

银杏叶提取物通过调控 NF- κ B 信号通路抑制神经胶质瘤 U87 细胞增殖和侵袭

陈金良¹, 单国进¹, 孙才兴², 吴斌², 夏亮², 章勇军¹, 姜健飞¹, 陈杰¹
(1. 金华广福医院, 浙江 金华 321000; 2. 中国科学院肿瘤与基础医学研究所, 中国科学院大学附属肿瘤医院, 浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022)

摘要: [目的] 评价银杏叶提取物(EGb761)对神经胶质瘤 U87 细胞的生长与侵袭的影响, 并进一步分析 EGb761 对 U87 细胞作用的分子机制。[方法] 体外培养人神经胶质瘤 U87 细胞, 给予不同浓度(0, 100, 200, 400mg/L)银杏叶提取物干预(24h, 48h, 72h)后, 采用 CCK-8 技术检测 EGb761 对 U87 细胞增殖的影响。Transwell 小室和流式细胞凋亡技术分析 EGb761 对 U87 细胞侵袭和凋亡的影响; Western blot 检测 EGb761 处理后 U87 细胞内 NF- κ B 与 cyclin D1、iNOS 和 COX-2 蛋白的表达变化。[结果] 银杏叶提取物可有效抑制神经胶质瘤 U87 细胞的增殖和侵袭, 促进细胞凋亡; Western blot 提示 EGb761 干预的 U87 细胞内 NF- κ B 与 cyclin D1、iNOS、COX-2 蛋白的表达均明显下调。[结论] EGb761 抑制神经胶质瘤 U87 细胞的生长增殖和侵袭能力, 其可能是通过 NF- κ B 信号通路而发挥抗肿瘤作用的。

关键词: 银杏叶提取物; 神经胶质瘤; 增殖; 侵袭

中图分类号: R739.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)01-0026-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.01.B006

Ginkgo Biloba Extract Inhibits Proliferation and Invasion of Glioblastoma U87 Cells Through Regulating NF- κ B Signaling Pathway

CHEN Jin-liang¹, SHAN Guo-jin¹, SUN Cai-xing², WU Bin², XIA Liang², ZHANG Yong-jun¹, JIANG Jian-fei¹, CHEN Jie¹

(1. Jinhua Guangfu Hospital, Jinhua 321000, China; 2. Institute of Cancer and Basic Medicine, Chinese Academy of Science, Cancer Hospital of the University of Chinese Academy of Science, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of Ginkgo biloba extract (EGb761) on the growth and invasion of glioma U87 cells and the molecular mechanism. [Methods] U87 cells were cultured in vitro and treated with EGb761 of different concentrations (0, 100, 200, 400mg/L) for different time (24h, 48h, 72h). The proliferation of U87 cells was detected with CCK-8 assay. Transwell migration assay and flow cytometry were employed to determine the effect of EGb761 on invasion and apoptosis of U87 cells, respectively. Changes of NF- κ B, cyclin D1, iNOS and COX-2 expressions in U87 cells were detected by Western Blot. [Results] EGb761 inhibited the proliferation and invasion of U87 cells and promoted its apoptosis. Western blot revealed that EGb761-treated U87 cells significantly down-regulated the expression of NF- κ B, cyclin D1, iNOS and COX-2. [Conclusion] EGb761 can significantly inhibit the proliferation and invasion of U87 cells, which is associated with the regulation of NF- κ B signaling pathway.

