

文章编号:1000-582X(2004)12-0131-03

银杏提取物对内皮细胞产生 NO, MDA 和 SOD 的影响^{*}

唐春红^{1,2}, 蔡绍哲¹, 王伯初¹

(1. 重庆大学 生物工程学院 生物力学与组织工程教育部重点实验室, 重庆 400030;

2. 重庆工商大学 环境与生物工程学院, 重庆 400033)

摘要:比较了几种不同银杏提取物的物理性质和药效。用 HPLC 法测定了不同银杏提取物中黄酮的含量, 以内皮细胞为作用对象, 用联胺对内皮细胞进行氧化损伤, 同时用不同银杏提取物对内皮细胞进行保护, 24 h 后测定细胞上清液中 NO, MDA 和 SOD 的含量。结果显示几种银杏黄酮提取物对内皮细胞因联胺损伤而降低的 NO 具有恢复能力, 可以提高细胞的 SOD 含量, 但对 MDA 的分泌影响不大。结果表明银杏提取物有效成分含量变化对药效的影响较大。

关键词:银杏叶提取物; 物理特性; 内皮细胞; 比较

中图分类号: R285

文献标识码: A

银杏(*Ginkgo biloba* L)为现存古代孑遗植物之一, 又名白果树, 素有裸子植物“活化石”之称, 为我国特产, 资源拥有量占世界总量的 70%。银杏叶制剂是目前在欧美最畅销的食用增补剂和药品。银杏提取物(GBE)具有独特药理活性和巨大的临床应用价值^[1]。谢培山调查报道^[2], 由于当前许多生产厂家生产的银杏叶制剂所用的提取物均购自外厂, 难以实现原料的质量控制, 市售商品良莠不齐。质量标准只能反映 24% 以上的黄酮, 6% 以上的内酯或是体积分数为 5×10^{-6} 以下的银杏酚酸的限度检查, 对于醇水-大孔树脂吸附工艺的标准研究与 EGb761 的全面质量分析比较还没有进行, 文献报道^[2] EGb761 进一步纯化药理作用并未见增强。笔者对几种不同的银杏提取物的有效成分含量与药理作用作一比较, 现将研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验仪器: HPLC 仪; 紫外可见光检测器;

实验试剂: 槲皮素、山柰酚、异鼠李素对照品购自贵州大学生化基地; 甲醇为色谱纯; 三蒸水; 其余均为分析纯试剂;

实验材料: 人脐静脉内皮细胞株 ECV-304, 购自中国科学院上海细胞生物研究所。

1.2 实验药品

1) 银杏提取物 GBE-828w, GBE-624w, GBE1 均为贵州大学生化中试基地惠赠;

2) 银杏提取物 GBE2 达尔曼生物中心惠赠;

3) 银杏提取物 GBE3 日本某公司惠赠。

1.3 实验方法

1.3.1 GBE 中 3 种黄酮甙的 HPLC 测定^[3]

仪器分析条件: 色谱柱: (资生堂生物科技有限公司); 柱温: 40 °C; 流动相: 甲醇-0.5% 磷酸溶液(体积比 48:52); 流速 0.2 mL/min; 检测器波长: 360 nm; 进样量 1 μ L。

标准溶液仪器分析的线性关系考察: 精密称取槲皮素标准品 0.002 g 用甲醇溶解, 于 50 mL 容量瓶中定容, 作为标准液, 依次取上述标准液 1, 2, 3, 4, 5, 6 μ L 进样, 然后进行线性回归分析, 得到回归方程及相关系数为: $Y = 4.750 - 2.106x$, $R = 0.9977$ 。

样品测定: 准确称取银杏叶提取物样品 M 于水解瓶中, 加甲醇 10 mL 温热溶解后加入 1.5 mol/L 盐酸溶液, 沸水浴水解 25 min, 冷却至室温, 用甲醇定容至 25 mL 过滤, 滤液供高效液相色谱分析; 以槲皮素为对

* 收稿日期: 2004-08-18

作者简介: 唐春红(1965-), 女, 四川三台人, 重庆工商大学副教授, 重庆大学博士, 从事保健食品开发及天然产物制药研究。

照品,测定各黄酮甙元的含量,再分别乘以换算因子计算出样品中总黄酮甙的含量。

1.3.2 GBE 的细胞药理实验

将 ECV-304 传代于 50 mL 的培养瓶中,待细胞均匀铺满瓶底后,用胰蛋白酶消化细胞,DMEM/F₁₂ 培养液吹打制成细胞悬液,接种于 96 孔培养板中,接种量每孔 0.1 mL,密度为 1×10^5 个/孔,培养 24 h 后弃上清液(或改用无血清培养液培养 24 h 后,弃上清液),再同时加入联胺和不同浓度的 GBE,24 h 后检测 NO、

