

银杏酮酯对 β -淀粉样蛋白诱导大鼠海马神经元氧化应激致细胞损伤影响的实验研究

夏趁意 董献文 赵 妍 徐 颖 郝 莉 张志雄

摘要 目的 研究银杏酮酯(GBE50)对由 β -淀粉样蛋白($A\beta$)诱导的海马神经元氧化应激反应的影响及可能机制。**方法** 通过体外原代培养获得海马神经细胞,将细胞分成4组:正常对照组(Ctrl组)、 $A\beta$ 组、溶剂对照组(PDO组)和 GBE50 组(分6个浓度梯度5、10、25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$)。除 Ctrl 组外,其他组中的细胞均经 20 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 诱导后出现氧化应激状态,采用 MTT 和荧光探针标记法,观察不同浓度的 GBE50 对海马神经元细胞活力和细胞内活性氧(ROS)的影响。运用 Western blotting 法检测观察 GBE50(25、50、100 $\mu\text{g/mL}$)3个浓度梯度对氧化应激通路中的胞质内细胞色素 C(Cyto C)与胞内总 Cyto C 蛋白表达量之间的比值,以及活化的 Caspase-3 蛋白表达量的影响。**结果** 与 Ctrl 组比较,20 $\mu\text{mol/L}$ 的 $A\beta_{25-35}$ 诱导细胞后使细胞活力明显降低,细胞内 ROS 量明显增多(均 $P < 0.05$)。与 $A\beta$ 组比较,GBE50 能够改善细胞活力,除 10 $\mu\text{g/mL}$ 浓度外,GBE50 其他浓度组的细胞活力随着浓度的增高而明显升高($P < 0.05$);同时 GBE50 各浓度组的胞内 ROS 量均明显减少(均 $P < 0.05$)。 $A\beta$ 诱导后细胞内的 Cyto C 比值及活化 Caspase-3 表达量均较 Ctrl 组明显升高($P < 0.05$)。与 $A\beta$ 组比较,在 GBE50 的3个浓度组中,100 $\mu\text{g/mL}$ 的 GBE50 组中 Cyto C 比值明显降低($P < 0.05$),50、100 $\mu\text{g/mL}$ 的 GBE50 组中活化 Caspase-3 表达量均显著降低($P < 0.05$)。**结论** 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 $A\beta_{25-35}$ 能够诱导海马神经元胞内活性氧的产生,而 GBE50 通过减小胞质内与胞内总 Cyto C 量的比值,抑制凋亡蛋白 Caspase-3 活化,从而抑制 $A\beta$ 诱导的细胞内氧化应激反应。

关键词 银杏酮酯; β -淀粉样蛋白;海马神经元;氧化应激

Ginkgo biloba Extract 50 Inhibited Beta-amyloid-induced Oxidative Stress in Rats' Hippocampal Neurons: an Experimental Study XIA Chen-yi, DONG Xian-wen, ZHAO Yan, XU Ying, HAO Li, and ZHANG Zhi-xiong Department of Physiology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (201203), China

ABSTRACT Objective To study the *in vitro* effect and mechanism of *Ginkgo biloba* Extract 50 (GBE50) for inhibiting beta-amyloid ($A\beta$)-induced oxidative stress in rats' hippocampal neurons. **Methods** The primary hippocampal neurons were cultured *in vitro* and divided into 4 groups, i. e. the normal control group (Ctrl), the $A\beta$ group, the propanediol control group (PDO), and the six GBE50 concentrations groups (5, 10, 25, 50, 100, and 200 $\mu\text{g/mL}$). Excepted the Ctrl group, neurons were induced to oxidative stress by 20 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$. The MTT and fluorescent probes labeling were used to observe the effect of GBE50 with different concentrations on the cell viability and the generation of intracellular reactive oxygen species (ROS) in neurons. Furthermore, Western blot was used to detect the cytoplasmic/total cytochrome C (Cyto C) ratio and total intracytoplasmal Cyto C, and the effect of the expression of oxidative stress-related protein Cyto C and activated Caspase-3 in three GBE50 concentrations groups (25, 50, and 100 $\mu\text{g/mL}$). **Results** Compared with the Ctrl group, the cell vitality was obviously lowered