Subject words: extract of ginkgo biloba; glioblastoma; proliferation; invasion

神经胶质瘤细胞具有增殖能力强, 侵袭性强等特点, 是导致胶质瘤患者预后差等根本原因^[1]。近年

来, 针对神经胶质瘤的生物治疗方法为研究热点, 包括分子靶向治疗以及基因治疗等。但是, 由于目前的相关技术尚不成熟, 生物治疗方法尚不能广泛地应用于临床中^[2]。中药提取物因具有多靶点、多途径、毒副作用低等优点, 越来越广泛地用于辅助治疗各种肿瘤^[3]。银杏叶提取物 (ginkgo biloba extract 761, EGb761) 在心脑血管疾病的治疗中有明显的治

基金项目: 浙江省医药卫生科技项目(2017KY260); 浙江省医药卫生科技项目(2019RC127); 浙江省中管局项目(2016ZA039); 浙江省医药卫生科技项目(2018KY291, 2018KY292)

通信作者: 陈杰, 主任医师, 本科; 金华广福医院神经外科, 浙江省金华市环城北路 1296 号(321000); E-mail: jie_8189@163.com

收稿日期: 2019-04-21; **修回日期:** 2019-07-22

疗效果,对肿瘤细胞增殖有明显的抑制作用,并能增强化疗药物的敏感性,但目前关于银杏叶提取物对胶质瘤细胞的抗肿瘤作用的研究报道较少^[4]。为证实银杏叶提取物的在神经胶质瘤的抗癌作用,本实验主要从神经胶质瘤的增殖和侵袭研究其抗癌作用及分子机制,为其临床应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

神经胶质瘤 U87 细胞来源于中国上海中科院细胞库;EGb761 来源中国南京博瑞公司。标准胎牛血清(FBS)、DMEM 高糖液体培养基、胰蛋白酶溶液和细胞增殖检测试剂盒 (cell counting Kit-8,CCK-8)、细胞凋亡检测试剂盒、Transwell 小室、96 孔板、24 孔板及 RIPA 细胞裂解液产自南通碧云天生物科技公司;Matrigel 基质胶(10mg/ml)由北京威格拉斯仪器有限公司提供;兔抗人 NF- κ Bp65 多克隆抗体、兔抗人 COX-2 多克隆抗体、兔抗人 iNOS 多克隆抗体及兔抗人多克隆抗体 cyclin D1 为美国 Santa Cruz 公司, β -actin 抗体由江苏南通碧云天生物科技公司生产。

1.2 细胞培养

神经胶质瘤细胞株 U87 培养于含 10%胎牛血清及 1%谷氨酰胺的低糖 DMEM 培养基中,于 37℃,5%CO₂ 浓度和饱和湿度的条件下置于 25ml 培养瓶中培养,待生长融合度达 90%后,使用含 0.25%胰酶进行 1:3 传代。常规冻存和复苏。

1.3 CCK-8 检测细胞增殖抑制率

以胶质瘤 U87 细胞为材料配制细胞悬液,细胞需处于对数生长期。细胞悬液中,胶质瘤 U87 细胞含量为 1×10^5 /ml。之后,将细胞悬液接种在 96 孔板上,各孔的细胞悬液为 100 μ l。将接种于 96 孔板的细胞悬液放于培养箱中培养,并使培养箱中温度保持在 37℃,二氧化碳的体积分数保持在 5%。24h 后,去除细胞悬液,并在每孔的悬液中分别加入不同量的 EGb761(1mg/ml)。本研究中,细胞悬液内 EGb761 浓度有 0、100、200、400 mg/L 4 种,每个浓度对应了 3 个孔内的细胞悬液。利用 CCK-8 10 μ l 继续培养加入 EGb761 细胞悬液,时间 3h。之后,利用酶标仪测定各孔内细胞悬液的吸光度(OD)值,酶标仪的波长

设定为 450nm。利用 OD 值计算不同浓度的 EGb761 对胶质瘤 U87 细胞增殖的抑制率。

细胞增殖抑制率=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值) $\times 100\%$

1.4 Annexin V/PI 凋亡实验检测细胞凋亡

分别以 0、100、200、400mg/L 的银杏叶提取物作用于 U87 细胞 48h,弃培养基,0.25%胰蛋白酶消化收集细胞,用冷 PBS 洗涤细胞 3 次。用 400 μ l 1 $\times$ Binding Buffer 悬浮细胞。分别以 0、100、200、400mg/L 银杏叶提取物作用于 U87 细胞 48h,弃培养基,0.25%胰蛋白酶消化收集细胞,用冷 PBS 洗涤细胞 3 次。以 Annexin V-FITC 为添加剂,加入处理后的细胞悬浮液中,Annexin V-FITC 添加量 5 μ l。之后,在细胞悬液中方添加 10 μ l PI,保证 PI 与细胞混合均匀,将细胞悬液静置 5min,并保持静置环境避光,且温度为 2~8℃之间。之后,利用流式细胞仪对细胞悬液中的细胞量进行检测。

