

银杏叶提取物对新生 SD 乳鼠心肌细胞缺氧损伤的影响

闵宁斌¹ 唐治国² 黎 璞³ 王丽萍¹ 党亚茹¹

(1 陕西省渭南市合阳县人民医院内科 陕西 渭南 715300 2 陕西省人民医院内科 陕西 西安 710068 ;

3 中国人民解放军第四军医大学唐都医院 陕西 西安 710038)

摘要 目的:研究银杏叶提取物对缺氧状态下新生 SD 乳鼠心肌细胞的影响及其可能机制。方法:新生 1 天 SD 乳鼠心肌细胞原代培养并利用氮气培养箱模拟低氧构建乳鼠心肌缺氧体外模型。分为 3 组处理:对照组、缺氧组、缺氧+药物拮抗组。缺氧时间为 12 h,通过免疫组化等检测方法,观察各组心肌细胞的损伤情况及心肌 Bcl-2、Bax 蛋白表达情况。结果:缺氧可以造成新生 SD 乳鼠心肌细胞凋亡的发生(hypoxia: 75.21 %± 1.21 %, control: 1.38 %± 0.45 %, P<0.05, n=20),并导致其表达凋亡抑制因子 Bcl-2 蛋白水平的显著降低(0.125 fold VS control group, P<0.05),促细胞凋亡因子 Bax 蛋白水平显著升高(3.011 fold VS control group, P<0.05);而银杏叶提取物作用后可明显逆转新生 SD 乳鼠心肌细胞凋亡的发生(EGb761: 23.17 %± 0.43 %, hypoxia: 73.13 %± 1.22 %, P<0.05, n=20),并明显逆转 Bcl-2 (5.716 fold VS hypoxia group, P<0.05)、Bax (0.273 fold VS hypoxia group, P<0.05)等蛋白的表达水平。结论:凋亡相关因子 Bcl-2 和 Bax 等参与缺氧致心肌损伤过程,导致心肌细胞凋亡,银杏叶提取物能降低心肌 Bax 表达,提高 Bcl-2 表达,从而保护心肌细胞,抑制凋亡。

关键词 银杏叶提取物 SD 乳鼠 缺氧 凋亡

中图分类号: Q95-3 R54 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)18-3464-05

The Effect of Extract of Ginkgo Biloba Leaf on Neonatal SD Rat Myocardial Cells during Hypoxic Injury

MIN Ning-bin¹, TANG Zhi-guo², LI Pu³, WANG Li-ping¹, DANG Ya-ru¹

(1 Department of Internal Medicine, Heyang People's Hospital, Weinan, 715300 China;

2 Department of Cardiology, Shaanxi People's Hospital, Xi'an, 710068, China;

3 Department of Anesthesiology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of extract of ginkgo biloba leaf on neonatal SD rat myocardial cells during hypoxic injury and its possible mechanism. **Methods:** Neonatal 1 d SD rats' myocardial cells were cultured and the nitrogen incubator was used to mimic hypoxia model in vitro. Primary cultures were divided into three groups: blank group, hypoxia group, hypoxia and medicine interference group. For the hypoxia group and hypoxia plus medicine interference group, cells were cultured in hypoxia incubator for 12 h, then the expression of Bcl-2 and Bax were detected by western blot and the cell apoptosis was detected with in situ TUNEL assay. **Results:** The apoptosis of neonatal SD rat myocardial cells were detected after 12 h hypoxia (hypoxia: 75.21 %± 1.21 %, control: 1.38 %± 0.45 %, P<0.05, n=20). Meanwhile, hypoxia also reduced expression of Bcl-2 (0.125 fold VS control group, P<0.05) and elevated expression of Bax (3.011 fold VS control group, P<0.05). Moreover, the extract of ginkgo biloba leaf could significantly inhibit the apoptosis of neonatal SD rat myocardial cells exposed to hypoxia (EGb761: 23.17 %± 0.43 %, hypoxia: 73.13 %± 1.22 %, P<0.05, n=20) and significantly invert the expression of Bcl-2 (5.716 fold VS hypoxia group, P<0.05) and Bax (0.273 fold VS hypoxia group, P<0.05). **Conclusion:** Apoptosis-related factors such as Bcl-2 and Bax may play an important role in the process of hypoxia-induced myocardial cells injury, which may lead to myocardial cells apoptosis. The extract of ginkgo biloba leaf could reduce the expression of Bax and elevate the expression of Bcl-2, and accordingly protect myocardial cells from hypoxia induced apoptosis.

