of hippocampal neurons from the 17-19 days old embryo rats were used for the study. On the 7th day of incubation, the neurons in the experimental group were treated with bilirubin (10 μg/ml) for 24 h after the pretreatment with PF (1, 2.5, and 5 μg/ml). MTT assay was used to detect the effect of paeoniflorin on neuronal activity and then to select the proper dose of PF, and Annexin V-FITC/PI double staining was used to inspect the impact of PF (2.5 μg/ml) on the morphology of neuronal apoptosis and apoptosis rate; and immunocytochemistry was used to detect the expression of NF-κB protein in hippocampal neurons at different time points (3, 6, 12, and 24 h) after bilirubin treatment. *Results*: Compared with bilirubin group, pretreatment with PF (2.5 μg/ml) could decrease the neuronal apoptosis rate to (17.11±2.64)% ($P<0.05$). Moreover, bilirubin induced a significant activity of NF-κB in hippocampal neurons ($P<0.05$), especially when acting for 3-6 h ($P<0.05$); meanwhile, PF (2.5 μg/ml) significantly suppressed NF-κB activity induced by bilirubin stimulating for 3-6 h ($P<0.05$). *Conclusion*: PF (2.5 μg/ml) preconditioning for 24 h can inhibit bilirubin-induced apoptosis of hippocampal neurons, which might be associated with its suppression on NF-κB activity at early phase (3-6 h) after bilirubin stimulation.

【Key words】paeoniflorin; bilirubin; hippocampal neuron; apoptosis; nuclear factor-κB

作者介绍：朱叶芳（1985-），女，硕士，
研究方向：胆红素脑损伤。

通信作者：华子瑜，女，副教授，Email：ziyu_h@yahoo.com.cn。

基金项目：重庆市自然科学基金资助项目（编号：CSTC，2009BB5067）。

严重的新生儿高胆红素血症可引起胆红素脑损伤，而后者可引起各种神经系统后遗症，甚至死亡，受到人们的广泛关注。目前对胆红素神经毒性的机制认识仍有限，缺乏有效的神经保护药物。前期实验证实，胆红素可引起新生大鼠海马神经元凋亡，ERK/核因子-κB（Nuclear factor-κB，NF-κB）信号通路可能参与其中[1,2]。

芍药苷（Paeoniflofin，PF）是中药芍药中提取的一种单萜类糖苷化合物，具有调节免疫、保肝、保护心血管、抗肿瘤及镇痛等作用。近年来在缺血性脑损伤及老年痴呆模型的研究中发现，PF 有显著的神经保护作用，可能与防止钙离子超载、线粒体损伤、氧化应激损伤有关[3,4]，但确切机制不明。

本实验观察 PF 预干预对胆红素诱导原代培养的大鼠海马神经元凋亡和 NF-κB 活性的影响，探讨 PF 是否抗胆红素神经毒性及可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级 SD 大鼠共 40 只，体质量（280±30）g，按雌雄 3:1 合笼，以见到脱落的阴栓为交配成功（孕 0 d），清洁级 SD 大鼠由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 试剂与仪器

胆红素、二甲基亚砜（DMSO）（sigma 公司），PF（天津马克生物技术有限公司，纯度≥98.0%，批号 20090120），NF-κB p65 蛋白抗体（Cell signal 公司），DMEM/F12 培养基和 B27（Gibco 公司），胎牛血清（PAA 公司），Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒（上海炎彬化工科技有限公司），免疫组织化学试剂盒（北京中杉金桥生物技术有限公司），5%CO_2 细胞培养箱（Forma 公司），全自动酶标仪（Humareader 公司），荧光显微镜（Olympus 公司）。

1.3 方法

1.3.1 大鼠海马神经元培养 无菌操作下取孕 17~19 d SD 大鼠的胚胎鼠，分离得到海马。分散海马神经元，调整神经元密度为 5×10^5 个/ml 后种植[2]。

