

银杏叶提取物抗氧化及其抗胰岛 RIN-m 细胞凋亡的作用

叶春玲, 金永亮, 周光雄, 覃亮

(暨南大学药学院药理学教研室, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 探讨银杏叶提取物 (EGb761) 的抗氧化及其抗过氧化氢 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 诱导的胰岛 RIN-m 细胞凋亡的作用。方法: 以 $500 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用于胰岛 RIN-m 细胞 6 h 建立凋亡模型; 采用荧光探针 DCFH-DA 法进行活性氧检测细胞内氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 的变化, NO 测试试剂盒检测细胞 NO 释放的变化, Annexin V-P 双染色法流式细胞术分析细胞凋亡情况。结果: 经 H_2O_2 损伤诱导凋亡后, 细胞存活率降低, 凋亡率增加, 细胞产生 NO 减少, 活性氧 ROS 增多。与阴性对照组相比, EGb761 能清除 ROS, 增加 NO, 改善凋亡情况, 且作用呈剂量依赖性。结论: EGb761 对 细胞凋亡有显著保护作用, 其机制可能与其清除氧自由基等作用有关。

[关键词] 银杏叶提取物; 过氧化氢; 细胞凋亡; 一氧化氮

[中图分类号] R96 [文献标识码] A [文章编号] 1000-9965(2007)04-0360-05

Effects of EGb761 on the antioxygen and cell apoptosis induced by H_2O_2 in RIN-m beta cells

YE Chun-ling, JIN Yong-liang, ZHOU Guang-xiong, QIN Liang

(Department of Pharmacology, Pharmacy College, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] **Aim:** To investigate the effects of Ginkgo biloba extract (EGb761) upon hydrogen peroxide (H_2O_2) induced apoptosis in RIN-m beta-cells. **Methods:** The apoptotic model was made by H_2O_2 exposed for six hours with a concentration of $500 \mu\text{mol/L}$. EGb761 and quercetin (Que) respectively pretreated the RIN-m beta-cells for 10 hours which would suppose to act as ROS cleaner to scavenge oxidative damage produced by H_2O_2 . The cytotoxicity was measured by cell counting-8 kit (CCK-8). The production of nitric oxide (NO) was assayed with NO assay kit, and peroxide levels were determined using dichlorofluorescein diacetate assay kit (DCFH/DA). AnnexinV-PI double staining of flow cytometry were used to quantitatively detect the effect of EGb761 on the apoptosis of RIN-m beta-cells induced by H_2O_2 . **Results:** Compared to normal control group, after exposed to $500 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 6 hours, the apoptosis level increased and cell survival levels were decreased considerably ($P < 0.001$). $100 \mu\text{g/mL}$ EGb761 or $100 \mu\text{mol/L}$ Que can scavenge the excessive ROS ($P < 0.01$, compared with H_2O_2 group). Pretreated with EGb761 or Que, the apoptosis level decreased and the NO increased considerably. **Conclusion:** EGb761 can decrease cell apoptosis through scavenging of the excessive ROS, increasing NO releasing in RIN-m beta-cells

[Key words] EGb761; H_2O_2 ; apoptosis; nitric oxide

[收稿日期] 2007-03-15

[基金项目] 广东省医学科研基金课题 (A2003407)

[作者简介] 叶春玲 (1963-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 临床药理学. Tel: 020-85223843 E-mail: yechunling2005@163.com

氧化应激状态是细胞凋亡发生的一个重要媒介^[1-2]。许多凋亡刺激可使胞内活性氧基团 ROS 产生或伴有氧化应激^[3-4]。相反,许多凋亡的抑制剂具有抗氧化活性或加强细胞抗氧化能力。银杏叶提取物 EGb761 的主要有效成分为黄酮糖苷类(24%)和萜烯内酯类(6%),具有较强的抗氧化作用和清除氧自由基作用,但对胰岛细胞氧化损伤及其凋亡的影响,至今未见报道。为此,本研究采用 H₂O₂ 诱导培养的胰岛 RN_m 细胞凋亡模型,考察银杏叶提取物对胰岛 细胞氧化损伤及其凋亡的影响,为 EGb761 的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

