

## 银杏内酯 B对慢性炎症血管生成的抑制作用

欧阳雪宇, 王文杰\*, 廖文辉, 陈晓红

(中国医学科学院·中国协和医科大学 药物研究所, 北京 100050)

**摘要:** 目的 研究银杏内酯 B对慢性炎症血管生成的作用及部分作用机制。方法 比色法测定小鼠慢性肉芽肿气囊模型血管生成指数,组织形态学方法检测气囊病理变化;放射免疫方法测定白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )含量;L929生物测定法测定肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )含量;RT-PCR法检测 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$  mRNA的表达。结果 银杏内酯 B可显著抑制模型小鼠的血管指数,与病理观察结果相符;银杏内酯 B可显著抑制模型小鼠血清中 IL-1和 TNF- $\alpha$ 的分泌;能显著抑制 PMA诱导的 U937细胞 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 的分泌及其 mRNA的表达。结论 银杏内酯 B能抑制小鼠慢性炎症性血管生成模型的血管生成,能抑制促血管生成细胞因子 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 的转录及表达,这可能是其抑制慢性炎症血管生成的机制之一。

**关键词:** 银杏内酯 B; 血管生成; 白介素-1 $\beta$ ; 肿瘤坏死因子

中图分类号: R282.71; R965 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2005)04-0311-05

## Inhibitory effect of ginkgolide B on angiogenesis in chronic inflammation

OU-YANG Xue-yu, WANG Wen-jie\*, LIAO Wen-hui, CHEN Xiao-hong

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract: Aim** To investigate the inhibitory effect of ginkgolide B on angiogenesis in chronic inflammation and the possible mechanisms. **Methods** The murine chronic granulomatous air pouch model was used to observe the anti-angiogenesis effect of ginkgolide B. The vascular index was determined by colorimetry of caminic acid, and angiogenesis was observed by histology method. The interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) levels in mice serum and in supernatants of U937 cell culture stimulated by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) were detected by radioimmunoassay (RIA). The tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) levels in mice serum and in supernatant of U937 cell culture were measured by cytotoxicity bioassay. The mRNA expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  of U937 cell culture was investigated by RT-PCR. **Results** Oral administration of ginkgolide B 25 and 100 mg $\cdot$ kg $^{-1}$  was shown to significantly inhibit the vascular index of murine chronic granulomatous air pouch model with the inhibitory rate of 22.52% and 25.29%, respectively. This result was supported by histological observation. Concomitantly, the IL-1 $\beta$  levels in mice serums were also significantly decreased with the inhibitory rate of 50.61% and 58.66%; so were the TNF- $\alpha$  levels with the inhibitory rate of 28.91% and 52.41%. Ginkgolide B at concentration of  $1 \times 10^{-5}$  to  $1 \times 10^{-8}$  mol $\cdot$ L $^{-1}$  could also reduce both the IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  contents in the supernatants of U937 cell culture stimulated by PMA, but the scopes of changes were much different. For IL-1 $\beta$  the IC $_{50}$  was  $1.93 \times 10^{-8}$  mol $\cdot$ L $^{-1}$ , while ginkgolide B at concentration of  $1 \times 10^{-5}$  mol $\cdot$ L $^{-1}$  only decreased the release of TNF- $\alpha$  by 25.99%. Furthermore, ginkgolide B at concentrations of  $1 \times 10^{-5}$  to  $1 \times 10^{-7}$  mol $\cdot$ L $^{-1}$  was shown to significantly inhibit TNF- $\alpha$  mRNA expression of U937 cells; and at concentrations of  $1 \times 10^{-5}$  and  $1 \times 10^{-6}$  mol $\cdot$ L $^{-1}$  could inhibit IL-1 $\beta$  mRNA expression. **Conclusion** Ginkgolide B was shown to significantly inhibit angiogenesis of the murine chronic granulomatous air pouch model, reduce

收稿日期: 2004-05-18.

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2002AA233081).

