

银杏叶提取物对 H_2O_2 诱导的胰岛 RN α m 细胞凋亡的影响

叶春玲, 金永亮, 叶开和, 覃亮

(暨南大学药学院药理学教研室, 广东广州 510632)

目的:探讨银杏叶提取物(Ginkgo bilba extract, EGb761)对过氧化氢(Hydrogen peroxide, H_2O_2)诱导的胰岛 RN α m 细胞株凋亡的影响。**方法:**以 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用于胰岛 RN α m 细胞 6 h 建立凋亡模型; 分别设空白对照组(Control)、阴性对照组(H_2O_2)、阳性对照组(槲皮素 Que 100 $\mu\text{mol/L}$)、EGb 761 单用对照组(EGb 761 100 $\mu\text{mol/L}$)、EGb 761 给药组(EGb 761 10、30、100 $\mu\text{g/ml}$); 采用 MTT 检测细胞存活率, Hoechst 33258 染色荧光显微镜观察细胞形态变化, PI 单染色法和 Annexin V-P 双染色法流式细胞术分析细胞凋亡情况。**结果:**与空白对照组比较, 阴性对照组 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 6 h 后, 细胞存活率明显降低, 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$)。与阳性对照组相比, EGb 761 显著降低 H_2O_2 诱导的细胞凋亡 ($P < 0.01$), 且呈剂量依赖性。**结论:**过氧化氢可诱导胰岛 RN α m 细胞凋亡, EGb 761 对 H_2O_2 诱导的 RN α m 细胞损伤和凋亡具有明显的保护作用。

银杏叶提取物; RN α m 细胞株; 过氧化氢; 细胞凋亡

: R285.5

: A

: 1001-4454(2007)04-0424-05

Effects of EGb 761 on the Cell Apoptosis Induced by H_2O_2 in RN α m Beta Cells

YE Chun-ling, JN Yong-liang, YE Kai-he, QN Liang

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

Abstract Objective: To investigate the effects of Ginkgo bilba extract (EGb 761) on apoptosis induced by hydrogen peroxide (H_2O_2) in RN α m beta-cells. Methods: The apoptotic model was made by H_2O_2 exposed for six hours with a concentration of 500 $\mu\text{mol/L}$. The cytotoxicity was measured by MTT. Hoechst 33258 fluorescent staining were used to detect the protective effect of EGb 761 on the apoptosis of RN α m beta-cells induced by H_2O_2 . Annexin V-PI double staining of Flow cytometry were used to detect apoptosis quantitatively. Results: Compare to control group, after exposed to 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 6 hours, the apoptosis rate increased and cell survival rate were decreased considerably ($P < 0.01$). Pretreated for 10 hours with EGb 761, the flow cytometry results showed that the apoptosis rate decreased and cell survival rate were increased considerably ($P < 0.01$, compared to H_2O_2 control group). Conclusion: EGb 761 can decrease RN α m beta-cells damage and apoptosis induced by H_2O_2 .

Key words EGb 761; RN α m beta-cells; H_2O_2 ; Apoptosis

近年有关银杏叶提取物的研究及临床应用已有较大进展,除治疗心脑血管疾病外,银杏叶提取物还具有神经系统的保护作用和抗神经细胞凋亡作用以及糖尿病肾病的治疗作用^[1,2]。由于胰岛细胞氧化损伤已被证明是糖尿病发病的重要机制之一,氧化损伤可诱导胰岛细胞发生大量凋亡,因此抗氧化损伤及抗凋亡对防治糖尿病具有重要意义。但迄今为止,银杏叶提取物对胰岛细胞氧化损伤是否具有保护作用以及是否具有抗胰岛细胞凋亡作用,还未见报道。为此,本研究采用 H_2O_2 诱导培养的胰岛 RN α m 细胞凋亡模型,考察银杏叶提取物对胰岛细胞氧化损伤的保护作用及抗凋亡作用,为 EGb 761 的临床应用提供实验依据。

