

· 论 著 ·

银杏叶提取物对 db/db 糖尿病小鼠胰岛功能的影响

刘春燕, 张 珍, 易秋艳, 刘艳清, 王昕怡, 卢 斌, 王英之杰, 邵加庆

【摘要】 目的 探讨银杏叶提取物 EGb761 对胰岛分泌功能的影响及相关机制。**方法** 10 只 8 周龄 db/db 小鼠随机分为两组, 观察组 (EGb761 组) 和糖尿病对照组 (db/db 组), 每组各 5 只, 分别给予 EGb761 100 mg/(kg·d) 和安慰剂灌胃。另选 5 只同周龄 db/m 小鼠给予安慰剂灌胃作为非糖尿病对照 (db/m 组)。每周监测体重、血糖, 8 周后行腹腔葡萄糖耐量试验并取胰腺行免疫组化检测, 分析胰岛内烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶表达情况。**结果** EGb761 组血糖、胰岛素分泌功能和胰岛素敏感性、胰岛内 NADPH 氧化酶 gp91phox、p22phox 亚基的表达水平、胰岛质量显著改善。**结论** EGb761 能够降低 NADPH 氧化酶的表达, 减少氧化应激的来源, 改善胰岛微环境, 从而保护胰岛 β 细胞。

【关键词】 糖尿病; 胰腺; 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶; 氧化应激; 银杏叶提取物 761

【中图分类号】 R587.1 **【文献标志码】** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2013.04.002

The effects of EGb761 on islet function in db/db mice

LIU Chun-yan, ZHANG Zhen, YI Qiu-yan, LIU Yan-qing, WANG Xin-yi, LU Bin, WANG Ying-zhi-jie, SHAO Jia-qing. Department of Endocrinology and Metabolism, School of Medicine, Nanjing University, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China

【Abstract】 Objective To explore the effects of Ginkgo biloba extract 761 on islet function in db/db mice and relative mechanisms. **Methods** Ten db/db mice aged 8 weeks were randomized to EGb761 group and db/db group, fed with 100 mg/(kg·d) and placebo respectively. Five age-matched db/misty mice were concurrently treated with placebo as non-diabetic control group. Body weight and fasting blood glucose were measured every week. After 8 weeks' treatment, intraperitoneal glucose tolerance test was performed and immunohistochemical staining of NADPH oxidase subunit gp91phox and p22phox were determined. **Results** Eight weeks' EGb761 treatment improved glucose tolerance, insulin secretory function and insulin sensitivity. And EGb761 treatment greatly decreased staining intensity of oxidative stress sources including p22phox and gp91phox in islets, thus preserved islet mass. **Conclusion** EGb761 treatment remarkably decreased expression level of NADPH oxidase in β -cells, and prevented the damage from excess oxidative stress, thus protected β -cell function.

【Key words】 diabetes; pancreatic islet; NADPH oxidase; oxidative stress; Ginkgo biloba extract 761

银杏叶提取物 EGb761 是目前国内外治疗缺血性心脑血管病中的常用药物, 在对合并糖尿病的心脑血管疾病的临床和基础研究中, 有学者发现 EGb761 能显著改善血糖水平^[1,2]、保护胰岛 β 细胞^[3], 这为糖尿病的治疗提供了一种新的治疗手段, 但其防治糖尿病的机制尚未明确。本研究采用 db/db 小鼠, 通过观察 EGb761 干预对胰岛分泌功能和胰岛内烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶表达

水平的影响, 探讨 EGb761 改善糖尿病的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物 选取 10 只 8 周龄清洁级雄性 C57BL/KsJ-db/db 小鼠 [许可证号 SCXX (苏) 2007-0012], 体重约 20~25 g, 饲养于清洁屏障设施内, 环境温度保持在 23℃, 12~12 h 亮暗周期, 自由摄取食物和饮水。动物的处置均遵循实验动物看护原则 (NIH Publication No. 85-23, 修订于 1985 年)。

