

银杏叶提取物对胶质瘤细胞 NF- κ B 表达和 NO 生成的调控

张 申¹, 李晓阳¹, 卫涛涛²

Regulatory Effect of Ginkgo Biboba Extract on the Expression of NF- κ B and Nitroxide Production in Glioma Cells

ZHANG Shen¹, LI Xiao-yang¹, WEI Tao-tao²

1. Department of Laboratory Medicine, Huaihua Medical College, Huaihua 418000, China; 2. Molecular Biology Center, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China

Abstract: **Objective** To study the effects of Ginkgo biloba extract (EGb761) on the expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B), contents of nitric oxide (NO) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in C6 glioma cells. **Methods** Upon stimulation with lipopolysaccharide (LPS) and phorbol-1, 2-myristate-1, 3-acetate (PMA), iNOS gene was expressed in cultured C6 glioma cells, which caused the consequent generation of high concentration of nitric oxide. The effects of EGb761 on the intracellular NO concentration and the expression of iNOS gene in stimulated C6 glioma cells was studied by fluorescence probe and laser scanning confocal system, Western blot analysis and reverse transcription polymerase chain reaction techniques. **Results** The results showed that EGb761 decreased the expression of iNOS at either the protein or mRNA level. Further investigation showed that EGb761 significantly inhibited the degradation of I κ B, and blocked the translocation of p65/RelA into the nuclei. **Conclusion** The results suggest that EGb761 inhibits the expression of iNOS by modulating the NF- κ B pathway.

Key words: EGb761; Glioma cell; iNOS; Nitric oxide; NF- κ B

摘 要: **目的** 研究银杏叶提取物 (EGb761) 对 C6 胶质瘤细胞核转录因子- κ B (NF- κ B) 表达和可诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、一氧化氮 (NO) 生成的影响。 **方法** 以脂多糖 (LPS) 和佛波酯 (PMA) 诱导体外培养的 C6 胶质瘤细胞表达可诱导型一氧化氮合酶、产生大量 NO, 应用激光共聚焦成像系统和 NO 荧光探针监测细胞内 NO 浓度变化, 逆转录基因扩增技术和蛋白质印迹技术检测 EGb761 对 C6 胶质瘤细胞中 iNOS 基因表达的影响, 并探讨这一调控作用的分子机制。 **结果** EGb761 能明显降低 C6 胶质瘤细胞中 iNOS mRNA 和蛋白的表达、减少 NO 的生成, 抑制 I κ B 的降解和阻止 p65/RelA 进入细胞核。 **结论** EGb761 可通过 NF- κ B 信号通路对 C6 胶质瘤细胞 iNOS 基因表达和 NO 的生成进行调控。

关键词: 银杏叶提取物; 胶质瘤细胞; 可诱导型一氧化氮合酶; 一氧化氮; 核转录因子- κ B

中图分类号: R73-35 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578 (2006) 06-0397-04

0 引言

银杏为最古老的中生代子遗稀有植物之一, 属裸子植物门银杏纲银杏科植物, 现仅存一科一属一种, 有裸子植物“活化石”之称。银杏树的根、叶、皮及种子均可药用。银杏叶入药始于明代, 传统医学用银杏叶治疗哮喘、支气管炎和老年性心血管疾病, 但叶中含有氢氰酸, 可加速心率, 副作用大。20 世纪 60 年代后, 德、法等欧洲国家先后开展了对银杏叶的研究。1965 年, 德国威玛舒培博士 (Dr. Will-

mar Schwabe) 药厂正式上市全球第一个银杏叶标准提取物 EGb761 (ginkgo biloba extract), 其质量指标为黄酮苷 24%, 萜内酯 6%, 银杏酸 10ppm, 此标准为许多国家所公用。但国际上并没有制定正式统一的标准, 也没有统一的含量测定方法, 各厂商都有自己的质控指标, 且不同的地区、不同的季节、不同的加工方法和不同的制剂工艺对银杏叶中药效成分影响很大。

