·论 著·

银杏叶提取物对鱼藤酮和1-甲基-4-苯基吡啶离子诱导PC12细胞损伤的保护作用

王铭维[1*]，顾 平[1]，刘 力[2]，王彦永[1]，崔冬生[2]
(1.河北医科大学第一医院神经内科，石家庄 050031；2.第一医院中心实验室)

[摘要] **目的**：观察银杏叶提取物(extract of *Ginkgo biloba* leaves，EGB)对PC12细胞损伤的保护作用。**方法**：采用细胞培养的方法，建立PC12细胞的鱼藤酮和1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP^+)损伤的模型。用倒置显微镜观察细胞形态，MTT法测定细胞存活率，ELISA法检测胞外多巴胺(DA)水平。**结果**：同毒物组比较，EGB在0.35、0.70、1.40 mg/ml浓度下能减轻MPP^+引起的PC12细胞损伤，在1.40 mg/ml浓度下能减轻鱼藤酮引起的损伤，明显提高细胞的存活率，增高胞外DA水平：2 mmol/L MPP^+和10 μmol/L鱼藤酮作用下胞外DA分别为(6.875±0.201)和(5.321±0.167) ng/ml，而1.40 mg/ml EGB分别与2 mmol/L MPP^+或10 μmol/L鱼藤酮共同作用，DA升高至(7.595±0.139) ng/ml($P<0.05$)和(6.917±0.201) ng/ml($P<0.01$)。**结论**：EGB对鱼藤酮和MPP^+体外诱导PC12细胞的损伤具有明显的保护作用。

[关键词] 银杏叶提取物；PC12细胞；鱼藤酮；1-甲基-4-苯基吡啶离子
[中图分类号] R 282.710.5 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2005)02-0155-03

Protective effect of *Ginkgo biloba* L. extract on PC12 cell damage induced by rotenone and MPP^+ *in vitro*

WANG Ming-wei[1*], GU Ping[1], LIU Li[2], WANG Yan-yong[1], CUI Dong-sheng[2] (1. Department of Neurology, No. 1 Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, China; 2. Central Laboratory, No. 1 Hospital)

[ABSTRACT] **Objective**: To study the protective effect of *Ginkgo biloba* L. extract(EGB) on PC12 cell damage induced by rotenone and 1-methyl-4-phenylpyridium(MPP^+). **Methods**: PC12 cells damage model was induced with different concentrations of rotenone and MPP^+ and were treated with EGB. Then cell morphology was observed; survival rate and ultracellular dopamine (DA) level were determined by MTT assay and ELISA assay, respectively. **Results**: MPP^+-induced damage was attenuated by pre- or co-treatment with EGB at 0.35, 0.70 and 1.40 mg/ml, while rotenone-induced damage was attenuated with EGB only at 1.40 mg/ml. The DA concentrations of extracellular at 2 mmol/L MPP^+ (6.875±0.201) ng/ml and 10 μmol/L rotenone (5.321±0.167) ng/ml increased to (7.595±0.139) ng/ml ($P<0.05$) and (6.917±0.201) ng/ml ($P<0.01$) after 1.40 mg/ml EGB were added. **Conclusion**: EGB can obviously protect PC12 cell damage induced by rotenone and MPP^+ *in vitro*.

[KEY WORDS] extract of *Ginkgo biloba* L.; PC12 cell; rotenone; 1-methyl-4-phenylpyridium
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(2): 155-157]

研究表明，环境毒素可能造成中脑多巴胺(DA)神经元变性死亡，从而表现为帕金森病(Parkinson disease, PD)[1]。研究发现用毒物1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP^+)、杀虫剂鱼藤酮(rotenone)等制成的细胞模型及表现为PD的动物模型中，多巴胺神经元的毒性作用表现在很多方面，尤其是对线粒体复合体Ⅰ有选择性损害。因此，保护神经元或减缓其损害，是预防和治疗PD的重要途径。

银杏叶提取物(EGB)主要成分是黄酮类和萜内酯类，能在许多病理情况下减轻神经细胞的损伤与凋亡。本研究考察EGB对由鱼藤酮和MPP^+导致的PC12细胞损伤是否具有保护作用。