1.2 方法 将 10 只 db/db 小鼠随机分为观察组 (EGb761 组)、糖尿病对照组 (db/db 组), 每组各 5 只, 分别给予 8 周的 EGb761 [GINATON (金纳多), 德国的施瓦伯制药集团], 100 mg/(kg·d) 和安慰剂 (5% 阿拉伯胶) 灌胃, 另选取 5 只同周龄同窝出生的 db/m 小鼠作为非糖尿病对照组 (db/m 组),

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30900697); 江苏省自然科学基金项目 (BK2012781); 南京军区医药卫生科研基金面上项目 (11MA100); 南京军区 334 高层次科技人才培养工程拔尖人才资助项目

作者单位: 210002 江苏南京, 南京大学医学院临床学院 (南京军区南京总医院) 内分泌科

通讯作者: 邵加庆, E-mail: shaojiaq@hotmail.com

给予安慰剂灌胃。

1.3 实验仪器、材料 血糖仪[One Touch Ultra, 强生(中国)医疗器材有限公司]、血糖试纸(lifescan 公司, 美国)、光学显微镜(尼康 E800, 日本)、豚鼠抗人胰岛素抗体(1:2000, LINCO 公司, 美国)、山羊抗人 p22phox、gp91phox 抗体(1:100, Santa Cruz 生物技术公司, 加拿大)、生物素化山羊抗豚鼠 IgG 抗体(1:1000, Chemicon 公司, 加拿大)、生物素化兔抗山羊 IgS 抗体(1:200)与生物素化山羊抗小鼠 IgS 抗体(1:200, Dako 公司, 日本)。

1.4 检测指标

1.4.1 相关生理指标检测 每周监测小鼠体重和随机血糖, 投药前和投药 8 周后测定空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FSI)、并计算葡萄糖和胰岛素曲线下面积及胰岛素敏感指数。并于投药 8 周后, 每组的 5 只小鼠均行腹腔葡萄糖耐量试验(IPGTT)。用胰岛素曲线下面积(AUC_{FSI})评价胰岛分泌功能, 以 0~30 min 胰岛素曲线下面积($AUC_{FSI0-30}$)评价早期相的胰岛素分泌, 计算公式为: $AUC_{FSI0-30} = FSI_{30} - FSI_0$ 。

1.4.2 免疫组织化学测定 投药 8 周后, 取小鼠胰腺固定、包埋、切片后利用抗生物素蛋白-生物素复合物(ABC)法检测胰岛素、NADPH 氧化酶 p22phox 亚基、gp91phox 亚基的表达, 按药盒说明书操作。

1.4.3 胰岛测量分析 光学显微镜下观察切片并拍照, 利用 Axiovision 4.3 软件获得数字照片后用 Image-Pro Plus 5.0.1 软件分析, 胰岛中 p22phox 和 gp91phox 的表达强度分析参照操作说明书。胰岛 β 细胞含量测定使用胰岛素染色照片分析并用下述公式计算: 胰岛 β 细胞含量(mg) = 胰岛面积/胰腺面积 \times 胰腺重量。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析, 正态分布的计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)

表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验, 实验前后的资料比较用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生理指标 投药前, EGb761 组和 db/db 组的体重、血糖无明显差异($P > 0.05$); 投药 8 周后两组体重仍无显著差异, 但 EGb761 组平均空腹血糖显著低于 db/db 组($P < 0.05$), 且胰岛素敏感指数明显升高($P < 0.05$, 表 1)。而 db/m 组投药前投药后各项指标均与 EGb761 组和 db/db 组有显著差异($P < 0.05$)。