Key words: Extract of ginkgo biloba leaf; SD rat; Hypoxia; Apoptosis

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3, R54 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)18-3464-05

前言

冠状动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)、急性心肌梗死等疾病的发生及其引起的心血管并发症是当前严重危害人类健康的疾病。动脉粥样硬化斑块使冠脉堵塞、破裂,从而引起冠脉

痉挛,直接导致急性冠脉综合征的发生^[1],急性心肌梗死后冠状动脉急性闭塞、冠状动脉供血急剧减少或中断,相应供血区心肌发生严重而持久的缺血、缺氧,均可加剧心脏的损伤^[2,3]。细胞过度凋亡是心肌缺血缺氧损伤过程中导致细胞损伤的重要事件之一^[4-6]。为探讨银杏叶提取物对缺血缺氧下心肌细胞保护作用,本实验通过建立乳鼠心肌细胞体外缺氧模型,通过细胞凋亡及凋亡相关细胞因子的检测研究银杏叶提取物对缺氧状态下心肌细胞损伤的保护作用及其可能机制。

作者简介:闵宁斌(1978)男,本科,主治医师,主要研究方向:心血管生理。E-mail: minnb1978@163.com

(收稿日期: 2012-02-12 接受日期: 2012-03-07)

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 出生 1 d 的 SD 乳鼠 雌雄不拘(第四军医大学实验动物中心提供)。

1.1.2 主要试剂 银杏叶提取物,台湾济生化制药股份有限公司生产,使用时由完全培养基配制并过滤除菌。TUNNEL 检测试剂盒 购自德国罗氏公司。Bcl-2 与 Bax 免疫组化试剂盒:一抗购自武汉博士德生物工程有限公司,为亲和纯化兔多克隆 IgG 抗体,二抗及相应试剂购自中杉生物工程有限公司。DMEM 培养基(低糖)、胰酶、青链霉素、胎牛血清、谷氨酰胺、D-Hank's 等细胞培养试剂均购自 Invitrogen 公司。

1.1.3 主要仪器 激光共聚焦显微镜(Olympus 公司)。紫外可见分光光度计(日本岛津公司)。 -85°C 超低温冰箱(美国 NuAire 公司)。SIM-F140 制冰机(日本三洋公司)。超声波细胞粉碎机(美国 Sonics 公司)。低氧培养箱(美国 Thermo 公司)。Allegra 64R 低温高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司)。5415D 小型高速离心机(Ependoff 公司)。

1.2 体外模型的建立与分组

乳鼠心肌细胞的原代培养 按照 Haracy^[7]的经典培养方法培养细胞,取出生 1 d 的 SD 乳鼠,无菌条件下开胸取心尖部,用预冷的 D-Hank's 液洗涤 3 遍,将心脏剪成约 1mm^3 大小,用 0.125 % 的胰酶在 37°C 恒温磁力搅拌器中消化心肌组织 10 min,轻轻吹打后自然沉淀取上清,1000 r/min 离心后弃上清,加适量含 10 % 胎牛血清的 DMEM 培养基,并以完全培养基重复离心洗涤 3 次。制成细胞悬液后放入 CO_2 培养箱培养 90 min,采用差速贴壁法收取培养瓶中的细胞悬液,调整细胞浓度为 5.0×10^5 细胞 /mL,将单细胞悬液接种于培养板中,24 h 后换液,以后隔日换液(对于进行免疫组织化学后续检测的细胞施行细胞爬片)。实验分为对照组、缺氧组、药物干预组。缺氧组细胞在 N_2 模拟低氧环境培养箱内培养 12 h,培养条件为 37°C ,饱和湿度, O_2 浓度维持在 $3\%\pm 0.1\%$ 。药物干预组在完全培养基内加入银杏叶提取物 $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 并在低氧环境下培养 12 h。