银杏叶提取物(Extract Ginkgo biloba, EGb761)(批号:20050601)由深圳海王药业提供,5.5 mmol/L 葡萄糖 DMEM 培养基购于 GBCO 公司;胎牛血清,杭州四季青公司生产;CCK-8 试剂盒(20050303)、NO 检测试剂盒、活性氧检测试剂盒、购自碧云天试剂公司;胰蛋白酶(Trypsin)购自 Sigma 公司;Annexin-V PI(批号:20051115)双染凋亡试剂盒购自北京保赛生物技术有限公司。

1.2 细胞株及培养

胰岛 RN_m 细胞株购自中山医科大学细胞库。培养基为含体积分数 10%胎牛血清及青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 μg/mL)的 5.5 mmol/L 葡萄糖 DMEM 培养基,于 37 ℃ 体积分数 5% CO₂ 条件下培养。

1.3 实验仪器

3111 二氧化碳培养箱(FORMA, U. S. A.); 5084R 型高速冷冻离心机(EPPENDORF, Germany); FACS Aria 流式细胞仪(美国 BD 公司);450 酶标仪(BD-RAD, USA);22D FE-D282 荧光倒置显微镜(LEICA, Germany)。

2 方法

2.1 H₂O₂ 致胰岛 RN_m 细胞凋亡模型的制备和药物处理

细胞以每孔 10⁵ /mL 的密度接种于 96 孔培养板中,37 ℃,体积分数 5% CO₂,饱和湿度条件下培养过夜使细胞完全贴壁。分别设空白对照组(control)、阴性对照组(H₂O₂)、槲皮素阳性对照组(Quercetin 100 μmol/L)、EGb761 单用对照组(EGb761 100 μmol/L),EGb761 给药组(EGb761 10、30、100

μg/mL),每组至少 6 孔。药物于 37 ℃ 预孵 10 h 后,再加入终浓度为 500 μmol/L 的 H₂O₂ 继续培养 6 h,然后进行活性氧测定等实验。至少重复 3 次实验。

2.2 CCK-8 法检测细胞活力

将接种过细胞的 96 孔培养板中培养液吸去,用 PBS 洗涤 1 次,加入每孔 0.2 mL PBS 和 20 μL 的 CCK-8。37 ℃ 培养 4 h 后,加入每孔 150 μL 的 DM-SO 溶解液 37 ℃ 培养过夜,用酶联免疫检测仪测定 570 nm/630 nm 处的吸光度 A。

2.3 活性氧检测

将培养瓶中对数生长期的 RN_m 细胞消化置成单细胞悬液后,以 5 × 10⁵ /mL 的密度接种于 96 孔培养板孔内,于体积分数 95% 空气、5% CO₂、37 ℃、饱和湿度条件下过夜培养,按活性氧检测试剂盒说明操作进行活性氧(ROS)测定。检测用荧光酶标仪,使用 488 nm 激发波长,525 nm 发射波长。

2.4 NO 检测^[5]

实验用一氧化氮(nitric oxide,NO)检测试剂盒,NO 由一氧化氮合酶(NO synthase)合成,其本身极不稳定,但可以用间接方法测量。NaNO₂ 是一氧化氮代谢形成的一种稳定产物。所以,测定其含量相当于测定 NO 的累积产量。按 NO 检测试剂盒说明操作进行 NO 测定,酶标仪 540 nm 测定吸光度 A。

2.5 流式细胞术(FCM)检测细胞凋亡

采用 Annexin V-PI 双染色法,用质量分数 0.25% 胰酶 - 0.02% EDTA 消化分离细胞,制成单细胞悬液,将待测细胞的密度调整为 5 × 10⁵ ~ 1 × 10⁶ /mL,按 Annexin-V PI 双染凋亡试剂盒操作说明书进行测定。PI 用氩离子激发光,激发光波长为 488 nm,发射光波长大于 630 nm,产生红色荧光,待用 CELLQuest 软件采集样本后,用 ModFit LT 软件进行分析。