SOD 和 MDA 的含量,其中 NO 用 Griess 比色法测定, SOD 用亚硝酸盐比色法测定,MDA 用 TBA 法测定。

2 实验结果

通过 HPLC 检验了不同生产厂家生产的 GBE 中 3 种黄酮甙的含量和纯度,结果见表 1。除 GBE-624w 因吸潮结块而降低了其中黄酮含量外,其余均较高,尤其是贵州大学的 GBE-828w 和 GBE1 中的黄酮含量比标准的 24% 高出 10% 以上,且溶解性相当好。

表 1 几种不同 GBE 黄酮含量和物理特性比较

检测指标	GBE-624w	GBE-828w	GBE1	GBE2	GBE3
颜色	深褐色	绛黄色	绛黄色	褐色	棕褐色
外观	已吸潮结块	细粉状	细粉状	小颗粒晶体	细颗粒晶体
溶解性	易溶	易溶	易溶	不易溶	难溶,有少量不溶杂物
水溶液	澄清透明	澄清透明	澄清透明	呈胶体状	较澄清
黄酮含量/%	18.1	34.4	38.05	32.06	27.01

表 2 是几种不同的 GBE 在 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 两种浓度下分别对用联胺损伤的内皮细胞保护作用比较,结果提示几种 GBE 对损伤的内皮细胞均有保护作

用,可以上调细胞因联胺损伤而降低的 NO 含量,其中贵州大学的 GBE-828w 促细胞释放的 NO 值为最高。

表 2 HUVEC 细胞培养上清液 NO 含量测定 ($n=6$)

GBE 浓度	空白	联胺	GBE-828w	GBE3	GBE-624w	GBE2	GBE1
500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	8.067 \pm 0.015	7.254 \pm 0.017	9.639 \pm 0.021	9.386 \pm 0.014	7.796 \pm 0.010	7.931 \pm 0.011	8.474 \pm 0.016
1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	8.102 \pm 0.017	7.248 \pm 0.017	9.432 \pm 0.019	9.412 \pm 0.022	8.367 \pm 0.020	7.796 \pm 0.018	8.882 \pm 0.014

表 3 是几种不同的 GBE 在 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 两种浓度下分别对联胺损伤的内皮细胞保护作用比较,几种黄酮均具有不同程度的上调受损细胞分泌

SOD 的作用,其中贵州大学的 GBE1 促细胞释放的 SOD 值为最高。

表 3 HUVEC 细胞培养上清液 SOD 含量测定 ($n=6$)

GBE 浓度	空白	联胺	GBE-828w	GBE3	GBE-624w	GBE2	GBE1
500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	16.462 \pm 0.021	14.061 \pm 0.019	14.909 \pm 0.016	15.995 \pm 0.018	14.122 \pm 0.017	14.237 \pm 0.019	16.462 \pm 0.022
1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15.945 \pm 0.019	14.536 \pm 0.020	17.428 \pm 0.022	17.984 \pm 0.018	16.499 \pm 0.021	15.288 \pm 0.021	18.017 \pm 0.023

说明:NU 指一个亚硝酸盐单位,为每 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量。

表 4 是几种不同的 GBE 在 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 两种浓度下分别对联胺损伤的内皮细胞保护作用比较,细胞受损后 MDA 会增加,如果加入的药物对细胞有保护作用,则加入不同浓度黄酮 MDA 值会下降。

结果表明 GBE-828w 和 GBE2 具有一定的下调 MDA 的作用外,GBE1, GBE-624w 和 GBE3 对 MDA 分泌量的影响不大。

表 4 HUVEC 细胞培养上清液 MDA 含量测定 ($n=6$)

GBE 浓度	空白	联胺	GBE-828w	GBE3	GBE-624w	GBE2	GBE1
500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.962 \pm 0.015	2.119 \pm 0.016	1.604 \pm 0.018	2.077 \pm 0.017	1.926 \pm 0.018	1.827 \pm 0.014	1.799 \pm 0.018
1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.009 \pm 0.016	2.169 \pm 0.019	1.698 \pm 0.014	1.792 \pm 0.009	2.070 \pm 0.014	1.415 \pm 0.015	1.803 \pm 0.014

