

·论著·

黄芩甙对 H_2O_2 诱导星形胶质细胞 NF- κ B/ $IKB\alpha$ 表达的影响

宋元宗, 杨于嘉, 贾延勤

(中南大学湘雅医院儿科, 湖南 长沙 410008)

[摘要] 目的 研究黄芩甙和 H_2O_2 对星形胶质细胞中 NF- κ B/ $IKB\alpha$ 表达的影响。方法 体外培养星形胶质细胞, 分别应用 H_2O_2 、黄芩甙及两者联用处理, 应用细胞免疫化学法检测 NF- κ B 分子 P65 亚基核移位情况, Western Blot 检测细胞中 $IKB\alpha$ 表达变化。结果 在星形胶质细胞中, H_2O_2 可使 P65 由胞浆向胞核移位, 并降低 $IKB\alpha$ 的表达水平; 黄芩甙自身不会导致 P65 核移位及影响 $IKB\alpha$ 表达水平, 但可减少 H_2O_2 所致 P65 亚基核移位及细胞内 $IKB\alpha$ 降低的程度。结论 黄芩甙能减轻 H_2O_2 所致星形胶质细胞 $IKB\alpha$ 异常降低及 NF- κ B 异常活化。

[关键词] 星形胶质细胞; 黄芩甙; 过氧化氢; 核因子- κ B; $IKB\alpha$

[中图分类号] R-33; R965.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2002)06-0436-03

Effect of Baicalin on the Expression of Nuclear Factor- κ B/ $IKB\alpha$ Induced by Hydrogen Peroxide in Astrocytes

SONG Yuan Zong, YANG YurJia, JIA YanJie

Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of baicalin, a flavonoid extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi, on the expression of nuclear factor (NF)- κ B/ $IKB\alpha$ induced by hydrogen peroxide (H_2O_2) in astrocytes. **Methods** Astrocytes were cultured in vitro, and treated with various concentrations of baicalin or/ and H_2O_2 . Immunocytochemistry was used to determine the translocation of P65 from cytoplasm to nucleus; and Western Blot was used to determine the expression change of $IKB\alpha$ in astrocytes. **Results** In astrocytes, H_2O_2 could induce the translocation of P65, a subunit of NF- κ B, from cytoplasm to nucleus, and reduce the level of $IKB\alpha$ expression, while baicalin could inhibit this effect. **Conclusions** Baicalin may decrease the degree of $IKB\alpha$ degradation and NF- κ B activation induced by H_2O_2 in astrocytes.

Key words: Astrocytes; Baicalin; Hydrogen peroxide; Nuclear factor- κ B; $IKB\alpha$

核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是一种重要的转录因子, 参与感染^[1]、缺血再灌注^[2]、创伤^[3]等多种脑损伤过程, 是炎症反应激活的关键^[4]。NF- κ B 分子由 P65 和 P50 两个亚基组成, 与其抑制因子 $IKB\alpha$ 结合而位于胞浆。在某些因素作用下, $IKB\alpha$ 被磷酸化后与 NF- κ B 分离, 而后被降解, 于是 NF- κ B 被激活并进入胞核而发挥其转录因子的作用, 启动一系列炎症相关基因的表达。我科通过对 10 余种中药单体成分的筛选, 发现黄芩甙对大鼠感染性脑水肿有较强保护作用^[5], 并证明这种保护作

用与黄芩甙抑制感染性脑水肿时脑组织内 NF- κ B 的异常活化有关^[6]。近来又发现黄芩甙具有拮抗 H_2O_2 所致星形胶质细胞氧应激损伤的功能, 但其具体机理尚有待研究。本文观察黄芩甙对星形胶质细胞中 H_2O_2 诱导的 NF- κ B/ $IKB\alpha$ 异常表达的影响, 为脑损伤的治疗提供新的思路和线索。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和设备

[收稿日期] 2002-04-16; [修回日期] 2002-08-10

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题 (No. 39870251)

