

组相比均有明显减慢心肌缺血时心率的作用;经两两比较 q 检验,党参组和黄芪组差异显著,黄芪组作用强于党参组。但各组动物给药后的 S-T 段位移经方差分析差异无显著性

4 讨论

据报道黄芪注射液可减少血清肌酸磷酸激酶 MB 同工酶 (CPK-MB) 含量,并使心肌缺血大鼠心电图 J 点位移明显减小,对心肌损伤起保护作用^[5]。另报道黄芪中的 3 种提取物总皂苷、总黄酮和甲苷均能改善心肌缺血再灌注时心功能的损伤,总皂苷和甲苷主要通过增加心肌环腺苷酸 (cAMP) 含量、抑制心肌细胞膜 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性发挥正性肌力作用,而总黄酮则主要通过抑制自由基的生成和清除氧自由基发挥正性肌力作用^[6]。

文献报道党参有显著的抗心肌缺血作用^[7],但对 P_{it} 引起的心律失常并无影响,其机制可能与解除冠脉痉挛,改善心肌代谢过程,降低心肌耗氧或使心肌对低氧的耐受性增强有关,表明党参是一种实验有效的抗心肌缺血药物。而党参中各成分对心肌缺血的改善作用未见报道,有待于进一步研究

本实验表明,黄芪和党参均可对 P_{it} 所致实验性心肌缺血起明显保护作用。并且对于减轻 T 波抬高作用党参强于黄芪,而对于减慢心率的作用黄芪

要强于党参,这可能是由于二者所含有效成分不同而对心肌缺血保护作用机制有所不同。本实验中党参和黄芪均为水提取物,党参中有效成分主要为皂苷,黄芪中有效成分主要为皂苷和黄酮。由此,推测党参皂苷抗心肌缺血损伤作用强于黄芪皂苷。

References

- [1] Wu H P, Zhu X G. The protective action of Huangqi Injection of acute experimental myocardial ischemia [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2000, 11(5): 388-389.
- [2] Zhao M J, Wang S R. Effect of *Lanceolata* on the left ventricular function of acute myocardial ischemia dog [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报), 1998, 21(4): 30-31.
- [3] Xu S Y. *Methodology in Pharmacological Experiments* (药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1982.
- [4] Xu G W. Reagent of Astragalus Injection fluid and standard of interim quality [J]. *Chin Pharm Bull* (药学通报), 1988, 23(1): 30.
- [5] Han H Y, Tan F H. Effects of *Radix Astragali* Injection on myocardial ischemic injury [J]. *J Shanxi Med Univ* (山西医科大学学报), 2001, 32(3): 200-201.
- [6] Zhou J Y, Fan Y. Effects of components isolated from *Astragalus membranaceus* Bunge on cardiac function injured by myocardial ischemia reperfusion in rats [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25(5): 300-302.
- [7] Wang K Z, Lu H X. Protective action of *Lanceolata* on acute experimental myocardial ischemia [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1989, 20(2): 77-78.

银杏提取物对细胞毒素 MPP⁺ 致小脑颗粒细胞损伤的保护作用

翟所迪¹, 姜大为¹, 蒲小平^{2*}

(1. 北京大学第三医院 药剂科, 北京 100083; 2. 北京大学药学院 分子与细胞药理学系, 北京 100083)

摘要:目的 探讨银杏提取物 (*Ginkgo biloba* L. extract, GBE) 对 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP⁺) 所致大鼠小脑颗粒细胞损伤的保护作用。方法 用 GBE 预先孵育大鼠小脑颗粒细胞, 然后用 MPP⁺ 处理细胞, 分别用 MTT 法和神经丝蛋白的免疫组织化学方法进行检测。结果 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 MPP⁺ 使小脑颗粒细胞损伤, 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 GBE 具有保护作用。结论 GBE 对神经毒素 MPP⁺ 致细胞损伤有保护作用, 提示 GBE 可能具有抗帕金森病 (Parkinson's Disease, PD) 的潜在功效。