1

1.1 药品与试剂 银杏叶提取物(Extract Ginkgo bilba, EGb 761)(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 Gibco 公司;胎牛血清,杭州四季青公司生产;细胞凋亡-Hoechst 染色试剂盒,购自碧云天试剂公司;胰蛋白酶(Trypsin),溴化-(4,5-二甲基,2-噻唑基)-2,5-二苯基四氮唑(MTT),碘化丙啶(propidium iodide, PI)购自 Sigma 公司,Annexin-V PI 双染凋亡试剂盒(批号:20051115)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 α m 细胞株购自中山医科大学细胞库。培养基为含 10% 胎牛血清及青霉素(100 U/ml)、链霉素(100 $\mu\text{g/ml}$)的 5.5 mmol/L 葡萄糖 DMEM 培养基,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。

: 广东省医学科研基金课题

*通讯作者:叶春玲,博士,教授。Tel: 020-85223843, E-mail: yechunling2005@163.com。

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

2.1 H_2O_2 致胰岛 RIN-m 细胞凋亡模型的制备和药物处理 细胞以每孔 10^5 个 /ml 的密度接种于 96 孔培养板中, 37 °C, 5% CO_2 , 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 (H_2O_2)、阳性对照组 (槲皮素 Que 100 $\mu\text{mol/L}$)、EGb 761 单用对照组 (EGb 761 100 $\mu\text{mol/L}$)、EGb 761 给药组 (EGb 761 10、30、100 $\mu\text{mol/L}$)、每组至少 6 孔。药物于 37 °C 预孵 10 h 后, 再加入终浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 继续培养 6 h, 然后进行 MTT 法检测细胞活力等实验。至少重复 3 次实验。

2.2 MTT 法检测细胞活力^[3,4] 将接种过细胞的 96 孔培养板中培养液吸去, 用 PBS 洗涤一次, 加入每孔 0.2 ml PBS 和 20 μl 的 MTT (5 mg/ml), 使其终浓度不低于 0.5 mg/ml。37 °C 培养 4 h 后, 加入每孔 150 μl 的 DMSO 溶解液 37 °C 培养过夜, 用酶联免疫检测仪测定 570 nm/630 nm 处的光密度值 (optical density, OD)。与试验平行孔设只含有溶解液的孔作空白对照, 最后比色时, 以正常空白孔调零。可间接定量反映活细胞数量。以空白对照组为 100%, 计算细胞存活率。

细胞存活率 = 试验组光密度值 / 对照组光密度值 \times 100%。

2.3 荧光染色法观察 按 Hoechst 33258 染色试剂盒说明操作, 细胞以 50 ~ 80% 密度接种于事先放入爬片的 6 孔培养板中, 制作细胞爬片, 经过药物或相应处理后, 600 g/min 离心 5 min 去上清; 用 4% 多聚甲醛 0.5 ml 重悬细胞, 室温下固定 10 min 或更长时间 (可 4 过夜); 去固定液, PBS 洗 2 次, 每次 3 min, 吸尽液体, 洗涤时宜用摇床, 或手动晃动数次; 600 g/min 离心 5 min 去 PBS; 加入 0.5 ml Hoechst 33258 染色 5 min, 也宜用摇床或手动晃动数次; 后用 PBS 洗 2 次, 每次 3 min, 滴一滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上, 盖上贴有细胞的盖玻片, 尽量避免气泡。使细胞接触封片液, 切勿弄反; 荧光显微镜可检测到呈蓝色的细胞核。激发波长在 350 nm 左右, 发射波长在 460 nm 左右。

2.4 流式细胞术 (FCM) 检测细胞凋亡

2.4.1 单染法 RIN-m 细胞凋亡检测: 收集细胞 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个 /ml, 经 0.25% 胰酶 -0.02% EDTA