基金项目:上海市教委重点学科资助项目(No. J50301);上海中医药大学预算内资助项目(No. 2013JW02)

作者单位:上海中医药大学生理教研室(上海 201203)

通讯作者:张志雄, Tel: 021-51322588, E-mail: zixion3@yahoo.com.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2014.07.0833

and intracellular ROS generation significantly increased after induction of 20 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ (both $P < 0.05$). Compared with the $\text{A}\beta$ group, the cell vitality was evidently improved after treated with different GBE50 doses. Except for 10 $\mu\text{g/mL}$, the cell vitality could be obviously elevated along with increased drug concentrations ($P < 0.05$). Meanwhile, the intracellular ROS generation decreased significantly in each GBE50 dose groups ($P < 0.05$). $\text{A}\beta$ could increase the cytoplasmic/total Cyto C ratio and enhance the activated Caspase-3 expression significantly ($P < 0.05$). Compared with the $\text{A}\beta$ group, among the three concentrations of GBE50, the Cyto C ratio was obviously lowered in the 100 $\mu\text{g/mL}$ GBE50 group ($P < 0.05$), and the expression of activated Caspase-3 significantly decreased in 50 $\mu\text{g/mL}$ and 100 $\mu\text{g/mL}$ GBE50 groups ($P < 0.05$). Conclusions 20 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ could induce the generation of intracellular ROS in hippocampal neurons. GBE50 could inhibit $\text{A}\beta$ induced intracellular oxidative stress of neurons through lowering the cytoplasmic/total Cyto C ratio and inhibiting the activation of apoptosis protein Caspase-3 expression.

KEYWORDS *Ginkgo biloba* extract 50; beta-amyloid; hippocampal neuron; oxidative stress

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种常见的老年性神经系统退行性疾病,临床表现为进行性认知功能减退。AD 典型的病理改变为在记忆和认知的关键脑区出现 β 淀粉样肽($\text{A}\beta$)的胞外沉积老年斑(senile plaque, SP)、胞内神经纤维缠结(neuronal fibrillary tangles, NFT)、胆碱能缺失和神经元丢失^[1]。AD 病情呈进行性加重,病因迄今未明。其可能的机制包括氧化应激、炎症、毒性和神经细胞凋亡等^[1]。迄今为止的研究认为,AD 不是由单一因素引起,而是多种因素综合作用的结果。国外对于天然化合物防治 AD 的作用研究较多,其中,银杏叶提取物对于 AD 的作用被认为是多靶点的,可作为防治 AD 的天然药物之一^[2]。因此本实验从神经元氧化应激致病机制出发,利用原代培养的大鼠海马神经元细胞来研究银杏酮酯(*Ginkgo biloba* Extract 50, GBE50)对由 $\text{A}\beta$ 诱导的神经元内氧化应激反应的影响,探讨 GBE50 对神经元保护作用的机制。

材料与方法

1 药物 GBE50 由上海杏灵科技药业有限公司自主研发并提供(批号:081108),原浓度为 5 mg/mL,溶剂为 2% 丙二醇(PDO)。取适量原浓度为 5 mg/mL 的 GBE50,用含 2% B27 的 Neurobasal 培养液依次稀释成 5、10、25、50、100 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 6 个浓度的溶液,备用。

2 试剂与仪器 DMEM 和 Neurobasal 培养液、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、马血清(horse serum, HS)及 B27 (No. 17504 - 044) 和 B27 minus AO (No. 10889 - 038) 为美国 Gibco 公司产品;一抗 GFAP 和 NF, 荧光二抗 Cy2 和 Cy3 均