\* 通讯作者 Tel: 86-10-63165192, Fax: 86-10-63037757, E-mail: wwenj@imm.ac.cn

the IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels in mice serums, and significantly inhibit IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  mRNA expression and protein secretion in supe matants of U937 cell culture. It was suggested that reduction of proangiogenic cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  secretion may contribute to the anti-angiogenesis effect of ginkgolide B in the murine chronic granulomatous air pouch model.

**Key words:** ginkgolide B; angiogenesis; interleukin-1 $\beta$ ; tumor necrosis factor- $\alpha$

血管生成是从已存在的血管网上生长出新血管的现象。慢性炎症和血管生成相互依赖、相互促进:新生的血管对组织的增殖和炎性细胞的浸润是必要的,而炎性细胞的浸润和炎症介质的分泌又促进了血管生成<sup>[1]</sup>。在此过程中,单核/巨噬细胞起着至关重要的作用,慢性炎症期浸润的细胞主要为单核/巨噬细胞,它是血管生成所需各种生长因子的重要来源<sup>[2,3]</sup>。抑制血管生成是目前抗慢性炎症研究的热点之一。

银杏内酯 B(BN52021)是从银杏叶中提取的一种活性物质,研究显示其具有多种药理活性:如血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)受体拮抗作用、免疫抑制作用、蛋白酶抑制作用、甘氨酸门控氯离子通道拮抗作用等。最近的研究表明 PAF能直接或间接促进血管生成<sup>[4]</sup>。

小鼠慢性肉芽肿气囊模型是一种慢性炎症性血管生成模型,能够定量研究药物对于炎症血管生成的调节作用<sup>[5]</sup>。本文采用此模型研究了银杏内酯 B对慢性炎症血管生成的作用,并对其作用机制进行了初步研究。

## 材料与方 法

**细胞** U937和 L929细胞株,由中国医学科学院基础医学研究所细胞中心提供。

**动物** Balb/c小鼠,♀,由中国医学科学院动物研究所提供。

**药品和试剂** 银杏内酯 B由丽华制药公司(宁波)提供;胭脂红酸为 Chroma产品(分装);完全弗氏佐剂、N-乙酰半胱氨酸、木瓜蛋白酶、明胶、佛波酯(PMA)、MTT和放线菌素 D为 Sigma产品;RPMI-1640培养基为 Gibco-BRL产品;IL-1 $\beta$ 放射免疫试剂盒为中国人民解放军总医院提供;TRIzol试剂为 Invitrogen公司产品, Taq 酶为 Takara公司产品, dNTP和 M-MLV为 Promega公司产品;hIL-1 $\beta$ , hTNF- $\alpha$ 及 hGAPDH引物由上海生工公司合成。

**小鼠慢性肉芽肿血管生成模型** 参考文献[6]并加以改进:d1小鼠背部 sc空气;d2在气囊中注射含有0.1%巴豆油的完全弗氏佐剂;d2开始给药

或相应的溶剂对照;d6将小鼠40℃保温10min,尾静脉注射1%的胭脂红酸溶液(含5%的明胶)1mL/只,0-4℃保留2-3h,分离气囊组织,56℃烘干48h,称得组织干重,然后加入消化液(木瓜蛋白酶12U·mL<sup>-1</sup>, EDTA1mmol·L<sup>-1</sup>, N-乙酰半胱氨酸0.33mg·mL<sup>-1</sup>, pH7.0 PBS配制),56℃消化48h;消化结束后在消化液中加入5mol·L<sup>-1</sup> NaOH,2000×g离心5min,取上清液,0.22 $\mu$ m滤膜滤过,540nm处测量吸收度值,依据胭脂红酸标准曲线计算组织中的胭脂红酸量。

实验结果用血管指数(vascular index)表示。血管指数=组织中胭脂红酸含量/组织干重(mg·g<sup>-1</sup>),血管生成抑制率%(IR%)=(对照组血管指数-给药组血管指数)/对照组血管指数×100%

