

银杏叶提取物 EGb761 神经保护作用研究进展

邹健¹, 蒋晓燕¹, 徐晓明^{1,2*}

(1. 上海第二医科大学 神经生物学实验室, 上海 200025; 2. 美国肯塔基脊髓损伤研究中心,

美国路易威尔大学神经外科系, 肯塔基 40292, 美国)

摘要:从提高痴呆病人认知能力到促进神经损伤后的恢复, 银杏叶提取物 EGb761 对神经系统疾病的治疗具有广阔的应用前景。研究证实 EGb761 的神经保护机制包括抗凋亡、抗氧化、清除淀粉样蛋白的聚集和影响神经递质转运。这些研究成果使得对 EGb761 神经保护作用有了进一步的理解, 也为探讨神经系统疾病和损伤的治疗提供了新的策略。

关键词:EGb761; 细胞凋亡; 自由基; β -淀粉样蛋白; 神经递质

中图分类号:R286.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2005)11-1734-03

Advances in studies on neuroprotection of *Ginkgo biloba* leaf extract EGb761ZOU Jian¹, JIANG Xiao-yan¹, XU Xiao-ming^{1,2}

(1. Department of Neurobiology, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China;

2. Kentucky Spinal Cord Injury Research Center, Department of Neurological Surgery, University of Louisville School of Medicine, KY40292, USA)

Key words: EGb761; apoptosis; free radical; β -amyloid; neurotransmitter

银杏叶作为药物使用在中国已有很久的历史, 近年来随着药物改良和加工工艺的改进, 其药用价值得到了进一步的肯定并越来越受到重视。目前国际上标准银杏叶提取物是按德国 Schwabe 专利工艺生产的 EGb761, 它是利用醇溶液从银杏的叶中提取出的混合物, 成分复杂, 含有 24% 的银杏黄酮苷(flavonoid)和 6% 的萜烯内酯(terpenoid), 后者含 5 种银杏苦内酯(ginkgolides A、B、C、M、J)和银杏内酯(bilobalide)。银杏叶提取物 EGb761 具有多种生理活性, 除对心血管系统具有明显的保护作用外, 在神经系统疾病治疗中也有明显疗效, 如改善脑和外周神经系统的血液供应, 保护神经细胞免受损伤, 改善神经退行性病变和衰老引起的认知能力的下降等^[1,2]。研究表明 EGb761 可能通过以下途径对神经系统产生保护作用, 即抗氧化和清除自由基; 抑制由缺血而引起的神经细胞的凋亡; 抑制和消除 β -淀粉样蛋白(β -amyloid)的聚积; 影响神经递质的转运等^[2-4]。本文拟对 EGb761 神经保护作用的分子机制研究进展作一综述。

1 抗凋亡作用

神经细胞的死亡是各类急性和慢性神经退行性病变的基本特征。在缺氧和局部缺血环境中, 凋亡引起的神经细胞死亡是加重神经损伤的重要因素。凋亡与阿尔茨海默(AD)病、亨廷顿病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症和帕金森氏病等退行性神经损伤关系密切^[4]。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)受体的激活、氧损伤及 β -淀粉样蛋白毒性作用等均可以引起神经细