为 CST 产品; $\text{A}\beta_{25-35}$ (No.A4559) 为美国 Sigma 公司产品;细胞线粒体分离试剂盒(C3601)、活性氧检测试剂盒(S0033)和 DAPI(C1002) 为上海碧云天生物技术有限公司产品;BCA 蛋白定量试剂盒(WB0124) 为上海威奥生物科技有限公司产品;细胞色素 C 抗体(4272)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (cysteine aspartic acid protease 3, Caspase-3) 抗体(9662) 和 β -actin 抗体(4970) 均为美国 CST 公司产品;氯化钠、氯化钾、磷酸二氢钾和磷酸氢二钠均购自国药集团化学试剂有限公司,以配制 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(Phosphate buffer solution, PBS);多聚甲醛和曲拉通 X-100 (Triton X-100) 均购自国药集团化学试剂有限公司。 CO_2 培养箱 (Thermo Scientific Series 8000 型; Thermo Scientific 公司, 美国);酶标仪 (BioTek Synergy 2 型; Bio-Tek 公司, 美国);低温离心机 (Eppendorf Centrifuge 5417R 型; Eppendorf 公司, 德国);电泳槽 (Mini-PROTEAN 165 - 8001 型; Bio Rad 公司, 美国);电泳仪 (Power pac Basic 164 - 5050 型; Bio Rad 公司, 美国);Tanon 数码凝胶图像分析系统(4500SF 型, 上海天能科技有限公司)。

3 海马神经元的分离培养与鉴定

3.1 海马神经元的分离培养 参考文献[3, 4], 取出生 1 天的 SD 大鼠[由上海中医药大学实验动物中心提供, 动物生产许可证号: SCXK (沪) 2008 - 0003], 断头并剥离出大脑, 分离出海马组织, 去除表面的血管膜;剪碎海马组织, 用 0.125% 胰酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 15 min;终止消化、离心, 再用含 5% FBS 和 5% HS 的 DMEM (高糖) 细胞培养液重悬细胞后制备细胞悬液;用 200 目尼龙网过滤成单细胞悬液接种于培养瓶

或培养板内,并放置于含 5% CO_2 的 37 °C 培养箱内。24 h 后细胞培养液全部更换为含 2% B27 的 Neurobasal 培养液,置于含 5% CO_2 的 37 °C 培养箱内继续培养 3 天,备用。

3.2 海马神经元细胞的鉴定 运用免疫荧光化学的方法鉴定海马神经元。将上述培养 3 天后的细胞,滴加 4 % 的多聚甲醛固定 30 min, 0.01 mol/L PBS 漂洗后,再加入 0.3% TritonX-100 室温下作用 15 min。随后滴加 10% 山羊血清封闭剂,于 37 °C 湿盒中孵育 20 min。倾去多余封闭剂,加入一抗(小鼠抗 GFAP 和兔 NF, 稀释度均为 1:100), 4 °C 孵育过夜。次日, 0.01 mol/L PBS 漂洗后,滴加抗鼠 Cy2 和抗兔 Cy3 二抗,湿盒中 37 °C 温育 1 h。随后滴加 DAPI,室温孵育 15 min。0.01 mol/L PBS 漂洗后,在荧光显微镜下进行观察。在显微镜下随机在 3 张玻片上各取 5 个视野,分别统计带有 GFAP 标记的神经胶质细胞和 NF 标记的神经元的数量,以此来鉴定培养得到的神经元的纯度。

4 观察指标与检测方法

4.1 大鼠海马神经元活力的测定 通过 MTT 测定细胞活力的方法来观察 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导后海马神经元活力的变化以及 GBE50 对其的影响。实验分 4 组:正常对照组(Ctrl 组)、 $\text{A}\beta$ 组、溶剂对照组(PDO 组)和 GBE50 组(分 6 个浓度梯度 5、10、25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$)。以每孔 150 μL 含 5×10^4 个海马神经元的细胞悬液接种于 96 孔板。其中,Ctrl 组、 $\text{A}\beta$ 组和 PDO 组每组各 6 个复孔,GBE50 组中的 6 个浓度梯度也各 6 个复孔。将 96 孔板放置于 37 °C, 5% CO_2 培养箱中培养 24 h。GBE50 组同时加入不同浓度的 GBE50 后放入培养箱孵育 1 h; PDO 组则加入终浓度为 0.8% 丙二醇(PDO); $\text{A}\beta$ 组、PDO 组和 GBE50 组再加入老化后的 $\text{A}\beta_{25-35}$ (终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$), 处理 24 h。Ctrl 组则加入等体积的无菌水。按照 MTT 常规方法操作,通过酶联检测仪测波长 570 nm 下的吸光度值。

