

# 天麻素抗谷氨酸和氧自由基诱导的PC12细胞损伤的研究

李运曼<sup>1\*</sup>, 陈芳萍<sup>2</sup>, 刘国卿<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>中国药科大学生理教研室; <sup>2</sup>药理教研室, 南京 210009)

**【摘要】目的:** 研究天麻素对谷氨酸和氧自由基所诱导的PC12细胞损伤的保护作用。**方法:** 用谷氨酸和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>造成PC12细胞损伤模型, 采用MTT比色法、乳酸脱氢酶(LDH)活力检测法, 探讨天麻素对兴奋性氨基酸和过氧化氢所致PC12细胞损伤的影响; 采用Fura-3/AM为荧光指示剂用Vector<sup>2</sup>1420研究天麻素对谷氨酸所致损伤PC12细胞内Ca<sup>2+</sup>的作用; 用流式细胞术检测该药对谷氨酸诱导PC12细胞凋亡的影响; 利用荧光染色考察该药清除自由基的能力。**结果:** 天麻素10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup> mol/L可明显提高谷氨酸诱导的PC12细胞还原MTT的能力, 抑制该细胞LDH的释放; 天麻素还可抑制兴奋性氨基酸所引起的细胞内Ca<sup>2+</sup>含量的升高; 剂量相关性地降低PC12细胞的凋亡百分率。10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup> mol/L剂量组可明显减轻H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>引起的PC12细胞损伤; 降低静息状态下PC12细胞内过氧化氢的含量。**结论:** 天麻素可抑制兴奋性氨基酸诱导的细胞死亡和凋亡, 具有清除自由基的能力, 能对抗自由基诱导的PC12细胞的损伤, 具有神经元保护作用。

**关键词:** 天麻素; PC12细胞; 谷氨酸; 自由基; 保护作用

**【中图分类号】** R965   **【文献标识码】** A   **【文章编号】** 1000-5048(2003)05-0456-05

天麻素是我国传统中药材天麻的有效单体, 具有镇静、抗惊厥、抗癫痫、镇痛, 增加脑血流量, 改善椎基底动脉、小脑前下动脉、小脑后下动脉、迷路动脉及内耳供血不足, 保护神经细胞, 促进心肌细胞能量代谢的功能, 临幊上广泛应用于眩晕(美尼尔氏病、病毒性眩晕、前庭神经元炎、椎基底动脉供血不足等)、神经痛(三叉神经痛、枕大神经痛等)、头痛(神经衰弱及神经衰弱综合征、血管性头痛、紧张性头痛、脑外伤综合征、偏头痛等)及癫痫的辅助治疗<sup>[1]</sup>。近年来, 对天麻素的药理及临幊进行了广泛的研究, 如对心脑血管系统的影响、镇静作用、抗癫痫作用和免疫作用。天麻是治疗中风的常用中药, 在日本还被用来改善学习记忆功能和治疗老年痴呆<sup>[2]</sup>。天麻素对谷氨酸和过氧化氢所致PC12细胞损伤模型的影响目前尚未见报道, 故本文在这方面进行了初步的探讨, 为该药的临床应用提供一定的理论基础。

## 1 实验材料

### 1.1 药物及试剂

天麻素(gastrodin, Gas): 含量99.8%, 批号010618, 由本校天然药化教研室提供, 临用前用PBS配制成所需浓度; 尼莫地平(nimodipine, Nim):

sigma进口分装, 用30%乙醇配制成1×10<sup>2</sup>的母液备用; 维生素E(vitamin E, VE): sigma进口分装, 用30%乙醇配制成1×10<sup>2</sup>的母液备用; 过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): 上海桃浦化工厂生产; 谷氨酸(glutamate, Glu): 上海伯奥生物科技公司产品; Fura-3/AM: sigma进口分装; MTT(溴化-(4, 5-二甲-2-噻唑基)-2, 5-二苯基四氮唑): Fluka产品; LDH(乳酸脱氢酶)试剂盒: 南京建成生物工程公司产品; PI染料: BD公司产品; 2', 7'-Dichlorofluorescin diacetate(DCFH-DA): sigma进口分装; 其它试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器

