

银杏叶聚戊烯醇对A β_{25-35} 诱导dPC12细胞损伤的保护作用研究[△]

陈卫卫^{1,2,3*}, 梁迪¹, 赵其秀², 罗毅¹, 刘灵杰¹, 莫丽萍¹, 黄俊善¹, 李海涛^{2,3#}(1.广西中医药大学药学院, 南宁 530001; 2.南京中医药大学药学院, 南京 210023; 3.江苏银杏研究院, 江苏邳州 221300)

中图分类号 R741.02 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)07-0881-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.07.05

摘要 目的:研究银杏叶聚戊烯醇(GP)对 β 淀粉样肽25-35(A β_{25-35})诱导dPC12细胞损伤的保护作用,为其用于阿尔茨海默病(AD)的治疗提供参考。方法:以神经生长因子(NGF)诱导PC12细胞分化为具有神经活性的dPC12细胞后,将dPC12细胞分为正常对照组(DMSO培养基)、A β_{25-35} 处理组(DMSO培养基)和GP试验组(分别含25、50、100、200、400 μ g/mL GP的DMSO培养基),培养24 h后,A β_{25-35} 处理组和GP试验组细胞均加入25 μ mol/L A β_{25-35} 诱导细胞损伤(即复制AD细胞模型),24 h后采用MTT法测定细胞存活率。另取细胞分为正常对照组(DMSO培养基)、A β_{25-35} 处理组(DMSO培养基)和GP试验组(分别含25、50、100、200 μ g/mL GP的DMSO培养基),同法处理后检测细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)、活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)水平。结果:与A β_{25-35} 处理组比较,50、100、200、400 μ g/mL GP试验组dPC12细胞的存活率明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),100、200 μ g/mL GP试验组细胞培养液中LDH、ROS和MDA水平以及50 μ g/mL GP试验组细胞培养液中ROS水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且呈一定的浓度依赖性。结论:GP对A β_{25-35} 致dPC12损伤有一定的保护作用,为一种潜在的AD治疗药物。

关键词 银杏叶;聚戊烯醇; β 淀粉样肽25-35;dPC12细胞;乳酸脱氢酶;活性氧;丙二醛

Study on Protective Effects of the Polypentenol from *Ginkgo biloba* Leaf on A β_{25-35} -induced Damage in dPC12 Cells

CHEN Weiwei^{1,2,3}, LIANG Di¹, ZHAO Qixiu², LUO Yi¹, LIU Lingjie¹, MO Liping¹, HUANG Junshan¹, LI Haitao^{2,3}
(1.School of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 2.School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 3.Jiangsu Institute of Ginkgo Biloba, Jiangsu Pizhou 221300, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: Study the protective effect of the polypentenol from *Ginkgo biloba* leaf (GP) on A β_{25-35} -induced damage in dPC12 cells, and to provide reference for the treatment of Alzheimer's disease (AD). METHODS: After PC12 cells were differentiated into dPC12 cells with neural activity by incubating with nerve growth factor (NGF), the dPC12 cells were divided into normal control group (DMSO medium), A β_{25-35} treatment group (DMSO medium) and GP test group (DMSO medium respectively containing 25, 50, 100, 200, 400 μ g/mL GP). After 24 h cultivating, cells in A β_{25-35} treatment group and GP test group were added 25 μ mol/L A β_{25-35} to induce cell damage (AD cell model), MTT method was used to determine the survival rate after 24 h. Other cells were divided into normal control group (DMSO medium), A β_{25-35} treatment group (DMSO medium) and GP test group (DMSO medium respectively containing 25, 50, 100, 200 μ g/mL GP), the lactate dehydrogenase (LDH), reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA) levels in cell culture medium were detected after the same treatment. RESULTS: Compared with A β_{25-35} treatment group, the survival rates of dPC12 cells in 50, 100, 200, 400 μ g/mL GP test groups were obviously increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); LDH, ROS, MDA levels in 100, 200 μ g/mL GP test groups and ROS level in 50 μ g/mL GP test group were significantly reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), showing a certain concentration-dependence. CONCLUSIONS: GP has certain protective effect on A β_{25-35} -induced damage in dPC12 cells, and it's a potential drug for AD.