资料表明银杏叶含有多种药用活性成分, 其有效成分主要是银杏内酯和黄酮类 (以槲皮素、山奈素、水杨梅素为主)^[1]。近年来, 生物类黄酮抗氧化活性倍受人们的重视, 生物类黄酮是最强的抗氧化剂之一。且分子较小, 水溶性强, 易被机体吸收, 无蓄积作用, 能清除自由基, 提高超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性, 抗细胞凋亡^[2-4], 调节器官组织功能,

收稿日期: 2005-08-29; 修回日期: 2005-11-15

基金项目: 湖南省教育厅高校科研资助项目 (04C050)

作者单位: 1. 418000 湖南怀化医专医学检验系; 2. 中国科学院生物物理研究所分子生物学研究中心

作者简介: 张申 (1955-), 男, 硕士, 副教授, 主要从事癌性肿瘤的基础与临床研究

有效延缓衰老^[5]。已有研究发现 EGb761 能抑制巨噬细胞以及内皮细胞中 iNOS 基因表达^[6]。本研究拟以 LPS 和 PMA 诱导体外培养的 C6 细胞为实验模型,采用激光共聚焦、RT-PCR、Western blot 分析等技术研究 EGb761 对 C6 胶质瘤细胞 NF- κ B 表达和 NO 生成的调控。

1 材料和方法

1.1 材料 实验试剂主要有:C6 胶质瘤细胞系(中科院上海细胞生物学研究所);DMEM 培养基、胎牛血清(Hyclone 公司);UNIQ-10 柱式总 RNA 提取纯化试剂盒(上海生工公司);Access QuickTM RT-PCR 试剂盒(Promega 公司)等;EGb761(法国 Beaufour Ipsen 制药公司 Marie-Thereses Droy-Le-faix 博士惠赠)。

实验仪器有:CO₂ 培养箱(Napco, USA);紫外分光光度计(Beckman, USA);电泳仪(EPS 301, USA);PCR 仪(Eppendorf, Germany);凝胶成像系统(UVP, USA);激光共聚焦扫描荧光显微镜(Olympus Japan)等。

1.2 细胞培养 将复苏的 C6 胶质瘤细胞混悬于 DMEM 培养基中(含 10% 灭活胎牛血清,100U/ml 青霉素,100 μ g/ml 链霉素),置 37 $^{\circ}$ C、含 5% CO₂ 的细胞培养箱内培养,待细胞长成单层后(约 3d)按 1:4 传代。

1.3 细胞内 NO 水平检测 将处于对数生长期的 C6 细胞用 0.1% 的胰酶消化,用含 10% 胎牛血清的培养基重悬细胞,配成 1 \times 10⁵ 的细胞悬液,接种于 4cm 培养皿中,每皿 2ml,贴壁 2h 后换成无血清培养基,分为 3 组,即对照组、诱导组(LPS 1 μ g/ml 和 PMA 400ng/ml)和药物组(在加入 LPS 和 PMA 前 2h 加 EGb761 50 μ g/ml),12h 后换成带 DAF-2-DA 探针(2.5 μ mol/L)的培养基,培养 1h,用培养基洗涤细胞 3 次,置显微镜下观察,激发波长 488nm。

1.4 亚硝酸盐测定 细胞接种于 24 孔培养板,1 \times 10⁵/孔,分为对照组、诱导组和药物组 3 组,对照组不加诱导剂和药物,诱导组加入诱导剂 LPS(终浓度 1 μ g/ml)和 PMA(终浓度 400ng/ml),药物组在加入诱导剂前 2h 先加入 EGb761(终浓度 50 μ g/ml),取上清培养液加入等量 Griess 试剂,室温放置 10min,用 Bekman DU-640 可见-紫外分光光度计,在 546nm 处测定其吸光度 A 值,以亚硝酸钠为标准,绘制标准曲线,求出亚硝酸盐的含量,并换算成 nmol/L \times 10⁵ 个细胞。