DG3022A型酶联免疫检测仪(华东电子管厂); XSZ-D倒置显微镜(重庆光学仪器厂); BB-16型CO<sub>2</sub>培养箱(德国Heraeus公司); XIDP超净工作台(苏州吴县实验动物仪器厂); 752型紫外分光光度计(上海精密科学有限公司); FACACalibur型流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司); 1420 Vector<sup>2</sup>多标记免疫分析仪(Perkin Elmer Lifescience公司)。

## 2 方法

### 2.1 谷氨酸(Glu)诱导PC12细胞损伤模型

方法参照文献<sup>[3]</sup>稍加改进。将处于对数生长

\*【收稿日期】 2003-03-28 【\*通讯作者】 Tel: 025-3271185

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

期的PC12细胞接种于预先用多聚赖氨酸处理过的96孔培养板,细胞完全贴壁、铺满单层后弃去原培养液,用D-Hank's液轻轻荡洗2次,加入无糖Earle's液作用30min,荡洗后正常对照组和损伤对照组加入无血清培养液,阳性对照组加入终浓度为 $10^{-6}$ mol/L的尼莫地平,天麻素设3个剂量组分别为 $10^{-5}$ , $10^{-6}$ , $10^{-7}$ mol/L,每组10个复孔,于37℃培养30min,荡洗后加入终浓度为0.5mmol/L的谷氨酸继续培养20min,正常对照组不加谷氨酸。D-Hank's液洗2次,加入不完全DMEM培养基(不含小牛血清)每孔100μl继续培养24h。实验结束后用MTT法和LDH法测细胞活性。

2.1.1 MTT法 向96孔培养板中加入每孔25μl的MTT(5mg/ml),终浓度为0.5mg/ml,37℃培养4h后,加入每孔100μl的Formazan溶解液(50%DMF,含20%v/v SDS,pH 4.7),37℃培养过夜,用酶联免疫检测仪测定570nm/630nm处的光密度值(optical density, OD)。根据下式计算药物对造模引起的PC12细胞损伤的抑制百分比:损伤抑制率(%)=(OD<sub>drug</sub>-OD<sub>model</sub>)/(OD<sub>control</sub>-OD<sub>model</sub>)。

2.1.2 乳酸脱氢酶(LDH)释放的测定 用乳酸脱氢酶(LDH)测试盒,测定培养液中LDH的活性,步骤按测试盒的说明书进行。LDH的释放抑制率按下式计算:释放抑制率(%)=(LDH<sub>model</sub>-LDH<sub>drug</sub>)/(LDH<sub>model</sub>-LDH<sub>control</sub>)。

2.1.3 兴奋性谷氨酸损伤后PC12细胞内钙的测定<sup>[4]</sup> 参照文献<sup>[4]</sup>法,细胞经DMEM洗涤后加荧光探针Fura-3/AM,37℃孵育30min,再次洗涤后,用1420Vector<sup>2</sup>多标记免疫分析仪在380~420nm激发波长条件下进行检测。

2.1.4 流式细胞仪检测谷氨酸(Glu)诱导的PC12细胞凋亡率 方法参照文献<sup>[3]</sup>稍加改进。将处于对数生长期的PC12细胞接种于预先用多聚赖氨酸处理过的96孔培养板,细胞完全贴壁、铺满单层后弃去原培养液,用D-Hank's液轻轻荡洗2次,加入无糖Earle's液作用30min,荡洗后正常对照组和损伤对照组加入无血清培养液,阳性对照组加入终浓度为 $10^{-6}$ mol/L的尼莫地平,天麻素设3个剂量组分别为 $10^{-5}$ , $10^{-6}$ , $10^{-7}$ mol/L,于37℃培养30min,荡洗后加入终浓度为0.3mmol/L的谷氨酸继续培养20min,正常对照组不加谷氨酸。D-Hank's液洗2次,加入不完全DMEM培养基(不含小牛血