KEYWORDS *Ginkgo biloba* leaf; Polypentenol; A β_{25-35} ; dPC12 cell; Lactate dehydrogenase; Reactive oxygen species; Malondialdehyde

[△]基金项目:广西自然科学基金面上项目(No.2013GXNSFAA-019115);广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项课题(No.GZZY13-09);壮瑶药协同创新中心课题(No.桂教科研[2013]20号);广西壮瑶药重点实验室课题(No.桂科基字[2014]32号)

*教授,博士研究生。研究方向:新药研发、药理学。E-mail:weiweichen2012@sina.com

#通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:新药研发、药理学。E-mail:lihaitao0003@sina.com

银杏叶为银杏(*Ginkgo biloba* L.)的干燥叶,被收载于2015年版《中国药典》(一部)中,具有活血化瘀、通络止痛、化浊降脂等功效^[1],在临床使用较为广泛。迄今为止,已从银杏叶中发现了160多种化合物,主要包括黄酮、萜内酯、多糖、聚戊烯醇、挥发油及甾醇等。银杏叶聚戊烯醇(Polyprenols from the *Ginkgo biloba* leaves, GP)是银杏叶中一种具有显著生理活性的天然化合物,

由15~21个异戊烯基单元构成,在银杏叶中的含量为1.0%~2.0%,高于银杏黄酮(0.8%~2.0%)和银杏萜内酯(0.2%~0.4%)^[2-4]。研究表明,GP对高血压、糖尿病、慢性肝炎及肿瘤等具有明显改善作用,但关于其对阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的研究尚未见报道。国外对针叶聚戊烯醇的研究较为多见,将其用于早、中期AD和其他脑疾病的治疗观察研究中发现聚戊烯醇能提高认知能力、改善脑损伤程度和影响酶活性,对于脑疾病有一定的疗效^[5-8]。因此,本实验以GP为研究对象,以神经生长因子(NGF)诱导PC12细胞分化为具有神经活性的dPC12细胞后,通过体外 β 淀粉样肽25-35($A\beta_{25-35}$)诱导dPC12细胞损伤,制备体外AD细胞模型,探讨GP的神经保护作用,为GP在AD的治疗研究方面提供理论依据,并为神经保护药物的研发提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

RT-6000酶标分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司);FA2004电子天平(上海越平科学仪器有限公司);Sorvall ST16台式高性能离心机(美国Thermo公司);IX51荧光倒置显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 提取物与试剂

GP(广西中医药大学药学院自制,批号:20150109,纯度:74.69%);胎牛血清(美国Hyclone公司);马血清、双抗(青链霉素)购自杭州四季青有限公司;微量丙二醛(MDA)试剂盒(批号:20150810)、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(批号:20150615)均购自南京建成生物工程研究所;活性氧(ROS)检测试剂盒(批号:S0033)均购自碧云天生物技术研究院; $A\beta_{25-35}$ 、NGF、二甲基亚砜(DMSO)、MTT均购自美国Sigma公司。

1.3 细胞株

鼠肾上腺嗜铬细胞瘤单克隆细胞系PC12细胞购自中国科学院上海生化与细胞所。

2 方法

2.1 GP的保存及 $A\beta_{25-35}$ 老化处理

取GP 40 mg,精密称定,溶于1 mL DMSO中,滤过除菌,分装,4℃条件下保存,备用。

参考文献[9-10]中方法,将1 mg $A\beta_{25-35}$ 粉末溶于0.943 mL灭菌Mili-Q水中,制备成1 mmol/L的母液,振荡混匀,一次性无菌滤器过滤后于37℃环境中进行至少1周的老化,使其老化聚集产生神经毒性。将老化聚集的 $A\beta_{25-35}$ 溶液用1.5 mL EP管分装,-20℃冰箱中保存。试验前用所需培养液或细胞外液稀释至所需浓度。