1.5 Transwell 小室检测细胞侵袭性

将 Matrigel 基质胶用不含血清的冷 DMEM 培养基稀释至 5mg/ml,取 100 μ l 稀释胶加到 24 孔 transwell 上室中,37℃孵育 4h,以重建基底膜。对数生长期的 U87 细胞经 0、100、200、400mg/L EGb761 处理 48h 后进行实验,胰酶消化,用含 5% FBS 的 DMEM 培养基调整细胞密度到 5×10^5 /ml。24 孔板 Transwell 小室上室加 200 μ l 细胞悬液,下室加 600 μ l 含 20% FBS 的 DMEM 作为趋化液。37℃培养箱孵育 24h,用棉签擦去滤膜内表面未穿过的细胞,外表面采用结晶紫染色,取 5 个视野(上、中、下、左、右)照相并计数,每组平行设 3 个小室,重复 3 次。

1.6 Westernblot 检测细胞 NF- κ B 通路相关蛋白表达

取对数期 U87 细胞,加入不同浓度终浓度银杏叶提取物 0、100、200、400mg/L,于 37℃、体积分数为 5%CO₂ 培养箱中培养 48h 后,用预冷 PBS 洗 3 遍,刮下细胞,蛋白提取试剂盒提取总蛋白及核蛋白,加入一定量的 4 $\times$ 上样缓冲液,沸水浴中煮沸 5min。用质量分数为 20%SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,分离的蛋白电转移至 PVDF 膜后,用脱脂牛奶室温封闭 1h,分别用一抗 NF- κ B、cyclin D1、COX-2 及 iNOS 等 4℃孵育过夜,PBS-T 洗膜 20min $\times 3$ 次,再加 1:1000 稀释的 HRP 标记的二抗室温孵育 0.5h,经 PBS 清洗 3 次,ECL 发光显影。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析。利用单因素方差分析的方法进行多组数据间的统计比较;采用 LSD 检验的方法进行两组数据间比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 银杏叶提取物 EGb761 抑制胶质瘤细胞增殖

不同浓度 (0、100、200、400 mg/L) 银杏叶提取物 EGb761 处理胶质瘤 U87 细胞 24、48、72 h 后, CCK8 检测结果显示, 200、400 mg/L 银杏叶提取物浓度时在 24 h (38.25 ± 2.17 , 57.75 ± 1.31)、48 h (54.00 ± 3.136 , 76.00 ± 2.85)、72 h (60.75 ± 1.75 , 82.25 ± 2.65) 后其能够明显抑制细胞的增殖活性, 与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。但在 100 mg/L 银杏叶提取物处理胶质瘤 U87 细胞 24、48 h、72 h 后, 对其增殖抑制作用不明显 (Figure 1)。

2.2 银杏叶提取物 EGb761 诱导胶质瘤细胞凋亡

以 0 mg/L 银杏叶提取物 EGb761 处理组为对照组, 对照组早期凋亡细胞 (FITC+/PI-) 为 (10.8 ± 0.8)%, 100 mg/L 银杏叶提取物处理组细胞凋亡率为 (11.6 ± 0.9)%, 与对照组相比无显著性差异; 200 mg/L 和 400 mg/L 用药组凋亡率分别为 (22.3 ± 3.1)% 和 (34.5 ± 4.4)%, 与对照组相比有统计学差异 ($P < 0.01$) (Figure 2)。