2.2 EGb761 对糖耐量及胰腺分泌功能的影响 糖负荷前及负荷后 60、120 min, EGb761 组血糖较 db/db 组显著降低, 且 AUC_{FSI} 显著低于 db/db 组($P < 0.05$, 图 1)。糖负荷后 30 min EGb761 组血浆胰岛素水平升高, 且 $AUC_{FSI0-30}$ 显著高于 db/db 组($P < 0.05$, 表 2、图 2), 说明 EGb761 对糖耐量的改善部分得益于胰岛 β 细胞早期相功能的改善。db/m 组各项指标与 EGb761 组和 db/db 组亦有显著差异($P < 0.05$)。

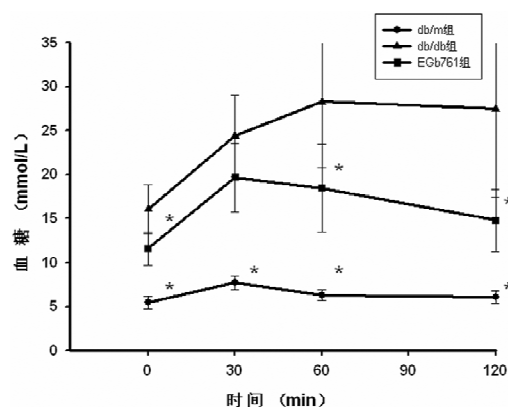
2.3 EGb761 对胰岛质量的影响 与 db/m 组相比, db/db 组的胰腺内胰岛素染色强度明显降低, 提示胰岛质量的显著下降, 而 EGb761 组的胰岛素染色强度、胰岛 β 细胞含量均显著高于 db/db 组, 介于 db/m 组和 db/db 组之间(图 3、4), 表明了 EGb761 有效减轻了胰腺损伤导致的胰岛质量下降。

2.4 EGb761 对胰腺内 NADPH 氧化酶表达的影响 Gp91phox 和 p22phox 阳性区域出现在胰岛细胞的细胞质, 半定量分析显示 db/db 组 gp91phox 和 p22phox 表达最强, EGb761 治疗显著降低 gp91phox 和 p22phox 表达强度, 并低至接近 db/m 组水平($P < 0.01$, 图 5~8), 反映胰岛内氧化应激程度下降。

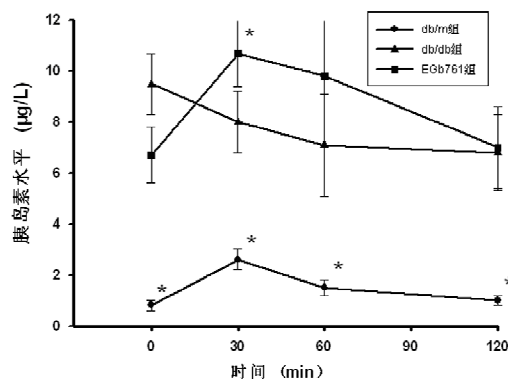
表 1 投药前及投药 8 周后相关生理指标比较($\bar{x} \pm s$)

指标	n	时间	db/m 组	db/db 组	EGb761 组
体重(g)	5	投药前	14.0 \pm 0.3 *	21.6 \pm 2.1	19.8 \pm 1.3
	5	投药 8 周后	28.7 \pm 0.5 *	51.6 \pm 1.5	49.6 \pm 2.4
空腹血糖(FBG) (mmol/L)	5	投药前	5.3 \pm 0.6 *	8.8 \pm 1.7	8.1 \pm 1.7
	5	投药 8 周后	5.5 \pm 0.7 *	16.1 \pm 2.8	11.6 \pm 1.9 *
空腹胰岛素(FSI) (μ g/L)	5	投药前	0.8 \pm 0.1 *	6.2 \pm 1.0	6.3 \pm 1.1
	5	投药 8 周后	0.8 \pm 0.2 *	9.5 \pm 1.2	6.7 \pm 1.1 *
胰岛素敏感指数(ISI)	5	投药前	-1.4 \pm 0.2 *	-4.7 \pm 0.2	-4.6 \pm 0.3
	5	投药 8 周后	-1.5 \pm 0.2 *	-5.0 \pm 0.2	-4.3 \pm 0.3 *