消化分离成单个细胞之后, 3 ml PBS 洗一次, 加入冰预冷的 70% 乙醇固定, 4 ~ 24 h 后离心去固定液, 3 ml PBS 重悬细胞 5 min, 加入 1% Triton X-100 摇匀后静置 10 min, 离心去上清液, 加入 0.01% RNA 酶消化 10 min, 离心去上清液, 加入 0.005% PI, 4 °C 避光染色 30 min, 400 目不锈钢筛网过滤一次, 流式细胞仪上测试。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 Cell Quest 软件采集样本后, 用 ModFit LT 软件进行分析。

2.4.2 双染法 RIN-m 细胞凋亡检测: 用 0.25% 胰酶 -0.02% EDTA 消化分离细胞, 制成单细胞悬液, 将待测细胞的浓度调整为 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个 /ml, 按 Annexin-VPI 双染凋亡试剂盒操作说明书进行测试, 流式细胞仪检测和仪器分析步骤同 PI 单染法。

2.5 统计方法 所有实验数据用均数 \pm 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。采用 SPSS10.00 统计。

3

3.1 药物对细胞存活率的影响 H_2O_2 组给予 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 后与空白对照组相比, 胰岛 RIN-m 细胞的活力显著下降 ($P < 0.01$)。10 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ EGb 761 对 H_2O_2 引起的损伤有保护作用, 与 H_2O_2 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。

Tab 1 Effect of EGb 761 on RIN-m beta-Cells in the Presence of 500 M H_2O_2 ($\bar{x} \pm s$, n = 6)

Groups		Viability (%)
Control		100 \pm 9.1
H_2O_2	500 $\mu\text{mol/L}$	54.7 \pm 8.9 ^{##}
EGb 761	100 $\mu\text{g/ml}$	101.7 \pm 6.6 ^{**}
Que + H_2O_2	100 $\mu\text{mol/L}$	97.0 \pm 7.9 ^{**}
EGb 761 + H_2O_2	10 $\mu\text{g/ml}$	73.0 \pm 4.4 [*]
	30 $\mu\text{g/ml}$	81.7 \pm 14.1 [*]
	100 $\mu\text{g/ml}$	98.8 \pm 7.2 ^{**}

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs H_2O_2 ; ## $P < 0.01$ vs Control

3.2 细胞形态学检测 荧光显微镜下观察, 活细胞核呈弥散均匀的蓝色荧光, 凋亡细胞的细胞核或细胞质内可见浓染致密的颗粒块状荧光, 蓝色荧光比正常细胞要强, 并可见到凋亡细胞中分散着较多的 DNA 荧光碎片。EGb 761 各给药组中正常细胞的比例高于损伤组细胞, 对凋亡细胞的形态变化有所改善, 尤其是 EGb 761 100 $\mu\text{g/ml}$ 组基本上逆转了细胞凋亡形态学改变, 说明 H_2O_2 能诱导细胞凋亡而 EGb 761 能抑制 H_2O_2 诱导的细胞凋亡。结果见图 1。