清)100μl/孔继续培养20h。

凋亡细胞DNA断裂成不同大小的寡聚核苷酸片段(凋亡相关的内源性核酸酶激活的结果),在FCM的DNA直方图中表现为G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>峰前形成特征性亚二倍体峰(Sub-G<sub>1</sub>, 亚-G<sub>1</sub>),根据该峰所占比例,可进行凋亡的定量分析。采用PI单染色法,样本制备步骤如下:收集(1~5)×10<sup>6</sup>个已处理好的细胞,离心(1000r/min, 5min),弃上清液;3ml PBS洗1次,离心去上清液,加入冰冷的乙醇于4℃条件下固定24h;离心弃去固定液,3ml PBS重悬细胞5min,1500r/min离心5min去上清,0.01%RNA酶消化10min,离心去上清液,加入0.005%PI,4℃避光染色30min,300目的筛网过滤1次,即可上机分析。流式细胞仪检测和仪器分析步骤如下:PI用氩离子激发荧光,激发光波波长为488nm,发射光波波长大于630nm,产生红色荧光。使用Cellquest软件采集样本后,用Mod Fit LT软件进行分析。

## 2.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>合并培养基缺糖诱导的PC12细胞损伤模型

2.2.1 MTT法和乳酸脱氢酶(LDH)释放的测定 按照文献稍加改进<sup>[4]</sup>,细胞接种于预先用多聚赖氨酸处理过的96孔培养板,细胞完全贴壁后,用D-Hank's液轻轻荡洗2次,每孔加入无糖Earle液作用30min。荡洗后正常对照组加入无血清培养液,阳性药组加入终浓度为 $10^{-5}$ mol/L的VE,天麻素设3个剂量组分别为 $10^{-5}$ , $10^{-6}$ , $10^{-7}$ mol/L(每组10个复孔),于37℃分别培养1h,加入终浓度为0.5mmol/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>继续培养2h。吸去含H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的培养液,用D-Hank's液洗细胞2次,加入不完全DMEM培养基(不含小牛血清)100μl/孔继续培养12h,采用MTT法和LDH法检测细胞活力。

2.2.2 荧光染色及流式细胞仪测定PC12细胞内的过氧化氢含量 2',7'-Dichlorofluorescin diacetate(DCFH-DA)本身是一种非荧光的物质,而且是一种非极性的化合物,扩散透过细胞膜后被细胞内的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化成为一种高度荧光的物质。2',7'-Dichlorofluorescein(DCF)细胞的荧光强度与细胞内H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的含量成正比,可以直接用流式细胞仪进行检测。进行流式细胞仪分析时,选用488nm激发波长测定细胞内的DCF,DCF发射出的荧光波长为530±20nm,DCF荧光强度在对细胞进行染色后30~60min

内可达到稳定水平, 峰强度可稳定 $1\text{h}^{[7]}$ 。本实验采用处于成对数生长期的PC12细胞, 各组加入终浓度为 $100\mu\text{mol/L}$ 的DCFH-DA,  $37^\circ\text{C}$ 培养30 min, 去原培养液, 加入天麻素/ $\text{V}_E$ 处理1 h, 使天麻素的终浓度为 $10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}\text{ mol/L}$ , 维生素E的终浓度为 $10^{-5}\text{ mol/L}$ , 对照组加入DMEM培养液,  $37^\circ\text{C}$ 培养30 min, 去原培养液, 各组分别加入 $0.5\text{ mmol/L}$ 的 $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$ 培养30 min。用PBS洗2遍, 吹打制成单细胞悬液, 样品用300目尼龙膜过滤后即可上机分析。