**组织形态学** 采用常规 HE染色方法,镜下观察并拍照。

**U937细胞培养及药物处理** 取对数生长期 U937细胞,调细胞数为2×10<sup>6</sup>·mL<sup>-1</sup>,48孔培养板,每孔接种500 $\mu$ L;无血清培养2h,加入不同浓度的药物或相应的溶剂对照,37℃孵育30min,然后加入1.0×10<sup>-8</sup>mol·L<sup>-1</sup> PMA刺激24h,收上清液待测。

**放射免疫法测定小鼠血清和细胞培养上清液 IL-1 $\beta$ 的含量** 血清样品的制备:气囊形成d6,眼眶采血,室温静置2h,2000r·min<sup>-1</sup>离心10min,取血清待测。取血清样品或细胞培养上清液,每个样品设两个复孔,按试剂盒说明书测定 IL-1 $\beta$ 含量。

**L929生物测定法测定小鼠血清和细胞培养上清液 TNF- $\alpha$ 含量** 参考文献[7]进行。

**RT-PCR法检测 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$  mRNA表达** (1)总 RNA的提取:取 U937细胞(2×10<sup>6</sup>·mL<sup>-1</sup>)6mL,加入不同浓度的药物和相应的溶剂对照,培养30min后加入1×10<sup>-8</sup>mol·L<sup>-1</sup> PMA刺激24h,按照 TRIzol试剂说明书提取细胞总 RNA。(2)RT-PCR法扩增 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$  mRNA:调整各管总 RNA量一致,采用随机引物,参照逆转录酶 M-MLV说明书方法进行逆转录;取逆转录产物进行 PCR。

引物核苷酸序列为, hIL-1 $\beta$ : sense 5'-CTC GCC AGT GAA ATG ATG-3'; antisense 5'-ATG AAG GGA AAG AAG GTG-3'. hTNF- $\alpha$ : sense 5'-AAG CAT GAT CCG GGA CGT G-3'; antisense 5'-TGG CAG AGA GGA GGT TGA CC-3'. hGAPDH sense 5'-ACG GAT TTG GTC GTA TTG GG-3'; antisense 5'-CGC TCC TGG AAG ATG GTG AT-3'. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  和 GAPDH 分别进行逆转录和扩增, IL-1 $\beta$ 的反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 5 m in; 94  $^{\circ}$ C 0.45 m in; 54  $^{\circ}$ C 0.45 m in; 72  $^{\circ}$ C 0.45 m in; 28个循环; 72  $^{\circ}$ C延伸 7 m in. TNF- $\alpha$ 的反应条件为 94  $^{\circ}$ C 5 m in; 94  $^{\circ}$ C 0.45 m in; 62  $^{\circ}$ C 0.45 m in; 72  $^{\circ}$ C 0.45 m in; 28个循环; 72  $^{\circ}$ C延伸 7 m in. GAPDH的反应条件为 94  $^{\circ}$ C 5 m in; 94  $^{\circ}$ C 0.45 m in; 55  $^{\circ}$ C 0.45 m in; 72  $^{\circ}$ C 0.45 m in; 30个循环; 72  $^{\circ}$ C延伸 7 m in. 准确吸取上述 PCR产物电泳,紫外凝胶成像系统照相和灰度扫描。

统计学分析 结果  $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 的 ANOVA进行统计学检验,以  $P < 0.05$ 为显著性指标。

## 结果

### 1 银杏内酯 B对气囊模型小鼠血管指数的抑制

表 1显示 BN52021 能显著抑制气囊模型小鼠的血管指数,抑制率分别为 22.52%和 25.29% ( $P < 0.05$ )。但对气囊组织的增生无显著作用(结果未列出)。

### 2 组织形态学

气囊组织的组织学结果显示分离的气囊组织呈典型的肉芽组织形态,有丰富的毛细血管和大量炎性细胞浸润。与对照组相比,BN52021 组血管明显较少,与血管指数结果一致,见图 1。