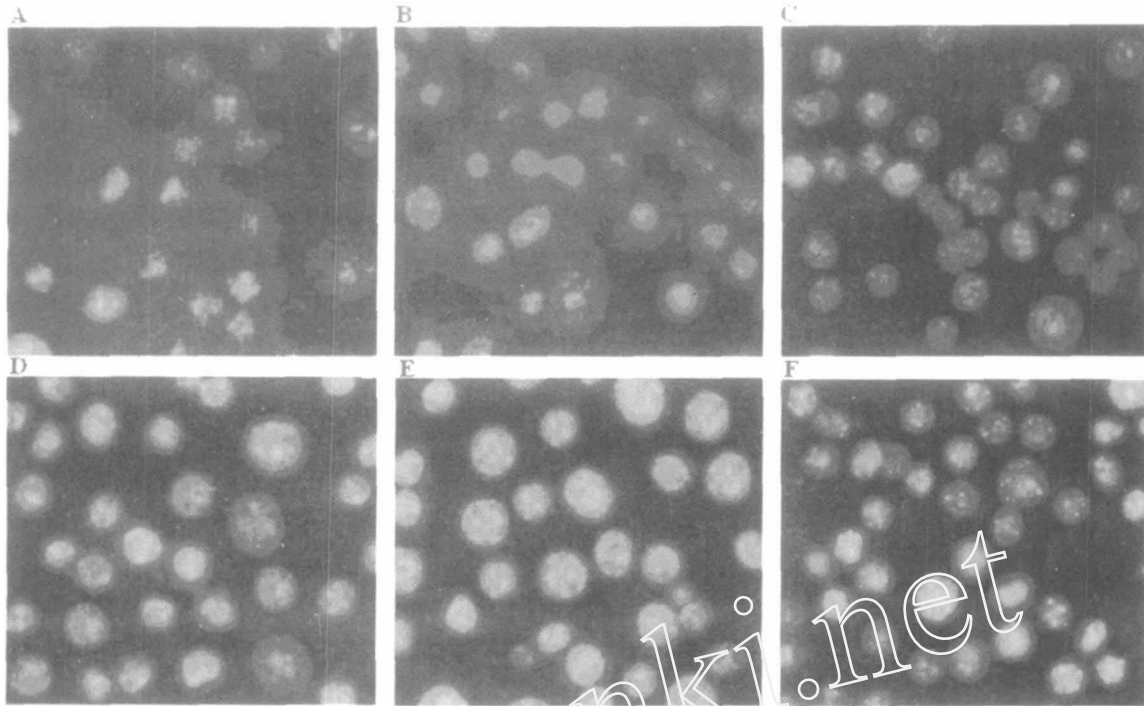


Fig. 1. Protection of EGb 761 Against Apoptosis Induced by H₂O₂ in RN-m -cells(×400)

A. H₂O₂; B. H₂O₂ + 10 μg/ml EGb761; C. H₂O₂ + 30 μg/ml EGb761; D. H₂O₂ + 100 μg/ml EGb761; E. Control; F. H₂O₂ + Que

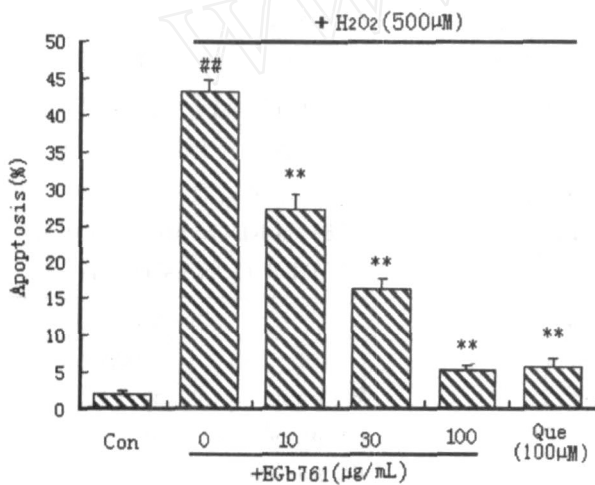


Fig. 2 Protection of EGb 761 Against H₂O₂-Induced Apoptosis in RN-m -cells(P1)

** P < 0.01 vs H₂O₂ without EGb 761, ## P < 0.01 vs Control

3.3 对 RN-m 细胞凋亡的影响

3.3.1 PI单染法细胞凋亡分析:分析 PI荧光直方图结果见图 2图 3。H₂O₂ 组经过 H₂O₂ 处理后,胰岛 RN-m 细胞在 G₀/G₁ 期前出现一明显的亚二倍体峰 (sub-G₁),说明 500 μmol/L H₂O₂ 作用 6 h 可以诱导胰岛 RN-m 细胞凋亡 (凋亡率 43.2 ± 1.6%); EGb 761 预孵处理后,对细胞凋亡有显著改善,并且有明显的浓度依赖性。EGb 761 高剂量组 (凋亡率 5.2 ± 0.9%) 或阳性对照药 Que (凋亡率 5.9 ± 1.0%) 能明显降低细胞凋亡,与阴性对照组