1.3 乳鼠心肌细胞损伤检测

取各组细胞爬片,弃去培养液,4 % 多聚甲醛固定 30 min,含 0.1 % 枸橼酸钠、0.1 % Triton X-100 的透化液冰上透化 15 min,加入新鲜配制的标记液, 37°C 孵育 60 min, PBS 洗涤 3 次后以 Hoechst 常温孵育 20 min, 30 % 甘油封片,荧光显微镜下观察结果。

1.4 乳鼠心肌细胞细胞因子表达水平检测

取各组细胞,弃去培养液,冰 PBS 洗涤一遍,每孔加入裂解液 $100\text{ }\mu\text{L}$,冰上裂解 20 min,以细胞刮刮下所有细胞,移入预冷 EP 管,超声裂解 60 s/管,12000 r/min 离心 15 min,定量,以最低浓度组为标准配平,120 V 恒压电泳 90 min,250 mA 恒流电转 90 min,分别加 anti-Bcl-2 和 anti-Bax 一抗 4°C 过夜,相应二抗在室温下孵育 2 h,以凝胶成像仪检测各组蛋白表达水平。

1.5 统计学处理

所有数据均用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,各项指标

结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。各组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA) $P<0.05$ 为有统计学意义。各组蛋白表达水平以 alpha innotech 软件进行半定量灰度分析。

2 结果

2.1 缺氧对乳鼠心肌细胞的影响

实验结果显示(图 1),采用低氧处理细胞后,心肌细胞出

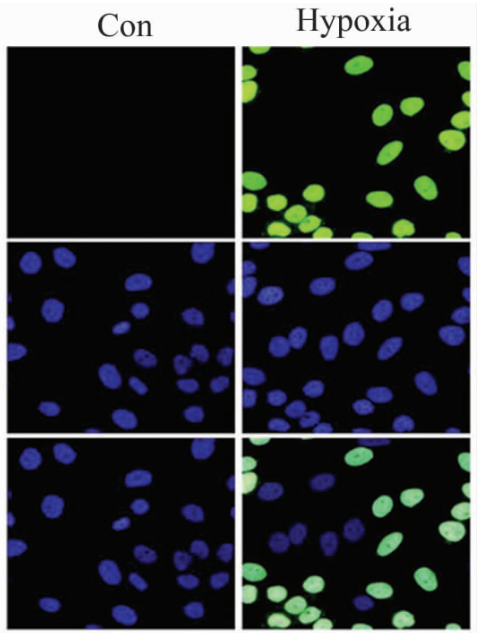


图 1 缺氧对乳鼠心肌细胞的影响

Fig.1 The effect of hypoxia on myocardial cells of neonate rat

现明显的凋亡($75.21\%\pm 1.21\%$, $n=20$),与对照组相比($1.38\%\pm 0.45\%$, $n=20$),结果具有显著性差异($P<0.05$)。

2.2 缺氧对乳鼠心肌细胞的细胞因子表达的影响

实验结果显示(图 2),采用低氧处理细胞后,心肌细胞表达的细胞因子 Bcl-2 的表达水平显著降低 ($0.125\text{ fold VS control}$),与对照组相比,结果具有显著性差异($P<0.05$)。而细胞因

