



# 银杏叶提取物及银杏内酯 B 对体外培养大鼠 神经元损伤的保护作用比较

徐静<sup>1</sup>, 孙长凯<sup>2\*</sup>, 马辉<sup>2</sup>, 王禄<sup>2</sup>, 张健<sup>2</sup>, 张玉梅<sup>2</sup>, 吴兰香<sup>2</sup>

(1. 大连医科大学 机能学实验室, 辽宁 大连 116044;

2. 大连医科大学 脑疾病研究所, 辽宁 大连 116044)

**[摘要]** 目的:经预处理给药模式观察了银杏叶提取物(extract of *Ginkgo biloba*, EGb761)及其单体银杏内酯 B(ginkgolide B, GB)对神经元损伤的影响,以探讨 EGb761 及 GB 在抗兴奋毒性神经损害中的应用价值与实施途径。方法:原代培养新生 Sprague-Dawley(SD)大鼠的海马神经元,建立谷氨酸诱导的兴奋毒性模型。采用台盼蓝染色、凋亡神经元测定及乳酸脱氢酶(LDH)测定的方法观察不同剂量 EGb761,GB 的神经保护作用,并与 NMDA(*N*-甲基-*D*-天门冬氨酸盐)受体非竞争性拮抗剂 MK801 的神经保护作用相比较。结果:EGb761,GB 在不同剂量下均能不同程度的提高细胞存活率,降低凋亡率,减少 LDH 泄露,且在一定范围内保护作用呈剂量依赖的方式。EGb761,GB 分别在  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的剂量下有最佳的保护效果,但均弱于 MK-801( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),GB 最佳剂量下保护效果优于 EGb761。结论 EGb761,GB 对谷氨酸兴奋毒性损害有保护作用。在预处理给药模式的最佳剂量下,GB 的保护效果优于 EGb761,将其用于高危人群的预防干预可能有更大价值。

**[关键词]** 银杏叶提取物;银杏内酯 B;谷氨酸;海马神经元

谷氨酸(Glutamate, Glu)是中枢神经系统内主要的兴奋性氨基酸,可参与多种生理功能<sup>[1]</sup>。但过量的谷氨酸对神经元有损伤作用,研究表明许多病理情况<sup>[2-3]</sup>都与谷氨酸兴奋毒性损害有关。人们致力于寻找高效低毒的拮抗剂用于抗兴奋毒治疗。但大多有较多并发症<sup>[4]</sup>,不能有效的用于临床。银杏叶提取物用于抗兴奋毒性神经损害的研究很多<sup>[5]</sup>,我国银杏叶产品与进口产品相比缺乏竞争力主要是因为其中银杏叶酸含量过高,因此从银杏叶中分离出的单体银杏内酯 B(ginkgolide B, GB)得到越来越多的关注,然而国内尚无两者作用比较方面的研究。本实验即利用原代培养海马神经元的谷氨酸兴奋毒性模型,经预处理给药模式观察了不同剂量 EGb761,GB 对神经元损伤的影响,以探讨 EGb761 及 GB 在抗兴奋毒性神经损害中的应用价值。

## 1 材料

**1.1 动物** 新生(出生 24 h 以内)SD 大鼠,由大连

医科大学实验动物中心提供。

**1.2 试剂、药物和器械** DMEM 干粉,谷氨酰胺,  $\text{N}_2$ ,  $\text{B}_{27}$ , Penicillin-Streptomycin, 胎牛血清, 马血清(Gibco 公司);10% 多聚赖氨酸,阿糖胞苷,*L*-谷氨酸,甘氨酸,DEPC 水,PI, Monoclonal anti- $\beta$ -Actin, Ginkgolide B(Sigma 公司);TritonX-100, 胰蛋白酶(Amresco 公司);SlowFade Light Anti-Fade Kit, Tritizol 试剂(Invitrogen 公司);MK-801(Calbiochem 公司);Cytotoxicity Detection Kit(LDH)(Roche 公司);DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System, RNase-Free DNase(Promega 公司);小鼠抗大鼠 NeuN 单克隆抗体(Chemicon 公司)。EGb761(台湾济生化学制药厂股份有限公司,德国舒培博士药厂 授权制造)。