3 讨论

1) GBE-828w, GBE1 和 GBE2 的黄酮含量均高于 28%, GBE3 的黄酮含量接近 28%, GBE-624w 的黄酮含量低于标注的 24%, 可能与样品吸潮有关。这几种黄酮的水溶液颜色相差较大,推测与黄酮和内酯

的比例不同有关,与总黄酮中各种黄酮单体之间和萜内酯中不同内酯单体的比例不同可能也有关。

2) 根据表 2 中 NO 值的大小,可以看出 GBE-828w 在调节细胞释放 NO 的药物活性最高, GBE1 的黄酮含量比 GBE-624w 的高但其释放 NO 的作用却未见明显增加。对水溶性不太好的 GBE3,在调节细

胞释放 NO 量方面的药物活性也较好,在 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的药物浓度下,GBE3 的 NO 值高于水溶性好的 GBE1。在调节细胞的 SOD 值方面的作用,GBE1 的 SOD 值最高,其次是 GBE3(见表 3),推测可能是 GBE 中黄酮和内酯含量之间的比例影响了药物的药效作用。另外在银杏提取物中的不溶成分可能不是有效成分,因此对药物的药效影响不大。几种 GBE 对细胞受损伤后 MDA 的下调作用不是太明显。

3) 本研究对 GBE-624w 和 GBE-828w 进行了研究比较发现后者的作用效果好于前者,这与前人研究的 EGb761 提高黄酮和内酯的含量后作用效果没有大的改变^[4]的结果不一致,推测可能与提取的溶剂和生产工艺不同有关,这需要更进一步的研究。对相同黄酮含量的银杏提取物进行对比研究发现,它们的药效不尽相同,推测可能与所含的黄酮和内酯之间的比例不同有关。这些都有待今后更进一步的研究。

由于我国目前银杏提取物均是以乙醇抽取再经大孔吸附树脂分离纯化,与国外的 EGb761 的丙酮提取的化学成分不尽相同,EGb761 按照专利规定的方法生产出来的银杏提取物每批产品的质量都是稳定的,不存在批间差异。而我国的银杏提取物均是采用乙醇提

取^[5],对原料的种植又没有具体的要求,不同的厂家生产出来的产品和同一厂家不同批次之间均存在一定的差异^[6],不仅银杏黄酮的含量不同,各黄酮单体之间的比例差异就更大,这对药效的稳定和临床用药指导有一定的影响。

参考文献:

- [1] 徐世民,张志鹏,王继峰. 银杏叶活性成分的提取制备及质量标准、测定方法的研究进展[J]. 世界科学技术—中药现代化药品分析与鉴定,2000,13(6):33-36.
- [2] 谢培山. 银杏叶标准提取物 EGb761 及银杏叶制剂的质量评价(待续)[J]. 中国中药杂志,1999,24(1):3-5.
- [3] 张迪清,何照范. 银杏叶资源的化学研究[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999.
- [4] 谢培山. 银杏叶标准提取物 EGb761 及银杏叶制剂的质量评价(续完)[J]. 中国中药杂志,1999,24(2):116-118.
- [5] 陈仲良. 银杏提取物的化学成分和制剂的质量[J]. 中国药学杂志,1996,31(6):326-331.
- [6] 马明东,蒲尚饶. 银杏叶提取物(GBE)质量指标及其影响因素[J]. 四川林业科技,2000,21(1):25-28.

Effect of Different Ginkgo Extraction on NO, MDA, SOD Secreted by Damaged ECV-304

TANG Chun-hong^{1,2}, CAI Shao-xi¹, WANG Bo-chu¹

(1. Key Laboratory for Biomechanics and Tissue Engineering Under the State Ministry of Education, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China;

2. Bioengineering Department of Chongqing Business and Technology University, Chongqing 400033, China)

Abstract: The authors compared some different ginkgo extraction on their physical characteristic and pharmic function and determined their flavones content by HPLC. In pharmacological study, the HUVEC was used as action target, damaged by hydration diamine, at the same time the different desity GBE was added to protect the cell, after cultivated 24 h, the NO value, MDA and SOD in supernate were determined. The results show that all these GBEs can recover the NO value decreased due to the cell damaged by hydration diamine while it had nearly no effect on MDA. The results indicat that the change of the availability ingredient of GBE have strong effect on their pharmic function.

Key words: extract of ginkgo bilobo; physical characteristics; endothelial cell; comparison