1.5 RT-PCR 分析 分别提取各组总 RNA,RT-PCR 试剂盒进行扩增以分析 iNOS 基因的 mRNA

表达,-actin 为内参物。PCR 引物设计参照文献[7],由上海生工公司合成。引物序列如下:iNOS:5'-AGA GAG ATC CGG TTC ACA-3' / 5'-CAC A GA ACT GAG GGT ACA-3',扩增片段长度 376bp; -actin:5'-TCC TTC GTT GCC GGT CCA CA-3' / 5'-CGT CTC CGG AGT CCA TCA CA-3',扩增片段长度 509bp。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,UVP 扫描分析。

1.6 蛋白质印迹分析 用细胞刮刀将各组细胞刮下,离心收集,加入细胞裂解液 A(细胞膜裂解),混匀后冰浴 15min,13000g 离心 15min,上清作为胞浆蛋白提取物进行蛋白质印迹分析,用于分析 iNOS 基因的表达水平以及检测 I κ B⁻ 的降解;沉淀用细胞裂解液 A 洗 1 次,混悬于细胞裂解液 B(细胞核裂解),混匀后 -20 $^{\circ}$ C 冷冻过夜,13000g 离心 15min,上清作为核蛋白提取物进行蛋白质印迹分析,用于分析 NF- κ B p65/Rel A 亚基的转运入核。

用 Bradford 法分别测定胞浆蛋白和核蛋白浓度。取胞浆蛋白 40 μ g、核蛋白 20 μ g,以 8% SDS-PAGE 凝胶电泳分离,电转移蛋白至 PVDF 膜,根据检测的蛋白采用不同封闭液封闭 1~2h,加入一抗在室温孵育 1h,漂洗一抗,加入二抗 1h,漂洗二抗,暗室显影。

1.7 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 软件用 *t* 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

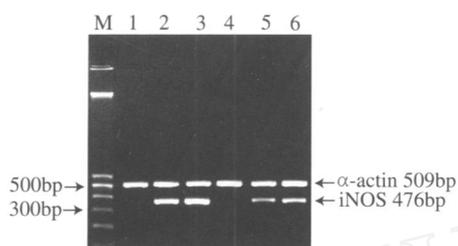
2.1 EGb761 抑制 NO 的合成 对照组细胞荧光强度很弱,表明 NO 生成的量很少,见图 1A;经诱导组细胞荧光强度明显增强,表明产生了大量 NO,见图 1B;药物组见图 1C。提示 EGb761 对于 C6 胶质瘤细胞中 NO 的合成具有显著抑制作用。

同时应用 Griess 反应测定培养液中 NO 的含量。对照组细胞产生的 NO 含量很低,诱导组细胞产生大量 NO,在一定时间范围内随诱导时间的延长而增多,而药物组 C6 细胞 NO 产量明显减少,两者差异有显著性($P < 0.01$),见表 1。

表 1 胶质瘤细胞的一氧化氮产量
(nmol/L \times 10⁵ cell, $\bar{x} \pm s$, n=6)

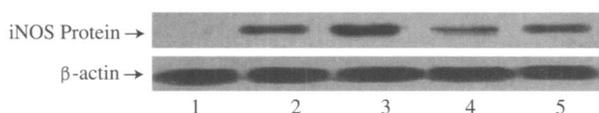
Groups	Inductive time				
	0h	3h	6h	12h	24h
LPS + PMA	0.562 \pm 0.022	1.426 \pm 0.034	4.160 \pm 0.026	5.024 \pm 0.076	6.981 \pm 0.206
Egb761 + LPS + PMA	0.546 \pm 0.028	0.590 \pm 0.068	1.571 \pm 0.152	1.585 \pm 0.196	2.035 \pm 0.078