## 2 方法

**2.1 神经元培养** 参照已有的神经细胞培养方法<sup>[6]</sup>:取 24 h 内新生的 SD 大鼠,在无菌条件下分离出双侧海马,以 0.125% 胰蛋白酶消化( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30 min),分散并制成细胞悬液,以种植液稀释(含 78% DMEM, 10% 胎牛血清, 10% 马血清, 1% 谷氨酰胺, 1% 青链霉素双抗)至细胞密度为  $1 \times 10^6$  个/ $\text{cm}^2$  和  $2 \times 10^5$  个/ $\text{cm}^2$  的细胞悬液用 200 目尼龙网过滤,接种于包被有 10% 多聚赖氨酸的 3.5 mm 培养皿和 24 孔板内的盖玻片上,放置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、含 5%  $\text{CO}_2$  的

**[收稿日期]** 2009-09-20

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(30400143)

**[通信作者]** \* 孙长凯,教授,博士生导师, E-mail: jingjingflash@163.com

**[作者简介]** 徐静,硕士,讲师,研究方向为神经生理, Tel: 13940950516



培养箱内进行培养。2 h 后换成维持液(含有 90% DMEM, 5% 马血清, 1%  $N_2$ , 2%  $B_{27}$ , 1% 谷氨酰胺, 1% 青链霉素双抗), 第 5 天, 向培养液中加入细胞分裂抑制剂阿糖胞苷  $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  以抑制非神经细胞的过度增殖, 作用 48 h 后更换新鲜培养液, 以后每周换液 2 次, 每次更换半量。

**2.2 神经细胞鉴定** 取培养 18 d 的海马神经元, 用神经元胞核特异性标记物 NeuN 进行抗血清免疫细胞化学染色, 并随机计数 500 个细胞, 计算 NeuN 阳性细胞百分率, 神经元数目为 95% 以上, 用于实验。

**2.3 分组** 培养 18 d 的海马神经元随机分为正常对照组: 暴露于含有 0.9% 生理盐水的维持液中 15 min, 弃去该维持液, 然后换上新鲜的维持液继续培养 18 h。谷氨酸损伤组: 参照 Michaels 和 Prehn 等方法<sup>[7-8]</sup>, 培养的神经元暴露于含  $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  谷氨酸和  $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  甘氨酸的维持液 15 min, 弃去该维持液, 然后换上新鲜的维持液继续培养 18 h 以评价谷氨酸的兴奋毒性。MK-801 组: 在谷氨酸暴露前 2 min 加入 MK-801 (终浓度为  $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 继续培养 18 h。药物保护组: 以不同剂量 EGb761 (分别为 25, 50, 100,  $200 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), GB (分别为 25, 50, 100,  $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 采用预处理给药模式, 在加入谷氨酸前 3 d 加入药物, 持续作用至加入谷氨酸后 18 h 以评价毒性。以上每组设 2 个平行皿, 实验重复 3 次。

**2.4 谷氨酸毒性评价** 台盼蓝染色: 室温下将培养细胞以 0.4% 台盼蓝染色 10 min, 4% 多聚甲醛在  $4 \text{ } ^\circ\text{C}$  下固定至少 30 min。倒置显微镜下随机计数 50 个相邻视野中未蓝染的细胞, 即存活细胞。

细胞存活率 (%) = (实验组细胞存活数/对照组细胞存活数)  $\times 100\%$

**凋亡神经元测定:** 按照 DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System 试剂盒要求, 显色后在荧光倒置显微镜下随机计数 50 个相邻视野中 TUNEL 阳性和阴性神经元数目 (阳性神经元显绿色, 全部神经元显红色)。