2.2 PC12细胞培养

将PC12细胞培养于含6%马血清、6%胎牛血清和1%青链霉素的DMEM完全培养基中,在37℃、5%CO₂培养箱中培养。隔天换液、传代,取状态良好的处于对

数生长期的细胞用于试验。

2.3 NGF诱导PC12细胞分化

将对数生长期的PC12细胞接种于事先经0.1%多聚赖氨酸包被的96孔板中,接种密度为 1×10^3 个/孔。培养24 h后,换成含NGF(50 ng/mL)的分化培养基,置于37℃、5%CO₂培养箱中继续培养。隔天换液,连续诱导分化6 d,得到分化的PC12细胞(即dPC12细胞),在荧光倒置显微镜下观察细胞的生长状态。

2.4 $A\beta_{25-35}$ 对dPC12细胞的损伤作用

将dPC12细胞接种于96孔板中,每孔加入不同量的 $A\beta_{25-35}$,作为终浓度分别为6.25、12.50、25、50 μ mol/L的 $A\beta_{25-35}$ 处理组,同时设置正常对照组(加等体积的DMSO完全培养基正常培养,不作其他处理),共5组。各组细胞数基本相同,每组设6个复孔。将细胞置于37℃、5%CO₂培养箱中培养24 h后,观察不同浓度 $A\beta_{25-35}$ 对dPC12细胞的损伤情况。每孔加入20 μ L MTT溶液(5 mg/mL),使MTT终质量浓度为0.5 mg/mL,37℃孵育4 h后终止培养。吸净上清,加入150 μ L DMSO,室温振荡10 min,使结晶物充分溶解,最后在酶标分析仪上测定570 nm波长处的光密度(OD)值。计算细胞的存活率(SR)[SR(%)=(试验组OD值/正常对照组OD值) \times 100%],以筛选最佳的损伤浓度。

2.5 GP对dPC12细胞存活率的影响

将dPC12细胞接种于96孔板中,每孔加入不同质量浓度的GP溶液,作为终质量浓度分别为25、50、100、200、400 μ g/mL的GP试验组,另设正常对照组(加等体积DMSO完全培养基常规培养,不作其他处理),共6组。各组细胞数基本相同,每组6个复孔。将细胞置于37℃、5%CO₂培养箱中培养24 h。根据“2.4”项下方法操作,考察细胞的存活率。

2.6 GP对 $A\beta_{25-35}$ 诱导dPC12细胞损伤的保护作用

将dPC12细胞接种于96孔板中,试验共设置7组,分别为正常对照组(加等体积的DMSO完全培养基常规培养,不作其他处理)、 $A\beta_{25-35}$ 处理组(先用等体积DMSO完全培养基培养细胞24 h,再加入终浓度为25 μ mol/L的 $A\beta_{25-35}$ 溶液继续培养24 h)与GP试验组(先分别经25、50、100、200、400 μ g/mL GP药液预处理24 h,再加入终浓度为25 μ mol/L的 $A\beta_{25-35}$ 溶液继续培养24 h)。各组细胞数基本相同,每组6个复孔。将细胞置于37℃、5%CO₂培养箱中培养24 h。根据“2.4”项下方法操作,考察细胞的存活率。

2.7 GP对 $A\beta_{25-35}$ 诱导损伤的dPC12细胞培养液中LDH、ROS和MDA水平的影响

将dPC12细胞接种于96孔板中,试验共设置5组,分别为正常对照组(加等体积的DMSO完全培养基常规培养,不作其他处理)、 $A\beta_{25-35}$ 处理组(先用等体积DMSO