2.2 EGb761 抑制 iNOS 的表达 为了揭示 EGb761 抑制 C6 胶质瘤细胞中 NO 合成的分子机制,用 RT-PCR 和蛋白质印迹分析分别从 mRNA 和蛋白水平检测了 EGb761 对 iNOS 基因表达的影响。结果表明:C6 细胞经 LPS 和 PMA 诱导后,iNOS mRNA 的表达量大大增加,而在加入 LPS 和 PMA 诱导前 2h 用 EGb761 预处理的 C6 细胞,则 iNOS 基因表达水平明显降低,以 12h 单独诱导为 100%计,6h 时为 64.5%,用 EGb761 预处理细胞,则 12h 时为 32.8%,6h 时为 21.6%,提示 EGb761 抑制了 C6 胶质瘤细胞 iNOS 的表达,见图 2。用蛋白质印迹分析也可以观察到 EGb761 能显著地减少 iNOS 蛋白,以 12h 单独诱导为 100%计,6h 时为 63.6%,用 EGb761 预处理细胞,则 12h 时为 58.7%,6h 时为 23.6%,见图 3。



M:Marker; 1:空白对照组; 2:LPS + PMA 6h; 3:LPS + PMA 12h; 4:EGb761; 5:EGb761 + LPS + PMA 6h; 6:EGb761 + LPS + PMA 12h

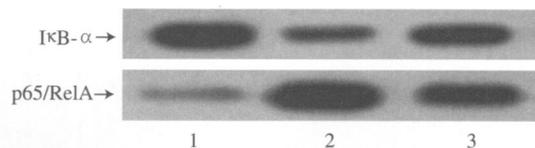
图 2 RT-PCR 法检测 EGb761 对 C6 细胞 iNOS 基因表达的抑制作用



1:空白对照组; 2:LPS + PMA 6h; 3:LPS + PMA 12h; 4:EGb761 + LPS + PMA 6h; 5:EGb761 + LPS + PMA 12h

图 3 蛋白质印迹分析法检测 EGb761 对 C6 细胞 iNOS 蛋白表达的抑制作用

2.3 EGb761 对 NF- κ B 信号通路的影响 NF- κ B 信号通路是一个调控 iNOS 基因表达的关键信号通路,在 LPS 和 PMA 诱导 C6 细胞表达 iNOS 基因的过程中伴随有 NF- κ B 抑制蛋白 I κ B⁻ 的降解,以空白对照组为 100%计,单独诱导 30min 时为 23.8%,用 EGb761 预处理组则为 76.5%。同时可以检测到 NF- κ B p65/RelA 的转移入核,以单独诱导 30min 为 100%计,空白对照组为 8.6%,用 EGb761 预处理组则为 75.7%,见图 4,提示在本实验条件下 iNOS 基因的表达依赖于 NF- κ B 信号通路。



1. 空白对照组; 2. LPS + PMA; 3. EGb761 + LPS + PMA

图 4 I κ B⁻ 的降解和 p65/RelA 转移进入细胞核

3 讨论

iNOS 主要分布于吞噬细胞和胶质细胞中,在细胞受到内毒素、炎性细胞因子和氧化应激等因素的刺激下,细胞内 iNOS 基因被诱导表达,产生大量的 NO,并迅速与超氧阴离子反应,生成具有强氧化性的过氧亚硝基,对细胞产生毒副作用。本研究以 C6 胶质瘤细胞为实验对象,研究了 LPS 与 PMA 协同对 C6 细胞 iNOS 基因表达的诱导和 EGb761 的调控作用。实验结果表明,LPS 与 PMA 能协同诱导 C6 细胞 iNOS 基因的表达,导致细胞产生高浓度的 NO,且具有一定的时间依赖性。EGb761 能明显地下调 iNOS 基因的表达,减少 C6 细胞 NO 的生成。结果提示 EGb761 对神经系统疾病的预防和治疗作用可能与它能调控 iNOS 基因表达有关。