细胞凋亡率 (%) = TUNEL 阳性总数 / (TUNEL 阳性总数 + TUNEL 阴性总数)  $\times 100\%$

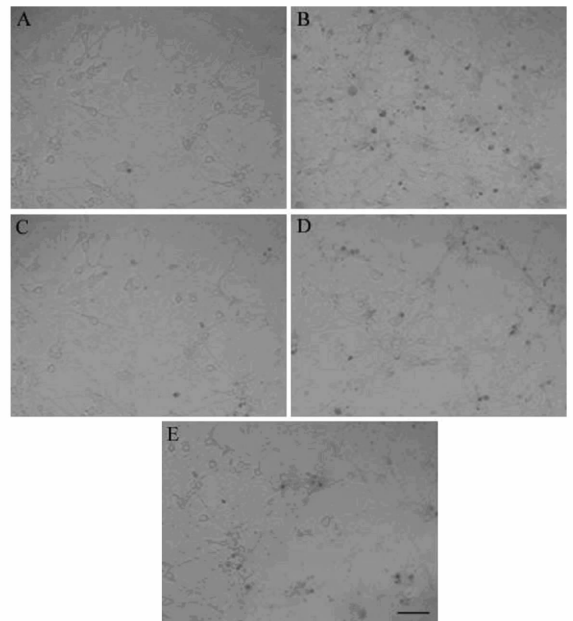
**LDH 活性测定:** 参照 LDH 试剂盒说明书操作并计算。

LDH 泄漏率 (%) = 细胞外 LDH 活性 / 细胞总的 LDH 活性  $\times 100\%$

**2.5 统计学方法** 实验结果以  $\bar{x} \pm s$ , 采用组间  $t$  检验判断均数差异的显著性,  $P < 0.05$  有统计学差异。所有数据用 SPSS13.0 软件进行分析。

### 3 结果

**3.1 EGb761, GB 对细胞存活率的影响** 正常组神经元折光性强, 有明显立体感, 突起交织成网, 谷氨酸暴露后 18 h, 接近 65% 神经元失去正常光晕, 胞体变圆, 突起断裂, 甚至溶解为碎片, 经预处理给药模式的 EGb761, GB 处理后, 细胞均保持了较好的形态 (图 1), 并且呈剂量依赖的方式提高了细胞的存活率。EGb761, GB, BB 分别在  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的剂量下有最佳的保护效果, 但均弱于 MK-801 组 (浓度为  $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。GB 最佳剂量下保护效果均优于 EGb761 最佳剂量 (表 1)。



A. 正常对照组; B. 谷氨酸损伤组; C. MK-801 组; D. EGb761 组 ( $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ); E. GB 组 ( $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ); bar =  $80 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

图 1 海马神经元台盼蓝染色

**3.2 EGb761, GB 对细胞凋亡率的影响** 正常组可观察到少数染色阳性的细胞, 经谷氨酸处理后 TUNEL 阳性细胞增多, 凋亡率接近 37%, 预处理给药模式的 EGb761, GB 可明显降低凋亡率, 其保护效果仍弱于 MK-801 组。GB 最佳剂量下保护效果均优于 EGb761 最佳剂量 (表 1)。

**3.3 EGb761, GB 对 LDH 泄漏率的影响** 谷氨酸作用后 LDH 泄漏率增加, 加入 EGb761, GB 处理, 可



表 1 谷氨酸对海马神经元存活率、凋亡率及 LDH 的影响及 EGb761 与 GB 保护作用的比较

%

组别	存活率	凋亡率	LDH 泄漏率
正常	100	9.5 ± 2.74	12.71 ± 2.47
谷氨酸损伤	64.6 ± 3.78	35.5 ± 3.93	39.72 ± 1.99
MK-801	88.5 ± 3.01	12.33 ± 2.58	15.21 ± 2.99
EGb761 (100 mg · L <sup>-1</sup> )	76.83 ± 3.87 <sup>2)</sup>	22.67 ± 3.14 <sup>2)</sup>	26.35 ± 2.75 <sup>2)</sup>
GB (100 μmol · L <sup>-1</sup> )	80.17 ± 3.06 <sup>1,3)</sup>	19.33 ± 3.88 <sup>1,3)</sup>	22.32 ± 3.16 <sup>1,3)</sup>

