

银杏叶提取物对牛主动脉内皮细胞增殖及其机制

徐西振 王琳 赵刚 涂玲*

(华中科技大学同济医学院附属同济医院老年医学科, 武汉 430030)

摘要 研究银杏叶提取物(extract of ginkgo biloba, EGB)对牛主动脉内皮细胞(bovine aortic endothelial cells, BAECs)增殖的影响及其机制。分离培养 BAECs, 给予 EGB 刺激, 采用噻唑蓝比色法检测细胞增殖改变, 用流式细胞仪检测对细胞增殖周期的影响, 同时用 Western 印迹检测细胞内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)表达的变化。结果 EGB 刺激显著促进 BAECs 的增殖并呈剂量依赖效应, 而一氧化氮合酶抑制剂可显著抑制上述效应。EGB 刺激显著促进牛主动脉内皮细胞 eNOS 的表达, 并呈剂量依赖效应。EGB 显著促进 BAECs 增殖, 其作用由 EGB 上调的 NO 介导。

关键词 银杏叶提取物; 细胞增殖; 内皮细胞; 牛

内皮细胞损伤是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)发病的早期关键性环节, 减少内皮细胞损伤, 改善和提高血管内皮细胞功能、逆转内皮细胞功能障碍成为防治 AS 的一种新思路。银杏叶提取物含银杏黄酮苷、银杏内酯和白果内酯等多种活性物质。已有研究报道, 银杏叶提取物具有防治动脉粥样硬化的作用^[1,2], 但有关该药改善动脉粥样硬化患者内皮细胞功能的机制尚未完全阐明, 本研究拟通过在牛主动脉内皮细胞(bovine aortic endothelial cells, BAECs)给予银杏叶提取物(extract of ginkgo biloba, EGB)刺激, 探讨其对内皮细胞增殖的影响及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和传代

BAECs 按本实验室建立的方法进行培养和传代^[3,4], 实验采用第 2~5 代细胞。

1.2 EGB 对细胞增殖的影响及信号转导

EGB(银杏叶提取物来自于舒血宁注射液, 黑龙江省珍宝岛制药有限公司)刺激: 取对数生长期细胞, 用含 15% 胎牛血清(FBS, Hyclone)的 DMEM 培养基(Hyclone)调整细胞浓度为 2×10^7 个/L, 以每孔 0.2 ml 分别加入 96 孔的 Nunc 培养板内, 置 37 °C、5%CO₂ 培养箱内培养 12 h, 换 0.5%FBS 的 DMEM 培养基饥饿培养 12 h, 换用无血清的 DMEM 培养基, 分别加入不同浓度的 EGB, 每剂量组设 3 复孔, 24 h 后进行噻唑蓝(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, MTT)检测细胞增殖。为研究细

胞增殖的信号转导, 给予 EGB 前 2 h 加用一氧化氮合酶抑制剂 L-单甲基精氨酸(N^G-methyl-L-arginine, L-NMMA)(100 μmol/L)(Sigma), 培养相应时间后进行 MTT 检测。

1.3 细胞增殖 MTT 检测

经药物处理的细胞, 按培养基体积的 1/10 加入 MTT 储存液(浓度为 5 g/L, PBS 配制), 继续培养 4 h 后, 吸弃培养液, 加入二甲基亚砷(96 孔板加入 150 μl)置室温振荡器上振荡 15 min, 至细胞内的结晶溶解并混匀后在酶标读数仪上测定 570 nm 处 A 值。

1.4 EGB 对细胞周期的影响

BAECs 置 75 cm² 培养瓶生长至 80% 汇合后, 细胞计数后按 1:3 传代至 6 孔板培养 12 h, 换 0.5%FBS 的 DMEM 培养基饥饿培养 12 h, 换用无血清的 DMEM 培养基, 分别加入不同浓度的 EGB 温育 12 h, 进行流式细胞仪检测, 每组重复 3 次。