[作者简介] 宋元宗 (1970-), 男, 医学博士, 主治医师, 现为暨南大学第一附属医院围产医学中心在站博士后。

DMEM 培养基为 Gibco 产品;兔抗 P65 抗体购自北京晶美公司,羊抗兔 IgG SABC 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒购自武汉博士德公司;兔抗 IKB 多克隆抗体购自 CHEMICON 公司;羊抗兔显色试剂盒为 LAB VISION 公司产品。黄芩甙(纯度 98%,分子量 446.35)由我院药剂科提供。

1.2 实验分组

A 组为空白组,细胞不用黄芩甙预处理,也不用 H_2O_2 损伤细胞;B 为对照组,不用黄芩甙预处理,但以终浓度为 $160\ \mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理 1 h;C 组和 D 组细胞分别用 $40\ \mu\text{mol/L}$ 和 $80\ \mu\text{mol/L}$ 的黄芩甙处理 30 min,然后再用 $160\ \mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理 1 h;E 组和 F 组细胞分别用 $40\ \mu\text{mol/L}$ 和 $80\ \mu\text{mol/L}$ 的黄芩甙处理 90 min,不以 H_2O_2 处理。

1.3 星形胶质细胞培养

参照文献^[7]进行。取生后 1 d SD 大鼠前脑,剪碎后以 0.25%胰酶消化 15 min,灭活胰酶后反复吹打成单细胞悬液。将悬液 $200\ \text{g}$ 离心 10 min,吸除上层,加入适量的培养液后再次小心吹打成细胞悬液,通过 300 目钢网过滤。调整细胞密度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$,而后接种至培养瓶,在湿化、8% $\text{CO}_2/92\%$ 空气的孵箱中培养。接种后 3 d 始换培养基,以后每周换液 2 次培养。细胞融合成片时传代接种至新瓶,传代 2~3 次后,可得纯度 > 90% 的星形胶质细胞(GFAP 免疫细胞化学染色)。

1.4 免疫细胞化学

细胞固定后用 PBS 洗 5 min,用含 0.75% H_2O_2 的甲醇溶液灭活内源性过氧化物酶。以 0.1% 的 Triton X-100 处理 30 min 后,滴加正常山羊血清以消除非特异性染色。弃去羊血清后滴加兔抗 GFAP 抗体,4 $^\circ\text{C}$ 过夜,而后滴加生物素化羊抗兔 IgG,在湿盒内 37 $^\circ\text{C}$ 保温 30 min。PBS 振洗后滴加 ABC 复合试剂,在湿盒内 37 $^\circ\text{C}$ 保温 30 min。用新鲜配制的底物溶液显色 3~10 min。自来水洗 5 min 后拍照,或脱水、透明、封片后保存。

P65 免疫荧光检测基本程序同上,其中一抗用 P65 多抗代替,链酶亲和素用荧光试剂 Cy3 代替,不用 DAB 显色。应用荧光显微镜观察红色荧光信号,每样本随机观察 5~7 个视野(300 $\times$),以胞核黄色信号阳性细胞占有所有观察细胞数的百分比,来代表 NF- κ B 激活的百分率。

1.5 Western Blot 分析

收集细胞(在 $75\ \text{cm}^2$ 培养瓶中培养至融合成片),用细胞裂解液 $100\ \mu\text{l}$ 裂解 15 min。沸水浴变性 5 min, $14\ 000\ \text{rpm}$ 离心 20 min,收集上清测定蛋

白质含量, - 70 $^\circ\text{C}$ 保存待用。取 50~100 μg 蛋白在 12% 的 SDS-PAGE 胶中电泳。之后将蛋白质在电转移电泳槽(40 mA, 15 h)中转至硝酸纤维素(NC)膜。取出膜后用封闭液(正常山羊血清)室温下封闭 3 h,取出 NC 膜,用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,然后置于杂交袋中,加入兔抗 IKB 多抗(1:500),4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜。采用羊抗兔显色试剂盒检测多抗信号,拍摄照片记录结果。

1.6 统计学处理

各实验组间阳性率的比较选用行 χ^2 列表资料的 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为显著性意义标准。