2.6 统计方法

所有实验数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用两样本均数比较的 *t* 检验。

3 结果

3.1 药物对细胞存活率的影响

给予 500 μmol/L 的 H₂O₂ 后,胰岛 RN_m 细胞的活力显著下降($P < 0.01$,与空白对照组相比)。10 ~ 100 μg/mL EGb761 对 H₂O₂ 引起的损伤有保护作用,与 H₂O₂ 组比较细胞活力增加明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),并呈剂量依赖性。结果见表 1。

表1 银杏叶提取物对 H_2O_2 作用下的胰岛 RIN-m 细胞活力 ($\bar{x} \pm s, n=6$) 的影响

| 组别 | 活力 / % |
|----------------------------------|-------------------------------|
| Control | 100.0 \pm 9.1 |
| H_2O_2 (500 μ mol/L) | 54.7 \pm 8.9 ¹⁾ |
| EGb761 (100 μ g/mL) | 101.7 \pm 6.6 |
| H_2O_2 + 100 μ mol/L Que | 97.0 \pm 7.9 ³⁾ |
| H_2O_2 + 10 μ g/mL EGb761 | 73.0 \pm 4.4 ²⁾ |
| H_2O_2 + 30 μ g/mL EGb761 | 81.7 \pm 14.1 ²⁾ |
| H_2O_2 + 100 μ g/mL EGb761 | 98.8 \pm 7.2 ³⁾ |

与 Control 组相比, 1) $P < 0.01$; 与 H_2O_2 组相比, 2) $P < 0.05$, 3) $P < 0.01$

3.2 药物对细胞内 ROS 含量的影响

与空白对照组相比, H_2O_2 损伤组胰岛 RIN-m 细胞内 ROS 含量显著增加 ($P < 0.05$)。EGb761 能明显降低细胞内 ROS 含量, 与 H_2O_2 损伤组相比, 中、高剂量组细胞内 ROS 显著减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。由于单独给予 100 μ g/mL EGb761 时, 细胞内 ROS 未见明显改变, 由此推测 EGb761 主要是清除胞内异常增多的自由基 (见表 2)。

3.3 药物对细胞 NO 含量的影响

如表 2 所示, H_2O_2 损伤组胰岛 RIN-m 细胞内 NO 明显减少, 与空白对照组比较, 有极显著性统计学意义 ($P < 0.01$)。EGb761 能明显增加细胞内 NO 含量, 与 H_2O_2 损伤组相比, 中、高剂量组细胞内 NO 含量明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。单独给予

100 μ g/mL EGb761 时 NO 含量呈升高趋势, 但无统计学意义。

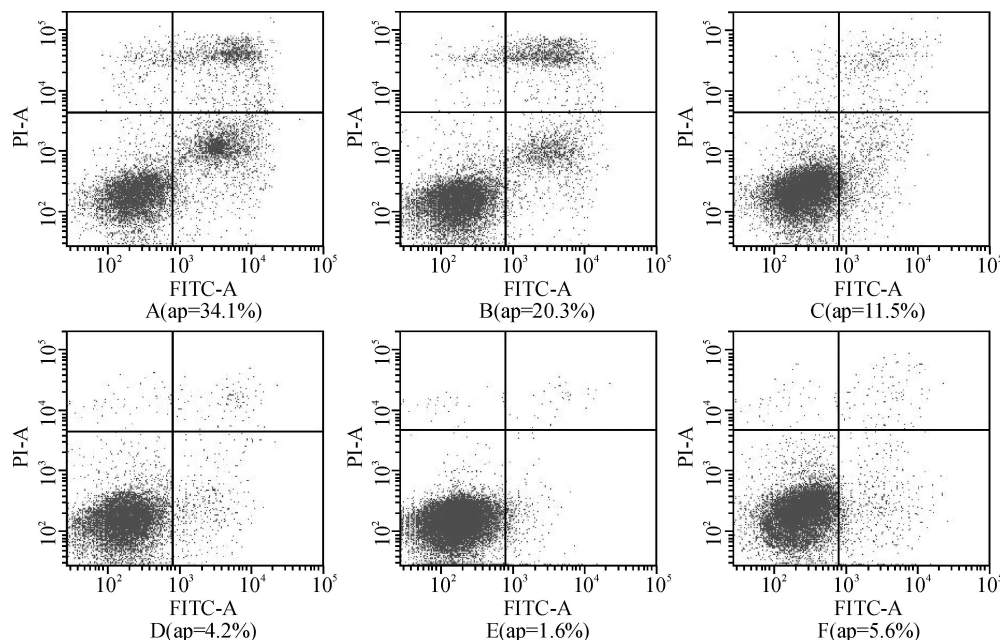
表2 银杏叶提取物对 H_2O_2 作用下的胰岛 RIN-m 细胞 ROS 和 NO ($\bar{x} \pm s, n=6$) 的影响