4.2 大鼠海马神经元细胞内活性氧(ROS)的检测 通过活性氧检测试剂盒来测定 GBE50 对 $\text{A}\beta$ 诱导大鼠海马神经元内 ROS 的影响。以每孔 150 μL 含 5×10^4 个细胞的细胞悬液接种于 96 孔板, 37 °C, 5% CO_2 培养箱中培养 24 h, 再将每孔中的培养基全部更换 2% B27 (minus AO) 的 Neurobasal 培养液, 每孔 100 μL 。实验分组及药物处理方法同 4.1。最后按照活性氧检测试剂盒的操作进行处理,并用酶联检测仪测波长 488/525 nm 下的吸光度

(OD) 值。

4.3 大鼠海马神经元细胞质中 Cyto C 比值及活化 Caspase-3 表达量的测定 本观察指标中, GBE50 组只含有 3 个浓度梯度(25、50 和 100 $\mu\text{g/mL}$)。操作方法具体如下:以每孔 1.5 mL 含 1×10^6 个海马神经元的细胞悬液接种于 6 孔板, 其中, Ctrl 组、 $\text{A}\beta$ 组和 PDO 组每组各 6 个复孔, GBE50 组中的 3 个浓度梯度也各 6 个复孔。将这些 6 孔板放置于 37 °C, 5% CO_2 培养箱中培养 24 h。各组细胞的药物处理方法同 4.1。然后,用 0.125% 胰酶消化液消化细胞,离心收集细胞,冰浴匀浆、离心并去除沉淀,从而获得全细胞蛋白液,用于细胞内 Cyto C 总量和活化的 Caspase-3 蛋白表达量的检测;同样,使用细胞线粒体分离试剂盒可获得海马神经元去除线粒体的细胞质蛋白液,可用于神经元细胞质中 Cyto C 表达量的检测。将上述所得到的蛋白液首先采用 BCA 蛋白定量试剂盒来测定其蛋白含量,然后通过 Western blotting 法来分别检测神经元细胞内 Cyto C 总量和细胞质中 Cyto C 的量,及活化的 Caspase-3 表达量^[5]。并且计算得出胞质中 Cyto C 蛋白量与胞内 Cyto C 总量的比值(简称 Cyto C 比值)。

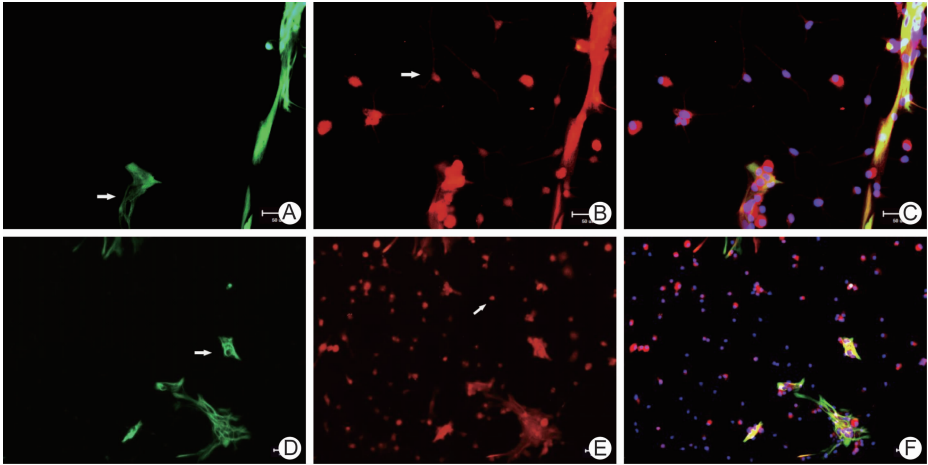
5 统计学方法 采用统计软件 SPSS 16.0 分析数据,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间差异采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 大鼠海马神经元鉴定结果(图 1) 约 90% 细胞为 NF 阳性细胞,即神经元;约 10% 细胞为 GFAP 阳性细胞,即神经胶质细胞(星形胶质细胞)。