1.3.2 药物配置及试验分组处理 胆红素用 DMSO 溶解，PF 用 DMEM/F12 培养基溶解，均-20℃储存。神经元培养至第 7 天，完全随机分为正常组、胆红素组和经 PF 预处理的胆红素组，后者再按所用 PF 的剂量分为 PF 1 组、PF 2 组、PF 3 组，分别用 1、2.5、5 μg/ml 的 PF 预处理 24 h 后弃去，再加入胆红素（10 μg/ml）处理 3、6、12、24 h。正常组加入同体积 DMSO。

1.3.3 海马神经元细胞活力的测定 采用改良 MTT 法[5]检测胆红素作用 24 h 各组神经元存活情况。每组设置 5 个平行复孔，分组处理后，每孔加 MTT 液 20 μl，培养 4 h，加 150 μl 酸化异丙醇，选择波长 570 nm 处酶联免疫仪检测各孔的吸光度值（Optical density，OD），实验重复 3 次，求其均值[2]。

1.3.4 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测神经元凋亡 胆红素作用 24 h 后，4%多聚甲醛固定 15 min，PBS 洗 2 次，按 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作处理海马神经元。凋亡早期的细胞膜完整，Annexin V 高染，细胞膜呈绿色荧光，PI 低染，细胞核呈弱红色荧光；凋亡中期及晚期 Annexin V 及 PI 均高染，细胞膜呈绿色荧光，细胞核呈强红色荧光。每张盖玻片在 10×40 倍荧光显微镜下观察海马神经元，随机选 5 个视野计数，计算凋亡率：凋亡早、中、晚期神经元数/神经元总数，实验重复 3 次，求其均值。

1.3.5 免疫细胞化学法检测 NF-κB 蛋白表达 胆红素作用不同时间点后，预冷丙酮固定 10 min，按免疫组织化学试剂盒说明书操作，以 PBS 代替一抗作阴性对照。以海马神经元内（细胞核及细胞浆）见棕黄色或深棕黄色颗粒为表达的NF-κB 蛋白；以细胞核内见此颗粒为阳性细胞；阴性对照应无棕黄色反应产物。每张盖玻片在 10×40 倍显微镜下随机选5 个视野；计算神经元内 NF-κB 蛋白的 OD 值，了解NF-κB 蛋白在细胞浆内（未活化）及细胞核内（活化入核）表达的总和；计算阳性细胞率，明确 NF-κB 活化入核的情况，实验重复 3次，求其均值。

1.4 统计学处理

实验数据均以$\bar{x}\pm s$表示，应用 SAS 9.2 统计软件进行数据处理，各组间比较采用秩和检验，经 SAS 中 PROC RANKS 程序转化为正态后，不同组间两两比较采用 Tukey-Kramer 校正，免疫组化实验资料采用重复测量的方差分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PF 对胆红素作用的海马神经元细胞活力的影响

MTT 结果表明，与正常组比较，胆红素组海马神经元细胞活力显著降低，2 组比较差异有统计学意义（$P=0.009$）。与胆红素组比，PF 1 组、PF 2 组和 PF 3 组海马神经元细胞活力有升高趋势，但分别与胆红素组两两比较并无统计学意义（$P>0.05$）。见表 1。

表 1 MTT 法检测各组海马神经元细胞活力（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	OD值
正常组	0.353 ± 0.056
胆红素组	0.167 ± 0.027△
PF 1 组	0.223 ± 0.058
PF 2 组	0.293 ± 0.045
PF 3 组	0.236 ± 0.067

注：与正常组比较，△，$P<0.01$

2.2 PF 对胆红素诱导海马神经元凋亡的影响

Annexin V-FITC/PI 双染色法结果表明，与正常组比较，胆红素组海马神经元凋亡率显著升高（$P=0.002\ 4$）；而 PF（2.5 μg/ml）能显著降低胆红素诱导的海马神经元凋亡率（$P=0.046\ 1$）。见图 1、表 2。

表 2 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测各组海马神经元凋亡率（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	凋亡率（%）
正常组	7.88 ± 0.36
胆红素组	29.55 ± 3.87△
PF+ 胆红素组	17.11 ± 2.64▲