2 结果

2.1 星形胶质细胞的培养与鉴定结果

星型胶质细胞以 GFAP 为标志,进行免疫细胞化学鉴定。图 1 表示 GFAP 显色阳性细胞,I 型星形胶质细胞胞体大而扁平,立体感不强,相互连接成片,而 II 型星形胶质细胞胞体较小,但细胞突起明显,可见大量胶质原纤维酸性蛋白,两型细胞均为胞浆着色而胞核淡染。

2.2 黄芩甙抑制 H_2O_2 所致神经胶质细胞 P65 由胞浆向胞核移位

2.2.1 H_2O_2 可引起 P65 由胞浆向胞核移位 空白组细胞扁平,立体感不强,胞浆 P65 信号强于胞核。见图 2A。 H_2O_2 作用后,对照组细胞不仅胞体立体感增强,细胞突起断裂多见,而且胞核 P65 信号明显增强。见图 2B。

2.2.2 黄芩甙预处理可减少 H_2O_2 所致 P65 核移位程度 星形胶质细胞以 $40\ \mu\text{mol/L}$ 的黄芩甙预处理 1 h 后再以 H_2O_2 处理,P65 核移位情况减少,表现为大部分细胞胞核淡染,但胞核深染的情况仍可见到。见图 2C。细胞用 $80\ \mu\text{mol/L}$ 的黄芩甙预处理后再以 H_2O_2 处理,胞核深染的情况难以见到,可见较多淡染的胞核周围 P65 信号浓聚。见图 2D。

2.2.3 黄芩甙本身不会导致 P65 核移位 $40\ \mu\text{mol/L}$ 和 $80\ \mu\text{mol/L}$ 的黄芩甙作用 2 h 后,与空白组比较,均未发现 P65 核移位增多表现,胞浆信号强于胞核,提示黄芩甙自身不会诱导星形胶质细胞中 NF- κ B 的激活。见图 2E 和图 2F。

2.2.4 P65 核移位的定量检测 H_2O_2 可使胞核 P65 阳性细胞数目增多,而黄芩甙本身无此种作用,但可减轻 H_2O_2 所致 P65 胞核移位程度。见表 1。由于 P65 是 NF- κ B 分子的一个亚单位,以上结果提示, H_2O_2 可激活星形胶质细胞中 NF- κ B,使之向胞

核移位,而黄芩甙可减轻 H₂O₂ 所致 NF-KB 活化,而其自身并不直接影响 NF-KB 的活化水平。

表 1 P65免疫荧光检测法测得的胞核数目
Table 1 Cytonucleus number assayed
by P65 immunofluorescence

分组	细胞核数目		合计	P65 阳性率(%)
	P65 阴性	P65 阳性		
A 组	253	17	270	6.3
B 组	269	120	389	30.8 ^a
C 组	298	70	368	19.0 ^b
D 组	236	36	272	13.2 ^b
E 组	239	16	255	6.7
F 组	272	19	291	6.5
合计	1567	278	1845	15.1

注: a 与 A 组比较 P < 0.01; b 与 B 组比较 P < 0.01

2.3 黄芩甙减轻 H₂O₂ 诱导的神经胶质细胞 IKBα 表达下降程度

在星形胶质细胞中, H₂O₂ 可降低 IKBα 的表达水平,而 40 μmol/L 及 80 μmol/L 的黄芩甙对细胞内 IKBα 的表达水平没有影响,但这两种浓度的黄芩甙预处理均可减轻 H₂O₂ 所致 IKBα 表达水平下降的程度,而且浓度为 80 μmol/L 的黄芩甙预处理效果较 40 μmol/L 的效果更为显著。见图 3。说明这种作用有剂量依赖性。

3 讨论

研究表明,活性氧参与了神经系统感染^[8]、缺血再灌注^[9]及创伤^[10]等的发生发展过程,是介导神经系统损伤的重要环节。如前所述,NF-KB/IKBα 的异常表达也参与以上脑损伤过程,而由于 NF-KB 的异常激活是许多疾病发生的关键因素,NF-KB 已经被认为是一个有前景的用于治疗疾病的新药作用靶点^[4]。本文研究结果显示, H₂O₂ 可导致星形胶质细胞中 IKBα 表达下降及 NF-KB 活化,而黄芩甙本身不直接影响 NF-KB/IKBα 的表达,但对 H₂O₂ 诱导的这种 NF-KB/IKBα 的异常表达有拮抗作用。本文发现

