

银杏叶提取物对胎鼠皮质神经元细胞的影响*

张皓楠,王益民,王蕴华,何 畔

摘要:[目的]在正常条件和缺氧条件下研究银杏叶提取物对胎鼠皮质神经元细胞的影响。[方法]在正常条件和缺氧条件下分别检测对照组和加药组的细胞活性值、细胞上清液中乳酸脱氢酶(LDH)含量、超氧化物歧化酶(SOD)含量和丙二醛(MDA)含量。[结果]在正常培养下,加药组细胞活性高于对照组,差异有统计学意义;加药组的LDH值小于对照组,差异有统计学意义;加药组的SOD值和MDA值与对照组差异无统计学意义;在缺氧条件下,加药组细胞活性高于对照组,差异有统计学意义;加药组的LDH值也高于对照组,差异有统计学意义;加药组的SOD值和MDA值均高于对照组,差异有统计学意义。[结论]在正常培养条件下,本实验所选银杏叶提取物可以促进神经元细胞生长,降低细胞膜损伤,对细胞抗氧化性无显著影响;在缺氧培养条件下,本实验所选银杏叶提取物可以促进神经元细胞生长,增加细胞膜损伤,可以提高细胞抗氧化性。

关键词:银杏叶;胎鼠皮质神经元;细胞活性;细胞膜;细胞抗氧化性

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1673-9043(2012)04-0218-03

银杏叶是一种具有很高药用价值的植物,在中国的传统医学中广泛使用,《本草纲目》、《滇南本草》等中医论著中均有相关药效的记载,现也收录于我国的药典之中。现有研究发现银杏叶对于神经系统性疾病有治疗效果,Rojas等^[1-2]通过实验发现银杏叶是未来治疗帕金森症的有效药物之一,王暖等^[3]通过实验发现银杏叶提取物能激活和改善海马CA1区细胞凋亡和大鼠认知障碍,对阿尔茨海默病的有很好的预防效果。神经元细胞是神经系统的基本结构和功能单位之一,它的生长状态会对人体身体产生重要的影响,神经系统性疾病与神经元细胞的生长与损伤有着密切的关系。所以本实验将在正常培养条件和缺氧培养条件下,通过检测细胞活性、细胞膜损伤以及细胞抗氧化能力,研究银杏叶提取物对胎鼠皮质神经元细胞的影响,为银杏叶在该领域的研究和应用提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物试剂与仪器 实验动物:无特定病原体(SPF)级大鼠[中国医学科学院放射医学研究所,

批号:SCSK(津)2005-0001]。

主要试剂:银杏叶注射液(山西银湖制药有限公司,批号:09090831)、胰酶(sigma公司)、达氏修正伊氏培养液-F12(DMEM-F12)(Gibco公司)、B27(Gibco公司)、优级胎牛血清(Gibco)、四甲基偶氮唑盐(MTT)(Sigma)、二甲基亚砜(DMSO,美国Sigma)、乳酸脱氢酶(LDH)全自动试剂盒(中生北控生物有限公司)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物工程有限公司)、丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程有限公司)。

主要仪器:CO₂培养箱(SANYO)、三气培养箱(日本ASTECC公司)、超净化工作台(东联哈尔公司)、IX-70型倒置显微镜(Olympus)、酶标仪(奥地利SUNRISE)、全自动生化仪(日立公司)、多功能读板机(瑞士TECAN)。

1.2 实验方法

1.2.1 神经元细胞原代培养 取孕15d的胎鼠双侧大脑半球,在放大镜下用眼科镊分离皮质,去除软脑膜。用手术刀切碎大脑皮质,加入20mL的0.3%胰酶移入50mL离心管中,37℃消化10min,消化完毕后用吸管吹打分离细胞,将细胞悬液经200目滤网过滤后加入胎牛血清(FBS),15℃,1000r/min,离心5min。弃上清,制备神经元细胞悬液。

1.2.2 细胞活性检测 对数生长期细胞以10⁶/mL

*基金项目:国家自然科学基金项目(30873467)。

作者单位:300193 天津中医药大学

作者简介:张皓楠(1981-),男,硕士研究生,实验师,主要从事中医工程研究。

通讯作者:王益民。

密度每孔 100 μL 种于 96 孔板,有对照组(不加药)和加药组,且每组 12 个复孔,加药组每孔加密度为 350 mg/L 银杏叶注射液 10 μL 。正常培养条件放置于体积分数 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 的培养箱内;缺氧条件培养于氧气含量低于 5%、37 $^\circ\text{C}$ 的培养箱内。培养 72 h 后,无色 D-hank's 清洗 2~3 遍,加入滤菌后的磷酸盐缓冲液(PBS)液配制的浓度为 5 mg/mL MTT 溶液,每孔 20 μL ,放入培养箱内作用 4 h,弃上清液,每孔加入 150 μL DMSO 作用并充分振荡 10 min,在 570 nm 比色,利用酶标仪测定细胞的光密度。