胞凋亡^[5], 而凋亡过程也是多因素、多途径作用的结果, 与 Bcl-2 家族、衔接蛋白 Apaf-1 及半胱氨酸蛋白酶(caspase)家族等有关^[6]。

研究已证实 EGb761 能够抑制氧化损伤引起的细胞凋亡, EGb761 及其成分可抑制脂质的过氧化, 清除自由基, 从而提高细胞存活率^[7,8]。Ahlemeyer 等证实 EGb761 及其某些成分可以保护无血清和十字孢碱(staurosporine)引起的鸡神经元凋亡; 但在海马神经元中, EGb761 只能抑制无血清引起的细胞凋亡^[7]; 在由十字孢碱诱导凋亡的皮层神经元中, EGb761 提高了神经元的存活率, 减少了出现核固缩或碎裂的细胞数量, 在加入十字孢碱后很短时间内可明显抑制超氧化物的产生, 表现出抑制 caspase-3 活化的趋势^[5]。利用黄嘌呤诱发 PC12 细胞凋亡模型, Zhou 等^[9]发现银杏内酯对 PC12 细胞具有剂量依赖性保护作用, 更为重要的是银杏内酯能削弱由黄嘌呤诱导的 p53、c-Myc、Bax 和 caspase-3 蛋白的表达, 直接证实银杏内酯可拮抗由氧化损伤导致的细胞凋亡, 并且可以在凋亡早期阻断其进程, 表明 EGb761 对神经细胞的凋亡保护作用依赖于引起凋亡的刺激信号及神经细胞的种类。2002 年 Smith 等^[10]证实 EGb761 及其多种成分能通过多途径协调发挥抑制 PC12 细胞凋亡的作用, 他们还发现 EGb761 能够维持线粒体膜的完整性, 减少线粒体细胞色素 C 的释放, 而细胞色素 C 正是形成凋亡小体的关键分子。他们还发现 EGb761 可上调 Bcl-2 抗凋亡蛋白、下调

收稿日期: 2005-04-20

作者简介: 邹健(1976—), 男, 研究生, 从事脊髓损伤的修复研究。

* 通讯作者 徐晓明 E-mail: xmxu0001@gwise.louisville.edu

Tel: (021)63846590-776578 E-mail: zou_jian@yahoo.com.cn

内质网调节蛋白 caspase-12 蛋白酶的表达、抑制凋亡关键蛋白酶 caspase-3 的活化和 DNA 的片段化。上述研究表明 EGb761 能多方面发挥抗凋亡作用,但还应看到细胞凋亡是极其复杂的过程,许多细胞因子和信号转导途径参与其中,对这些因子和信号分子在细胞凋亡中的作用还存在争论,EGb761 抗凋亡作用的机制目前也尚未完全阐明。因此,有必要结合体外和体内实验对 EGb761 抗凋亡的分子机制进行更深入的研究。

2 抗氧化损伤和清除自由基

线粒体功能异常和氧化损伤在 AD 病等神经退行性疾病的细胞死亡中扮演重要角色。神经系统消耗大量的氧,也极易遭受氧化损伤。细胞内产生的自由基物质主要是超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)和羟自由基($OH^{\cdot}$),其他分子诸如过氧化氢(H_2O_2)、过(氧化)亚硝酸盐($ONOO^{\cdot}$)尽管自身不是自由基,但通过各种生化反应产生自由基,这些分子统称为活性氧(ROS)。通过氧化代谢产生的 ROS 被认为是细胞衰老及神经退行性疾病的主要因素,当 ROS 的产生量超过了机体所能清除的量,就会引起神经细胞因膜脂、蛋白、DNA 的氧化损伤导致的凋亡或坏死^[3]。

根据自由基理论,在细胞和组织水平应用抗氧化剂能够延缓细胞的衰老和相关疾病,而 EGb761 作为非常出色的抗衰老药物也主要得益于它的抗氧化作用^[4]。许多体内外实验已证实 EGb761 能够清除自由基。线粒体是体内 ROS 的主要来源,最易受到大量 ROS 分子的攻击造成氧化损伤,呼吸链受损会影响 ATP 的生成,还原型谷胱甘肽(GSH)的形成减少从而导致细胞的凋亡。Eckert 等^[11]报道用过氧化氢造成的 PC12 细胞线粒体损伤中,EGb761 可使线粒体免受过氧化氢的损伤;在老年鼠体内实验中给予 EGb761 处理后,外周淋巴细胞的氧化损伤程度和 ROS 诱导的凋亡现象明显减少。在颈动脉闭塞 5 d 后小鼠海马 CA1 区神经元大量死亡,而 EGb761 可避免海马中的神经元的大量丢失,进一步研究发现其不仅防止缺血引起的海马突触小体脂质氧化和 ROS 的生成,且有助于线粒体功能的保护,显著降低线粒体 Ca^{2+} 内流,抑制由缺血引起的线粒体锰-超氧化物歧化酶(Mn-SOD)活性下降及线粒体膜电位的改变,从而保护神经元^[12]。