1 材料和方法

1.1 药品和试剂 EGB由德国威玛舒培博士药厂生产，批号7400500，为棕黄色液体，其中银杏叶提取物含量3.5 mg/ml；MPP^+购于Sigma公司；马血清和DMEM基础培养液购于Gibco公司；胎牛血清，杭州四季青生物制品厂；四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、鱼藤酮，北京华美公司；DA检测试剂盒，天津市宇基医疗技术有限公司。

1.2 细胞培养 PC12细胞由美国匹兹堡大学刘永健教授惠赠；细胞接种在含5%马血清和5%胎牛血清的DMEM基础培养液中，并含2 mmol/L谷氨酰胺、100 U/ml青霉素、100 mg/ml链霉素。

[基金项目] 河北省自然科学基金(303479).
[作者简介] 王铭维(1956-)，女(汉族)，博士，教授，博士生导师.
* Corresponding author. E-mail: wyong7673@sohu.com

1.3　细胞毒性实验　取对数生长期的 PC12 细胞，分别以 2×10^5/ml 种于 96 孔板，每孔 100 μl，置于 37℃、5%CO_2 饱和湿度的培养箱中孵育，24 h 后换培养液。

分组如下：(1)正常对照组；(2)鱼藤酮组：鱼藤酮用 DMSO 溶解，再用培养液稀释，浓度 1.0、10 μmol/L，每个浓度的 DMSO 终浓度均为 0.05%（预实验表明 DMSO 终浓度＜0.1% 对细胞无毒性）；(3)MPP^+ 组，浓度为 1.0、2.0 mmol/L；(4)EGB 组；(5)鱼藤酮＋EGB 组；(6)MPP^+＋EGB 组。其中第 4、5、6 组除加入上述浓度的鱼藤酮或 MPP^+ 外，还加入 EGB，其含量分别为 0.35、0.70、1.40 mg/ml；每个浓度均作 5 个复孔，轻轻混匀，继续培养 72 h，毒性实验过程中进行形态学观察。

1.4　MTT 比色法检测细胞活性　达到预期培养时间前 4 h 终止培养，每孔加入 MTT(5 mg/ml)20 μl，37℃ 孵育 4 h，去除上清液，每孔加入 100 μl DMSO，孵育 1 h，振荡使结晶充分溶解，在酶标仪上检测光密度(D_{192})，计算存活率（存活率＝毒物作用组光密度值/正常对照组密光度值×100%）。

1.5　DA 浓度的测定　毒物作用 72 h 后，收集各组培养细胞的上清液，采用 ELISA 法检测 DA 的含量，每个浓度分别作 3 个复孔。

1.6　统计学分析　应用 Excel 2000 统计软件进行 t 检验。

2　结　果

2.1　形态学改变　倒置显微镜下，正常对照孔细胞状态良好，胞体折光性强，周围有亮晕，细胞均匀分布，局部有增殖小簇。EGB 组增殖明显，细胞状态良好。而鱼藤酮和 MPP^+ 组随浓度的增加细胞数量减少，胞体膨大明显，周围亮晕减弱，细胞内隐约可见点状颗粒，并随时间的延长颗粒增多；少许细胞发生分化，长出较长突起，胞体亦呈多边形。鱼藤酮＋EGB组和 MPP^+＋EGB 组细胞均匀致密，立体感增强，状态明显好于未加 EGB 组。

2.2　EGB 对 PC12 细胞活性的影响　EGB 组的浓度在 0.35、0.70、1.40 mg/ml 时，细胞状态良好，增殖明显，细胞存活率明显提高($P<0.01$，图 1)。

2.3　EGB 对鱼藤酮和 MPP^+ 导致的 PC12 细胞损伤的保护作用　鱼藤酮和 MPP^+ 作用 PC12 细胞 72 h，细胞存活率显著降低。EGB 在 0.35、0.70 mg/ml 浓度下对鱼藤酮作用下的 PC12 细胞无明显的保护作用，1.40 mg/ml 组存活率高于鱼藤酮对照组($P<0.05$)，细胞活力显著增强（图 2A）。而 MPP^+ 作用下随浓度的升高，细胞存活率降低并不显著，0.35、0.70、1.40 mg/ml EGB 对 MPP^+ 引起的细胞毒性损伤均有保护作用($P<0.01$)，且 3 个浓度之间无显著性差异（图 2B）。