相比,有极显著统计学意义 (P < 0.01)。从图 3 可以看出,代表凋亡的亚二倍体峰随 EGb 761 药物浓度的增加,逐渐减小,与空白对照组靠近。

3.3.2 Annexin V-P 双染法分析细胞凋亡: Annexin V-P 双染色法荧光散点图结果见图 4 图 5。细胞膜磷脂酰丝氨酸 (PS) 去极性外翻是指示细胞凋亡的一个重要标志,Annexin V 可以特异性结合 PS; 活细胞拒染 PI 染料,而坏死细胞允许其进入细胞核并且与 DNA 结合显色。因此,本实验 Annexin V-FITC/PI 双染后,H₂O₂ 组在 6 h 时点的流式细胞术检测结果呈现 4 个细胞群,即机械性损伤细胞 (Annexin V⁻-PI⁺)、正常活细胞 (Annexin V⁻-PI⁻)、早期凋亡细胞 (Annexin V⁺-PI⁻) 和晚期凋亡细胞或继发性坏死细胞 (Annexin V⁺-PI⁺)。H₂O₂ 组在 500 μmol/L 的 H₂O₂ 诱导下,胰岛 RN-m 细胞在 6 h 凋亡比率为 (33.2 ± 4.5)%,空白对照组为 (1.7 ± 0.7)%,差异显著 (P < 0.01); 100 μg/ml EGb 761 组 (4.5 ± 0.7)% 或 Que 组 (5.5 ± 1.4)% 与 H₂O₂ 组比较,凋亡率显著下降 (P < 0.01)。

4

糖尿病是一种复杂的代谢紊乱性疾病,多种原因可导致 细胞凋亡,从而引起胰岛素合成与释放减少。凋亡是胰岛细胞损伤死亡的主要形式^[5],研究胰岛 细胞凋亡及其机制对糖尿病防治具有重要意义。