流式细胞仪检测: 细胞用胰蛋白酶消化, 1 000 g, 5 min, 4 °C 离心收集细胞沉淀, PBS 洗 1 次, 1 000 g, 5 min, 4 °C 离心, 取细胞沉淀加入 75% 乙醇固定 30 min, 1 000 g, 5 min, 4 °C 离心收集细胞, PBS 洗 1 次, 加入 10 μl 10 mg/L RNA 酶置 37 °C 消化 30 min, 离心收集细胞, 加入 0.5 ml 0.1 g/L 碘化吡啶, 调整细胞密度为 1×10^9 个/L, 4 °C 避光染色 30 min, 上样进行流式细胞仪(Becton-Dickinson)检测(激发光波长 488 nm)。

收稿日期: 2006-11-24 接受日期: 2007-03-15

* 通讯作者。Tel: 027-83662533, Fax: 027-83663039, E-mail:

profutu@tom.com

1.5 免疫印迹检测

EGB 刺激: BAECs 置 75 cm² 培养瓶生长至 80% 汇合后, 细胞计数后按 1:3 传代至 6 孔板培养至 80% 汇合后, 换 0.5% FBS 的 DMEM 培养基饥饿培养 12 h, 换用无血清的 DMEM 培养基, 使用溶媒(1×PBS, 用来配制不同浓度的 EGB), EGB 浓度分别为 7 μg/ml, 210 μg/ml, 350 μg/ml 刺激 BAECs 12 h 后, 提取蛋白质进行免疫印迹检测内皮型一氧化氮合酶(eNOS)表达水平。

免疫印迹: 细胞处理后吸出培养基, 用预冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后加入三祛污细胞裂解液(500 mmol/L Tris·HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.02% 叠氮钠, 0.1% SDS, 100 μg/ml PMSF, 1 μg/ml 抑肽酶, 1% NP40, 0.5% 去氧胆酸钠), 冰浴 20 min 后刮下细胞转至微量离心管, 12 000 g, 10 min, 4 °C 离心, 转移上清液至新离心管。Bradford 方法测定蛋白质浓度, 等量蛋白(10 μg)加入缓冲液, 煮沸 3 min 后上样, SDS 聚丙烯酰胺凝胶(分离胶 8%, 积层胶 4.5%)垂直电泳分离, 电转至 PVDF 膜上(4 °C 转膜过夜), 室温下含 5% 脱脂奶粉的 TBST(10 mmol/L Tris·HCl, 100 mmol/L NaCl + 0.1% Tween20)封闭 2.5 h, 加入一抗(兔抗 eNOS, 小鼠抗 β 肌动蛋白, Santa Cruz Biotechnology)(1:500 稀释) 4 °C 作用过夜, 第 2 天 TBST 于室温下洗膜 4 次, 每次 15 min, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗(相应的分别为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔, 羊抗小鼠抗体, Jackson ImmunoResearch Lab)(1:8 000 稀释), 室温下轻摇 2.5 h, TBST 室温下同法洗膜 4 次, ECL 试剂显色曝光。冲洗显示条带, 并通过计算机 Gene Tools 密度分析软件进行条带密度扫描分析。

2 结果

2.1 EGB 对内皮细胞增殖的影响

分别以不同浓度的 EGB、L-NMMA 作用于 BAECs 细胞 24 h 后进行 MTT 检测, 溶媒组与对照组相比, 差异没有统计学意义($P>0.05$)。与对照组和溶媒组(1×PBS)相比, 三种剂量的 EGB 均能显著促进内皮细胞的增殖并呈剂量依赖性, 而 L-NMMA (100 μmol/L) 可以显著抑制内皮细胞的增殖(图 1)($P<0.05$), 但是 L-NMMA 对对照组的细胞增殖无明显影响, 更高浓度的 L-NMMA 作用结果类似。

2.2 EGB 对 BAECs 细胞周期的影响

EGB 刺激 12 h 后, 收获细胞进行流式细胞仪检

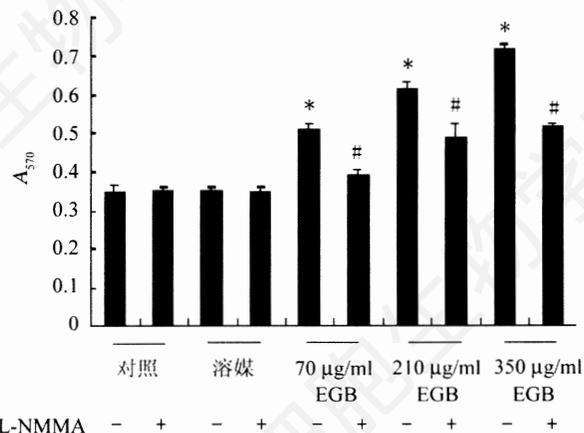


图 1 EGB 对 BAECs 增殖的影响(MTT 法)