| 组别 | 荧光强度 / % | c(NO) / (μ mol \cdot L ⁻¹) |
|----------------------------------|----------------------------------|---|
| Control | 120.00 \pm 13.06 | 100.0 \pm 8.9 |
| EGb761 (100 μ g/mL) | 117.96 \pm 13.06 | 110.0 \pm 14.5 |
| H_2O_2 + 100 μ mol/L Que | 117.01 \pm 13.06 ¹⁾ | 119.7 \pm 14.8 ¹⁾ |
| H_2O_2 + 0 μ g/mL EGb761 | 125.37 \pm 13.06 ³⁾ | 84.6 \pm 7.1 ³⁾ |
| H_2O_2 + 10 μ g/mL EGb761 | 122.80 \pm 13.06 | 93.3 \pm 13.9 |
| H_2O_2 + 30 μ g/mL EGb761 | 120.39 \pm 13.06 ²⁾ | 100.3 \pm 11.3 ²⁾ |
| H_2O_2 + 100 μ g/mL EGb761 | 115.07 \pm 13.06 ¹⁾ | 118.4 \pm 8.7 ¹⁾ |

与 H_2O_2 组相比, 1) $P < 0.01$, 2) $P < 0.05$; 与 Control 组相比, 3) $P < 0.01$

3.4 流式细胞术分析

Annexin V - P 双染色法荧光散点图结果 (见图 1), H_2O_2 组在 6 h 时点的流式细胞术检测结果呈现 4 个细胞群, 即正常细胞 (双阴性)、凋亡细胞 (Annexin V 阳性, PI 阴性)、凋亡和坏死细胞 (Annexin V 阴性, PI 阳性) 和坏死细胞 (双阳性) (图 1 A)。 H_2O_2 组在 500 μ mol/L 的 H_2O_2 诱导下, 胰岛 RIN-m 细胞在 6 h 凋亡比率为 (33.2 \pm 4.5)%, 空白对照组为 (1.7 \pm 0.7)%, 差异显著 ($P < 0.01$); 100 μ g/mL EGb761 组 (4.5 \pm 0.7)% 或 Que 组 (5.5 \pm 1.4)% 与 H_2O_2 组比较, 凋亡率显著下降 ($P < 0.01$)。



(A) H_2O_2 组; (B) EGb761 (10 μ g/mL) 组; (C) EGb761 (30 μ g/mL) 组; (D) EGb761 (100 μ g/mL) 组; (E) Control 组; (F) 槲皮素 (Que) 组

图1 银杏叶提取物对 H_2O_2 诱导的胰岛 RIN-m 细胞凋亡的影响

4 讨论

EGb761在糖尿病方面已进行了不少实验及临床研究,证明对糖尿病肾病及糖尿病神经病变有明显的治疗作用^[6],我们的前期研究也证明 EGb761可以减轻 2型糖尿病大鼠的血管病变^[7]。近十几年来,国内外研究表明氧自由基代谢参与了糖尿病的发生和发展,糖尿病大鼠模型体内存在着明显的脂质过氧化现象^[8]。给予 EGb 治疗后,血清 MDA 明显降低、SOD 水平明显升高。其原因可能在于银杏黄酮能有效清除自由基,从而拮抗自由基所导致的多不饱和酸的破坏和保护膜蛋白免受这些降解产物的可逆性结合。Vasseur^[9]用电生理研究发现,EGb 对四氧嘧啶诱导的糖尿病小鼠模型的胰岛 细胞具有保护作用,提示 EGb 可能对糖尿病小鼠胰岛 细胞有一定的修复作用,使胰岛素分泌增多从而改善糖代谢。本实验采用 H₂O₂ 氧化损伤凋亡模型,结果证实 EGb761 具有明显的减少 ROS 产生及对抗 H₂O₂ 诱导的胰岛 R N m 凋亡的作用。

