



# 芍药苷对皮质酮损伤大鼠皮层神经元的预防性保护作用

刘洋, 崔广智\*, 张艳军, 高秀梅, 高艳

(1. 天津中医药大学 中药学院 天津市中药药理重点实验室, 天津 300193)

**[摘要]** 目的: 考察芍药苷对皮质酮损伤的大鼠皮层神经元的预防性保护作用, 为抗抑郁中药新药研发提供实验基础。方法: 体外培养 16 d 胎鼠皮层神经元, 于原代第 7 天加入各浓度(0.5, 2, 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 芍药苷预处理 30 min 后, 加入皮质酮(200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 损伤, 采用 MTT 法检测芍药苷对神经元活力的影响, 采用 DAPI 染色考察芍药苷对神经元凋亡形态的影响, 采用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒检测芍药苷对神经元凋亡的影响。结果: 与模型组比较, 各剂量组(0.5, 2, 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 芍药苷均可显著提高神经元的活力( $P < 0.05$ ), 2, 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  芍药苷可以显著降低神经元的凋亡率( $P < 0.05$ )。结论: 芍药苷对皮质酮损伤的大鼠皮层神经元损伤具有预防性保护作用。

**[关键词]** 芍药苷; 神经元; 皮质酮; 神经保护

皮质酮(CORT)是啮齿类动物主要的糖皮质激素(glucocorticoids, GC)。临床研究表明, 焦虑和抑郁症病人的下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic pituitary adrenal axis, HPA)功能亢进, 血中糖皮质激素水平显著升高<sup>[1]</sup>, 脑神经细胞上存在介导糖皮质激素作用的受体, 研究表明, 持续高浓度皮质酮可以导致淋巴细胞、皮层及海马神经细胞损伤, 本实验拟以体外培养的大鼠皮层神经元为研究对象, 考察芍药苷对皮质酮损伤的大鼠皮层神经元的预防性保护作用, 为抗抑郁中药新药研发提供实验基础。

## 1 材料

**1.1 动物** 胎龄 16 d(E16)SD 大鼠, SPF 级的雌雄 SD 大鼠晚上合笼, 以第 2 天早上见到脱落的阴栓, 则为交配成功, 为 0 d(E0), 雌雄 SD 大鼠[SCXK(京)2005-0013]购于中国医学科学院实验动物研究所。

**1.2 试剂与仪器** DMEM/F12 培养基(Hychem, Cat. No. NUA0143); B27 无血清培养基添加剂(GIB-

CO 公司, Cat. No. 17504-044); 特级胎牛血清(Hyclone 公司, Cat. No. SH30070.03); 左旋多聚赖氨酸(Sigma 公司, Cat. No. P1399-1MG); 四甲基偶氮唑(MTT); Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基, KGA107); 皮质酮(Sigma, 纯度  $\geq 98.5\%$ ); 4', 6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride(DAPI, Sigma 公司); 芍药苷(天津中新药业中药现代化技术工程中心, 纯度  $\geq 98.0\%$ ); CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(Forma 3110, Thermo); 荧光显微镜(DMR  $\times$  A2, Leica); 流式细胞仪(FACS)。

## 2 方法

**2.1 大鼠皮层神经元的分离和培养** 取孕龄为 16 d 的大鼠, 脱臼处死后 75% 乙醇浸泡消毒。无菌操作取出胎鼠大脑的皮层部份(冰上操作), 眼科剪剪碎后, 用 0.125% 的胰酶 37  $^{\circ}\text{C}$  消化 10 min, 胎牛血清终止消化, 用移液枪吸头轻轻吹打混匀, 过 200 目筛网, 1 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 弃上清液。加 15 mL 种植液(DMEM/F12 + 10% 胎牛血清 + 0.5% 双抗)重悬, 接种于 75  $\text{cm}^2$  培养瓶中差速培养 1 h。1 h 后弃除贴壁细胞, 将细胞悬液 1 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 弃上清液。加 10 mL 种植液重悬细胞, 台盼蓝计数, 调整细胞数为  $1 \times 10^6$  个/mL, 接种于预先包被好的培养板中。4 h 后换成含 B<sub>27</sub> 无血清培养液(DMEM/F12 + 2% B<sub>27</sub> + 0.5% 双抗)。以后隔天半量换液。培养至 72 h 后加入终质量浓度为 2.5  $\text{mg} \cdot$