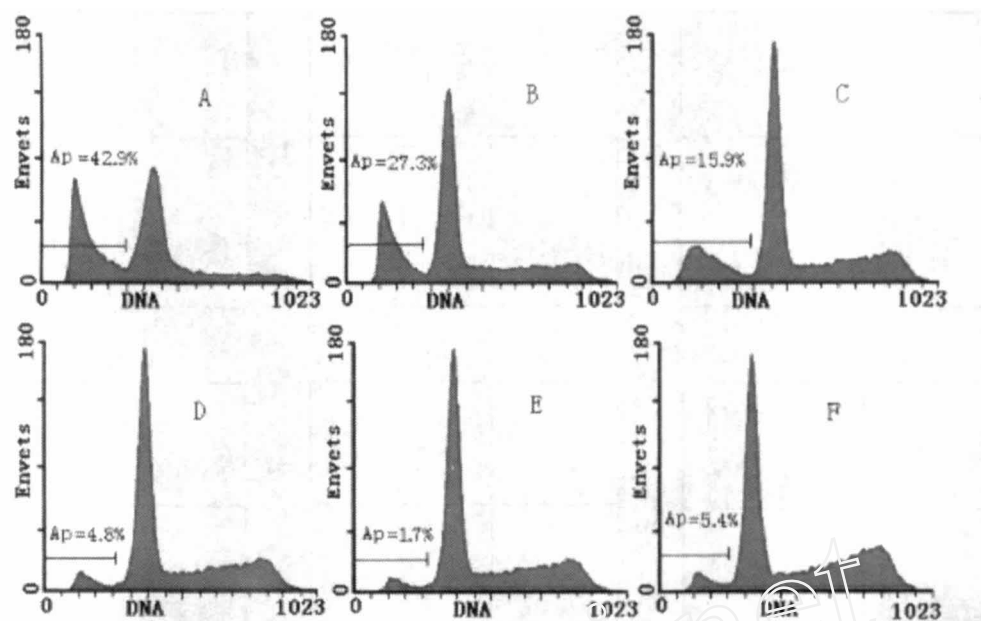


Fig. 3. Apoptosis in RIN-m cells Assessed by FCM

A. H₂O₂; B. H₂O₂ + 10 μg/ml EGb761; C. H₂O₂ + 30 μg/ml EGb761; D. H₂O₂ + 100 μg/ml EGb761; E. Control; F. H₂O₂ + Que

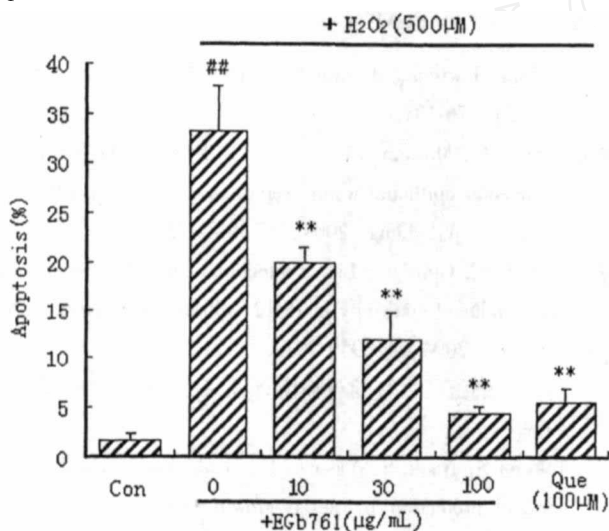


Fig. 4 Protection of EGb 761 Against H₂O₂-Induced Apoptosis in RIN-m cells (Annexin V-PI)

** P < 0.01 vs H₂O₂ without EGB 761, ## P < 0.01 vs Control

正常生存状态下,细胞膜磷脂在胞膜内外表面之间呈不对称分布,磷脂酰胆碱和神经鞘磷脂暴露于脂质双分子层的外表面,而磷脂酰丝氨酸定位于内表面。众多研究发现,凋亡早期的特点是细胞膜对称性消失,质膜内侧的磷脂酰丝氨酸重新分布,由细胞膜内侧翻转到膜外侧,使凋亡细胞能被巨噬细胞特异性地识别与清除。细胞膜的这种改变可以通过一种与带负电荷的磷脂高度亲和的蛋白连接素 Annexin V 来检测,Annexin V 具有钙依赖性,和磷脂有高度的亲和力,尤其与带负电荷的磷脂酰丝氨酸具极强的结合力。用标记的 Annexin V 对细胞进行

染色,可使早期凋亡细胞膜外表面暴露的磷脂酰丝氨酸与 Annexin V-PI 特异性结合,但细胞仍维持其细胞膜的完整性,使变性染色质着色的荧光染料 PI 不能进入细胞,然而坏死或凋亡晚期的继发性坏死细胞可同时受 Annexin V 与 PI 标记,借助 FCM 可定量分析受标记的凋亡坏死细胞数。本研究采用 Annexin V-PI 对细胞进行双标,较细胞亚群单参数直方图更为敏感及精确,但二者各有优点,结合使用对数据的重复性及稳定性有很大帮助,能更准确的反应胰岛 RIN-m 细胞凋亡的比例。

本实验采用常用的 H₂O₂ 氧化损伤凋亡模型^[6,7],PI 单染法和 Annexin V-PI 双染法流式细胞术分析细胞凋亡情况,结果表明 EGb 761 具有明显的对抗 H₂O₂ 诱导的胰岛 RIN-m 凋亡作用,且随着剂量的增加作用增强,说明 EGb 761 对 H₂O₂ 氧化损伤致凋亡具有保护作用。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^[8]。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^[9]。由于抗氧化作用是 EGb 的主要药理作用之一^[10,11],EGb 中黄酮类化合物等有效成分能清除自由基,包括超氧阴离子、羟自由基、NO、脂质过氧化自由基等,因此,本实验 EGb 的抗凋亡作用可能与