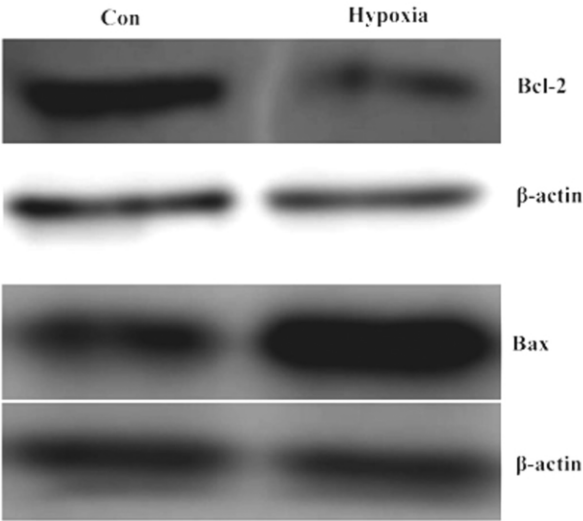


图 2 缺氧对乳鼠心肌细胞 Bax 及 Bcl-2 表达的影响

Fig.2 The effect of hypoxia on protein expression of Bax and Bcl-2

子 Bax 的表达水平显著升高 (3.011fold VS control) ,与对照组相比 结果具有显著性差异(P<0.05)。

2.3 银杏叶提取物对缺氧状态下乳鼠心肌细胞的影响

实验结果显示(图 3) ,采用低氧处理细胞后 ,心肌细胞出

现明显的凋亡(73.13 %± 1.22 % ,n=20) ,与对照组相比(1.45 % ± 0.19 % , n=20) ,具有显著性差异(P<0.05)。而采用银杏叶提取物干预后 ,心肌细胞的凋亡率(23.17 %± 0.43 % , n=20)显著低于单独缺氧组(73.13 %± 1.22 %) ,同时未能恢复到对照组水

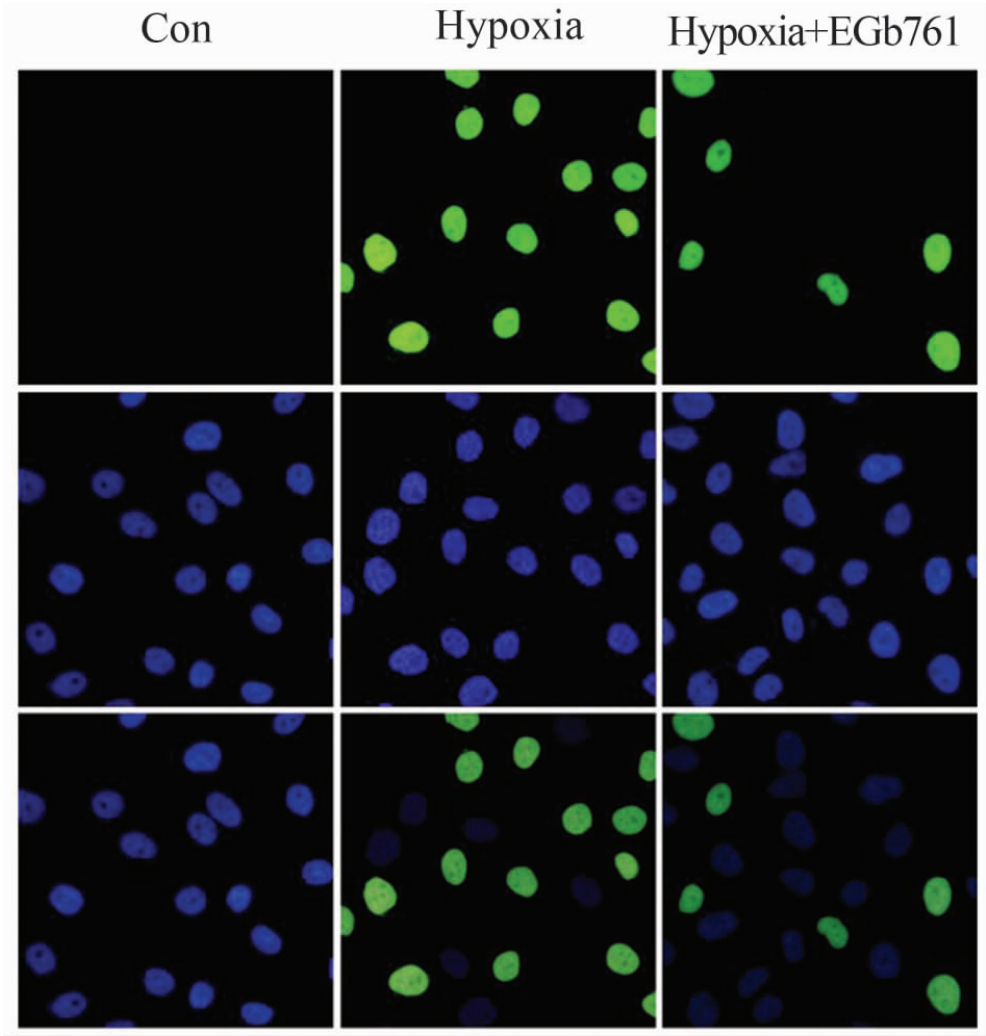


图 3 银杏叶提取物对缺氧状态下乳鼠心肌细胞的影响
Fig.3 The effect of EGb761 on myocardial cells of neonatal rat under hypoxia condition