**[收稿日期]** 2009-07-06

**[基金项目]** 教育部重点课题(208009); 天津市科技攻关项目(06YFSZSF01600)

**[通信作者]** \* 崔广智, Tel: (022) 23052238, E-mail: cuigz2003@yahoo.com.cn

**[作者简介]** 刘洋, 在读硕士, 主要从事中药药理研究, Tel: 13803082905, E-mail: liu8042222@163.com



L<sup>-1</sup>阿糖胞苷作用 48 h,以抑制神经胶质细胞的分裂增殖。于原代第 7 天用于试验。

**2.2 芍药苷对皮质酮损伤的皮层神经元活力的影响** 采用 MTT 法测定神经元活力。将原代培养的神经元以 1 × 10<sup>6</sup> 个/mL 接种于 96 孔板(100 μL/孔),正常培养 7 d 后加入芍药苷(0.5,2,10 μmol · L<sup>-1</sup>)预处理 30 min,加入终浓度 200 μmol · L<sup>-1</sup>皮质酮损伤神经元,芍药苷作用 48 h 后,向培养板中加入 100 μL 终质量浓度为 0.5 g · L<sup>-1</sup>的 MTT 溶液,培养箱中孵育 4 h,弃除 MTT 溶液,向每孔中加入 100 μL 二甲基亚砷,利用酶标仪在 570 nm 处测定各组细胞吸光度 A 值。

**2.3 芍药苷对皮质酮损伤神经元凋亡形态的影响** 采用 DAPI 染色法考察神经元凋亡形态。将原代培养的神经元以 1 × 10<sup>6</sup> 个/mL 接种于预先置有 0.01 g · L<sup>-1</sup>多聚赖氨酸包被的无菌盖玻片的 12 孔板(1.5 mL/孔),正常培养 7 d 后加入芍药苷(0.5,2,10 μmol · L<sup>-1</sup>)预处理 30 min,加入终浓度 200 μmol · L<sup>-1</sup>皮质酮损伤神经元,芍药苷作用 48 h 后,4%多聚甲醛固定,制备细胞爬片。DAPI 染色 5 min,荧光显微镜下观察,每组计数 6 个视野,考察神经元凋亡率,凋亡率 = 凋亡细胞数/细胞总数 × 100%,实验重复 3 次。

**2.4 流式细胞术检测芍药苷对神经元早期凋亡的影响** 将原代培养的神经元以 1 × 10<sup>6</sup> 个/mL 接种于预先包被多聚赖氨酸的 6 孔板(2 mL/孔),正常培养 7 d 后加入芍药苷(0.5,2,10 μmol · L<sup>-1</sup>)预处理 30 min,加入终浓度 200 μmol · L<sup>-1</sup>皮质酮损伤神经元,芍药苷作用 48 h 后,用 0.125% 的胰蛋白酶液消化神经元,将细胞悬液转移至 5 mL 流式管中,按 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作处理细胞,上流式细胞仪(FACS)分析。

**2.5 数据处理** 应用 SPSS11.5 统计软件进行数据处理,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,单因素 ANOVA(方差分析)方法进行显著性检验。

### 3 结果

**3.1 芍药苷对皮质酮损伤的皮层神经元细胞活力的影响** MTT 实验结果表明,与模型组比较,芍药苷各剂量组(0.5,2,10 μmol · L<sup>-1</sup>)对皮质酮损伤的皮层神经元均有不同程度的保护作用,结果具有显著性差异,见表 1。