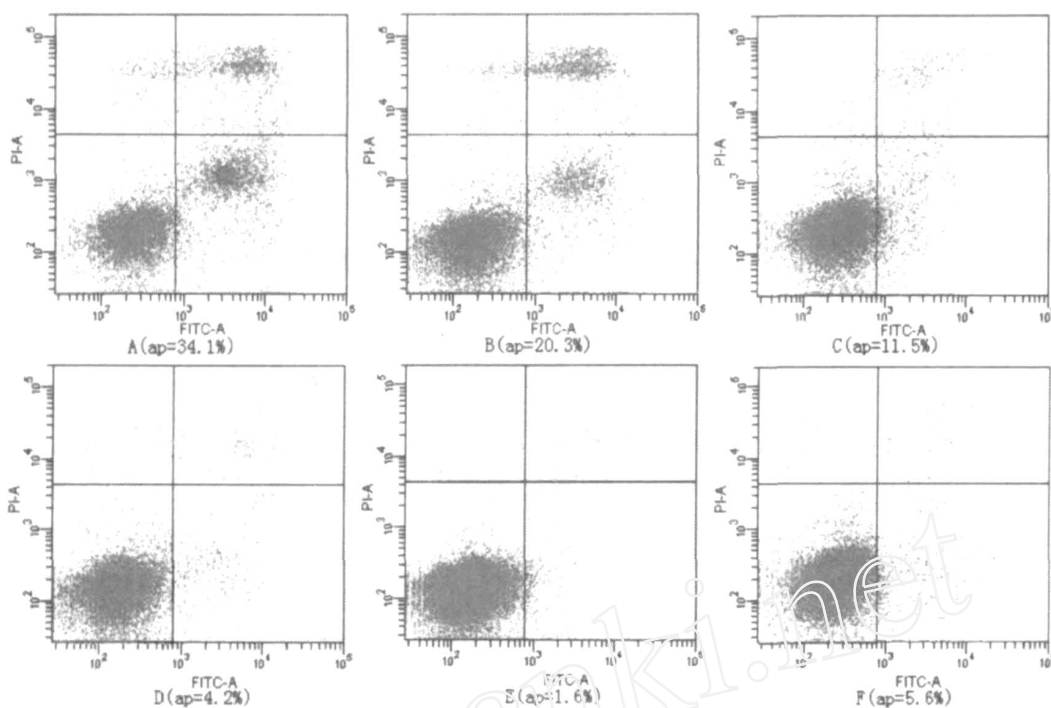


Fig 5. Apoptosis in RIN-m cells assessed by FCM

其抗氧化作用有关,详细机制还有待进一步研究。

[1] Vasseur M, Jean T, DeFeudis FV, et al. Effects of repeated treatments with an extract of Ginkgo biloba (EGb 761), bilbalide and ginkgolide B on the electrical activity of pancreatic beta cells of normal or alloxan-diabetic mice: an ex vivo study with intracellular microelectrodes. *Gen Pharmacol*, 1994, 25 (1): 31-46.

[2] 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. *中国药房*, 2000, 11 (3): 114-115.

[3] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养. 北京:世界图书出版公司, 1996.

[4] 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 Immunol Meth*, 1989, 119: 203-210.

[5] OBiren BA, Hamon BV, Cameron DP, et al. Beta-cell apoptosis is responsible for the development of DDM in the

multiple low-dose streptozotocin model. *J Pathol*, 1996, 178 (2): 176-181.

[6] Thomas G, Masanobu I, Coretta van L, et al. H₂O₂ inhibits alveolar epithelial wound repair in vitro by induction of apoptosis. *AJP-Lung*, 2004, 287: 448-453.

[7] Hao Hong, Guo-Qing Liu. Protection against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells by scutellarin. *Life Sciences*, 2004, 74: 2959-2973.

[8] 姜泊. 细胞凋亡基础与临床. 北京:人民军医出版社, 1999.

[9] Takumi S, Naoto S, Yasushi E, 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: 540-546.

[10] 李年生,钟志莲,胡长平. 银杏叶提取物对内外源性自由基所致兔离体心脏损伤的保护作用. *湖南中医学院学报*, 2003, 23 (5): 20-22.

[11] 银杏叶、山楂叶对氧自由基的清除作用. *中国中药杂志*, 1996, 21 (4): 245-246.

(2006 - 10 - 23收稿)