一方面提示黄芩甙在治疗活性氧参与的感染、缺血再灌注损伤以及创伤等神经系统损伤方面可能具有一定的临床应用前景,值得进一步研究开发,从而为脑损伤的治疗提供了新的思路和线索;另一方面,本研究也提示黄芩甙拮抗星形胶质细胞氧应激损伤的机制可能与其抑制 H₂O₂ 诱导的 IKBα 表达下降及 NF-KB 异常活化有关,从而为阐明黄芩甙这一传统药物抗脑水肿的机制提供了细胞和分子水平的实验依据。(图见彩色插页 I)

[参 考 文 献]

[1] Clemens JA, Stephenson DT, Smalstig B, et al. Global ischemia activates nuclear factor-KB in forebrain neurons of rats [J]. Stroke, 1997, 28(5): 1073 - 1080.

[2] Nonaka M, Chen XH, Pierce JE, et al. Prolonged activation of NF-KB following traumatic brain injury in rats [J]. J Neurotrauma, 1999, 16(11): 1023 - 1034.

[3] 毛定安,杨于嘉,俞燕,等. 核因子-KB 在大鼠脑水肿的变化及热休克反应对其影响的研究 [J]. 中国当代儿科杂志,1999, 1(5): 277 - 280.

[4] Perkins ND. The Rel/ NF-kappa B family: friend and foe [J]. Trends Biochem Sci, 2000, 25(9): 434 - 440.

[5] 杨于嘉,朱彩云,陈翔,等. 黄芩甙对百日咳菌液致大鼠脑水肿的保护作用 [J]. 中华医学杂志,1998, 78(8): 630 - 632.

[6] 俞燕,杨于嘉,毛定安,等. 黄芩甙对大鼠感染性脑水肿 NF-KB 活性的影响 [J]. 中国当代儿科杂志,2000, 2(6): 386 - 389.

[7] Poulter MO, Brown LA. Transient expression of GABAA receptor subunit mRNAs in the cellular processes of cultured cortical neurons and glia [J]. Brain Res Mol Brain Res, 1999, 69(1): 44 - 52.

[8] McNaught KS, Jenner P. Extracellular accumulation of nitric oxide, hydrogen peroxide, and glutamate in astrocytic cultures following glutathione depletion, complex I inhibition, and/or LPS-induced activation [J]. Biochem Pharmacol, 2000, 60(7): 979 - 988.

[9] Kontos HA. Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willis lecture [J]. Stroke, 2001, 32(11): 2712 - 2716.

[10] Rosenberger J, Petrovics G, Buzas B. Oxidative stress induces proenkephalin FQ and proenkephalin gene expression in astrocytes through p38 and ERK-MAP kinases and NF-kappaB [J]. J Neurochem, 2001, 79(1): 35 - 44.

(本文编辑:俞燕)

黄芩甙对 H_2O_2 诱导星形胶质细胞 NF- κ B / I κ B α 表达的影响

(正文见第 436 页)

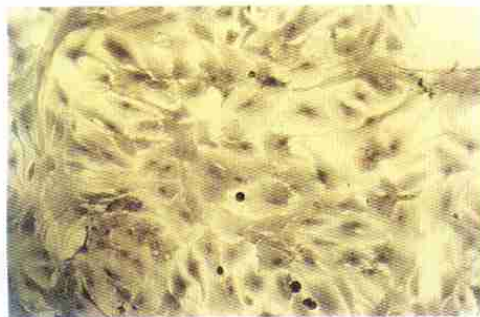


图 1 星形胶质细胞 (GFAP 染色, 放大倍数 $\times 200$) 的免疫细胞化学结果。星形胶质细胞传代 3~5 次后染色
Figure 1 Immunocytochemistry results for astrocytes (GFAP staining with magnification $\times 200$). Astrocytes were passaged for 3-5 times before immunostaining.