注: 与 db/db 组比较, * $P < 0.05$



与 db/db 组比较, * $P < 0.05$
图 1 葡萄糖耐量试验血糖曲线



与 db/db 组比较, * $P < 0.05$
图 2 葡萄糖耐量试验胰岛素释放曲线

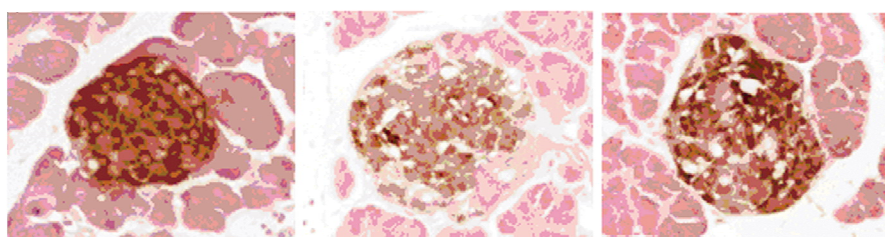
表 2 葡萄糖耐量试验中血糖和胰岛素曲线下面积($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AUC _{血糖}	AUC _{胰岛素}	AUC _{FSI0-30}
db/m 组	5	780.0 ± 41.5 *	187.5 ± 17.5 *	27.0 ± 3.0 *
db/db 组	5	3072.0 ± 410.0	906.0 ± 94.5	-22.5
EGb761 组	5	2041.5 ± 239.0 *	1072.5 ± 115.0	45.0 ± 3.0 *

注:与 db/db 组比较, * $P < 0.05$

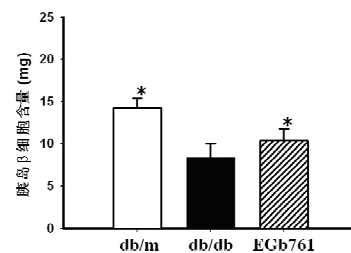
3 讨 论

本研究所选取的 15 只小鼠是同窝出生的,根据实验要求,在进入本实验前其中的 10 只小鼠已被成功造模成糖尿病鼠(db/db 小鼠),另 5 只作为非糖尿病对照组(db/m 组)也纳入本次实验中。在实验

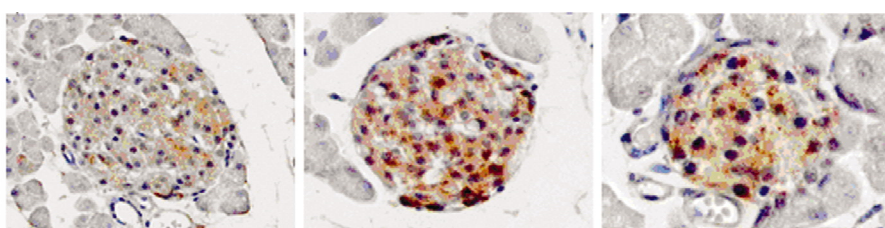


db/m db/db EGb761

图 3 胰腺胰岛素染色(ABC × 400)

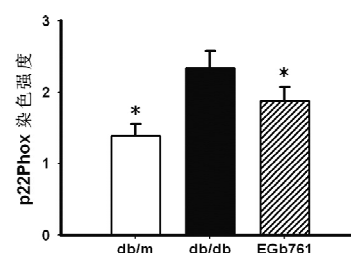


与 db/db 组比较, * $P < 0.05$
图 4 胰岛组织胰岛 β 细胞含量

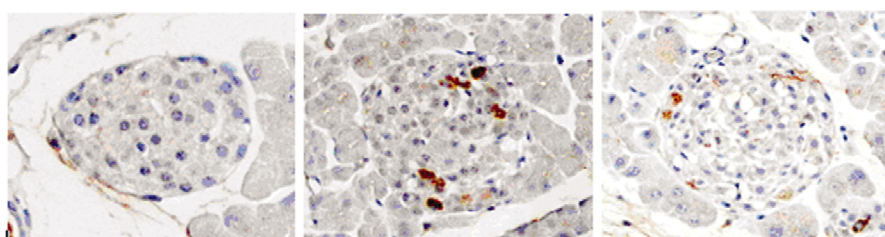


db/m db/db EGb761

图 5 胰岛组织 p22phox 染色显示(ABC × 400)