注:与 MK-801 组比较<sup>1)</sup> P < 0.01, <sup>2)</sup> P < 0.001; 与 EGb761 组比较<sup>3)</sup> P < 0.05。

降低 LDH 泄漏率,其效果弱于 MK-801 组。GB 最佳剂量下效果优于 EGb761 最佳剂量(表 1)。

#### 4 讨论

谷氨酸是哺乳动物脑内含量最高的兴奋性氨基酸,根据与配基结合后效应的不同,将 Glu 受体分为 2 种类型:亲离子型谷氨酸受体(iGluR)和亲代谢型谷氨酸受体(mGluR)。iGluR 按选择性激动剂的不同又可分为 3 种亚型,其中 NMDA 受体是研究最早也是最多的受体,在谷氨酸介导的兴奋毒性损伤中起关键性作用<sup>[9]</sup>。谷氨酸是 NMDA 受体最为强烈的激动剂,甘氨酸(Gly)是 NMDA 受体的协同激动剂。实验结果显示 NMDA 受体非竞争性拮抗剂 MK-801 可以明显降低神经细胞的死亡率和凋亡率,表现出较强的抗兴奋毒性作用,说明 Glu 主要通过激活 NMDA 受体导致细胞大量死亡,该体外兴奋毒性模式提供了一个研究抗兴奋毒性神经元保护的检测体系。

20 世纪 60 年代人们开始对银杏叶的现代药用进行开发。德国舒培博士药厂生产的 EGb761,为现行的银杏叶提取物成分的国际标准<sup>[10]</sup>。标准的 EGb761 主要包括银杏黄酮(flavonoid, 24%)及萜类(terpenoids, 6%)两大类的物质成分。前者黄酮醇苷为主,后者以二萜内酯类及倍半萜内酯为主,还包括一些有机酸,如犬尿喹啉酸等。银杏萜内酯目前共分离提取到 8 种<sup>[11]</sup>,迄今尚未发现存在于其他任何植物中。银杏酸具有致敏性、免疫毒性、细胞毒性等作用,是银杏叶主要的有毒成分,在 EGb761 中需限定其含量。我国银杏资源最丰富,然而与进口产品相比缺少竞争力,主要是其中银杏酸含量过高,因此从银杏叶中分离出的单体 GB 日益受到关注。

本实验观察到 EGb761, GB 的保护作用在一定范围内均呈剂量依赖的方式,且具有相似的变化趋势,推测 EGb761 的神经保护作用主要由 GB 所介导。本研究组观察过银杏叶提取物不同给药模式之

间的差异,结果显示通过预处理途径比治疗给药途径能明显提高细胞的存活率,降低凋亡率<sup>[12]</sup>,因此本实验重视其预处理给药对于高危人群预防干预的应用价值,着重观察预处理给药模式下 2 种药物的差异,为银杏叶制剂的临床应用提供了新的思路。结果显示 EGb761, GB 通过预处理给药均能明显提高细胞的存活率,降低凋亡率,减少 LDH 泄露率,其中 GB 保护作用优于 EGb761,因此将其用于高危人群的预防干预可能有更大价值。