完全培养基培养细胞 24 h,再加入终浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{A}\beta_{25-35}$ 溶液继续培养 24 h)与 GP 试验组(先分别经 50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ GP 药液预处理 24 h,再加入终浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{A}\beta_{25-35}$ 溶液继续培养 24 h)。各组细胞数基本相同,每组 6 个复孔。细胞培养 24 h 后,根据试剂盒说明书检测细胞培养液中 LDH、ROS 和 MDA 水平。

2.8 统计学方法

采用 GraphPad Prism 6 软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验进行组间的两两比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 NGF 诱导 PC12 细胞分化结果

常规条件下 PC12 细胞的形态与嗜铬瘤细胞相似,呈圆形、短梭形或三角形,有的细胞两极有短突起;当用 NGF 处理后,可分化成类交感神经元样细胞,形成轴突样突起,细胞胞浆中还伸出多条其他突起,突起长短不一、数目不等,细胞之间相互连接交织成网,结果见图 1。

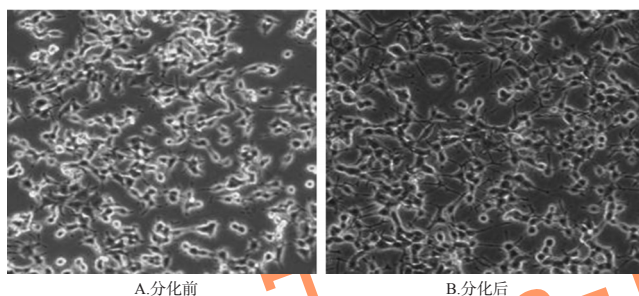


图 1 PC12 细胞分化前、后的形态变化

Fig 1 Morphological changes of PC12 cells before and after differentiation

3.2 $\text{A}\beta_{25-35}$ 对 dPC12 细胞的损伤作用考察结果

与正常对照组比较(细胞存活率为 100%), $\text{A}\beta_{25-35}$ 处理组在浓度为 6.25~50 $\mu\text{mol/L}$ 时对 dPC12 细胞有明显损伤作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且随着 $\text{A}\beta_{25-35}$ 浓度的增加细胞存活率也随之明显下降,呈现浓度依赖性。当 $\text{A}\beta_{25-35}$ 浓度为 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞的存活率为 83.18%,表明其对 dPC12 细胞的活性产生了明显的抑制作用($P < 0.01$)。 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞损伤的半数抑制浓度(IC_{50})约为 25 $\mu\text{mol/L}$,因此本研究选择 25 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ 处理 dPC12 细胞以复制 AD 细胞模型。

3.3 GP 对 dPC12 细胞存活率的影响考察结果

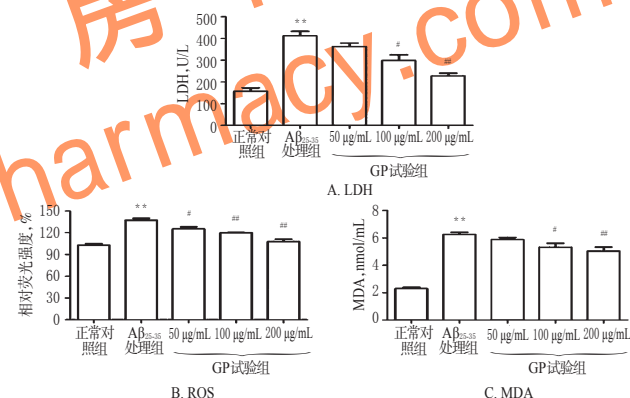
GP 试验组的溶剂 DMSO 对 dPC12 细胞存活率基本无影响;不同质量浓度 GP(25~400 $\mu\text{g/mL}$)与 dPC12 细胞共孵育 24 h 后,各组细胞存活率分别为 100%、97.43%、97.43%、105%、100%,差异均无统计学意义($P > 0.05$),表明 GP 在 25~400 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围时对 dPC12 细胞无毒性作用。