**Table 1 Effect of ginkgolide B (BN52021) on angiogenesis of murine chronic granulomatous air pouch model**

Group/mg $\cdot$ kg $^{-1}$	Vascular index/mg $\cdot$ g $^{-1}$	Inhibitory rate/%
Control	1.11 $\pm$ 0.26	
BN52021 25	0.86 $\pm$ 0.14*	22.52
100	0.83 $\pm$ 0.09*	25.29

The vascular index (in milligrams of caminic acid dye/gram of dry tissue) of granuloma was measured following oral treatment with water (control), BN52021 (25 and 100 mg $\cdot$ kg $^{-1}$  $\cdot$ day $^{-1}$ ) for 6 days after induction of granuloma by injection of 0.5 mL Freund's complete adjuvant with 0.1% croton oil into the murine air pouch.  $n=8$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*  $P < 0.05$  vs control

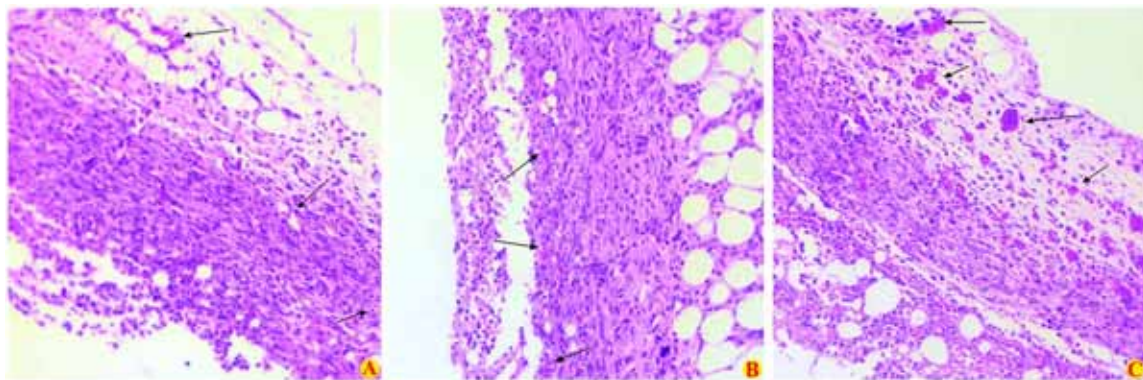
### 3 银杏内酯 B对气囊模型小鼠血清中 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 分泌的抑制作用

给药方式同上。结果显示,模型组小鼠血清中 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 的含量显著高于正常对照组,BN52021 能显著抑制模型组小鼠血清 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 的分泌:对 IL-1 $\beta$ 的抑制率分别为 50.61%和 58.66% ( $P < 0.05$ )。对 TNF- $\alpha$ 的抑制率分别为 28.91% ( $P < 0.05$ )和 52.41% ( $P < 0.001$ )。

### 4 银杏内酯 B对 U937细胞培养上清液中 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 分泌的抑制作用

$1.0 \times 10^{-8}$  mol $\cdot$ L $^{-1}$  PMA能显著刺激 U937细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 的分泌,BN52021 在  $1.0 \times 10^{-8}$  -  $1.0 \times 10^{-5}$  mol $\cdot$ L $^{-1}$ 能显著抑制 PMA刺激的 U937细胞 IL-1 $\beta$ 的分泌,其 IC $_{50}$ 为  $1.93 \times 10^{-8}$  mol $\cdot$ L $^{-1}$ 。

$1.0 \times 10^{-8}$  mol $\cdot$ L $^{-1}$  PMA能显著刺激 U937细胞上清液中 TNF- $\alpha$ 的分泌,BN52021 能剂量依赖性抑制 TNF- $\alpha$ 分泌,但  $1.0 \times 10^{-5}$  mol $\cdot$ L $^{-1}$  BN52021 对 TNF- $\alpha$ 的抑制率只有 25.99% ( $P < 0.001$ )。