#### 【参考文献】

- [1] Gasic G P, Hollmann M. Molecular neurobiology of glutamate receptors [J]. Annu Rev Physiol, 1992, 54: 507.
- [2] D'Ambrosio R. Does glutamate released by astrocytes cause focal epilepsy [J]. Epilepsy Curr, 2006 6 (5): 173.
- [3] Mitsios N, Gaffney J, Kumar P, et al. Pathophysiology of acute ischaemic stroke: An analysis of common signalling mechanisms and identification of new molecular targets [J]. Pathobiology, 2006, 73 (4): 159.
- [4] Gallen C C. Strategic challenges in neurotherapeutic pharmaceutical development [J]. NeuroRx, 2004, 1: 165.
- [5] Ramassamy C, Longpr F, Christen Y. Ginkgo biloba extract (EGb 761) in Alzheimer's disease: Is there any evidence [J]. Curr Alzheimer Res, 2007, 4 (3): 253.
- [6] Ding A S, Wang F Z, Yu S, et al. Effects of hypoxic-preconditioning on anoxic-tolerance and Hsp70 expression in cultured rat hippocampal neurons [J]. Chin J Neurosci, 2001, 17: 51.
- [7] Michaels R L, Rothman S M. Glutamate neurotoxicity in vitro: Antagonist pharmacology and intracellular calcium concentrations [J]. Neurosci, 1990, 10: 283.
- [8] Prehn J H, Lippert K, Kriegstein J. Are NMDA or AMPA/kainite receptor antagonists more efficacious in the delayed treatment of excitotoxic neuronal injury [J]. Eur J Pharmacol, 1995, 292: 179.
- [9] Gardoni F, Di L M. New targets for pharmacological intervention in the glutamatergic synapse [J]. Eur J Pharmacol, 2006, 545: 2.
- [10] Gertz H J, Kiefer M. Review about Ginkgo biloba special extract EGb 761 (Ginkgo) [J]. Curr Pharm Des, 2004, 10 (3): 261.
- [11] VAN BEEK T A. Ginkgolides and bilobalide: Their physical,



Chromatographic and spectroscopic properties [J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13 : 5001.

[12] 孙晶,孙长凯,范明,等. 新银杏叶提取物抗兴奋毒性神经损害研究[J]. *中国临床药理学与治疗学*,2006,11 (1): 95.

## Neuroprotective effect of extract of *Ginkgo biloba* against excitotoxicity compared with ginkgolide B in neuron cell of rat

XU Jing<sup>1</sup>, SUN Changkai<sup>2</sup>, MA Hui<sup>2</sup>, WANG Lu<sup>2</sup>, ZHANG Jian<sup>2</sup>, ZHANG YUmei<sup>2</sup>, WU Lanxiang<sup>2</sup>  
(1. *Functional laboratory, Dalian Medical University, Dalian 116044, Chiha;*  
2. *Institute for Brain Disorders, Dalian Medical University, Dalian 116044, China*)

[**Abstract**] **Objective:** To observe the effect of the extract of *Ginkgo biloba* (EGb761) and the components isolated from the extract named ginkgolide B (GB) against damage of glutamate in pretreatment modes so that determine their application value and approach. **Method:** Based on glutamate-induced excitotoxicity to primary cultures from neonatal Sprague-Dawley (SD) rat hippocampal neuron, our experiment utilized trypan blue, TUNEL and LDH to study the effect of EGb761 and GB on neuron in different doses pretreatment modes, as well as to compare with the NMDA receptor uncompetitive antagonist-MK-801. **Result:** EGb761 and GB can increase cell viability, reduce apoptosis rate and decrease LDH leakage in different degree and depended on dose in certain range. The maximal protection was achieved at a concentration of  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , but inferior to MK-801 ( $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). The protective effect of GB is superior to EGb761. **Conclusion:** Treatment with EGb761 and GB could protect the neurons against glutamate-induced injury. The maximal protection of GB was achieved by pretreatment is superior to EGb761, so its precautionary intervention to high-risk population could have more value.

[**Key words**] EGb761; GB; glutamate; hippocampal neuron

doi: 10.4268/cjcmm20100124

[责任编辑 刘 ■]