表 1 芍药苷对 200 μmol · L<sup>-1</sup>皮质酮损伤的皮层神经元活力的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/μmol · L <sup>-1</sup>	A <sub>570</sub>
对照	-	0.210 ± 0.028
模型	200	0.061 ± 0.011 <sup>3)</sup>
芍药苷	0.5	0.089 ± 0.020 <sup>1)</sup>
	2	0.148 ± 0.031 <sup>2)</sup>
	10	0.132 ± 0.032 <sup>2)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>P < 0.05, <sup>2)</sup>P < 0.01;与对照组比较<sup>3)</sup>P < 0.01(表 2 同)。

**3.2 芍药苷对皮质酮损伤的神经元凋亡形态的影响** DAPI 染色结果表明,正常细胞核呈弥散均匀荧光,细胞出现凋亡时核内出现碎片,芍药苷各剂量组均能显著抑制皮质酮引起的神经元凋亡,结果见表 2。

表 2 芍药苷对 200 μmol · L<sup>-1</sup>皮质酮损伤的神经元凋亡形态的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/μmol · L <sup>-1</sup>	凋亡率/%
对照	-	17.307 ± 2.738
模型	200	31.599 ± 5.007 <sup>3)</sup>
芍药苷	0.5	24.517 ± 6.030 <sup>1)</sup>
	2	19.382 ± 6.067 <sup>2)</sup>
	10	16.632 ± 5.697 <sup>2)</sup>

**3.3 芍药苷对皮质酮损伤的神经元凋亡的影响** 0.5,2,10 μmol · L<sup>-1</sup>组凋亡率分别为(44.0 ± 3.0)%, (28.7 ± 4.4)%, (35.9 ± 4.4)%,而模型对照组凋亡率为(58.4 ± 12.7)%,结果表明 2,10 μmol · L<sup>-1</sup>芍药苷可显著降低皮质酮引起的神经元凋亡比例。

### 4 讨论

抑郁症属于心理应激反应范畴或应激作用的结果,慢性应激所引起的糖皮质激素的持续升高与抑郁症的发病机制极为相似<sup>[2]</sup>,脑神经细胞上普遍存在着介导 GC 作用的受体,故本研究采用皮层神经元细胞为实验对象,以 200 μmol · L<sup>-1</sup>皮质酮损伤体外培养的神经元,模拟慢性心理应激抑郁时糖皮质激素升高的状态。结果表明,皮质酮处理的神经元细胞生长状态差,悬浮细胞明显增多,细胞存活率明显低于正常细胞对照组,结果提示 200 μmol · L<sup>-1</sup>皮质酮对神经元具有一定损伤作用,可以在一定程度上体现抑郁模型的病理特征。

芍药苷(paeoniflorin, PF)在小鼠强迫游泳和悬尾实验中有抗抑郁样活性<sup>[3]</sup>,体外实验表明,芍药苷可促进皮层神经元活性且作用与剂量有明显关



系<sup>[4]</sup>,对 *N*-甲基-*D*-门冬氨酸(NMDA)诱导的钙超载损伤模型具有明显的保护作用<sup>[5]</sup>,对皮质酮、过氧化氢、谷氨酸、一氧化氮诱导 PC12 细胞凋亡具有保护作用<sup>[6-9]</sup>,芍药苷能够抑制花生四烯酸的代谢,从而发挥抗血栓的作用<sup>[10]</sup>,通过药理预适应对大鼠 MCAO 模型有神经保护作用<sup>[11]</sup>,可改变大鼠脑缺血后的神经行为,有抗神经元凋亡作用<sup>[12]</sup>,并且还有一定抗氧化<sup>[13]</sup>和抗惊厥<sup>[14]</sup>等作用。

本实验结果发现,芍药苷各浓度组与模型组比较均能显著提高皮质酮损伤的皮层神经元的活力。DAPI 形态观察及流式细胞术检测发现预先给予芍药苷浓度为 2, 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理后再加入皮质酮,可对抗皮质酮所致的神经毒性,能显著降低皮层神经元的凋亡率( $P < 0.05$ ),但芍药苷对抗皮质酮所致神经损伤的机制尚待进一步的研究。

#### [参考文献]

[1] Barden N. Modulation of glucocorticoid receptor gene expression by antidepressant drugs[J]. *Pharmacopsychiat*, 1996, 29(1): 12.