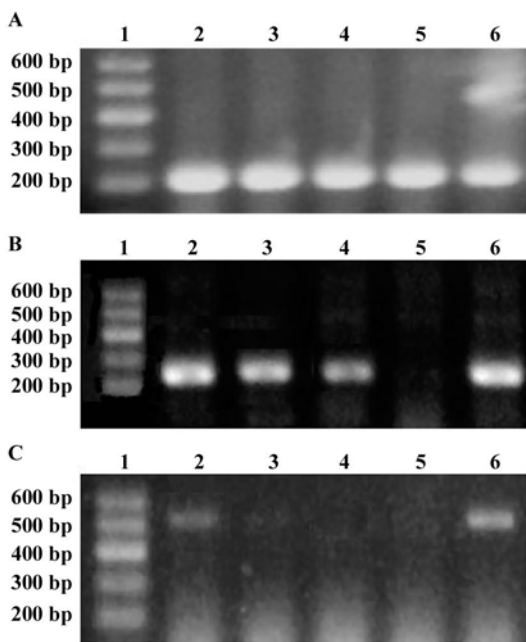


A: BN52021 25 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ ; B: BN52021 100 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ ; C: Control

Figure 1 Haematoxylin and Eosin histology of air pouch granuloma

### 5 银杏内酯 B对 U937细胞 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ mRNA表达的抑制作用

实验结果表明,静息状态下无血清培养的 U937 细胞中 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 的分泌量很小,在  $1.0 \times 10^{-8}$  mol $\cdot$  L $^{-1}$  PMA 的诱导下, U937 细胞中 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 的表达量显著增加。BN5201 ( $1.0 \times 10^{-6}$ 和  $1.0 \times 10^{-5}$  mol $\cdot$  L $^{-1}$ )可显著降低 PMA 诱导的 IL-1 $\beta$  mRNA 表达, Kodak 1D 软件灰度扫描结果显示其抑制率分别为 26.81%和 43.02%; BN5201 ( $1.0 \times 10^{-7}$  -  $1.0 \times 10^{-5}$  mol $\cdot$  L $^{-1}$ )可显著降低 PMA 诱导的 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达,其抑制率分别为 54.88%, 95.31%和 96.07%,见图 2。



Lane 1: DNA marker; Lane 2: PMA +  $1.0 \times 10^{-7}$  mol $\cdot$  L $^{-1}$  BN5201; Lane 3: PMA +  $1.0 \times 10^{-6}$  mol $\cdot$  L $^{-1}$  BN5201; Lane 4: PMA +  $1.0 \times 10^{-5}$  mol $\cdot$  L $^{-1}$  BN5201; Lane 5: Control; Lane 6: PMA

Figure 2 Effect of BN5201 on IL-1 $\beta$  (B) and TNF- $\alpha$  (C) mRNA expression in cultured U937 cell stimulated with PMA. A: GAPDH

### 讨论

本文采用小鼠慢性肉芽肿气囊模型研究了银杏内酯 B 对慢性炎症血管生成的作用,结果发现 BN5201 能显著抑制模型小鼠的血管指数,而对肉芽组织的生长没有显著影响,表明对血管生成的抑制不是对肉芽组织影响的间接结果。组织形态学结果与此相符。

以前的研究表明,小鼠慢性肉芽肿气囊模型的血管生成可分为 3 个阶段,其中中期 (5 - 7 d 时)是从急性炎症期向慢性炎症期转化阶段,此阶段血管

生成主要由 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$  介导<sup>[6,8,9]</sup>。IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 在多种体内外实验模型中都显示出促进血管生成的作用<sup>[10-12]</sup>。因此作者测定了模型小鼠血清中 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 的含量,结果发现模型小鼠血清中 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 水平显著高于正常组,而 BN5201 能显著降低模型小鼠血清 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 的含量。

单核/巨噬细胞在血管生成过程中具有极其重要的作用,研究发现去除单核/巨噬细胞的肿瘤组织中血管生成完全被抑制<sup>[3,13]</sup>;因此作者研究了 BN5201 对人单核细胞株 U937 细胞 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 分泌的影响,结果发现 BN5201 能显著抑制 PMA 刺激的 U937 细胞 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 的分泌。