平(1.45 %± 0.19 %)。

2.4 银杏叶提取物对缺氧状态下乳鼠心肌细胞因子表达的影响

实验结果显示(图 4) ,采用低氧处理细胞后 ,心肌细胞表达的细胞因子 Bcl-2 的表达水平显著降低 (0.177 fold VS control) ,与对照组相比 结果具有显著性差异(P<0.05)。而在银杏叶提取物干预组 ,其细胞因子 Bcl-2 的表达水平(5.716 fold VS hypoxia group, P<0.05)显著高于单独缺氧组。采用低氧处理细胞后 ,细胞因子 Bax 的表达水平显著升高(2.921 fold VS control) ,与对照组相比 结果具有显著性差异(P<0.05)。而在银杏叶提取物干预组 ,其细胞因子 Bax 的表达水平 (0.273fold VS hypoxia group, P<0.05)显著低于单独缺氧组。

3 讨论

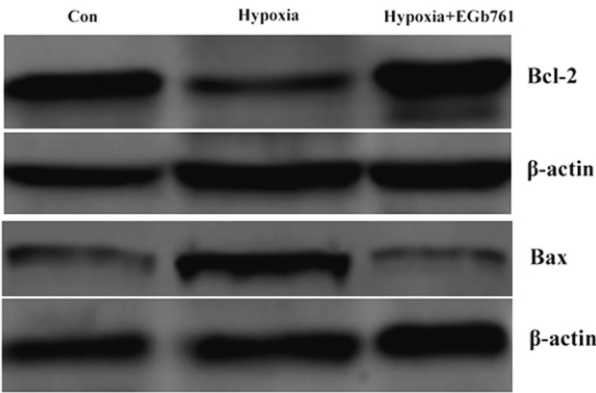


图 4 银杏叶提取物对缺氧状态下乳鼠心肌细胞 Bax 及 Bcl-2 表达的影响
Fig.4 The effect of EGb761 on protein expression of Bax and Bcl-2 under hypoxia condition

心肌缺血缺氧、缺血-再灌注损伤、心肌梗死及心力衰竭等均可诱发心肌细胞凋亡^[8-12]。心肌细胞为已终末分化细胞,心脏体积随身体发育的增大只是心肌细胞体积的增大,其数目并没有变化,心肌细胞一旦发生凋亡就无法再生。因此,基于心肌细胞凋亡的研究具有重要意义。本研究以原代培养的乳鼠心肌细胞作为研究对象,采用低氧培养系统构建体外心肌细胞缺氧模型,检测结果发现在低氧培养条件的诱导下心肌细胞发生显著的凋亡。心肌细胞是终生搏动的细胞,因此能量的充足供应显得尤为重要,而线粒体主要通过氧化磷酸化作用合成 ATP,为细胞各种生理活动提供能量,是真核细胞的能量输出工厂,心肌细胞的线粒体占其体积的 1/3 左右,因此对于心肌细胞而言,线粒体的作用不可或缺^[13-16]。另外,研究也已证实,线粒体是细胞凋亡调控的中心环节,它通过释放膜间隙中的促凋亡蛋白(细胞色素 C、Smac/DIABLO、AIF 和 en donucleaseG 等)来起作用^[17,18]。线粒体膜间隙(IMS)蛋白的释放是由 Bcl-2 家族蛋白调控的。BCL-2 家族蛋白能够诱导线粒体通透性转变孔道(PT 孔道)的开放,导致细胞凋亡^[19]。目前发现,Bcl-2 家族有 20 多个成员,根据其功能可分为抑制细胞凋亡和促进细胞凋亡两大类,抑制细胞凋亡的家族成员以 Bcl-2 和 Bcl-xL 为代表,促进细胞凋亡的家族成员以 Bax, Bad, Bak 和 Bid 为代表,两方的平衡在细胞的生存中起着重要的决定作用。Bcl-2 是 bcl-2 原癌基因的编码产物,它是 Bcl-2 家族的一个重要的抑制凋亡蛋白,Bcl-2 可增强细胞对大多数 DNA 损伤因子的抵抗性,抑制大多数化疗药物所引起的靶细胞凋亡,但其本身并不能抑制这些因素对细胞的损伤,同样地,它也不能促进 DNA 修复。p53 蛋白是 DNA 损伤的一个分子传感器,已证实 Bcl-2 能抑制 p53 介导的凋亡,但不能抑制 p53 向核内转位或者 p53 介导的生长停滞,可能 Bcl-2 的作用是在 DNA 损伤后,阻止激活凋亡机制的信号到达其靶分子,Bax 是 Bcl-2 家族的一个重要的促凋亡蛋白,细胞在正常生理状态下,主要分布在胞质,在凋亡刺激因子的作用下,则从细胞胞质转位到线粒体,并在线粒体外膜形成孔径较大的通道,导致线粒体膜电位的丢失及线粒体内促凋亡分子(如 cyto-C 等)的外流,进而启动细胞凋亡过程^[20],最终激活 caspase-3 引起细胞凋亡^[21-23]。促存活因子可通过调节 Bcl-2/Bax 发挥其抗凋亡作用。而在细胞接受凋亡刺激因素作用后,Bax 的表达水平会发生上调,参与到细胞的凋亡过程^[24]。据此,我们推测缺氧可能是通过调节 Bcl-2 和 Bax 的水平,从而诱导心肌细胞凋亡。而研究结果也显示,缺氧状态下的培养,可以显著上调 Bax 的表达水平,并且降低 Bcl-2 的表达水平。说明缺氧可以通过调节二者的表达水平诱导心肌细胞的凋亡过程。但其调节 Bcl-2 和 Bax 表达的确切机制尚未明确。