[2] 路翠艳,潘芳. 应激反应中 HPA 轴的中枢调控和免疫调节[J]. *中国行为医学科学*, 2003, 12(3): 353.

[3] Mao Q Q, Ip S P, Tsai S H, et al. Antidepressant-like effect of peony glycosides in mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 119(2): 272.

[4] 吴玉梅,许汉鹏,王春婷,等. 芍药苷对体外培养大鼠星形胶质细胞活性的作用[J]. *解剖学报*, 2002, 33(4): 430.

[5] 杨军,何丽娜. 芍药苷对大鼠皮层神经细胞钙超载损伤的保护作用[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2001, 5(3): 164.

[6] Mao Q Q, Ip S P, Ko K M, et al. Peony glycosides protect against corticosterone-induced neurotoxicity in PC12 cells[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2009, 29(5): 643.

[7] 孙蓉,武栋栋,张作平,等. 过氧化氢诱导 PC12 细胞凋亡及芍药苷的保护作用[J]. *中国药理学杂志*, 2006, 41(22): 1710.

[8] 孙蓉,武栋栋,张作平,等. 芍药苷对谷氨酸引起的 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. *中国药理学杂志*, 2006, 41(23): 1792.

[9] 孙蓉,武栋栋,张作平,等. 一氧化氮诱导 PC12 细胞凋亡及芍药苷的保护作用[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2005, 10(11): 1266.

[10] Ryu G, Park E K, Joo J H, et al. A new antioxidant monoterpenic glycoside, alpha-benzoyloxypaeoniflorin from *Paeonia suffruticosa*. [J]. *Arch Pharm Res*, 2001, 24(2): 105.

[11] 王国峰,陈冬梅. 芍药苷诱导药理预适应抗脑缺血的神经保护作用[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2007, 12(5): 504.

[12] 王君萍,韦颖梅,郭梅. 芍药苷对大鼠脑缺血再灌注损伤细胞凋亡相关基因的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2008, 6(3): 310.

[13] Dumas T C, McLaughlin J R, Ho D Y, et al. Gene therapies that enhance hippocampal neuron survival after an excitotoxic insult are not equivalent in their ability to maintain synaptic transmission[J]. *Exp Neurol*, 2000, 166(1): 180.

[14] Fujii T, Kanai T, Kozuma S, et al. Theoretical basis for herbal medicines, Tokishakuyaku-san and Sairei-to, in the treatment of autoimmunity-related recurrent abortion by correcting T helper-1/T helper-2 balance[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2000, 44(6): 342.

## Prophylactic protective effects of paeoniflorin on corticosterone-induced primary cultures of rat cortical neurons damages

LIU Yang, CUI Guangzhi\*, ZHANG Yanjun, GAO Xiumei, GAO Yan

(Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Laboratory of Chinese Medicine Pharmacology, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the prophylactic neuroprotective effect of paeoniflorin (PF) on corticosterone-induced primary cultures of rat cortical neurons damages. **Method:** Primary cultures of neurons from the of 16 days old embryo rats were used to study. Neurons in the experimental group were treated with cort (200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 30 min after the pretreatment of PF (0.5, 2, 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). We used MTT assay to detect the action of paeoniflorin on neuronal activity. DAPI staining to study of the influence of PF on neuronal apoptosis morphology, and Annexin V-FITC/PI apoptosis detection kit to inspect the impact of paeoniflorin on the early neuronal apoptosis. **Result:** Compared with model group, every dose of PF (0.5, 2, 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) can raise the neuronal activity notably ( $P < 0.05$ ), PF of 2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  and 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  can reduce the rate of neuronal apoptosis. **Conclusion:** Our data indicated that PF achieved prophylactic neuroprotective effect through against corticosterone-induced neurons damages.

[Key words] paeoniflorin; neurons; corticosterone; neuroprotection

doi: 10.4268/cjcm20100220

[责任编辑 张宁宁]