关键词: 银杏提取物; 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (MPP⁺); 小脑颗粒细胞

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)11-1020-03

Protective effect of *Ginkgo biloba* extract on cerebellar granule neurons injury induced by MPP⁺

ZHAI Suo-di¹, JIANG Da-wei¹, PU Xiao-ping²

(1. Department of Pharmacy, Third Hospital of Peking University, Beijing 100083, China; 2. Department of Molecular

* 收稿日期: 2003-02-26

作者简介: 翟所迪 (1956-), 男, 北京大学第三医院药剂科副主任药师, 1992年赴日本北海道大学进修, 主要从事新药研发、医院药学研究。Tel (010) 62017691-2737 E-mail: zhaisuodid@263.net

* 通讯作者

and Cellular Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China)

Key words *Ginkgo biloba* L. extract; 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺); cerebellar granule neurons (CGNs)

银杏叶含有多种药用活性成分,包括银杏内酯(ginkgolides)和黄酮类(flavonoides)^[1],以槲皮素、山柰素和水杨梅素等为主,但由于银杏内酯成分复杂,单体成本昂贵,故银杏叶提取复合成分的药理作用研究和分析更为重要。银杏叶提取物(*Ginkgo biloba* L. extract, GBE)的主要作用为调节血管张力,改善血液流变、改善微循环,抗自由基、抑制脂质过氧化反应;选择性拮抗血小板活化因子(PAF)引起的血小板聚集和血栓形成,提高红细胞超氧化物歧化酶(SOD)的活性,防止血管内皮细胞损伤。国外研究表明 GBE可改善认知功能缺损,促进学习和记忆,使记忆信息的过程速度加快^[2]。目前 GBE主要用于阿尔茨海默病、动脉粥样硬化症、脑血管循环障碍等疾病的治疗。

帕金森病(Parkinson's disease, PD),目前认为是锥体外系功能障碍引起的一种慢性中枢神经系统疾病。用神经毒素 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinium, MPTP)复制的 PD 动物模型常用于抗 PD 药物的研发。MPTP 的脑中代谢产物 1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP⁺)可特异性地导致多巴胺能神经元或小脑颗粒细胞(cerebellar granule neurons, CGNs)损伤。本实验采用 MPP⁺诱导产生 PD 样的细胞模型,探讨 GBE 对 MPP⁺造成的细胞损伤是否具有保护作用,为开发其新用途提供依据。

1 材料

1.1 动物:7~8 d 龄 Wistar 大鼠,北京大学医学部实验动物科学部提供。

1.2 试剂:MEM 培养基(Gibco),牛胰蛋白酶(Dfco),牛胰蛋白酶抑制剂、RNA 酶(中国科学院上海生物化学研究所东风生物公司),蛋白酶 K(Merck),多聚赖氨酸(相对分子质量大于 3×10^4 , Sigma),MTT 和 MPP⁺(Sigma),其余试剂均为国产分析纯。神经丝蛋白(广谱)单克隆抗体,生物素标记的山羊抗鼠 IgG,辣根酶标记链酶卵蛋白(SP-9000通用型)试剂盒,DAB Kit 均为 Santa Cruz 公司产品。GBE 取自银杏叶胶囊(商品名:百路达,上海信谊制药厂,批号 D000901,含总黄酮醇苷 9.6 mg 粒,实验时药物浓度换算为总黄酮醇苷的量)。