2.3 Transwell 小室迁移实验结果

随着银杏叶提取物 EGb761 浓度的增加, 细胞悬液中能够穿过小室基底膜的细胞数量逐渐减少, 两者之间呈现明显的负相关关系 (63.00 ± 7.45 , 59.50 ± 4.69 , 27.00 ± 2.858 , 13.50 ± 3.42) (Figure 3)。

2.4 银杏叶提取物 EGb761 对神经胶质瘤 NF- κ B 信号通路的影响

Western blot 结果显示核提取蛋白中 NF- κ Bp65 含量呈现明显的浓度依赖性, 且随着浓度的增加其核内表达逐渐减低 (Figure 4A)。NF- κ B、cyclin D1、

COX-2 及 iNOS 表达情况随着银杏叶提取物处理浓度的增加, 其表达均呈现逐渐下降 (Figure 4B), 提示银杏叶提取物 EGb761 在神经胶质瘤 U87 细胞中可能是通过抑制 NF- κ Bp 蛋白进入细胞核内从而调控

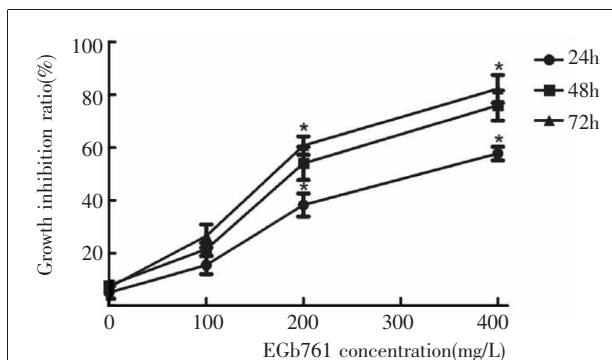


Figure 1 Proliferation of U87 cells influence of EGb761 by CCK-8 assay

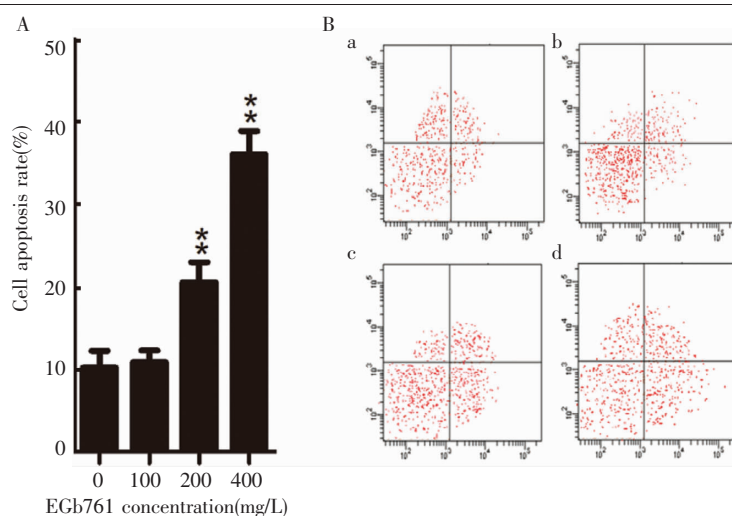


Figure 2 Influence of EGb761 on cell apoptosis in U87 cells

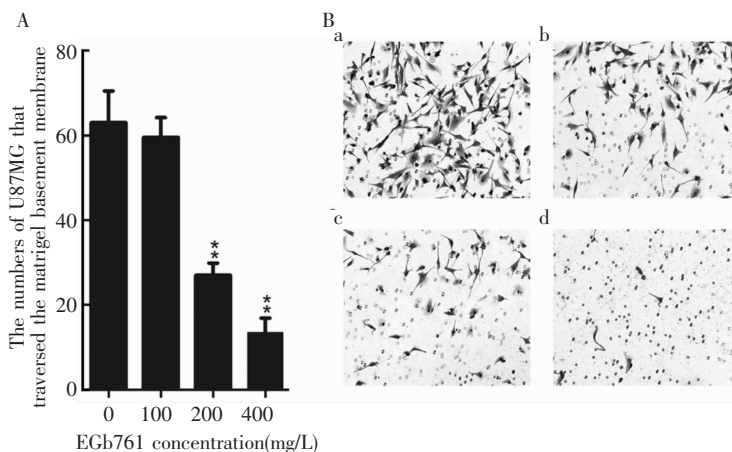
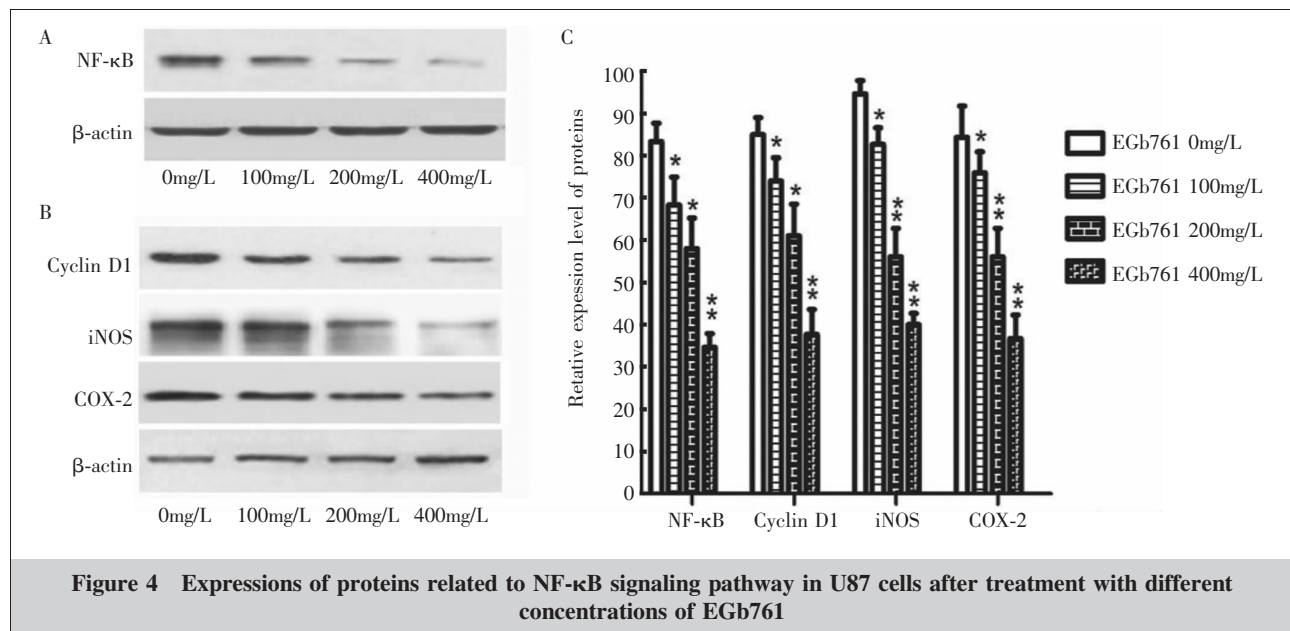