1.2.3 细胞膜损失检测 将对数生长期细胞以 10%/mL 密度每孔 500 μL 将细胞种于 24 孔板,分为对照组(不加药)和加药组,每组 12 个复孔,加药组每孔加密度为 350 mg/L 银杏叶注射液 10 μL 。正常条件培养于体积分数 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 的培养箱内;缺氧条件培养于氧气含量低于 5%、37 $^\circ\text{C}$ 的培养箱内。培养 72 h 后(细胞密度达到 70%~80%),取细胞培养液上清,使用 LDH 试剂盒在全自动生化仪进行检测细胞培养液上清中的 LDH 含量。

1.2.4 细胞抗氧化损失检测 将对数生长期细胞以 10%/mL 密度每孔 500 μL 种于 24 孔板,分为对照组(不加药)和加药组,每组 12 个复孔,加药组每孔加密度为 350 mg/L 银杏叶注射液 10 μL 。正常条件培养于体积分数 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 的培养箱内;缺氧条件培养于氧气含量低于 5%、37 $^\circ\text{C}$ 的培养箱内。培养 72 h 后,取细胞上清液,使用 SOD 试剂盒与 MDA 试剂盒,分别在多功能读板机上进行检测细胞外的 SOD 与 MDA 的 A 值,然后根据试剂盒说明书分别换算出上清液中 SOD 与 MDA 的含量。

1.2.5 统计学分析 所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,对照组与加药组采用单因素方差分析,经 SPSS18.0 统计软件包处理, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。每组数均采用 12 个样本进行统计分析($n=12$)。

2 实验结果

2.1 正常培养条件下银杏叶对神经元细胞的影响 通过实验检测,加药组细胞活性高于对照组,差异具有统计学意义;加药组的 LDH 值小于对照组,差异有统计学意义;加药组的 SOD 值和 MDA 值与对照组差异没有统计学意义。见表 1。

2.2 缺氧培养条件下银杏叶对神经元细胞的影响 通过实验检测,加药组细胞活性高于对照组,差异有统计学意义;加药组的 LDH 值也高于对照组,差异有统计学意义;加药组的 SOD 值和 MDA 值均高

于对照组,差异有统计学意义。见表 2。

表 1 在正常培养状态下银杏叶对神经元细胞的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	A 值	LDH 值	SOD 值	MDA 值
对照组	12	0.154 2 \pm 0.000 4	13.50 \pm 4.33	22.65 \pm 0.07	1.698 \pm 2.352
加药组	12	0.445 3 \pm 0.020 2*	9.25 \pm 1.58*	22.77 \pm 0.13	2.252 \pm 4.366

注:与对照组比较,* $P<0.05$ 。

表 2 在缺氧培养状态下银杏叶对神经元细胞的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	A 值	LDH 值	SOD 值	MDA 值
对照组	12	0.144 7 \pm 0.000 2	11.50 \pm 0.33	19.62 \pm 3.06	1.287 \pm 0.018
加药组	12	0.273 7 \pm 0.004 0*	13.00 \pm 0.67*	21.21 \pm 0.57*	1.550 \pm 0.019*

注:与对照组比较,* $P<0.05$ 。

3 讨论

银杏叶的化学成分十分复杂,主要的生物活性成分为黄酮类、萜内酯、聚戊烯醇和多糖类化合物。此外,还含有机酸、烷基酚酸类、氨基酸、甾类、微量元素等^[4]。现代药学利用溶剂萃取专利技术对其有效成分进行提取,生产标准银杏叶提取物^[5]。银杏叶提取物应用范围广泛,特别在神经系统方面有着明显的调节机制^[6],并有实验多次验证银杏叶可以提高生物体的认知能力^[7-9]。神经元细胞作为是神经系统的基本结构和功能单位之一,其活动直接影响着生物的认知与成长。所以银杏叶提取物对神经细胞的影响会对今后对神经系统的疾病的治疗与康复有着重要意义。