银杏叶(Folium Ginkgo)主要含有黄酮类、萜内酯类及少量多酚类、生物碱等成分,其提取物主要为总黄酮类及银杏内酯类等,简称为银杏叶提取物(ginkgo biloba extract,EGb761)。银杏叶提取物是天然的血小板活性因子拮抗剂,研究表明银杏叶提取物具有抗氧化活性、抗氧自由基活性、改善微循环、降低血液黏度等多种药理作用^[25-27],近年研究证实它对心脑血管及多种疾病有确切的治疗作用。在心血管领域中,银杏叶制剂已被用于冠状动脉粥样硬化性心脏病的临床治疗,对于预防心肌缺血-再灌注损伤具有较显著的作用^[28]。有研究显示,银杏叶提取

物中的银杏黄酮成分能诱导体外培养的心肌细胞表达血红素氧合酶-1(HO-1)。而 HO-1 高表达的转基因鼠能抑制缺血再灌注损伤(IRI)心肌细胞凋亡^[29]。另有文献报道,缺血-再灌注损伤的根源在于大量的自由基的产生^[30-32],而银杏叶提取物具有抗氧化作用,同时还具有结合自由基和抗脂质过氧化作用^[29]。在银杏叶提取物抗凋亡作用的研究方面,研究者更为关注其对神经细胞缺血再灌注损伤中的保护作用,而对于心脏抗凋亡作用的研究罕见报道。本研究显示,在银杏叶提取物的干预下,乳鼠心肌细胞的原代培养因为缺氧而发生的细胞凋亡发生了明显的逆转,但是未能达到对照组的水平。说明,银杏叶提取物对缺氧状态下的心肌细胞的凋亡确实存在保护作用。鉴于此前的文献学习及我们前面的研究设想,我们检测了 Bcl-2 家族中的 Bcl-2 及 Bax 的表达,检测结果显示,在银杏叶提取物的拮抗作用下,缺氧状态下原代培养的心肌细胞的 Bcl-2 表达水平显著高于单独缺氧组,同时与之相反的,缺氧状态下心肌细胞的 Bax 表达水平显著低于单独缺氧组。由此我们能够证实银杏叶提取物可以通过调节 Bcl-2 家族的表达水平来拮抗缺氧对心肌细胞的损伤作用。但其确切的作用机制,尚需我们进一步的研究。

综上所述,本研究证实,缺氧状态可以导致乳鼠心肌细胞的凋亡发生,这一作用是经由对 Bcl-2 家族的调控,特别是对 Bcl-2 及 Bax 的调控实现的。而银杏叶提取物可以通过拮抗 Bax 的高表达及提高 Bcl-2 的表达水平,从而逆转心肌细胞的损伤发生,促进心肌细胞的存活。