3.4 GP 对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导 dPC12 细胞损伤的保护作用考察结果

与正常对照组比较(细胞存活率为 100%), $\text{A}\beta_{25-35}$ 处理组细胞存活率(55.26%)显著降低($P < 0.01$)。与 $\text{A}\beta_{25-35}$ 处理组比较,GP 试验组用 25 $\mu\text{g/mL}$ GP 预处理后,细胞存活率(59.00%)无显著变化($P > 0.05$);用 50~400 $\mu\text{g/mL}$ GP 预处理后,细胞存活率(分别为 68.18%、76.27%、88.63%、86.36%)均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。这提示 GP 可以减轻 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的神经细胞毒性,对 dPC12 细胞有一定保护作用。

3.5 GP 对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导损伤 dPC12 细胞培养液中 LDH、ROS、MDA 水平的影响

与正常对照组比较, $\text{A}\beta_{25-35}$ 处理组细胞培养液中 LDH、ROS、MDA 水平均显著升高($P < 0.01$);与 $\text{A}\beta_{25-35}$ 处理组比较,100、200 $\mu\text{g/mL}$ GP 试验组细胞培养液中 LDH、ROS、MDA 水平以及 50 $\mu\text{g/mL}$ GP 试验组细胞培养液中 ROS 水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),呈一定的浓度依赖性。这提示 GP 可保护细胞膜的完整性,从而有效对抗 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的 dPC12 细胞损伤,结果见图 2。



注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与 $\text{A}\beta_{25-35}$ 处理组比较,* $P < 0.05$,# $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P < 0.01$; vs. $\text{A}\beta_{25-35}$ treatment group,* $P < 0.05$,# $P < 0.01$

图 2 各组细胞培养液中 LDH、ROS 和 MDA 水平测定结果

Fig 2 Determination results of LDH, ROS and MDA levels in cell culture medium in each group

4 讨论

银杏叶提取物对脑局部缺血、癫痫发作、外周性神经炎具有神经保护作用,临床上用于治疗早期 AD、血管性痴呆等疾病,但是银杏叶提取物化学成分复杂,其抗 AD 的物质基础未能阐明^[1]。AD 是老年人常见的神经退行性疾病,其发病可能与 $\text{A}\beta$ 诱导的神经元凋亡密切相关。PC12 细胞具有神经嵴源性和神经细胞特点,经 NGF 诱导后产生神经元样细胞,是目前比较公认的用来制作 AD 模型的细胞之一。 $\text{A}\beta$ 是一种分子量为 4.2 kD

的多肽,含39~42个氨基酸,是许多正常细胞内的β淀粉样前体蛋白(β -amyloid precursor protein, APP)的裂解产物。 $A\beta$ 通常以 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 两种形式存在,其中 $A\beta_{1-42}$ 更易沉积,是老年斑的主要成分; $A\beta_{25-35}$ 是 $A\beta$ 生物活性片段,25-35位氨基酸序列呈 β 折叠是引起神经毒性必需的结构。研究表明,凝聚态 $A\beta_{25-35}$ 在体或离体条件下皆可表现出神经细胞毒性作用,诱导细胞凋亡,故 $A\beta_{25-35}$ 常被广泛应用于体内外AD模型制备的研究中^[12-13]。在正常细胞中,LDH是主要存在细胞内的胞浆酶,细胞凋亡裂解时,LDH会释放到细胞外基质液中。因此,可以通过测定细胞培养液中LDH的含量来反映细胞损伤的程度^[14]。机体受到毒性刺激时,细胞内ROS的产生与抗氧化防御之间失去平衡,导致ROS在体内蓄积,损伤细胞功能直至细胞死亡。MDA是神经元脂质过氧化物的产物,可结合蛋白质、磷脂等物质,使膜通透性增加,引起膜内外离子浓度失衡,造成细胞损伤。细胞培养液中ROS、MDA水平也可评价神经细胞损伤的程度。