### 3 结 果

#### 3.1 天麻素对谷氨酸损伤后细胞活力的影响

由表1和表2可见, 经Glu处理后的PC12细胞对MTT的还原能力下降,  $\text{OD}_{570\text{ nm}}$ 值明显低于正常对照组( $P<0.01$ ), LDH释放量明显增加( $P<0.05, P<0.01$ ), 表明细胞因受损伤或死亡而导致细胞活力明显下降。天麻素 $10^{-6}$ 和 $10^{-5}\text{ mol/L}$ 组还原MTT的能力显著高于损伤组( $P<0.01$ ), LDH的释放量明显低于损伤组( $P<0.05, P<0.01$ ), 表明天麻素能明显改善细胞活力。

Tab 1. The effect of gastrodin on Glu-induced injury in PC12 cells ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Groups	$\text{OD}_{570\text{ nm}}$	Inhibition rate(%)
Control	$1.51\pm0.19^{**}$	
Model	$0.34\pm0.09$	
Gas $1\times10^{-7}\text{ mol/L}$	$0.53\pm0.12^{**}$	15.4
Gas $1\times10^{-6}\text{ mol/L}$	$0.62\pm0.13^{**}$	24.0
Gas $1\times10^{-5}\text{ mol/L}$	$0.79\pm0.14^{**}$	38.5
Nim $1\times10^{-6}\text{ mol/L}$	$0.81\pm0.09^{**}$	40.2

\* \*  $P<0.01$  vs model

#### 3.2 胞浆钙荧光强度检测

由表3可见经谷氨酸处理过的PC12细胞荧光

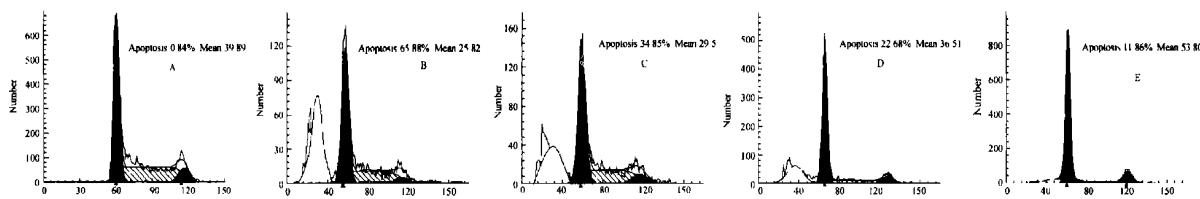


Fig 1. The effect of gastrodin on Glu-induced apoptosis in PC12 cell

A. control; B. model; C. gastrodin  $10^{-5}\text{ mol/L}$ ; D. gastrodin  $10^{-6}\text{ mol/L}$ ; E. gastrodin  $10^{-7}\text{ mol/L}$

#### 3.4 天麻素对过氧化氢损伤后细胞活力的影响

由MTT法和LDH法测定的结果(见表4和表

强度明显升高( $P<0.01$ ); 给予天麻素 $10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}\text{ mol/L}$ 组的荧光强度则显著低于损伤组( $P<0.05$ 和 $P<0.01$ ), 表明天麻素能明显降低PC12细胞内游离钙的积累, 对谷氨酸引起的PC12细胞损伤的抑制率分别为36.4%, 58.1%, 66.4%。

Tab 2. The effect of gastrodin on Glu-induced LDH leakage in PC12 cells ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Groups	LDH (KU/L)	Inhibition rate(%)
Control	$3.40\pm0.25^{**}$	
Model	$4.51\pm0.37$	
Gas $1\times10^{-7}\text{ mol/L}$	$4.13\pm0.37^*$	34.2
Gas $1\times10^{-6}\text{ mol/L}$	$3.98\pm0.33^{**}$	47.7
Gas $1\times10^{-5}\text{ mol/L}$	$3.71\pm0.36^{**}$	72.1
Nim $1\times10^{-6}\text{ mol/L}$	$3.6\pm0.29^{**}$	75.7