细胞凋亡是多种生理病理因素参与的由凋亡相关基因启动的细胞凋亡过程,许多炎症介质和细胞因子均影响凋亡过程。其中,氧应激造成大量活性氧 ROS 的产生及其造成的继发性细胞损伤在细胞凋亡过程中起着重要作用。虽然对 H₂O₂ 在细胞凋亡发生及其细胞内信号传递过程中的确切作用仍不十分清楚,但已证实 H₂O₂ 造成 PC12 细胞凋亡与细胞内 ROS 的增加有关^[10]。活性氧 ROS 的产生主要是线粒体由状态 向状态 转换中高氧的环境和高还原态的呼吸链使大量电子漏出并还原氧分子而形成。不论是在两类刺激信号(膜受体信号和非膜受体信号)和两条信号转导途径引起的凋亡中,还是在同种信号诱导的凋亡或坏死以及不同的凋亡敏感性中,ROS 都起着不容忽视的作用。因此,减少 ROS 的形成可能有助于抑制细胞凋亡。

作为一种独特的生物信使因子和效应因子,NO 在生物体内对组织细胞凋亡的作用具有双重性,既可以刺激超氧阴离子、H₂O₂ 和羟自由基诱发的脂质过氧化作用诱导细胞凋亡,又可以介导细胞膜的抗氧化反应抑制细胞凋亡,这两种作用的强弱取决于生物体内自由基相对浓度^[11]。本实验结果显示,H₂O₂ 损伤组较空白对照组 NO 浓度下降,EGb761 给药组 NO 浓度增加,并且 NO 随 EGb761 剂量的增加而增加,呈一定的剂量依赖性。本实验 NO 的总体增减幅度在 10 μmol/L 左右,是低浓度增加,故而

对细胞凋亡起到的是一种保护作用。孙保亮^[12]等研究表明,EGb 可以促进大鼠脑组织细胞 NO 的释放,细胞 NO 在给予 EGb761 后增多,可能是 EGb761 保护细胞发挥抗凋亡作用之一,NO 增多起到抗凋亡作用或者对细胞起到保护作用。

NO 抑制细胞凋亡的机制很多^[13-14]:首先,NO 可以通过激活 cGMP 级联反应阻止细胞凋亡。已经发现,结合于鸟苷酸环化酶辅基血红素的 NO 可增加 cGMP 的生成,激活 cGMP 依赖性激酶(PKC)或者交叉激活 cAMP 依赖性激酶(PKA)。实验证明,cGMP 能阻断肝细胞、神经元和脾细胞的凋亡。NO/cGMP 抑制凋亡的机制与 cGMP 依赖的蛋白激活及半胱天冬酶活性抑制应有关^[15]。其次,NO 可以上调线粒体内 Bcl-2 蛋白,过多的 Bcl-2 蛋白与凋亡蛋白酶活化因子-1(Apaf-1)结合,可中断凋亡进程。据测 Bcl-2 蛋白主要存在于所有造血细胞、淋巴细胞、许多上皮细胞和神经元的线粒体膜、细胞核膜和内质网上。Reed 等^[16-17]认为 Bcl-2 蛋白可能参与调节细胞内钙离子的分布,并可使细胞膜的通透性增大。也有实验表明 Bcl-2 蛋白具有抗氧化剂的作用。现在认为,Bcl-2 蛋白主要是通过阻断细胞凋亡的共同信号传导通路,达到抑制或阻断多种细胞及细胞系的细胞凋亡过程^[18],而 NO 和 cGMP 对 caspase-3 裂解 Bcl-2 蛋白具有抑制作用,因此能够在多层次、多阶段作用于凋亡过程,并达到抑制凋亡的目的;最后,其它 NO 介导的抗细胞凋亡机制可能有:NO 抑制 Fas 介导的细胞凋亡,半胱天冬蛋白酶因子内半胱氨酸被氧化和 S 亚硝基化而失活,诱导生成热休克蛋白 HSP32 和 GSP10,它们都能控制线粒体的功能和膜通透性从而阻止细胞色素 C 释放,发挥抑制凋亡的作用^[19]。