2 各组大鼠海马神经元细胞活力比较(表 1) 与 Ctrl 组比较, $\text{A}\beta$ 组和 PDO 组的细胞活力明显降低($P < 0.05$)。PDO 组与 $\text{A}\beta$ 组之间无明显变化($P > 0.05$)。与 $\text{A}\beta$ 组比较,除 10 $\mu\text{g/mL}$ 浓度外, GBE50 其他浓度组的细胞活力随着浓度的增高而明显升高,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度 GBE50 还可以使细胞活力提高 23.9%。

3 各组大鼠海马神经元 ROS 量比较(表 1) $\text{A}\beta$ 组和 PDO 组的胞内 ROS 量较 Ctrl 组均明显增多($P < 0.05$)。GBE50 各浓度组的胞内 ROS 量较 Ctrl 组均未出现明显增加($P > 0.05$);而与 $\text{A}\beta$ 组比较,各浓度组的胞内 ROS 量均减少,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。



注:A、D 为 GFAP;B、E 为 NF;C、F 为 GFAP/NF/DAPI 嵌合图;A、B 和 C 的放大倍数为 200 倍,D、E 和 F 的放大倍数为 100 倍;图中标尺为 50 μm ;箭头所指为 GFAP 及 NF 阳性细胞

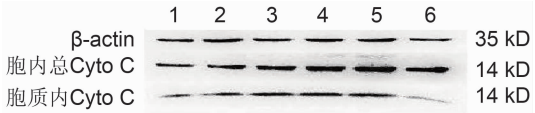
图 1 海马神经细胞的鉴定(荧光免疫化学标记法)

表 1 各组大鼠海马神经元细胞活力及 ROS 的结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	细胞活力 OD _{570 nm}	细胞内 ROS OD _{488/525 nm}
Ctrl	6	1.358 ± 0.064	2775.0 ± 292.3
A β	6	0.840 ± 0.048 *	3291.2 ± 451.2 *
PDO	6	0.857 ± 0.059 *	3170.8 ± 278.6 *
GBE50 5 $\mu\text{g/mL}$	6	0.928 ± 0.054 Δ	2667.4 ± 127.1 Δ
10 $\mu\text{g/mL}$	6	0.895 ± 0.042	2621.4 ± 165.6 Δ
25 $\mu\text{g/mL}$	6	0.984 ± 0.049 Δ	2685.2 ± 265.9 Δ
50 $\mu\text{g/mL}$	6	1.022 ± 0.039 Δ	2778.2 ± 262.2 Δ
100 $\mu\text{g/mL}$	6	1.175 ± 0.061 Δ	2859.2 ± 216.5 Δ
200 $\mu\text{g/mL}$	6	1.683 ± 0.048 Δ	2907.5 ± 270.9 Δ

注:与 Ctrl 组比较,* $P < 0.05$;与 A β 组比较, $\Delta P < 0.05$;表 2 同

4 各组大鼠海马神经元 Cyto C 比值比较(图 2, 表 2) 与 Ctrl 组比较,A β 组和 PDO 组 Cyto C 比值明显升高($P < 0.05$)。A β 组与 PDO 组之间 Cyto C 比值差异无统计学意义($P > 0.05$)。在 GBE50 的 3 个浓度组中,Cyto C 比值则出现随着浓度的增高而降低的趋势,但与 A β 组比较,100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度 GBE50 组 Cyto C 比值明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



注:1 为 Ctrl 组;2 为 A β 组;3 为 PDO 组;4 为 GBE50 组 25 $\mu\text{g/mL}$;5 为 GBE50 组 50 $\mu\text{g/mL}$;6 为 GBE50 组 100 $\mu\text{g/mL}$