本试验研究了GP对 $A\beta_{25-35}$ 诱导dPC12细胞损伤的影响。结果显示,给予 $A\beta_{25-35}$ 处理dPC12细胞后,细胞存活率显著下降,细胞培养液中LDH、ROS、MDA水平也显著升高,这提示造模成功。用GP预处理dPC12细胞后,再用 $A\beta_{25-35}$ 诱导细胞损伤,结果与 $A\beta_{25-35}$ 处理组比较细胞存活率显著升高,细胞培养液中LDH、ROS、MDA水平明显降低,且呈一定的浓度依赖性,这提示GP具有拮抗 $A\beta_{25-35}$ 诱导dPC12细胞损伤的作用,可保护细胞膜完整性、减轻细胞损伤。GP作为一种潜在的抗AD药物,其作用机制值得进一步研究。

参考文献

[1] 田季雨,刘澎涛,李斌.银杏叶提取物化学成分及药理活性研究进展[J].国外医学中医中药分册,2004,26(3):142-145.

[2] 夏晓晖,张宇,郗砚彬.银杏叶化学成分研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(9):100-104.

[3] 陈西娟,王成章,叶建中.银杏叶化学成分及其应用研究进展[J].生物质化学工程,2008,42(4):57-62.

[4] 周春华,陈鹏,陶俊,等.银杏叶聚戊烯醇研究进展[J].中成药,2009,31(9):1416-1419.

[5] Fedotova J, Soultanov V, Nikitina T, et al. Cognitive-enhancing activities of the polyphenol preparation Ropren® in gonadectomized β -amyloid (25-35) rat model of Alzheimer's disease[J]. *Physiol Behav*, 2016, 157(1): 55-62.

[6] Lee JS, Kim HG, Lee HW, et al. Hippocampal memory enhancing activity of pine needle extract against scopolamine-induced amnesia in a mouse model[J]. *Sci Rep*, 2015, doi:10.1038/srep09651.

[7] Fedotova luO, Sultanov VS, Kuznetsova NN, et al. Effect of new polyphenol drug ropren on anxiety-depressive-like behavior in rats with experimental Alzheimer disease[J]. *Eksp Klin Farmakol*, 2010, 73(9):2-5.

[8] Wang C, He L, Yan M, et al. Effects of polyphenols from pine needles of *Pinus massoniana* on ameliorating cognitive impairment in a D-galactose-induced mouse model[J]. *Age: Dordr*, 2014, doi:10.1007/s11357-014-9676-6.

[9] Ahn BR, Moon HE, Kim HR, et al. Neuroprotective effect of edible brown alga *Eisenia bicyclis* on amyloid beta peptide-induced toxicity in PC12 cells[J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(11):1989-1998.

[10] Liu YM, Li ZY, Hu H, et al. Tenuifolin, a secondary saponin from hydrolysates of polygalasaponins, counteracts the neurotoxicity induced by $A\beta_{25-35}$ peptides in vitro and in vivo[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2015, doi:10.1016/j.pbb.2014.11.010.

[11] 王志娟,高尔,法志强.银杏叶提取物治疗阿尔茨海默病的研究进展[J].中国药房,2007,18(36):2863-2865.

[12] D'Ursi AM, Armenante MR, Guerrini R, et al. Solution structure of amyloid β -peptide (25-35) in different media [J]. *J Med Chem*, 2004, 47(17):4231-4238.

[13] Giunta S, Galeazzi R, Valli MB, et al. Transferrin neutralization of amyloid beta25-35 cytotoxicity[J]. *Clin Chim Acta*, 2004, 350(1/2):129-136.

[14] 苏如维,林旭文,庄晓峰.黄芩素对过氧化氢致PC12细胞损伤的保护作用研究[J].中国药房,2008,19(15):1141-1143.

(收稿日期:2016-08-17 修回日期:2016-11-07)
(编辑:林静)

《中国药房》杂志——中文核心期刊,欢迎投稿、订阅