以前的研究发现 BN5201 能抑制多种细胞分泌 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ <sup>[14,15]</sup>,但其通过何种途径产生作用还不清楚。Du ZY 等<sup>[14]</sup>发现 BN5201 能显著抑制 LPS 刺激的新生鼠小胶质细胞 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 的分泌,该作用与拮抗 PAF 受体作用无关。作者检测了 BN5201 对 PMA 刺激的 U937 细胞 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$  mRNA 表达的影响,结果发现 BN5201 能显著抑制 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达。

BN5201 对模型小鼠血清 TNF- $\alpha$  的抑制作用非常显著,但对 PMA 刺激的 U937 细胞 TNF- $\alpha$  的抑制作用较弱,这可能由于体内与体外实验所使用的刺激剂不同,体内实验影响因素较多,导致了这种差异。

### References

- [1] Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, *et al.* The codependence of angiogenesis and chronic inflammation [J]. *FASEB J*, 1997, **11**(6): 457 - 465.
- [2] Linggen MW. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2001, **125**(1): 67 - 71.
- [3] Moldovan NI. Role of monocytes and macrophages in adult angiogenesis: a light at the tunnel's end [J]. *J Hematother Stem Cell Res*, 2002, **11**(2): 179 - 194.
- [4] Robert EG, Hunt JD. Lipid messengers as targets for antiangiogenic therapy [J]. *Curr Pharm Des*, 2001, **7**(16): 1615 - 1626.
- [5] Colville-Nash PR, Alam CA, Appleton I, *et al.* The pharmacological modulation of angiogenesis in chronic granulomatous inflammation [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995, **274**(3): 1463 - 1472.
- [6] Jackson JR, Bolognese B, Kircher CH, *et al.* Modulation of angiogenesis in a model of chronic inflammation [J]. *Inflamm Res*, 1997, **46**( Suppl 2): S129 - 130.

- [ 7 ] Li J, Cheng GF, Zhu XY. Inhibitory effects of three G<sub>n</sub> compounds on TNF $\alpha$  production by murine peritoneal macrophages [ J ]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2000, **35**(5): 335 - 338.
- [ 8 ] Jackson JR, Bolognese B, Hillegass L, *et al*. Pharmacological effects of SB 220025, a selective inhibitor of P38 mitogen-activated protein kinase, in angiogenesis and chronic inflammatory disease models [ J ]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, **284**(2): 687 - 692.
- [ 9 ] Kobayashi S, Inaba K, Kimura I, *et al*. Inhibitory effects of tetrandrine on angiogenesis in adjuvant-induced chronic inflammation and tube formation of vascular endothelial cells [ J ]. *Biol Pharm Bull*, 1998, **21**(4): 346 - 349.
- [ 10 ] Voronov E, Shouval DS, Knaflitz Y, *et al*. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(5): 2645 - 2650.
- [ 11 ] Klagsbrun M, D'Amore PA. Regulators of angiogenesis [ J ]. *Annu Rev Physiol*, 1991, **53**: 217 - 239.
- [ 12 ] Montecuccio G, Lupia E, Battaglia E, *et al*. Tumor necrosis factor alpha-induced angiogenesis depends on *in situ* platelet-activating factor biosynthesis [ J ]. *J Exp Med*, 1994, **180**(1): 377 - 382.
- [ 13 ] Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumor-associated macrophages in tumor progression: implications for new anticancer therapies [ J ]. *J Pathol*, 2002, **196**(3): 254 - 265.
- [ 14 ] Du ZY, Li XY. Effects of ginkgolides on interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production by rat microglia stimulated with lipopolysaccharides *in vitro* [ J ]. *Arzneimittelforschung*, 1998, **48**(12): 1126 - 1130.
- [ 15 ] Hunyadi J, Kenderessy AS, Duda E, *et al*. Platelet-activating factor antagonists (BN 52021 and BN 50730) inhibit tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity on murine L929 tumor cells [ J ]. *Mol Immunol*, 1993, **30**(6): 517 - 519.