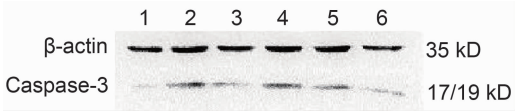
图 2 各组细胞内及细胞质内 Cyto C 的表达

5 各组大鼠海马神经元活化 Caspase-3 表达结果比较(表 2,图 3) 与 Ctrl 组比较,A β 组和 PDO 组活化 Caspase-3 表达明显升高($P < 0.05$)。与 A β

表 2 各组大鼠海马神经元 Cyto C 比值及活化 Caspase-3 蛋白表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Cyto C 比值	活化 Caspase-3 表达量
Ctrl	6	0.224 ± 0.018	0.093 ± 0.011
A β	6	0.342 ± 0.023 *	0.341 ± 0.029 *
PDO	6	0.389 ± 0.033 *	0.318 ± 0.033 *
GBE50 25 $\mu\text{g/mL}$	6	0.368 ± 0.031	0.326 ± 0.031
50 $\mu\text{g/mL}$	6	0.305 ± 0.025	0.236 ± 0.025 Δ
100 $\mu\text{g/mL}$	6	0.204 ± 0.024 Δ	0.152 ± 0.021 Δ

组比较,PDO 组无明显差异($P > 0.05$)。GBE50 的 3 个浓度组中活化 Caspase-3 表达随着 GBE50 浓度的增高而呈降低趋势,其中,与 A β 组比较,50 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 GBE50 组均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



注:1 为 Ctrl 组;2 为 A β 组;3 为 PDO 组;4 为 GBE50 组 25 $\mu\text{g/mL}$;5 为 GBE50 组 50 $\mu\text{g/mL}$;6 为 GBE50 组 100 $\mu\text{g/mL}$

图 3 各组大鼠海马神经元活化 Caspase-3 表达

讨 论

AD 可能的机制包括氧化应激、炎症、毒性和神经细胞凋亡等。由 A β 胞外沉积形成的 SP,是 AD 典型的病理改变之一,其可引起细胞内氧化应激和细胞凋亡等,从而造成神经组织损伤^[1]。本实验中在原代培养的海马神经元上也发现,A β_{25-35} 能够使细胞活力降

低,诱导 ROS 的增加,促使细胞产生氧化应激状态。

在 AD 各种致病因素中,氧化应激被认为是非常重要的因素,其是 ROS 与抗氧化之间的失衡所造成的^[6]。在 AD 患者脑内,构成老年斑的 A β 聚集物被认为在氧化应激介导发病中起核心作用^[7]。已有研究发现,在海马神经细胞^[8,9]、大鼠皮层神经元^[10]、大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(PC12)^[11]和在体大鼠海马组织^[12]中,A β_{25-35} 和 A β_{1-40} 能够诱导产生 ROS。而本实验也发现 A β_{25-35} 可以使海马神经元内 ROS 含量增加,促使细胞内出现超氧化而产生损伤。不同浓度的 GBE50 都可以明显地逆转 A β 诱导的细胞内 ROS 的作用,并改善细胞活力,进而对神经元产生保护作用。A β 诱导细胞毒性的分子机制还未完全阐明,一般认为其毒性牵涉到氧自由基和一氧化氮的形成以及钙失调^[13]。如 A β_{25-35} 和 A β_{1-40} 能诱导海马神经元胞内自由基增加 2 倍,游离钙增加 3.5 ~ 4 倍^[8]。A β_{1-42} 也能诱导细胞出现钙失调,且 H₂O₂ 和 PAF 能介导此现象^[14]。而线粒体是 A β 的重要作用部位^[15]。A β_{1-42} 和 A β_{25-35} 可以使大鼠大脑和肌肉组织的线粒体中 ROS 增加^[16]。A β_{1-40} 能使大鼠大脑线粒体内 H₂O₂ 增多^[17]。