[参考文献]

- [1] SHEN Han-ming, LU Zheng-gang JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2006, 40(6): 928 - 939.
- [2] RAFFAELLA C, ENRICO B, PATRIZIA R, et al Oxidative stress signaling in the apoptosis of Jurkat T-lymphocytes[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2001, 82(3): 437 - 444.
- [3] KEHRER J P. Cause-effect of oxidative stress and apoptosis[J]. Teratology, 2000, 62(4): 235 - 236.
- [4] POURZAND C, TYRRELL R M. Apoptosis the role of oxidative stress and the example of solar UV radiation

- [J]. *Photochem Photobiol*, 1999, 70(4): 380 - 390.
- [5] MONCADA S, PALMER R M, HIGGS E A, et al Nitric oxide: physiology, and pharmacology [J]. *Pharmacol Rev*, 1991, 43(2): 109 - 142
- [6] 廖 璞, 王淑琴, 廖雪松, 等. 银杏叶提取物对糖尿病大鼠肾脏保护作用的实验研究 [J]. *中国药房*, 2000, 11(3): 114 - 115.
- [7] 叶春玲, 卢超霞, 庄 岚, 等. 银杏叶提取物对糖尿病大鼠血管功能的影响 [J]. *中药材*, 2005, 28(8): 690 - 693.
- [8] 段有金. 氧自由基与糖尿病 [J]. *日本医学介绍*, 1999, 20(7): 331 - 332
- [9] VASSEUR M, JEAN T, DEFEUD IS FV, et al Effects of repeated treatments with an extract of *Ginkgo biloba* (EGb761), bilobalide and ginkgolide B on the electrical activity of pancreatic beta cells of normal or alloxan-diabetic mice: an ex vivo study with intracellular microelectrodes [J]. *Gen Pharmacol*, 1994, 25(1): 31 - 46
- [10] TAKUMI S, NAOTO S, YASUSHIE, et al Free radical independent protection by nerve growth factor and Bcl-2 of PC12 cells from hydrogen peroxide triggered apoptosis [J]. *Biochem*, 1996, 120(2): 540 - 546
- [11] PETER K M K, RUBEN Zamora, et al The regulatory role of nitric oxide in apoptosis [J]. *Inter Immunopharmacology*, 2001(1): 1421 - 1441.
- [12] 孙保亮, 夏作理, 郑澄碧, 等. 大鼠脑血管痉挛时血及脑组织 NO、内皮素改变和银杏叶制剂的作用 [J]. *中华实验外科杂志*, 1999, 16(5): 499 - 154.
- [13] LI Chun-qi, GERALD N W. Nitric oxide as a modulator of apoptosis [J]. *Cancer Letters*, 2005, 226(1): 1 - 15.
- [14] BELTRÁN B, MATHUR A, DUCHEN M R, et al The effect of on cell respiration: A key to understanding its role in cell survival or death [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(26): 14602 - 14607.
- [15] KM YM, TALANIAN R V, B L L IAR T R. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(49): 31138 - 31148
- [16] REED F C. Bcl-2 family proteins [J]. *Oncogene*, 1998, 17(25): 3225 - 3236
- [17] PAULOWSKI F, KRAFT A S. Bax-induced apoptotic cell death [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(2): 529 - 531.
- [18] 潘耀谦, 于 艳, 高 丰. 细胞凋亡的常用调控基因研究近况 [J]. *动物医学进展*, 2001, 22(3): 1 - 4.
- [19] TZENG E, KM YM, PIIT B R, et al Adenoviral transfer of the inducible nitric oxide synthase gene blocks endothelial cell apoptosis [J]. *Surgery*, 1997, 122(2): 255 - 263.

[责任编辑:李 弘]