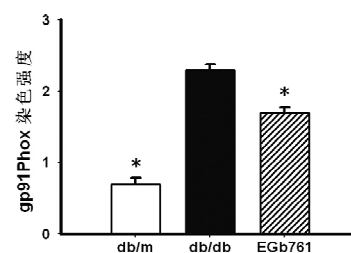


与 db/db 组比较, * $P < 0.01$
图 6 胰岛组织 p22phox 半定量显示



db/m db/db EGb761

图 7 胰岛组织 gp91phox 染色显示(ABC × 400)



与 db/db 组比较, * $P < 0.01$
图 8 胰岛组织 gp91phox 半定量显示

开始前把 10 只 db/db 小鼠随机分为两组,一组给予药物灌胃作为实验组(EGb761 组),另一组给予安慰剂灌胃作为糖尿病对照组(db/db 组),5 只非糖尿病小鼠给予安慰剂灌胃作为非糖尿病对照组(db/m 组)。分组的理论基础是观察 db/m 组与 db/db 组、EGb761 组与 db/db 组、EGb761 组与 db/m 组之间的体重、随机血糖、IPGTT、胰岛素敏感性、胰腺内 NADPH 氧化酶等各项指标变化,由此分析评估笔者所预计的实验结果以及 EGb761 可能的降糖机制。

Guzik 等^[4]研究发现 NADPH 氧化酶是血管生成活性氧簇(Reactive oxygen species, ROS)的主要酶体,ROS 可使细胞膜脂质过氧化、蛋白质变性、生物酶失活、核酸破坏,增强氧化应激等作用,本课题组前期研究证实 ROS 的过度蓄积不仅可以直接损伤胰岛 β 细胞,还可通过影响胰岛素合成和分泌的信号转导通路间接导致 β 细胞损伤凋亡,从而损害胰岛的分泌功能^[5-10]。Gp91phox 和 p22phox 是 NADPH 氧化酶复合体的膜结合亚基,被认为是 NADPH 氧化酶最主要的功能亚基,本研究利用免疫组化证实了 gp91phox 和 p22phox 在胰岛 β 细胞中的表达,db/db 组的表达强度远超过 db/m 组,而 EGb761 治疗可显著降低 NADPH 氧化酶的表达,证明 EGb761 通过其强大的抗氧化、清除自由基能力降低小鼠血糖,改善胰岛素分泌功能和胰岛素敏感性,机制可能是通过降低氧化应激的上游因子如 NADPH 氧化酶 gp91phox、p22phox 亚基的表达水平而改善胰腺微环境,减轻氧化应激损伤,保护胰岛 β 细胞。但 EGb761 改善糖尿病的具体机制尚未完全明确,仍需进一步加以研究。

银杏叶作为药物使用在中国已有很久的历史,其提取物 EGb761 作为一种公认的强抗氧化剂,已被证实不仅具有清除氧自由基、抑制 NO 的产生等作用,还能舒张血管平滑肌、降低外周血流阻力、增加局部血流量、改善心脑血管等器官血液循环^[11-12]。Zhou 等^[13]证实银杏内酯可拮抗氧化损伤导致的细胞凋亡,并且可以在凋亡早期阻断其进程。Smith 等^[14]发现 EGb761 能够维持线粒体膜的完整性,减少线粒体细胞色素 C 的释放,而细胞色素 C 正是形成凋亡小体的关键分子。