NO 是重要的信号分子,在心、脑血管调节,神经、免疫调节等方面有着十分重要的生物学作用,但 NO 分子及其代谢产物在体内积聚过多会对心、脑、血管和神经系统造成损害。亚硝酸铁氰化钠(SNP)能使原代培养的大鼠海马混合细胞的存活率显著下降且增加 NO 在细胞中积聚,EGb761 可防止这种活性氧的聚集,并且抑制由 SNP 诱导的蛋白激酶 C(PKC)活化,抑制 NO 诱导的海马神经元的损伤^[13]。在细菌脂多糖刺激小鼠产生 NO 前预先给予 EGb761,可抑制 NO 的产生;用培养的巨噬细胞来证实,发现 EGb761 不仅抑制了 NO 分子的产生而且同时抑制诱导型 NO 合成酶(iNOS)的活化。这些结果提示 EGb761 不仅能直接清除 NO,而且也能抑制 iNOS 表达,因此,EGb761 可以作为 NO 的抑制剂在组织损伤情况下发挥作用^[14]。

3 抑制 β -淀粉样蛋白的聚集

β -淀粉样蛋白(A β)多肽(A β 1-40、A β 1-42)在脑部的沉积被认为是 AD 发病的主要原因,且神经元损害、认知损害和记忆丧失的程度与 β -淀粉样物质沉积范围有关^[15]。A β 是由前体蛋白 APP 在加工修饰过程中经不同的剪切方式形成的由 39~43 氨基酸残基所组成。在退行性疾病中 A β 的沉积、氧化应激和细胞凋亡密切相关^[16,17]。这些发现提示抑制 A β 在脑部的沉积是延缓 AD 病人神经元死亡的有效途径。

在体外培养的 PC12 中,EGb761 和 A β 同时加入到培养物中,发现 EGb761 能阻止 A β 的细胞毒性作用,进一步研究发现 EGb761 呈剂量依赖性地抑制与 AD 致病有关的 AD-DLs(β -淀粉样蛋白源性播散性配基)的形成^[18]。Luo 等^[19]在稳定表达 APP 和早老素 PS1 基因突变的小鼠成神经胶质瘤细胞中也证实 EGb761 能抑制 A β 的分泌、积聚及 caspase 3 的活化。游离胆固醇调控 APP mRNA 的表达,在 APP 及 A β 的形成过程中起重要作用^[15]。研究表明 EGb761 能显著降低老年鼠体内游离胆固醇水平,抑制脑内 APP 及 A β 的形成;体外实验也证明,PC12 细胞在 EGb761 处理后 APP 的表达量降低,同时还能抑制游离胆固醇诱导的 APP 过表达。在人 NT2 细胞中证实 EGb761 能增强细胞排泄游离胆固醇的能力^[20]。因此,EGb761 在 AD 中发挥治疗效果的机制之一可能是削弱低密度脂蛋白转运游离胆固醇的能力而不影响高密度脂蛋白携带胆固醇转运回肝脏的能力。

4 对神经递质转运的作用

大量研究证实,AD 伴有脑内多种神经递质的紊乱,目前较为肯定的与 AD 相关的有乙酰胆碱(Ach)系统、单胺(MA)系统和氨基酸类神经递质,其中尤以 Ach 的减少最为突出,同时伴有去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)和 5-羟色胺(5-HT)等的减少。研究表明 EGb761 能影响血清素类、肾上腺素类、多巴胺类、胆碱类等递质系统的功能^[2]。Lee 等^[21]认为 EGb761 很可能通过抑制 A β 来增加胆碱类神经递质的转运,从而提高认知能力。他们发现 A β 25-35 可剂量依赖性地抑制大鼠海马脑片的 K^+ 门控的 Ach 的释放,这种作用能被银杏内酯 B(GKB)阻断,单独使用 GKB 对 Ach 的释放没有影响;GKB 针对 A β 的作用不被河豚毒素阻断。由此认为 GKB 可直接作用于 A β ,从而改变 A β 对中枢神经系统 Ach 释放的抑制作用。