研究证实,线粒体既是细胞内 ROS 主要的产生部位,也是其主要的的作用部位。因此,线粒体功能障碍对 ROS 的产生起到关键作用,后者可以造成细胞内氧化损伤^[6,18]。细胞内不断增加的 ROS 又可以反向地加强 A β 对线粒体的毒性作用,最终导致细胞凋亡^[18]。例如, Yang B 等^[19]将 A β_{1-42} 显微注射入 APP/PS1 小鼠神经元内,发现 ROS 可以加强 A β 的毒性作用。已有研究发现,A β 能够诱导细胞线粒体功能障碍,产生的 ROS 可以刺激 Cyto C 由线粒体释放到胞质中。在细胞色素 C 和 ATP(或 dATP)存在的情况下,前半胱氨酸蛋白酶(Caspase-9)结合凋亡蛋白酶激活因子 1(Apaf-1)被激活,即具有剪切和激活 Caspase-3 的能力。Caspase-3 能够直接参与 DNA 片段化,导致 DNA 损伤^[6]。本实验中,A β 诱导海马神经元胞内产生 ROS,并且出现了胞质内 Cyto C 含量增加和凋亡蛋白 Caspase-3 表达的增强现象,也印证了上述发现。而 GBE50 的孵育能够明显抑制胞内 ROS 的产生,降低胞质内 Cyto C 的含量,并抑制凋亡蛋白 Caspase-3 的表达。这些结果提示,GBE50 能够通过减少胞内 ROS 的生成,降低胞内氧化应激状态,并通过抑制线粒体释放 Cyto C 和 Caspase-3 的活化,从而避免细胞由于氧化应激而出现的 DNA 损伤和细胞凋亡,并由此改善细胞活力。

银杏叶提取物的作用可能是通过协同多个细胞内信号通路而实现的^[20],本实验中发现的这些作用环节可能只是 GBE50 抗细胞氧化应激的一个方面。所以需要进一步研究更多的作用机制。

参 考 文 献

- [1] Shi C, Liu J, Wu F, et al. *Ginkgo biloba* Extract in Alzheimer's disease: from action mechanisms to medical practice[J]. Int J Mol Sci, 2010, 11(1): 107-123.
- [2] Essa MM, Vijayan RK, Castellano-Gonzalez G, et al. Neuroprotective effect of natural products against Alzheimer's disease[J]. Neurochem Res, 2012, 37(9): 1829-1842.
- [3] Kelly BL, Ferreira A. Beta-amyloid disrupted synaptic vesicle endocytosis in cultured hippocampal neurons[J]. Neuroscience, 2007, 147(1): 60-70.
- [4] Wang PY, Chen JJ, Su HM. Docosahexaenoic acid supplementation of primary rat hippocampal neurons attenuates the neurotoxicity induced by aggregated amyloid beta protein and up-regulates cytoskeletal protein expression[J]. J Nutr Biochem, 2010, 21(4): 345-350.
- [5] Jiang ZQ, Yan XJ, Bi L, et al. Mechanism for hepato-protective action of Liangxue Huayu Recipe (LHR): Blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 148(3): 851-860.
- [6] Kaminsky YG, Marlatt MW, Smith MA, et al. Subcellular and metabolic examination of amyloid- β peptides in Alzheimer disease pathogenesis: evidence for A β_{25-35} [J]. Exp Neurol, 2010, 221(1): 26-37.
- [7] Eckert A, Keil U, Kressmann S, et al. Effects of EGB761 *Ginkgo biloba* Extract on mitochondrial function and oxidative stress[J]. Pharmacopsychiatry, 2003, 36(Suppl 1): S15-S23.
- [8] Liu Q, Zhao B. Nicotine attenuates beta-amyloid peptide-induced neurotoxicity, free radical and calcium accumulation in hippocampal neuronal cultures[J]. Br J Pharmacol, 2004, 141(4): 746-754.
- [9] Zeng H, Chen Q, Zhao B. Genistein ameliorates beta-amyloid peptide (25-35)-induced hippocampal neuronal apoptosis[J]. Free Radic Biol Med, 2004, 36(2): 180-188.
- [10] Café C, Torri C, Bertorelli L, et al. Oxidative stress after acute and chronic application of beta-amyloid fragment₂₅₋₃₅ in cortical cultures[J]. Neu-