$n=3$; 对照组 BAECs 为正常细胞, 未加任何干预; 溶媒为 1×PBS, 用来溶解 EGB; 100 μmol/L L-NMMA (- 为空白对照, + 为加药); 与对照组比较, * $P<0.05$; 与相应的空白对照组比较, # $P<0.05$ 。

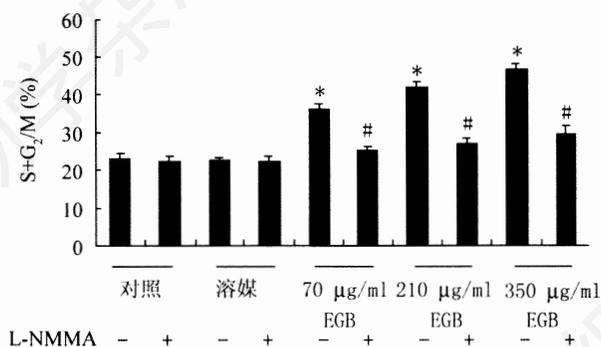


图 2 EGB 促进 BAECs 细胞增殖的流式细胞仪检测结果

$n=3$; 对照组 BAECs 为正常细胞, 未加任何干预; 溶媒为 1×PBS, 用来溶解 EGB; 100 μmol/L L-NMMA (- 为空白对照, + 为加药); 与对照组比较, * $P<0.05$; 与相应的空白对照组比较, # $P<0.05$ 。

测。结果显示, 70 μg/ml EGB、210 μg/ml EGB 和 350 μg/ml EGB 显著升高 S + G₂/M 期的细胞比例, 分别为(36.04±1.467311)%, (42.08±1.267675)% 和 (46.98±1.29499)%, 而对照组和溶媒组分别为(22.84±1.425833)% 和(22.18±1.460137)%($P<0.05$)(图 2), 而 L-NMMA (100 μmol/L) 可以显著抑制内皮细胞细胞周期的运行, 但是 L-NMMA 对对照组的细胞周期无明显影响, 说明 EGB 可促进细胞进入分裂期而促进牛主动脉内皮细胞增殖。图 3 为流式细胞仪检测分析图。

2.3 EGB 对 BAEC 细胞 eNOS 表达的影响

EGB 刺激 12 h 后, 收获细胞进行 Western 印迹检测。结果显示, 溶媒组与对照组相比, 差异没有统计学意义($P>0.05$)。与对照组和溶媒组(1×PBS)相比, 70 μg/ml EGB、210 μg/ml EGB 和 350 μg/ml EGB 显著促进 eNOS 的表达($P<0.05$)(图 4), 说明 EGB