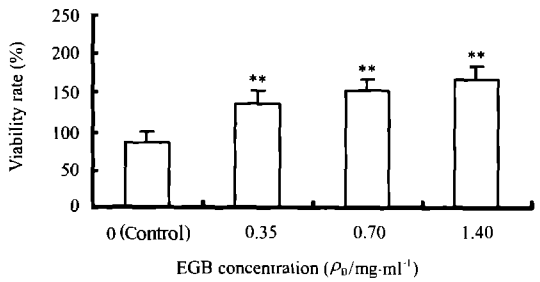

图 1　EGB 对 PC12 细胞存活率的影响

Fig 1　Effect of EGB on survival of PC12 cell

** $P<0.01$ *vs control group*; $n=5$

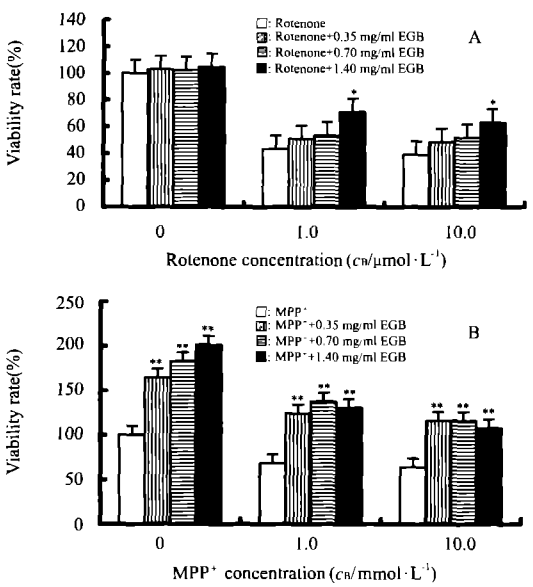

图 2　EGB 对鱼藤酮(A)和 MPP^+(B)作用 PC12 细胞 72 h 后细胞活性的影响

Fig 2　Effect of EGB on PC12 cells exposed to rotenone(A) or MPP^+(B) for 72 h

* $P<0.05$ *vs rotenone group of same concentration*;

** $P<0.01$ *vs* MPP^+ group of same concentration

2.4　EGB 对 PC12 细胞释放 DA 的影响　毒物作用细胞 72 h 后，毒物＋EGB(1.40 mg/ml)组比毒物组的胞外 DA 浓度普遍增高[MPP^+＋EGB 组 *vs* MPP^+ 组为(7.595±0.139) *vs* (6.857±0.028) ng/ml，$P<0.05$；鱼藤酮＋EGB 组 *vs* 鱼藤酮组为(6.917±0.201) *vs* (5.321±0.167) ng/ml，$P<0.01$]。EGB (1.40 mg/ml)组 DA 浓度高于对照组[(10.070±0.303) *vs* (7.556±0.104) ng/ml，$P<0.01$]。

3 讨 论

鱼藤酮和 MPP^+ 是经典的线粒体复合物 I 抑制剂,而线粒体损伤在决定细胞死亡中起关键的作用,包括线粒体能量的缺失和氧化还原的失衡、细胞膜电位的降低、线粒体呼吸链的损伤以及一系列物质如 Ca^{2+} 和细胞色素 C 等的释放,导致继发的过氧化产物和自由基的增加,引起细胞的凋亡[2]。PC12 细胞是大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤克隆化的细胞株,具有典型的神经内分泌细胞特征,能分泌 DA,是多巴胺能神经元良好的体外培养模型。

DA 替代疗法是 PD 临床常用的治疗方法,该疗法通过弥补脑内 DA 的不足,达到缓解临床症状的目的,但它并不能阻止 DA 能神经元的继续变性和凋亡。国外研究细胞和动物模型证实[3,4],一些营养因子如胶质源性神经营养因子(GDNF)及其分化因子(GDF-5)、胰岛素样生长因子(IGF-1)、脑源性神经营养因子(BDNF)等均有神经元保护作用。EGB 近年来广泛用于治疗呼吸系统、心脑血管系统疾病,特别是 EGB 对实验性脑损伤及轻中度老年性脑功能不全有较明显的治疗效果。对 Wistar 大鼠 PD 模型和 PC12 细胞的研究表明,EGB 能降低 MPP^+ 引起的细胞凋亡率,推测可能的机制为:增加了纹状体中的 DA 含量;提高组织清除自由基的能力,减轻组织的过氧化损伤;抑制 DA 能神经元的凋亡[5]。银杏内酯能在早期阶段通过降低 c-myc、Bax、caspase-3 等活性而阻滞细胞凋亡的发生,保护 PC12 抵抗氧化应激[6,7]。EGB 还能明显地改善 6-羟基多巴所致大鼠 PD 模型的旋转、震颤等症状,使多巴胺/高香草酸比率升高,提示 EGB 对保护提高残余 DA 神经元细胞活力,抑制 DA 氧化代谢有着明显的作用[8]。