- roschi Lett, 1996, 203(1): 61-65.
- [11] Pereira C, Santos MS, Oliveira C. Involvement of oxidative stress on the impairment of energy metabolism induced by Abeta peptides on PC12 cells: protection by antioxidants [J]. Neurobiol Dis, 1999, 6(3): 209-219.
- [12] Shen YX, Xu SY, Wei W, et al. The protective effects of melatonin from oxidative damage induced by amyloid beta-peptide₂₅₋₃₅ in middle-aged rats[J]. J Pineal Res, 2002, 32(2): 85-89.
- [13] Malyshev IY, Wiegant FA, Mashina SY, et al. Possible use of adaptation to hypoxia in Alzheimer's disease: a hypothesis[J]. Med Sci Monit, 2005, 11(8): HY31-HY38.
- [14] Shi C, Wu F, Xu J. H₂O₂ and PAF mediate Aβ₁₋₄₂-induced Ca²⁺ dyshomeostasis that is blocked by EGb761 [J]. Neurochem Int, 2010, 56(8): 893-905.
- [15] Wang X, Su B, Perry G, et al. Insights into amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease [J]. Free Radic Biol Med, 2007, 43(12): 1569-1573.
- [16] Aleardi AM, Benard G, Augereau O, et al. Gradual alteration of mitochondrial structure and function by beta-amyloids: importance of membrane viscosity changes, energy deprivation, reactive oxygen species production, and cytochrome c release[J]. J Bioenerg Biomembr, 2005, 37(4): 207-225.
- [17] Moreira PI, Santos MS, Sena C, et al. CoQ10 therapy attenuates amyloid beta-peptide toxicity in brain mitochondria isolated from aged diabetic rats[J]. Exp Neurol, 2005, 196(1): 112-119.
- [18] Pagani L, Eckert A. Amyloid-beta interaction with mitochondria [J]. Int J Alzheimer's Dis, 2011: 925050.
- [19] Yang B, Sun X, Lashuel H, et al. Reactive oxidative species enhance amyloid toxicity in APP/PS1 mouse neurons[J]. Neurosci Bull, 2012, 28(3): 233-239.
- [20] Smith JV, Luo Y. Studies on molecular mechanisms of *Ginkgo biloba* Extract[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 64(4): 465-472.

(收稿:2013-03-22 修回:2014-03-31)

第十一届全国中西医结合血液学学术会议暨第二届中西医结合血液学高峰论坛会议征文通知(第一轮通知)

为促进全国中西医结合血液学学术发展,增进血液学工作者的学术交流和提高,由中国中西医结合学会血液学专业委员会主办、中国中医科学院西苑医院承办的第十一届全国中西医结合血液学学术会议暨第二届中西医结合血液学高峰论坛定于2014年9月19—21日在福建省厦门市举行。会议将邀请国内知名专家就中西医结合血液病最为关注的问题作专题报告,并进行学术交流。热忱欢迎各省市中西医结合血液学委员、青年委员通知本专业医师投稿与参会。现将会议征文有关事宜通知如下。

征文内容 血液系统肿瘤(白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征等)中西医结合的临床和基础研究;造血干细胞生物学特性的中西医结合临床应用;造血干细胞移植的中西医结合研究;红细胞疾病(再生障碍性贫血、溶血性贫血、巨幼红细胞性贫血、单纯红细胞再生障碍性贫血等)中西医结合临床和基础研究;血栓与止血疾病(特发性血小板减少性紫癜、血栓性血小板减少性紫癜等)中西医结合临床和基础研究;血液学相关生物技术(形态学、免疫学、分子生物学、单克隆抗体、基因工程等)的中西医结合应用;血液学护理技术的临床和基础研究。

征文要求 来稿应为未公开发表的论文,内容应为结构式摘要(依次包括:文题、作者、作者单位、目的、方法、结果、结论),字数500~1 000字。并注明联系方式(工作单位、地址、邮编、联系电话、E-mail等)。征文请E-mail发送至xyxzywyh@163.com,邮件标题请注明“血液学会议稿件”字样。论文截止日期:2014年7月31日。

联系人/地址 中国中医科学院西苑医院血液科 唐旭东 收 邮编:100091, 电话:010-62835362