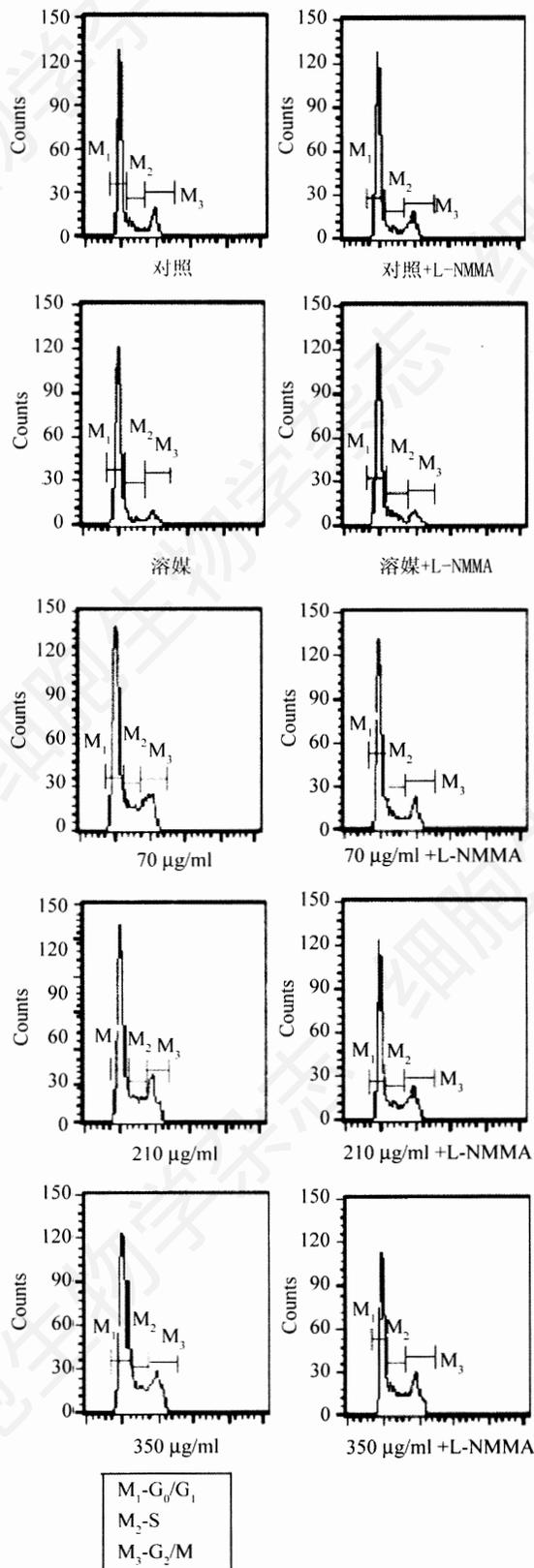


图3 流式细胞仪检测分析

X轴为碘化砒啶的荧光强度, Y轴为细胞相对数目; $n=3$; 对照组 BAECs 为正常细胞, 未加任何干预; 溶媒为 $1\times$ PBS, 用来溶解 EGB; $100\ \mu\text{mol/L}$ L-NMMA。

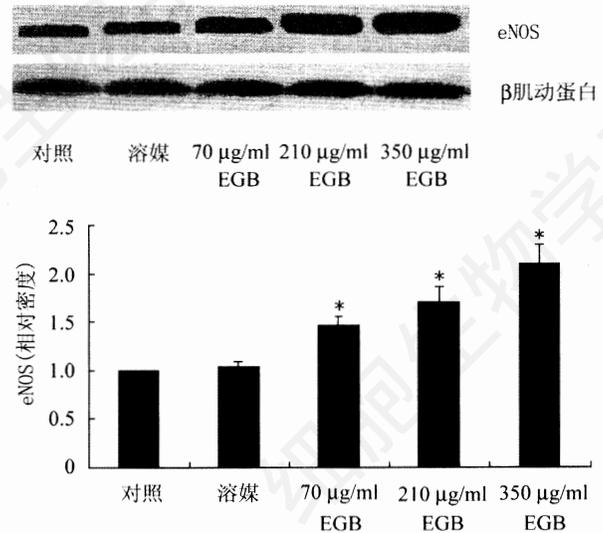


图4 EGB 促进 BAECs 细胞 eNOS 表达的 Western 印迹检测结果

$n=3$, 对照组 BAECs 为正常细胞, 未加任何干预; 溶媒为 $1\times$ PBS, 用来溶解 EGB; 上图为 Western 印迹杂交条带, 为 3 次结果中的一次, β 肌动蛋白作为内参照; 下图为密度扫描分析的统计结果, eNOS 相对密度用 eNOS 的密度灰度值与 β 肌动蛋白密度灰度值之比表示。与正常对照组和溶媒组相比较, $70\ \mu\text{g/ml}$ EGB、 $210\ \mu\text{g/ml}$ EGB 和 $350\ \mu\text{g/ml}$ EGB 显著促进 eNOS 的表达 ($P<0.05$)。