Figure 3 Influence of EGb761 on invasion in U87 cells



NF- κ B 信号通路而发挥抗肿瘤生长, 侵袭和促凋亡作用。

3 讨 论

神经胶质瘤发病率呈现逐年上升趋势, 虽近年来在胶质瘤的发病机制及治疗方面的研究取得了不少进展, 但仍未找到有效的治疗方法^[5-6]。中药具有靶点较多、途径较多与副作用较少的优点, 已成为肿瘤治疗方面的研究热点^[7]。银杏科植物银杏的干燥叶称为银杏叶, 用于治疗各种疾病, 包括心血管疾病、支气管疾病等。第一个用于临床实践的银杏叶标准提取物为 EGb761, 由德国威玛舒培研制^[8]。已有多项研究表明 EGb761 在多种肿瘤中具有抑瘤作用。在本实验中我们采用不同浓度 EGb761 干预神经胶质瘤 U87 细胞后, 分别采用细胞增殖、细胞凋亡、细胞侵袭实验, 结果表明 EGb761 能够明显抑制胶质瘤细胞增殖和侵袭, 促进胶质瘤细胞凋亡, 其作用具有浓度依赖性。前期国内外研究者已经明确了 EGb761 肝癌、乳腺癌及前列腺癌中发挥良好的抗癌作用。Tosaki 等^[9]的研究表明, EGb761 能提升细胞抗凋亡的能力, EGb761 提高了细胞内的超氧化物的活性, 进而使细胞内的氧自由基被清除^[9]。有研究显示 EGb761 明显抑制由 AFB₁ 诱导的大鼠肝癌的发生进展, 可能与 EGb761 降低自由基从而导致脂质过氧化反应、减轻氧化损伤相关^[10]。另外, EGb761

中黄酮类化合物可抑制人乳腺癌细胞及前列腺癌中的 FAS 的表达, 从而减少肿瘤组织中脂肪合成, 抑制肿瘤细胞增殖, 促进凋亡, 从而抑制乳腺癌及前列腺癌的生长^[11]。可见, EGb761 在肝癌、前列腺癌、乳腺癌以及神经胶质瘤中发挥良好的抗癌作用。

NF- κ B 信号通路的异常激活在多种人类肿瘤如非何杰金氏淋巴瘤、胰腺癌、头颈部鳞癌和神经胶质瘤等肿瘤细胞的增殖侵袭中发挥重要的作用^[12]。目前, 在多种肿瘤中发现持续激活的 NF- κ B 能刺激抗凋亡基因的转录, 持续激活的 NF- κ B 能激活周期蛋白 D1(cyclin D1)和其他周期蛋白的转录, 增强细胞的增殖能力^[13]。COX-2、iNOS 作为 NF- κ B 通路的下游基因, 启动子均含有 NF- κ B 结合位点, 与多种肿瘤的增殖和侵袭有关^[14]。COX-2 又可以通过其产物 PGE₂ 刺激肿瘤细胞的增殖。该通路还可能通过增加 Bcl-2 表达、减弱一氧化氮(NO)信号途径和降低细胞神经鞘氨醇含量而抑制凋亡。COX-2 过度表达可刺激瘤新生血管的形成, 还可上调基质金属蛋白酶 9(MMP-9), 使肿瘤更有侵袭性^[15]。

多项研究表明 EGb761 在多种人类疾病中通过调控 NF- κ B 信号通路而发挥良好的治疗效果。Lin 等^[16]在对哮喘模型小鼠的研究表明 EGb761 处理的肺组织 IKK β mRNA 及 NF- κ B p65 表达较哮喘组减弱, 细胞核内 NF- κ B p65 阳性表达减少, 提示 EGb761 能有效抑制 IKK/NF- κ B 信号通道, 从而缓解炎症。研究表明, 由于 EGb761 可预防动脉粥样硬

化,可能通过调整血脂,EGb761可缓解动脉粥样斑块镀金的炎症^[17]。另外有研究表明,EGb761抑制人脐静脉内皮细胞与人类单核细胞系U937黏附现象的抑制效果较为明显,主要原因是抑制了受NF- κ B调控的VCAM、ICAM-1及P-selectin表达,故推测EGb761可能也与抑制IKK/NF- κ B活性有关。

本研究中通过EGb761作用于胶质瘤U87细胞后,发现NF- κ B信号通路相关蛋白NF- κ B与重要靶蛋白cyclin D1、iNOS、COX-2表达均明显下降,提示EGb761可能通过调控NF- κ B信号通路发挥抗胶质瘤U87细胞的增殖侵袭,抑制凋亡的作用。