iNOS 基因的表达受到多种因素的调控。目前研究认为这种调控主要发生在转录水平上。iNOS 基因启动子区域含有 NF- κ B 结合元件、AP-1 结合元件以及肿瘤坏死因子反应元件等转录因子调控结合元件。其中 NF- κ B 的活化对胶质细胞、巨噬细胞 iNOS 基因表达的调控作用尤为关键^[8]。NF- κ B 是一种普遍存在的转录因子,在细胞中主要以 p50/p65 (RelA) 二聚体形式存在,其中 p65 亚基含有 DNA 活化域。细胞处于静息状态时,抑制蛋白 I κ B 与 p50/p65 二聚体结合,p65 亚基上的核定位信号 (NLS) 被 I κ B 覆盖,导致 p50/p65 二聚体不能进入细胞核内。当 NF- κ B 的诱导剂作用于细胞后,I κ B 被 I κ B 激酶 (IKK) 磷酸化,随后迅速被蛋白酶降解,释放出“游离态”的 p50/p65 二聚体,p50/p65 二聚体转移入细胞核引起基因表达^[9]。在这一信号通路中,I κ B 的磷酸化和降解步骤是 NF- κ B 活化的关键步骤^[8]。NF- κ B 是一个对细胞氧化还原状态敏感的转录因子,有研究表明 NF- κ B 的激活可以被多种抗氧化剂抑制^[10,11]。在巨噬细胞中,EGb761 可以通过抑制 NF- κ B 信号通路而下调 iNOS 基因的表达^[6]。本研究利用蛋白印迹技术检测了 EGb761 对 NF- κ B 信号通路活化过程中 I κ B⁻ 的降解以及 p65/RelA 的转移入核的影响,结果显示 EGb761 显著性抑制 I κ B⁻ 的降解,并且对 p65/Re-

IA 的转移入核有一定的抑制作用,说明 EGb761 通过调控 NF- κ B 信号通路调控 iNOS 基因的表达。

(本文图 1 见第 476 页)

参考文献:

- [1] Watanabe CMH, Wolfram S, Ader P. The in vivo neuromodulatory effects of the herbal medicine Ginkgo biloba[J]. Biochemistry, 2001, 98(12): 6577-65801.
- [2] Xin WJ, Wei TT, Chen C, et al. Mechanisms of apoptosis in rat cerebellar granule cells induced by hydroxyl radicals and the effects of EGb761 and its constituents[J]. Toxicology, 2000, 148(2-3): 103-110.
- [3] Shen JG, Wang J, Zhao BL, et al. Effects of EGb761 on nitric oxide and oxygen free radicals, myocardial damage and arrhythmia in ischemia-reperfusion injury in vivo[J]. Biochem Biophys Acta, 2000, 1406(3): 228-236.
- [4] Yuan L, Julie VS, Vijaykumar P, et al. Inhibition of amyloid aggregation and caspase-3 activation by the Ginkgo biloba extract EGb761[J]. PNAS, 2002, 99(19): 12197-12202.
- [5] Bastianetto S, Quirion R. Natural extracts as possible protective agents of brain aging[J]. Neurobiology of Aging, 2002, 23(5): 891-897.
- [6] Kobuchi H, Droy-Lefaix MT, Christen Y, et al. Ginkgo biloba extract (EGb761): inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW264.7[J]. Biochem Pharmacol, 1997, 53(6): 897-903.
- [7] Miljkovic D, Samardzic T, Mostarica Stojkovic M, et al. Leflunomide inhibits activation of inducible nitric oxide synthase in rat astrocytes[J]. Brain Res, 2001, 889(1-2): 331-338.
- [8] Baeuerle PA, Baltimore D. NF- κ B: ten years after[J]. Cell, 1996, 87(1): 13-20.
- [9] Baldwin AS Jr. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights[J]. Annu Rev of Immunol, 1996, 14: 649-683.
- [10] Li N, Karin M. Is NF- κ B the sensor of oxidative stress[J]. FASEB J, 1999, 13(10): 1137-1143.
- [11] Gilad E, Wong HR, Zingarelli B, et al. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NF- κ B activation[J]. FASEB J, 1998, 12(9): 685-693.