\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$  vs model

Tab 3. The effect of gastrodin on Glu-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  level in PC12 cells ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Groups	OD( $\times 10^5$ )	Inhibition rate(%)
Control	$3.45\pm0.62^{**}$	
Model	$7.45\pm1.66$	
Gas $1\times10^{-7}\text{ mol/L}$	$5.49\pm1.41^*$	36.4
Gas $1\times10^{-6}\text{ mol/L}$	$5.13\pm1.07^{**}$	58.1
Gas $1\times10^{-5}\text{ mol/L}$	$4.79\pm1.77^{**}$	66.4

\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$  vs model

#### 3.3 Glu诱导的PC12细胞凋亡流式细胞仪分析结果

用流式细胞仪可直接观察DNA含量, 凋亡细胞DNA荧光强度降低, 在正常的G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>峰前出现一个亚-G<sub>1</sub>峰, 称为凋亡峰(AP峰), 可根据AP峰计算细胞的凋亡百分率。模型组PC12细胞经Glu损伤后, 凋亡细胞的百分率为65.88%, 而正常对照组凋亡细胞百分率为0%, 经天麻素处理的PC12细胞, 凋亡率显著降低, 分别为34.85%, 22.65%, 11.86%, 呈剂量相关性(见图1)。

5)可见, 经过氧化氢处理后的PC12细胞对MTT的还原能力下降,  $\text{OD}_{570\text{ nm}}$ 值明显低于正常对照组( $P<0.01$ ), 经天麻素处理的PC12细胞对MTT的还原能力下降,  $\text{OD}_{570\text{ nm}}$ 值明显低于正常对照组( $P<0.01$ )。

$<0.01$ ), LDH 释放量明显增加( $P<0.01$ ), 表明细胞因受损伤或死亡而导致细胞活力明显下降。天麻素  $10^{-6}$  mol/L 和  $10^{-5}$  mol/L 组还原 MTT 的能力显著高于损伤组( $P<0.01$ )。LDH 的释放量明显低于损伤组( $P<0.01$ ), 表明天麻素能明显改善细胞活力。

Tab 4. Inhibitory effect of gastrordin on  $H_2O_2$ -induced injury in PC12 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

Group	OD <sub>570nm</sub>	Inhibition rate(%)
Control	$1.16 \pm 0.13^{**}$	
Model	$0.77 \pm 0.10$	
Gas $1 \times 10^{-7}$ mol/L	$0.80 \pm 0.08$	7.7
Gas $1 \times 10^{-6}$ mol/L	$0.86 \pm 0.06^{**}$	22.1
Gas $1 \times 10^{-5}$ mol/L	$0.90 \pm 0.09^{**}$	31.8
V <sub>E</sub> $1 \times 10^{-6}$ mol/L	$0.90 \pm 0.07^{**}$	33.8

\* \*  $P<0.01$  vs mode

Tab 5. Inhibitory effect of gastrordin on  $H_2O_2$ -induced LDH leakage in PC12 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

Group	IDH Activity (KU/L)	Inhibition rate(%)
Control	$2.16 \pm 0.25^{**}$	
Model	$3.73 \pm 0.27$	
Gas $1 \times 10^{-7}$ mol/L	$3.61 \pm 0.42$	7.1
Gas $1 \times 10^{-6}$ mol/L	$3.41 \pm 0.30^{**}$	19.9
Gas $1 \times 10^{-5}$ mol/L	$3.32 \pm 0.27^{**}$	26.3
V <sub>E</sub> $1 \times 10^{-7}$ mol/L	$2.75 \pm 0.28^{**}$	62.2

\* \*  $P<0.01$  vs mode

### 3.6 天麻素对PC12细胞内过氧化氢( $H_2O_2$ )含量的影响

通过对细胞内 DCF 荧光强度的分析比较, 正常对照组的荧光强度为 98.85, 模型组为 435.58, 加入天麻素  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  mol/L 后, 荧光值分别为 290.41, 214.10, 181.31, 抑制率为 43.1%, 65.7%, 75.5%, 表明天麻素能清除细胞内  $H_2O_2$  的含量。结果见图 2。