注：与正常组比较，△，P<0.01；与胆红素组比较，▲，P<0.05

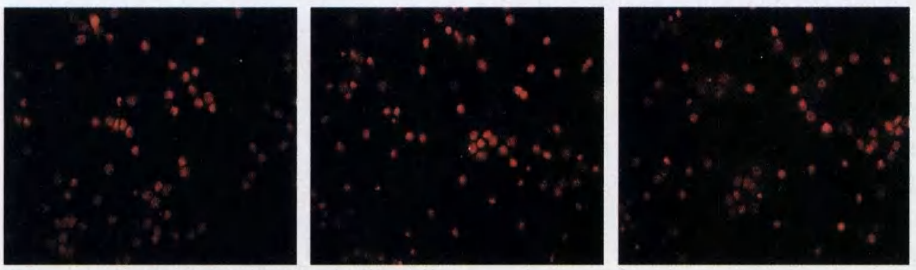
2.3 NF-κB 蛋白表达

平均 OD 值结果表明：胆红素作用 3~12 h 时 NF-κB 表达显著增多（P<0.05）；PF（2.5 μg/ml）可显著抑制胆红素作用 3 h 与 6 h 时 NF-κB 的表达（P<0.05），使各时间点均接近正常组水平（P>0.05）。

阳性细胞率结果显示：胆红素使神经元 NF-κB 活化水平显著增加（P<0.01）；且胆红素作用 3 h 与 6 h NF-κB 活化水平明显高于 12 h 及 24 h（P<0.05）。PF（2.5 μg/ml）可显著抑制胆红素作用 3 h 与 6 h 时 NF-κB 的活化（P<0.01），组内各时间点两两比较无统计学意义（P>0.05）；但仍高于正常组（P<0.05）。见图 2、表 3。

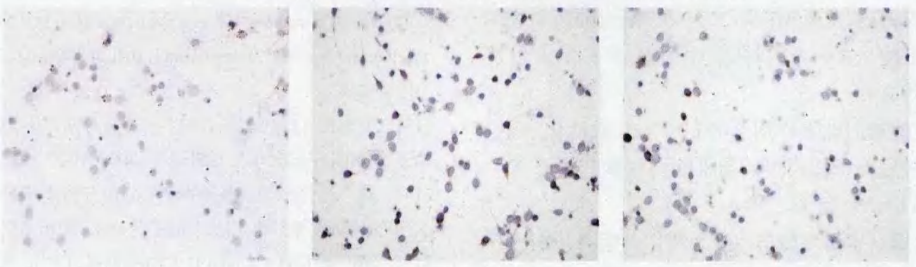
3 讨 论

胆红素脑损伤是新生儿黄疸的严重并发症，死亡率达 50%~67%，幸存者常遗留听力损伤、学习障碍、智力低下，甚至“核黄疸四联症”等严重神经系统后遗症[7]。随着诊疗水平的提高，严重的胆红素脑损伤后遗症已经罕见，神经性耳聋、学习困难成为目前较常见的胆红素脑损伤后遗症，受到人们的关注。边缘系统中的海马与学习记忆有着密切的联系，实验表明，胆红素可引起大鼠的学习和空间记忆能力明显降低，大鼠海马神经元呈明显的凋亡改变，且在胆红素作用 24 h 达凋亡高峰[1,2,8]。PF 作为芍药的一种有效成分，可透过血脑屏障，迅速分布到海马区域，改善东莨菪碱损伤的小鼠的学习记忆功能[9,10]；抑制缺血再灌注脑损伤，拮抗 Aβ（1-42）介导的神经毒性，抑制神经元的损伤及凋亡[3,4]。故 PF 可能拮抗胆红素神经毒性，但尚无报道。