谷氨酸(Glu)是一种典型的兴奋性神经递质,其兴奋性作用主要是通过受体(GluR)介导的。GluR 的活化引起细胞去极化,使神经细胞兴奋性增高,导致 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cl^- 等离子通道的通透性增加。 Na^+ 、 Ca^{2+} 持续大量内流,以及 Cl^- 和水的被动内流造成细胞水肿和胞内 Ca^{2+} 超载,由此引发的脂质和蛋白质代谢紊乱等一系列变化造成蛋白质不可逆变性,最终导致神经细胞死亡,这也可能是造成脊髓继发性损伤的原因之一。L-谷氨酸可使培养的大鼠小脑神经元大量死亡,而预先加入 EGb761 或银杏内酯可明显抑制谷氨酸的神经毒性^[22],提示 EGb761 可能作用于 GluR 活化水平,抑制受体活化后引起的一系列级联活化和离子通道

的开放,从而抑制谷氨酸的兴奋性毒性作用。

Pardon 等^[23]的实验发现细胞衰老影响动物行为意识的同时对中枢多巴胺能和血清素能递质的转运也有影响,老年小鼠较 5~6 月大的小鼠脑部的 5-HT、5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA)、DA 和二羟苯乙酸(DOPAC)显著下降。老年小鼠这些神经递质的减少反映了血清素能和多巴胺能神经纤维随着衰老出现退化。5-HT 能神经纤维的退化和功能变化引起老年小鼠的 5HT 系统可塑性和对环境变化的应激能力降低。他们又给予 4~8 周持续受伤害性刺激的老年小鼠长时间的 EGb761 治疗,发现 EGb761 可抑制 5-HT、5-HIAA、DA 和 DOPAC 水平的下降、改善应对环境变化的能力、恢复 5-HT_{1A} 受体的功能,保护这些受体因衰老而受到损伤。这些结果提示 EGb761 预防衰老的保护机制之一可能是它至少能部分恢复血清素能系统对环境的反应能力,但这尚需进一步研究证实。

5 展望

尽管对 EGb761 的神经保护作用机制的研究取得了显著成果,但是许多方面还有待进一步的研究和阐明,如 EGb761 的不同成分在神经保护作用中各自发挥了什么样的作用以及它们如何相互作用和协调,有待于更多的体内、外实验加以证实。此外,EGb761 的神经保护作用的研究目前仅限于缺血性损伤和体外氧化损伤模型,中枢神经系统创伤后的保护作用尚未见报道,EGb761 对神经损伤的保护和应用的研究有望成为脑和脊髓损伤临床治疗的新策略。

References:

- [1] Sierpina V S, Wollschlaeger B, Blumenthal M. *Ginkgo biloba* [J]. *Am Fam Physician*, 2003, 68(5): 923-926.
- [2] MacLennan K M, Darlington C L, Smith P F. The CNS effects of *Ginkgo biloba* extracts and ginkgolide B [J]. *Prog Neurobiol*, 2002, 67: 235-257.
- [3] Smith J V, Luo Y. Studies on molecular mechanisms of *Ginkgo biloba* extract [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64: 465-472.
- [4] DeFeudis F, Drieu K. *Ginkgo biloba* extract (EGb761) and CNS functions: basic studies and clinical applications [J]. *Curr Drug Targets*, 2000, 1(1): 25-58.
- [5] Massieu L, Moran J, Christen Y. Effect of *Ginkgo biloba* (EGb761) on staurosporine-induced neuronal death and caspase activity in cortical cultured neurons [J]. *Brain Res*, 2004, 1002(1-2): 76-85.
- [6] Yuan J Y, Bruce A Y. Apoptosis in the nervous system [J]. *Nature*, 2000, 407: 802-809.
- [7] Ahlemeyer B, Möwes A, Krieglstein J. Inhibition of serum deprivation- and staurosporine-induced neuronal apoptosis by *Ginkgo biloba* extract and some of its constituents [J]. *Eur J Pharmacol*, 1999, 367: 423-430.
- [8] Xin W, Wei T, Chen C, et al. Mechanisms of apoptosis in rat cerebellar granule cells induced by hydroxyl radicals and the effects of EGb761 and its constituents [J]. *Toxicology*, 2000, 148(2-3): 103-110.
- [9] Zhou L J, Zhu X Z. Reactive oxygen species-induced apoptosis in PC12 cells and protective effect of bilobalide [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 293(3): 982-988.
- [10] Smith J, Burdick A, Golik P, et al. Antiaapoptotic properties of *Ginkgo biloba* extract EGb761 in differentiated PC12 cells [J]. *Cell Mol Biol*, 2002, 48: 699-707.
- [11] Eckert A, Keil U, Kressmann S, et al. Effect of EGb761® *Ginkgo biloba* extract on mitochondrial function and oxidative stress [J]. *Pharmacopsychiatry*, 2003, 36 (Suppl 1): S15-S23.
- [12] Kwon Y S, Annb H S, Nabeshima T, et al. Selegiline potentiates the effects of EGb761 in response to ischemic brain injury [J]. *Neurochem Int*, 2004, 45: 157-170.
- [13] Wadsworth T L, Koop D R. Effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide [J]. *Chem Biol Interact*, 2001, 137 (1): 43-58.
- [14] Bastianetto S, Zheng W H, Quirion R. The *Ginkgo biloba* extract (EGb761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: involvement of its flavonoid constituents and protein kinase C [J]. *J Neurochem*, 2000, 74(6): 2268-2277.
- [15] Puglielli L, Tanzi R E, Kovacs D M. Alzheimer's disease: the cholesterol connection [J]. *Nat Neurosci*, 2003, 6(4): 345-351.
- [16] Kokoszka J E, Coskun P, Esposito L A, et al. Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis [J]. *PNAS*, 2001, 98 (5): 2278-2283.
- [17] Marx J. New leads on the "How" of Alzheimer's [J]. *Science*, 2001, 293: 2192-2194.
- [18] Yao Z X, Katy D, Vassiliou P. The *Ginkgo biloba* extract EGB761 rescues the PC12 neuronal cells from β -amyloid-induced cell death by inhibiting the formation of β -amyloid-derived diffusible neurotoxic ligands [J]. *Brain Res*, 2001, 889: 181-190.
- [19] Luo Y, Smith J V, Paramasivam V, et al. Inhibition of amyloid-beta aggregation and caspase-3 activation by the *Ginkgo biloba* extract EGb761 [J]. *PNAS*, 2002, 99(19): 12197-12202.
- [20] Yao Z X, Han Z Q, Katy D, et al. *Ginkgo biloba* extract (EGb761) inhibits β -amyloid production by lowering free cholesterol levels [J]. *J Nutr Biochem*, 2004, 15(12): 749-756.
- [21] Lee T F, Chen C F, Wang L C. Effect of ginkgolides on beta-amyloid-suppressed acetylcholine release from rat hippocampal slices [J]. *Phytother Res*, 2004, 18(7): 556-560.
- [22] Chandrasekaran K, Mehrabian Z, Spinnewyn B, et al. Neuroprotective effects of bilobalide, a component of *Ginkgo biloba* extract (EGb761) in global brain ischemia and in excitotoxicity-induced neuronal death [J]. *Pharmacopsychiatry*, 2003, 36 (Suppl 1): S89-S94.
- [23] Pardon M C, Hanoun N, Perez-Diaz F, et al. Long-term treatment with the antioxidant drug EGb761 at senescence restored some neurobehavioral effects of chronic ultramild stress exposure seen in young mice [J]. *Neurobiol Aging*, 2004, 25(8): 1067-1083.