### 4 讨论

兴奋性氨基酸和氧自由基都是导致脑损伤的主要因素。谷氨酸是脑组织内主要的兴奋性氨基酸, 在某些情况下, 对神经元有毒性作用<sup>[8]</sup>。Glu 可使胞内  $Ca^{2+}$  浓度( $[Ca^{2+}]_i$ )升高。有学者认为, 兴奋性毒性是脑卒中、低血糖、癫痫、Huntington 病和 Alzheimer 痘<sup>[9]</sup>的发病机制。谷氨酸及其化合物所致的神经元损害可能是由于过度刺激受体的结

果, 而钙离子在这个过程中起关键作用。天麻素可对抗谷氨酸引起的  $[Ca^{2+}]_i$  升高, 降低 LDH 释放, 对 PC12 细胞损伤有保护作用。

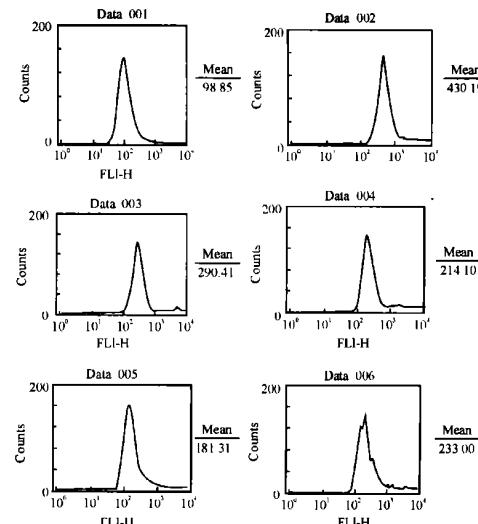


Fig 2. Cytograms obtained from the suspension containing PC12 cells by a flow cytometer

Data 001: control (without  $H_2O_2$ ); Data 002: model (without gastrordin); Data 003: gastrordin  $10^{-7}$  mol/L; Data 004: gastrordin  $10^{-6}$  mol/L; Data 005: gastrordin  $10^{-5}$  mol/L; Data 006: V<sub>E</sub>  $10^{-6}$  mol/L

凋亡(apoptosis)是一种受基因调节的细胞自主控制的独特的细胞死亡方式, 而坏死则是细胞处于强烈且持久的损伤条件下发生的细胞死亡。细胞凋亡在神经系统生理和病理情况下均存在。凋亡细胞的死亡及其辅助分子介质可能在许多神经退行性疾病均有作用<sup>[10]</sup>。研究表明许多神经退行性疾病, 如帕金森氏病、早老性痴呆、舞蹈病等都与神经元过早、过度老化有关。 $Ca^{2+}$  作为参与许多生命活动的关键第二信使, 在细胞凋亡中的作用受到普遍关注。80年代初, 人们发现糖皮质激素诱导胸腺细胞凋亡时, 涉及细胞内钙的持续上升。之后, 大量实验结果进一步证明, 钙本身是一种诱导细胞凋亡的信号。谷氨酸可通过多种机制引起神经细胞内钙超载, 使神经细胞内钙失衡, 引起神经细胞凋亡<sup>[11]</sup>, 谷氨酸损伤 PC12 细胞 20 h, 凋亡率即可达到 65.88%。天麻素呈剂量相关性地抑制谷氨酸诱导的 PC12 细胞凋亡。