1.3 仪器:CO₂培养箱(美国 Precision Scientific),

JJT-900 型超净工作台(北京半导体设备一厂),倒置显微镜(重庆光学仪器厂),高速低温离心机(美国 Sorvall)。

2 方法

2.1 小脑颗粒细胞的培养与药物处理^[3]:7~8 d 龄 Wistar 大鼠,常规消毒后,无菌分离小脑,剔除软脑膜,切成 1 mm³的小块,加入质量体积分数为 0.1% Trypsin 的 Krebs-Ringer 缓冲液(KRB),37℃ 消化约 10 min,其间振荡数次,再加入含 83 mg/L 胰蛋白酶抑制剂的 KRB 缓冲液(消化终止液),终止消化,经 200 目不锈钢网滤过,离心(500×g, 10 min)后将细胞再次悬浮于上述消化终止液中。用吸管轻轻吹打,沉降 5 min 后,吸取上清液,沉淀中再加入相同溶液,重复上述操作,合并上清液,1000×g 离心 5 min,沉淀悬浮于体积分数为 10% 小牛血清 MEM 培养液中,细胞计数后, 2×10^6 /L 接种于预先经 5 mg/L 多聚赖氨酸铺板的 96 孔培养板(MTT 测定)或 12 孔板(免疫组化)。置于 37℃ 含 5% CO₂培养箱中培养,24 h 后更换 10⁻⁶ mol/L 阿糖胞苷的培养液,以抑制非神经细胞的增殖,分为空白对照组、模型组和药物组。培养第 5 天药物组分别加入 10, 20, 40 μg/mL GBE,培养第 6 天,模型组和药物组分别加 50 μmol/L MPP⁺ 溶液,空白对照组加等体积的培养基,37℃, 5% CO₂培养箱中继续培养,观察加 MPP⁺ 溶液后 12, 24, 36 h 不同组别细胞生长状况,并进行以下检测。

2.2 MTT 的测定:以上各组于 12, 24, 36 h 从培养箱中取出 96 孔板,向每孔中加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL(终浓度为 0.5 mg/mL),反应 4 h 后,吸去培养液,向每孔中加入 200 μL DMSO,轻轻吹打,使蓝色颗粒溶解,采用全自动酶标仪在 570 nm 波长处测其吸光度(A),实验重复 3 次。

细胞存活率 = 实验组 A 值 / 对照组 A 值 × 100%

2.3 免疫组织化学染色:按 SP 法进行免疫组织化学染色,按 2.1 项下方法,将经 MPP⁺ 处理后细胞用体积分数为 4% 多聚甲醛室温下固定,0.3% H₂O₂ 蒸馏水阻断内源性过氧化物酶,加山羊血清封闭,洗涤后加稀释 200 倍的神经丝蛋白单克隆抗体,洗涤,加稀释 200 倍的生物素标记的山羊抗鼠 IgG,进一步洗涤,加稀释 100 倍的辣根酶标记链酶

卵蛋白 (SP) 试剂,洗涤后 DAB溶液染色,显微镜下观察,并照相,染色过程中严格设立阴性对照。

2.4 统计学处理:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较进行 t 检验。

3 结果

3.1 MTT法测定细胞存活率:结果表明 $50 \mu\text{mol/L}$ MPP⁺ 作用 12 h后,小脑颗粒细胞存活率降低,24 h后更加明显,细胞存活率与对照组比显著下降,36 h后最明显,和对照组相比 A 值可下降 50% 以上。 $20 \mu\text{g/mL}$ GBE可明显提高细胞存活率,在 12, 24, 36 h均有作用,差异显著 ($P < 0.001$), GBE提高细胞存活的作用存在剂量依赖关系,见表 1

表 1 GBE对 MPP⁺ 诱发 CGNs死亡的
保护作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Protective effect of GBE on CGNs death
induced by MPP⁺ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	加入 MPP ⁺ 后不同时间 A 值		
		12 h	24 h	36 h
正常	-	0.929 ± 0.018	1.01 ± 0.003	0.554 ± 0.009
MPP ⁺ 模型	-	0.998 ± 0.004	0.733 ± 0.019	0.24 ± 0.011
GBE	10	1.047 ± 0.017	1.20 ± 0.050**	0.536 ± 0.018**
	20	1.359 ± 0.198**	1.433 ± 0.016**	0.410 ± 0.027**
	40	1.418 ± 0.026**	1.035 ± 0.015**	0.398 ± 0.007**