综上所述,银杏叶提取物能够较好地抑制胶质瘤细胞生长增殖,其相关抗瘤作用可能是通过抑制NF- κ B信号通路而实现的。EGb761有望成为胶质瘤药物研究新的方向,然而其抗肿瘤作用精确分子机制仍有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Liu XP, Shun-Jin HU, Qi F. Establishment of IgAN model in rats and determination of the serum IL-6, FN and NO [J]. BMC Cancer, 2018, 18(1):48.
- [2] de Leeuw CN, Vogelbaum MA. Supratotal resection in glioma: a systematic review [J]. Neuro-oncology, 2018, 20(2):255.
- [3] Xu W, Yang G, Xu Y, et al. The possibility of traditional Chinese medicine as maintenance therapy for advanced nonsmall cell lung cancer [J]. Evid-Based Compl Altment Med, 2014; 278917.
- [4] Feng XL, Zhang LT, Zhu HM. Comparative anticancer and antioxidant activities of different ingredients of ginkgo biloba extract (EGb 761) [J]. Planta Medica, 2009, 75(8): 792-796.
- [5] Stupp R, Tonn JC, Brada M, et al. High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. Ann Oncol, 2010, 21(suppl 5): v190-v193.
- [6] Shi C, Lamba N, Zheng LJ, et al. Depression and survival of glioma patients: a systematic review and meta-analysis [J]. Clinical Neurology & Neurosurgery, 2018, 172: 8-19.
- [7] Li S, Fan TP, Jia W et al. Network pharmacology in traditional Chinese medicine [J]. Evid-Based Compl ment Al-
- temat Med, 2014: 138460.
- [8] Liu X, Hao WL, Qin YR, et al. Long-term treatment with Ginkgo biloba extract EGb 761 improves symptoms and pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. Brain Behavior and Immunity, 2015, 46: 121-131.
- [9] Tosaki A, Droy-Lefaix MT, Pali T, et al. Effects of SOD, catalase, and a novel antiarrhythmic drug, EGB 761, on reperfusion-induced arrhythmias in isolated rat hearts [J]. Free Radical Biology & Medicine 1993, 14(4): 361-370.
- [10] Hao YR, Fang Y, Ji C, et al. Ginkgo biloba extracts (EGb761) inhibits aflatoxin B₁-induced hepatocarcinogenesis in wistar rats [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2009, 32(1): 92.
- [11] Pretner E, Amri H, Li W, et al. Cancer-related overexpression of the peripheral-type benzodiazepine receptor and cytostatic anticancer effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) [J]. Anticancer research, 2006, 26(1A): 9-22.
- [12] Hayden MS, Sankar G. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions [J]. Genes & Development, 2012, 26(3): 203-234.
- [13] Qingming M, Tongle Z, Yuewen C, et al. Bex2 controls proliferation of human glioblastoma cells through NF- κ B signaling pathway [J]. Journal of Molecular Neuroscience, 2014, 53(2): 262-270.
- [14] Rubio MF, Fernandez PNL, Alvarado CV, et al. Cyclin D1 is a NF- κ B corepressor [J]. BBA-Molecular Cell Research, 2012, 1823(6): 1119-1131.
- [15] Shibata-Kobayashi S, Yamashita H, Okuma K, et al. Correlation among 16 biological factors [p53, p21waf1, MIB-1 (Ki-67), p16INK4A, cyclin D1, E-cadherin, Bcl-2, TNF- α , NF- κ B, TGF- β , MMP-7, COX-2, EGFR, HER2/neu, ER, and HIF-1 α] and clinical outcomes following curative chemoradiation therapy in 10 patients [J]. Oncology Letters, 2013, 5(3): 903-910.
- [16] Lin YP, Li CC, Ye HU, et al. Correlation between the signal pathway IKK/NF- κ B and the anti-oxidant activity in asthma rats and the modulation of Ginkgo biloba extract [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2006, 22(7): 1388-1391.
- [17] Soo L, Won YJ, Seon Mee K, et al. EGb761, a Ginkgo biloba extract, is effective against atherosclerosis in vitro, and in a rat model of type 2 diabetes [J]. PLoS One, 2011, 6(6): e20301.