病理条件下, 机体产生大量自由基, 或机体抗氧化防御系统遭到破坏, 造成细胞结构和功能的破坏, 最终导致自由基从正常线粒体电子传递链中漏

出。自由基所介导的脑损伤不仅发生在缺血期间，而且在随后的血液再灌注过程中仍是导致脑损伤的主要原因<sup>[12]</sup>。而且，在Fe<sup>3+</sup>和超氧阴离子自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)的存在下，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可以转化成毒性更强的羟自由基(·OH)。因此，外源性抗氧化剂和自由基清除剂的应用，以及降低神经细胞内活性氧的含量是保护脑组织免受缺血/缺血—再灌注损伤的有效方法<sup>[7]</sup>。本实验采用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的PC12细胞损伤，检测天麻素对此损伤的抑制作用。结果显示，天麻素10<sup>-7</sup>，10<sup>-6</sup>，10<sup>-5</sup> mol/L剂量组均可提高活细胞比率( $P < 0.01$ )，对损伤的抑制率分别为22.1%，31.8%，33.8%；抑制细胞LDH释放( $P < 0.01$ )，抑制率分别为7.1%，19.9%，26.3%。天麻素还可在静息状态下降低PC12细胞内过氧化氢的含量，推测其可能通过抑制神经细胞中活性氧的形成。上述结果表明，天麻素具有一定的自由基清除能力，对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的PC12细胞损伤有一定的保护作用。推测其可能通过影响神经细胞内过氧化氢的生成和/或神经细胞的氧化代谢过程，对神经元起到保护作用。

### 参考文献

- [1] 吕国平(Lu GP), 王春芹(Wang CQ), 蔡中琴(Cai ZQ). 天麻素注射液的药理及临床研究[J]. 中草药(Chin Tradit Herb Drugs), 2002, 33, 附3-5.
- [2] 黄健美(Huang JM), 唐一鹏(Tang YP), 洪庆涛(Hong QT). 抗
- [3] 熊文(Xiong W), 王友联(Wang YL), 李晓政(Li XZ), 等. 谷氨酸对原代培养海马神经细胞兴奋毒作用的研究[J]. 白求恩医科大学学报(J Norman Bethune Univ Med Sci), 1997, 23(5): 600-602
- [4] 叶静(Ye J), 张杰(Zhang J), 李胜富(Li SF), 等. β淀粉样多肽诱导培养大鼠神经元钙超载的实验研究[J]. 华西医学(West China Med J), 2000, 15(2): 247-249
- [5] Samantha L, Lalitha T, Timothy L, et al. Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in cerebrocortical neurons[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 6161-6166
- [6] Morten BH, Svend EN, Kurt B. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill[J]. J Immunol Meth, 1989, 119: 203-210.
- [7] Yasuo O, Akemi H, Toshiko U, et al. Characterization of 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence in dissociated mammalian brain neurons: estimation on intracellular content of hydrogen peroxide[J]. Brain Res, 1994, 635: 113-117.
- [8] Choi DW. Excitotoxic cell death[J]. J Neuro Biol, 1992, 23: 1261-1276
- [9] Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders[J]. N Engl J Med, 1994, 330: 613-622.
- [10] 彭黎明, 王曾礼. 细胞凋亡的基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 99.
- [11] Nagatu S. Apoptosis by death factor[J]. Cell, 1997, 88: 355-365
- [12] Evans PH. Free radicals in brain metabolism and pathology[J]. British Medical Bulletin, 1993, 49: 577-87.

## Studies on Inhibitive Effect of Gastrodin on PC12 Cell Damage Induced by Glutamate and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

LI Yun-Man, CHEN Fang-Ping, LIU Guo-Qing

Department of Physiology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**【ABSTRACT】** AIM: To study the protective effects of gastrodin on PC12 cell damage induced by Glu and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

METHOD: Detecting the protective effects of gastrodin on PC12 cells by the methods of MTT and LDH, detecting the decreasing concentration of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> by Fura-3/AM, and detecting Glu induced apoptosis of PC12 cells by PI. The clearance capacity of gastrodin on free radical was detected by FCM. RESULT: PC12 cell damage, the concentrations of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and apoptosis induced by Glu were decreased after being administrated with gastrodin. The damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the concentrations of free radical in PC12 cell were declined after being administrated with gastrodin. CONCLUSION: Gastrodin may act as a neuro-protector by weakening PC12 cell damages induced by excitatory amino acids and free radical.

**【KEY WORDS】** Gastrodin; PC12 cells; Glutamate; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Protective effects