EGB 对 PC12 细胞的降低凋亡、促进分化及促进 DA 分泌作用不仅体现在毒物影响的细胞,而且对正常无毒物作用的细胞亦有促进存活和增殖的作用。虽然鱼藤酮和 MPP^+ 的毒性机制类似,但 EGB 对其毒性的保护作用存在差异。对鱼藤酮引起的毒性有浓度依赖性,在较高的 EGB 浓度下(1.40 mg/ml)对鱼藤酮实验浓度才有明确保护作用,存活率增高。而对于 MPP^+ 引起的毒性,EGB 各浓度均有显著的保护作用。所以 1.40 mg/ml EGB 作用于 PC12 细胞 72 h,对于由鱼藤酮和 MPP^+ 导致的损伤有最强的保护作用。

正常情况下,DA 大部分储存在胞内的囊泡内,少部分分泌到胞外,而细胞质内游离的 DA 极少。鱼藤酮和 MPP^+ 均能影响囊泡转运蛋白对 DA 的转运[9,10],使胞质游离的 DA 增多,DA 发生被动氧化和自身氧化,并引起一系列的细胞毒性。ELISA 法检测儿茶酚胺稳定可靠,用此法检测的 PC12 细胞外 DA 反映了 DA 的分布情况。加入 EGB 后细胞外 DA 分泌量显著增加且高于毒物组,可能是胞质内的 DA 释放至胞外,表明一方面 EGB 通过直接消除氧化自由基减少过氧化氢对细胞线粒体的攻击,降低活性氧(ROS)水平及 ROS 引起的凋亡,另一方面 EGB 可能保护了囊泡转运蛋白,使其对 DA 的转运产生影响,减少了 DA 细胞质内的氧化代谢及自由基毒性,使 PC12 细胞得到保护。

[参 考 文 献]

[1] Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, *et al*. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's diseas [J]. *Nat Neurosci*, 2000, 3(12): 1301-1306.

[2] Eckert A, Keil U, Kressmann S, *et al*. Effects of EGb 761 *Ginkgo biloba* extract on mitochondrial unction and oxidative stress[J]. *Pharmacopsychiatry*, 2003, 36(Suppl 1): S15-S23.

[3] Ugarte SD, Lin E, Klann E, *et al*. Effects of GDNF on 6-OH DA-induced death in a dopaminergic cell line: modulation by inhibitors of PI3 kinase and MEK[J]. *J Neurosci Res*, 2003, 73 (1): 105-112.

[4] Hurley FM, Costello DJ, Sullivan AM. Neuroprotective effects of delayed administration of growth/differentiation factor-5 in the partial lesion model of Parkinson's disease[J]. *Exp Neurol*, 2004, 185(2): 281-289.

[5] 杨素芬,石京山,孙安盛,等. 银杏叶提取物防治帕金森病的实验研究[J]. 遵义医学院学报, 2000, 10(1): 29-32.

[6] Zhou LJ, Zhu XZ. Reactive oxygen species-induced apoptosis in PC12 cells and protective effect of bilobalide[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 293(3): 982-988.

[7] Smith JV, Burdick AJ, Golik P, *et al*. Anti-apoptotic properties of *Ginkgo biloba* extract EGb 761 in differentiated PC12 cells [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2002, 48(6): 699-707.

[8] 郜 文,王丽娟,景 朋,等. 银杏叶提取物及银杏总内酯对帕金森病大鼠模型的作用[J]. 中国新药杂志, 2000, 9(7): 458-461.

[9] Vaccari A, Saba P. The tyramine-labelled vesicular transporter for dopamine: a putative target of pesticides and neurotoxins [J]. *Eur J Pharmacol*, 1995, 292(3-4): 309-314.

[10] Staal RG, Sonsalla PK. Inhibition of brain vesicular monoamine transporter (VMAT2) enhances 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity *in vivo* in rat striata[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 293(2): 336-342.

[收稿日期] 2004-07-19 [修回日期] 2004-10-08

[本文编辑] 尹 荼