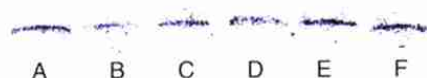


图 3 黄芩甙对 H_2O_2 诱导星形胶质细胞中 I κ B α 蛋白降解的抑制作用。A: 空白组; B: 对照组, 细胞用 160 μ mol H_2O_2 处理 1 h; C 和 D: 细胞分别用 40 μ mol 和 80 μ mol 的黄芩甙处理 30 min, 然后再用 160 μ mol H_2O_2 处理 1 h; E 和 F: 细胞分别用 40 μ mol 和 80 μ mol 的黄芩甙处理 90 min

Figure 3 Effect of baicalin on degradation of I κ B α protein induced by H_2O_2 in astroglial cells, determined with Western Blot. Astrocytes cells were cultured as indicated in Material and Method section, and then treated as A: Blank; B: Control, treated with 160 μ mol of H_2O_2 for 1 h; C and D: Preincubation with 40 μ mol and 80 μ mol of baicalin, respectively, for 30 min, and then treated with 160 μ mol of H_2O_2 for 1 h; E and F: Treated with 40 μ mol and 80 μ mol of baicalin of 90 min, respectively.

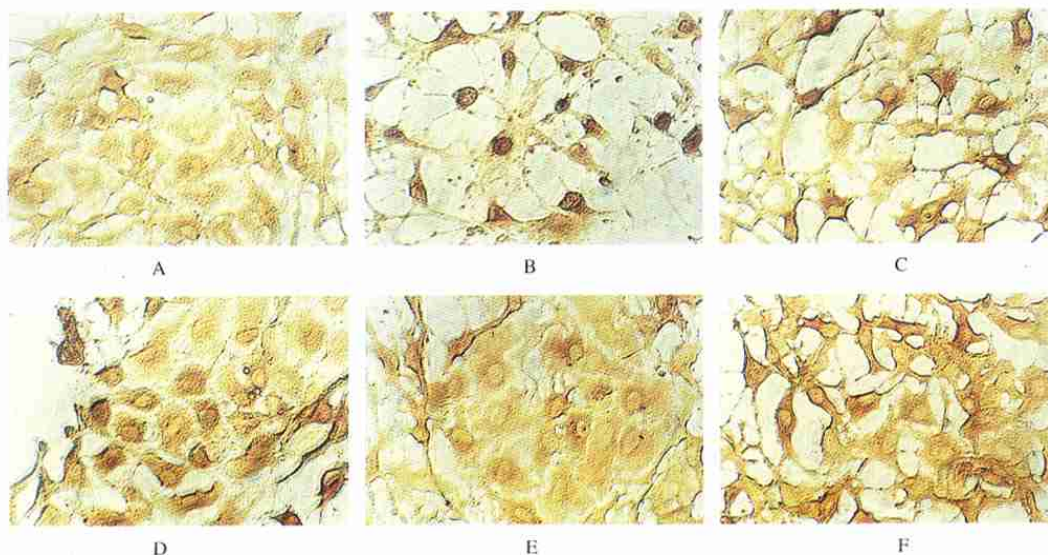


图 2 黄芩甙对 H_2O_2 诱导星形胶质细胞中 P65 由胞浆向胞核移位的抑制作用。A: 空白组; B: 对照组, 细胞用 160 μ mol H_2O_2 处理 1 h; C 和 D: 细胞分别用 40 μ mol 和 80 μ mol 的黄芩甙处理 30 min, 然后再用 160 μ mol H_2O_2 处理 1 h; E 和 F: 细胞分别用 40 μ mol 和 80 μ mol 的黄芩甙处理 90 min

Figure 2 Effect of baicalin on the translocation of P65 from cytoplasm to nucleus of astrocytes induced by H_2O_2 . Astrocytes were treated with 160 μ mol of H_2O_2 for 1 h (Fig. B), and immunocytochemistry staining revealed an obvious translocation of P65, a subunit of NF- κ B, from cytoplasm to nucleus, while no such translocation was observed in blank group (Fig. A). Baicalin preincubation (40 μ mol in Fig. C, and 80 μ mol in Fig. D, respectively) for 30 min can reduce this translocation induced by H_2O_2 , while baicalin itself (40 μ mol in Fig. E, and 80 μ mol in Fig. F, respectively) treatment for 90 min has no such effect on the translocation of P65.