近年来,随着研究的不断深入,糖尿病的治疗已经超越传统的促进胰岛素分泌以及减轻胰岛素抵抗上,针对性的抗炎、抗氧化已经成为糖尿病治疗的热点,EGb761、大黄酸^[15]、鬼针草提取物^[16]等都是近年来国内学者研究降糖机制的对象,中西医联手,

“降”、“调”结合,优势互补不失为一条提高全人类健康的新途径。

【参考文献】

- [1] 向志雄,黄 诚,彭新君,等. 中药治疗糖尿病及其并发症研究进展[J]. 中西医结合学报,2006,4(3):321-325.
- [2] Lim S, Yoon JW, Kang SM, 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):20301.
- [3] Vasseur M, Jean T, DeFeudis FV, et al. Effects of repeated treatments with an extract of Ginkgo biloba (EGb761), bilobalide and ginkgolide B on the electrical activity of pancreatic beta cells of normal or alloxan diabetic mice; an ex vivo study with intracellular microelectrodes[J]. Gen Pharmacol, 1994, 25(1):31-46.
- [4] Guzik TJ, Sadowski J, Kapelak B, et al. Systemic regulation of vascular NAD(P)H oxidase activity and nox isoform expression in human arteries and veins[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(9):1614-1620.
- [5] 邵加庆. 局部肾素-血管紧张素系统在 2 型糖尿病中的作用[J]. 医学研究生学报. 2011, 24(5):449-452.
- [6] Shao J, Iwashita N, Ikeda F, et al. Beneficial effects of candesartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, on beta-cell function and morphology in db/db mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 344(4):1224-1233.
- [7] Lu B, Wu H, Gu P, et al. Improved glucose-stimulated insulin secretion by intra-islet inhibition of protein-tyrosine phosphatase 1B expression in rats fed a high-fat diet[J]. J Endocrinol Invest, 2012, 35(1):63-70.
- [8] 邵加庆,顾 萍,杜 宏,等. 建立离体胰岛灌流系统用于评估胰岛素第一相分泌功能[J]. 中华医学杂志, 2010, 90(2):119-121.
- [9] 邵加庆,岩下乃夕,杜 宏,等. 血管紧张素 II 受体阻断剂治疗对 db/db 糖尿病小鼠胰岛的作用[J]. 中华内科杂志, 2007, 46(4):306-310.
- [10] 邵加庆,岩下乃夕,杜 宏,等. 坎地沙坦对 db/db 糖尿病小鼠胰岛功能和结构的保护[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2007, 23(2):110-116.
- [11] Kubota Y, Tanaka N, Umegaki K, et al. Ginkgo biloba extract-induced relaxation of rat aortas associated with increase in endothelial intracellular calcium level[J]. Life Sci, 2001, 69(20):2327-2336.
- [12] Nishida S, Satoh H. Comparative vasodilating actions among terpenoids and flavonoids contained in Ginkgo biloba extract[J]. Clin Chim Acta, 2004, 339(1-2):129-133.
- [13] Zhou LJ, Zhu XZ. Reactive oxygen species-induced apoptosis in PC12 cells and protective effect of bilobalide[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 293(3):982-988.
- [14] Smith J, Burdick A, Golik P, et al. Antiapoptotic properties of Ginkgo biloba extract EGb761 in differentiated PC12 cells[J]. Cell Mol Biol, 2002, 48:699-707.
- [15] 杜 宏,邵加庆,顾 萍,等. 早期大黄酸干预对 db/db 小鼠胰岛功能的影响[J]. 南方医科大学学报, 2011, (9):1526-1529.
- [16] 黄敏珠,陈海生,刘建国,等. 鬼针草提取物对糖尿病大鼠降糖活性的初步观察[J]. 东南国防医药, 2010, 12(2):100-101.

(收稿日期:2013-04-09;修回日期:2013-06-04)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)