正常组　　胆红素组　　PF+ 胆红素组

图 1 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测海马神经元凋亡（×400）



正常组　　胆红素组　　PF+ 胆红素组

图 2 免疫细胞化学法检测胆红素作用 3 h 各组海马神经元 NF-κB 蛋白的表达（SABC×400）

表 3 胆红素作用不同时间点各组海马神经元 NF-κB 蛋白表达及活化的平均 OD 值与阳性细胞率（%）（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	NF-κB 蛋白表达	胆红素作用时间（h）			
		3 h	6 h	12 h	24 h
正常组	平均 OD 值	0.114 ± 0.031	0.100 ± 0.023	0.096 ± 0.012	0.137 ± 0.024
	阳性细胞率	1.34 ± 0.89	1.41 ± 0.53	1.91 ± 0.54	1.44 ± 0.29
胆红素组	平均 OD 值	0.255 ± 0.065△△	0.216 ± 0.065△	0.162 ± 0.044△	0.196 ± 0.044
	阳性细胞率	8.69 ± 1.94△△	7.66 ± 0.60△△	5.02 ± 0.11△△☆*	5.48 ± 1.00△△☆*
PF+ 胆红素组	平均 OD 值	0.142 ± 0.025▲	0.127 ± 0.022▲	0.131 ± 0.027	0.166 ± 0.042
	阳性细胞率	3.43 ± 1.14▲▲	3.46 ± 0.14△△▲▲	3.81 ± 1.23△	3.58 ± 1.56

注：与同一时间点正常组比较，△，P<0.05，△△，P<0.01；与同一时间点胆红素组比较，▲，P<0.05，▲▲，P<0.01；与 3 h 胆红素组比较，☆，P<0.05；与 6 h 胆红素组比较，*，P<0.05

本实验显示，PF(2.5 μg/ml)预干预 24 h 可部分抑制胆红素诱导的海马神经元凋亡。Kim ID 等[11]也发现 PF 预干预 24 h 可抑制 LPS 对 RAW246.7(巨噬细胞)的毒性。亦有报道，PF 预干预 2 h~5 d 均有神经保护作用[1,12]，故 PF 预干预的最佳时间点有待研究。

Mao QQ 等[12]发现 PF 抑制谷氨酸盐对 PC12 细胞的毒性的有效浓度范围为 0.5~24 μg/ml；吴玉梅等[13]用 PF 抑制海人藻酸对小鼠皮层神经元的毒性，最大浓度为 41.6 μg/ml；刘洋等[14]用 PF 抑制皮质醇对大鼠皮层神经元的损伤，发现最佳浓度范围为 0.96~4.8 μg/ml。本研究显示，PF(1、2.5、5 μg/ml)有提高胆红素作用下的海马神经元细胞活力的趋势，其中以 PF(2.5 μg/ml)保护趋势明显，而 Annexin V-FITC/PI 双染结果显示，PF(2.5 μg/ml)可显著降低胆红素作用下的海马神经元凋亡率。故推测，细胞种类及损伤因素不同，PF 发挥保护作用的有效浓度也不同。因此，我们采用 PF(2.5 μg/ml)进一步实验。

NF-κB 是目前研究较深入的核因子，在调控细胞凋亡与存活方面有重要作用。近年来，在新生大鼠缺氧缺血模型中发现，NF-κB 的活化分早期(0.5~6 h)和晚期(24 h)两个高峰，抑制早期活化高峰可发挥神经保护作用，而抑制晚期活化则介导神经损伤[15]。故不同时期的 NF-κB 活化可能发挥不同的作用。研究表明，PF 可抑制缺血诱导的星形胶质细胞 NF-κB 活化，减少炎症因子的释放[16]；抑制肿瘤细胞中 NF-κB 的活化，协同 5-FU 发挥抗肿瘤作用[17]。但在胆红素诱导的海马神经元凋亡中，NF-κB 的活化机制及 PF 对 NF-κB 的影响鲜有报道。

本研究显示，胆红素诱导的 NF-κB 活化有时间依赖性，在 3~6 h 达高峰；但未发现 Nijboer C H 等[15]报道的两个 NF-κB 活化高峰，可能与本研究的时间范围仅限于 3~24 h 以及刺激因素不同等有关。

PF 可明显抑制胆红素作用 3~6 h NF-κB 的活化水平。故推测，PF 的神经保护作用可能与抑制胆红素作用下 NF-κB 的早期(3~6 h)活化有关。

综上所述，胆红素诱导海马神经元凋亡可能与其作用3~6 h 时 NF-κB 的活化相关；采用 2.5 μg/ml PF 预干预 24 h，可能通过抑制此时期的 NF-κB 活化拮抗胆红素神经毒性，但 PF 神经保护作用的最佳浓度、最适药理预适应时间点及对 NF-κB 活化的调控机制有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 胡 影，田巧红，华子瑜，等.小脑延髓池注射胆红素溶液建立新生大鼠胆红素脑损伤模型的评价[J].重庆医科大学学报，2008，33(2)：177-182.