在正常培养条件下,加药组细胞活性数值明显高于对照组,其差异具有统计学意义($P<0.05$),说明银杏叶提取物对神经元细胞生长有促进作用。对加药组细胞上清液中的 LDH 含量进行检测发现其数值也明显低于对照组,其差异也具有统计学意义($P<0.05$),这说明银杏叶提取物可以降低细胞膜损伤。通过实验数据又可以发现加药组细胞上清液中 SOD 值和 MDA 值相对于对照组无明显变化且无统计学意义,所以银杏叶提取物对细胞抗氧化性影响无显著影响。

而在缺氧培养条件下,加药组细胞活性值也高于对照组,其差异具有统计学意义($P<0.05$),说明银杏叶提取物在此条件也可以促进细胞生长。加药组细胞上清液中的 LDH 含量则高于对照组,其差异具有统计学意义($P<0.05$),说明银杏叶提取物增加了细胞膜损伤。加药组细胞上清液中 SOD 值和 MDA 值均高于对照组,且差异具有统计学意义($P<0.05$),这说明银杏叶提取物可以促进 SOD 的产生,增加细胞抗氧化能力,但由于细胞在缺氧状态下培

养,所以同时会增加最终氧化产物MDA的含量,所以在此条件下银杏叶提取物会一定程度上提高细胞抗氧化性。

综上所述,在正常培养条件下,本实验所选银杏叶提取物可以促进神经元细胞生长,降低细胞膜损伤,对细胞抗氧化性无显著影响;在缺氧培养条件下,本实验所选银杏叶提取物可以促进神经元细胞生长,增加细胞膜损伤,可以提高细胞抗氧化性。

参考文献:

[1] Rojas P, Montes P, Rojas C, et al, Effect of a phytopharmaceutical medicine, Ginkgo biloba extract 761, in an animal model of Parkinson's disease: Therapeutic perspectives[J]. Nutrition,2012,28(11-12): 1081-1088.
[2] Rojas P, Ruiz-sanchez E, Rojas C, et al, Ginkgo biloba extract (EGb 761) modulates the expression of dopamine-related genes in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in mice [J]. Neuroscience, 2012, 223: 246-257.

[3] 王 暖,耿德勤,黄红莉,等.银杏叶提取物对阿尔兹海默病大鼠认知功能的影响及其作用机制[J]. 神经损伤与功能重建,2012,7(4):263-285.
[4] 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].生物化学工程,2008,42(4):57-62.
[5] 孙笑槐.银杏叶中有效成分的研究进展[J].中国科技信息,2011,4:111-116.
[6] 谢作权,张庆华.银杏叶提取物对神经及心血管系统的调节机制[J].国外医学·药学分册,2007,34(1):35-38.
[7] 辛益妹,丁 香,穆慧玲,等.银杏叶提取物提高认知能力的药理及临床应用进展[J].解放军药学学报,2011,27(3):256-259.
[8] Tobinaga S, Hashimoto M, Utsunomiya I, et al. Chronic administration of cardanol (ginkgol) extracted from ginkgo biloba leaves and cashew nutshell liquid improves working memory-related learning in rats[J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(1):127-129.

(收稿日期:2012-10-20)

Effects of ginkgo biloba extract on fetal rat cortical neuronal cells

Zhang Hao-nan, Wang Yi-min, Wang Yun-hua, HE Pan
(Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

Abstract: [Objective] To study the effects of ginkgo biloba extract on fetal rat cortical neuronal cells under normal and hypoxic cell cultivations. [Methods] Under normal and hypoxic cultivations, test the control and dosing groups separately, for the cell activity values, and Lactate Dehydrogenase (LDH), Superoxide Dismutase (SOD), and Malondialdehyde (MDA) values in the cellular supernatant. [Results] Under normal cell cultivation, the cell activity values of the dosing group were higher than those of the control group; the differences were statistically significant. The LDH values of the dosing group were lower than those of the control group; the differences were statistically significant. The SOD and MDA values of the dosing group were different from those of the control group; the differences were not statistically meaningful. Under hypoxic cell cultivation, the cell activity values of the dosing group were higher than those of the control group; the differences were statistically significant. The LDH values of the dosing group were higher than those of the control group; the differences were statistically significant. The SOD and MDA values of the dosing group were higher than those of the control group; the differences were statistically significant. [Conclusion] Under normal cell cultivation, the ginkgo biloba extract can stimulate the cortical neuronal cells' growth, reduce cell membrane damage, and has no notable effects on cellular oxidation resistance. Under hypoxic cell cultivation, the ginkgo biloba extract can stimulate the cortical neuronal cells' growth, increase cell membrane damage, and increase cellular oxidation resistance.

Key words: ginkgo biloba extract; fetal rat cortical neuronal cells; cell activity; cell membrane; cellular oxidation resistance