与 MPP⁺ 模型组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs MPP⁺ model group

3.2 神经丝蛋白免疫组化染色:神经丝蛋白可用于标记神经元,在中枢和外周神经系统的神经元细胞核周围,特别是在小脑神经元的胞浆和轴突有高表达。本实验通过免疫组化方法,标记小脑颗粒细胞的胞体和轴突,从而准确观察药物对 MPP⁺ 致细胞损

伤的保护作用。正常对照组小脑颗粒细胞的胞体呈杏核状,且突起交织形成网状, MPP⁺ 组小脑颗粒细胞轴突消失,胞体变小,胞浆浓缩,死细胞碎片增多,而 GBE组小脑颗粒细胞生长完好,突起长且交织成网状(图略)。

4 讨论

本研究表明, GBE能够明显的保护 MPP⁺ 造成细胞损伤,提高细胞的存活率, MPTP或 MPP⁺ 造成细胞损伤的机制是氧化应激、线粒体功能障碍及诱导细胞凋亡^[4-6]。 GBE具有抗自由基、抑制脂质过氧化反应的作用, GBE是通过抗细胞氧化应激还是其他机制保护 MPP⁺ 造成细胞损伤还有待进一步研究。本实验结果提示, GBE可能具有抗帕金森病的潜在功效。其药效学研究还在进一步探讨中。

References

- [1] You S, Yao X S, Cheng Y J, *et al.* Study development of chemistry and pharmacology of *Ginkgo biloba* [J]. *J Shenyang Pharm Coll* (沈阳药学院学报), 1988, 5(2): 142-145.
- [2] Gianfranco D R. *Ginkgo biloba* and the central nervous system [J]. *Fitoterapia*, 2000, 71: S43-S47.
- [3] Levi G, Aloisi F, Ciotti M T, *et al.* Autoradiographic localization and depolarization induced release of acidic amino acids in differentiating cerebellar granule cell cultures [J]. *Brain Res*, 1984, 290: 77-86.
- [4] Julie L, Laura L D, Karen L M. Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. [J]. *Neuroscience*, 1999, 19(4): 1284-1293.
- [5] Aubin A, Curet O, Deffois A. Aspirin and salicylate protect against MPTP-induced dopamine depletion in mice [J]. *Neurochem*, 1998, 71: 1635-1642.
- [6] Nakamura K, Bindokas V P, Marks J D, *et al.* The selective toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium to dopaminergic neurons: the role of mitochondrial complex I and reactive oxygen species revisited. [J]. *Mol Pharmacol*, 2000, 58: 271-278.

紫金龙总生物碱的镇痛作用及其机制初探

吴 勤, 王银叶, 艾铁民*

(北京大学医学部, 北京 100083)

摘要: 目的 研究紫金龙总生物碱的镇痛作用及其机制。方法 采用热板法、扭体法研究紫金龙总生物碱的镇痛作用, 采用福尔马林实验、纳洛酮拮抗实验和竖尾实验研究其镇痛机制。结果 紫金龙总生物碱可以明显抑制醋酸导致的小鼠扭体反应, 但对热刺激所致小鼠疼痛无明显镇痛作用。紫金龙总生物碱对福尔马林所致小鼠两相疼痛均有明显镇痛作用。纳洛酮未能拮抗其镇痛作用且紫金龙总生物碱给药组动物均未出现 S形竖尾反应。结论 紫金龙总生物碱既具有外周镇痛作用, 又具有中枢镇痛作用, 但其作用不同于吗啡类药物, 也不同于非甾体抗炎药。提示其可能作用于阿片受体以外的疼痛相关受体。

关键词: 紫金龙总生物碱; 镇痛; 纳洛酮

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)11-1022-04

* 收稿日期: 2003-01-27

作者简介: 吴 勤 (1978-), 女 (回族), 北京人, 北京大学医学部天然药物学系硕士研究生。

Tel (010) 85773895 E-mail almond715@sina.com