[2] 王少雯，华子瑜.ERK/NF-κB 参与胆红素诱导海马神经细胞凋亡的调控研究[J].第三军医大学学报，2010，32(16)：1754-1757.

[3] Chen D M，Xiao L，Cai X，et al.Involvement of mulitargets in paeoniflorin induced preconditioning[J].J Pharmacol Exp Ther，2006，319(1)：165-180.

[4] Zhong S Z，Ge Q H，Li Q，et al.Peoniflorin attentuates Aβ(1-42)-mediated neurotoxicity by regulating calcium homeostasis and ameliorating oxidative stress in hippocampus of rats [J].J Neurol Sci，2009，280(1)：71-78.

[5] Ngai K C，Yeung C Y，Karlberg J.Modification of the MTT method for the study of bilirubin cytotoxicity [J].Acta Paediatr Jpn，1998，40(4)：313-317.

[6] Zhou S，Chen X，Gu X，et al.Achyranthes bidentata Blume extract protecs cultured hippocampal neurons against glutamate-induced neurotoxicity[J].J Ethnopharmacol，2009，122(3)：547-554.

[7] Gourley G R.Bilirubin metabolism and kernicterus [J].Adv Pediatr，1997，44：173-229.

[8] 谷献芳，华子瑜.高压氧对胆红素脑病新生鼠海马神经细胞凋亡和学习记忆的影响[J].第三军医大学学报，2009，31(18)：1770-1773.

[9] He X H，Xing D M，Ding Y，et al.Determination of paeoniflorin in rat hippocampus by high-performance liquid chromatography after intravenous administration of paeoniae radix extract[J].Journal of Chromatography B，2004，802(2)：277-281.

[10] 孙 蓉，吕丽莉，刘国卿.芍药苷对小鼠学习记忆能力的影响[J].中药药理与临床，2006，22(1)：23-25.

[11] Kim I D，Ha B J.*Paeoniflorin* protects RAW264.7 macrophages from LPS-induced cytotoxicity and genotoxicity[J].Toxicology in Vitro，2009，23(6)：1014-1019.

[12] Mao Q Q，Zhong X M，Feng R C，et al.Protective effects of paeoniflorin against glutamate-induced neurotoxicity in PC12 cell via antioxidant mechanisms and Ca^{2+} antagonism[J].Cell Mol Neurobiol，2010，30(7)：1059-1066.

[13] 吴玉梅，许汉鹏，王春婷，等.芍药苷对培养小鼠皮层神经元的保护作用[J].中国药理学与毒理学，2002，16(3)：172-175.

[14] 刘 洋，崔广智，张艳军，等.芍药苷对皮质醇损伤大鼠皮层神经元的预防性保护作用[J].中国中药杂志，2010，35(2)：208-210.

[15] Nijboer C H，Heijnen C J，Groenendaal F，et al.A dual role of the NF-{kappa}B pathway in neonatal hypoxic-ischemic brain damage[J].Stroke，2008，39(9)：2578-2586.

[16] Liu J，Jin D Z，Xiao L，et al.Paeoniflorin attenuates chronic cerebral hypoperfusion-induced learning dysfunction and brain damage in rats[J].Brain Res，2006，1089(1)：162-170.

[17] Wu H，Li W，Wang T，et al.Paeoniflorin suppress NF-κB activation through modulation of I kappa Balpha and enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in human gastric carcinoma cells[J].Biomed Pharmacother，2008，62(9)：659-666.

（责任编辑：冉明会）