可促进细胞 eNOS 的表达。

3 讨论

动脉粥样硬化是以脂质在大、中型血管壁内沉积为主要病理特征的动脉病变。血管内皮细胞, 由于其特殊的解剖学位置, 在参与动脉粥样硬化的循环血细胞和血管细胞的相互作用中扮演了重要角色。正常的内皮细胞合成、释放和代谢大量的血管调节因子, 为机体提供内在的抗动脉粥样硬化环境。内皮细胞损伤后, 导致血管调节因子的失衡, 从而引起平滑肌细胞迁移和增殖、诱导生长因子表达和启动凝血和纤溶系统, 可促使动脉粥样硬化发生^[5]。因此, 目前动脉粥样硬化的治疗靶标, 聚焦于保护和恢复内皮细胞功能^[6]。

本研究结果显示溶媒组与正常对照组相比较, 牛主动脉内皮细胞的增殖无明显差异, 说明溶媒对内皮细胞的增殖无影响, 可以用来进行以下试验的研究。本研究结果提示银杏叶提取物显著促进 BAECs 的增殖, 并呈剂量依赖性, 这与王玉英^[7]等关于银杏叶提取物可以促进人脐静脉内皮细胞增殖的结果是一致的。有研究报道一氧化氮具有促进内皮细胞增殖的作用^[8], 因此在本研究中, 在 EGB 刺激内皮细胞的同

时, 加用L-NMMA, 结果表明L-NMMA显著抑制EGB刺激的内皮细胞的增殖。同时免疫印记结果显示, EGB显著上调eNOS的表达, 这与张金霞^[9]等关于EGB增强了培养的内皮细胞的eNOS表达的研究结果是一致的。提示EGB促进内皮细胞的增殖是由增加eNOS的表达, 上调的一氧化氮介导的。但是EGB对对照组和溶媒组的细胞的增殖无明显影响, 提示维持内皮细胞增殖的因素还有很多, 不止eNOS一种。

本研究结果显示EGB对BAECs具有促增殖作用, 并呈剂量依赖性。其机制除了与EGB上调eNOS的表达, 促进一氧化氮的生成有关外, 可能还与EGB的抗氧化活性和抗自由基活性^[10-12]密切相关。银杏叶提取物促进内皮细胞的增殖, 改善了内皮细胞的功能, 有利于动脉粥样硬化斑块的缩小, 为临床合理应用银

杏叶提取物制剂治疗冠心病提供了理论依据。

参考文献(References)

- [1] 陈临溪等. 实用心脑血管病杂志, 2000, 8: 131
- [2] 李欣等. 中华急诊医学杂志, 2004, 13: 609
- [3] Wang H et al. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 307: 753
- [4] 林立等. 中国药理学通报, 2003, 19: 1003
- [5] Ross R. *New Engl J Med*, 1999, 340: 115
- [6] Shimokawa H. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, 31: 23
- [7] 王玉英等. 第四军医大学学报, 2004, 25: 1179
- [8] Kawasaki K et al. *Mol Cell Biol*, 2003, 23: 5726
- [9] 张金霞等. 心脏杂志, 2001, 13: 214
- [10] 陈瑗等. 自由基医学基础与病理生理, 北京: 人民卫生出版社, 2002, 294
- [11] Jaffe EA et al. *J Clin Invest*, 1973, 52: 2745
- [12] Clostre F. *Ann Pharm Fr*, 1999, 57 Suppl 1: 1S8

Extract of Ginkgo Biloba Promotes Bovine Aortic Endothelial Cells Growth

Xi-Zhen Xu, Lin Wang, Gang Zhao, Ling Tu*

(The Department of Geriatric Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College,
Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract To investigate the proliferating effects of extract of ginkgo biloba (EGB) on bovine aortic endothelial cells (BAECs) and relevant mechanism, BAECs were incubated with EGB, and the effects of EGB on BAECs proliferation were investigated by MTT assay, and cell cycle analysis by flow cytometry. Potential involvement of signaling pathways of the effects was explored by using related inhibitors of the signal molecules. And the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) was investigated by Western blot. And the results are that EGB markedly promoted BAECs proliferation. Our results also revealed that the effects were significantly attenuated by inhibitors of eNOS, and EGB markedly stimulated the expression of eNOS. EGB markedly promote endothelial cell proliferation, and the effects are mediated by eNOS.

Key words extract of ginkgo biloba; cell proliferation; endothelial cell; cattle

Received: November 24, 2006 Accepted: March 15, 2007

*Corresponding author. Tel: 86-27-83662533, Fax: 86-27-83663039, E-mail: profutu@tom.com