[编辑:贺文]

宫颈癌患者血清及组织 TGFβ 对激素替代治疗的影响

(正文见 422 页)

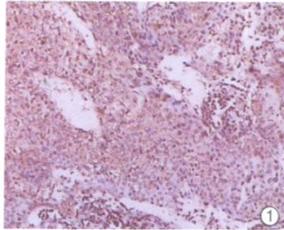


图 1 宫颈鳞状细胞癌组 TGFβ 免疫组化染色强阳性 (+++) (× 200)

银杏叶提取物对胶质瘤细胞 NF-κB 表达和 NO 生成的调控

(正文见 397 页)

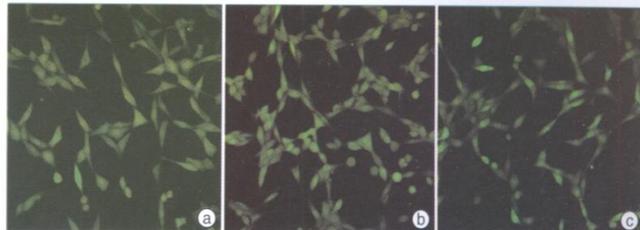


图 1 EGb761 对经 LPS 和 PMA 诱导的 C6 胶质瘤细胞 NO 生成的抑制 a. 未经 LPS 和 PMA 诱导; b. 经 LPS 和 PMA 诱导 12h; c. 经 LPS 和 PMA 诱导前用 50 μg/ml EGb761 预处理

cyclinD1、CDK4 和 Rb 在大肠癌中的表达及其意义

(正文见 428 页)

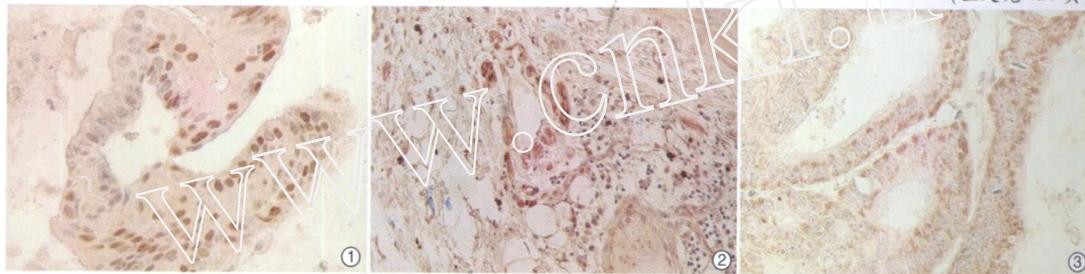


图 1 大肠癌 cyclinD1 阳性表达 (SP × 400) 图 2 大肠癌 CDK4 阳性表达 (SP × 200) 图 3 大肠癌 Rb 阳性表达 (SP × 400)

大肠腺癌组织中 VASP 和 PCNA 的表达

(正文见 431 页)

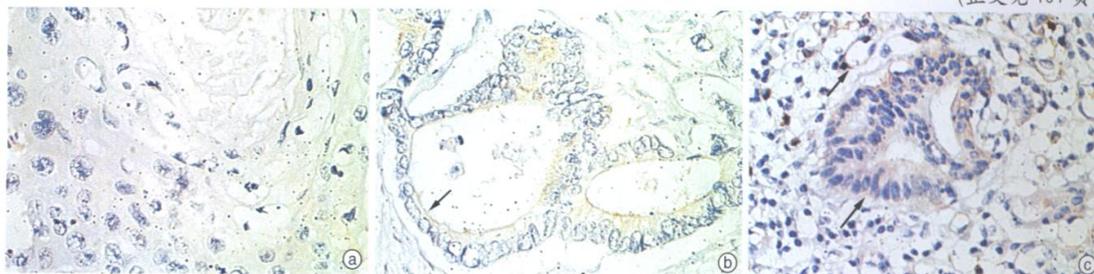


图 1 大肠腺癌标本 a. VASP 阴性表达; b. VASP 阳性表达; c. VASP 强阳性表达, 箭头所指处即为显色的 VASP