参考文献(References)

- [1] Hutton D. Acute coronary syndrome-part III [J]. *Plast Surg Nurs*, 2011, 31:108-112
- [2] Kwon JS, Kim YS, Cho AS, et al. The novel role of mast cells in the microenvironment of acute myocardial infarction [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50: 814-825
- [3] Lian WS, Cheng WT, Cheng CC, et al. In vivo therapy of myocardial infarction with mesenchymal stem cells modified with prostaglandin I synthase gene improves cardiac performance in mice [J]. *Life Sci*, 2011, 88:455-464
- [4] Huang M, Nguyen P, Jia F, et al. Double knockdown of prolyl hydroxylase and factor-inhibiting hypoxia-inducible factor with nonviral minicircle gene therapy enhances stem cell mobilization and angiogenesis after myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2011, 124: S46-54
- [5] Sasaki H, Ray PS, Zhu L, et al. Hypoxia/reoxygenation promotes myocardial angiogenesis via an NF kappa B-dependent mechanism in a rat model of chronic myocardial infarction [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33: 283-294
- [6] Xu WQ, Yu Z, Xie Y, et al. Therapeutic effect of intermittent hypobaric hypoxia on myocardial infarction in rats [J]. *Basic Res Cardiol*, 2011, 106: 329-342
- [7] Harary I and Farley B. In vitro studies of single isolated beating heart cells [J]. *Science*, 1960, 131: 1674-1675
- [8] Abbate A, Biondi-Zoccai GG, Bussani R, et al. Increased myocardial apoptosis in patients with unfavorable left ventricular remodeling and early symptomatic post-infarction heart failure [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41:753-760

- [9] Chen Z, Chua CC, Gao J, et al. Prevention of ischemia/reperfusion-induced cardiac apoptosis and injury by melatonin is independent of glutathione peroxidase 1 [J]. *J Pineal Res*, 2009, 46: 235-241
- [10] Juan YS, Chuang SM, Mannikarottu A, et al. Coenzyme Q10 diminishes ischemia-reperfusion induced apoptosis and nerve injury in rabbit urinary bladder [J]. *Neurourol Urodyn*, 2009, 28: 339-342
- [11] Li JS, Zhang W, Kang ZM, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning reduces ischemia-reperfusion injury by inhibition of apoptosis via mitochondrial pathway in rat brain [J]. *Neuroscience*, 2009, 159: 1309-1315
- [12] Loubele ST, Spek CA, Leenders P, van Oerle R, et al. Activated protein C protects against myocardial ischemia/ reperfusion injury via inhibition of apoptosis and inflammation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29: 1087-1092
- [13] Chu CH, Tzang BS, Chen LM, et al. Activation of insulin-like growth factor II receptor induces mitochondrial-dependent apoptosis through G (alpha)q and downstream calcineurin signaling in myocardial cells [J]. *Endocrinology*, 2009, 150: 2723-2731
- [14] Corbucci GC, Lettieri B, Luongo C, et al. Mitochondrial genome involvement in ischemia/ reperfusion-induced adaptive changes in human myocardial cells [J]. *Minerva Anesthesiol*, 2006, 72: 337-347
- [15] Mashimo K, Ohno Y. Ethanol hyperpolarizes mitochondrial membrane potential and increases mitochondrial fraction in cultured mouse myocardial cells [J]. *Arch Toxicol*, 2006, 80: 421-428
- [16] Sgobbo P, Pacelli C, Grattagliano I, et al. Carvedilol inhibits mitochondrial complex I and induces resistance to H₂O₂ -mediated oxidative insult in H9C2 myocardial cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1767: 222-232
- [17] Li G, Xiao Y, Zhang L. Cocaine induces apoptosis in fetal rat myocardial cells through the p38 mitogen-activated protein kinase and mitochondrial/cytochrome c pathways [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 312: 112-119
- [18] Jeong JJ, Ha YM, Jin YC, et al. Rutin from *Lonicera japonica* inhibits myocardial ischemia/reperfusion-induced apoptosis in vivo and protects H9c2 cells against hydrogen peroxide-mediated injury via ERK1/2 and PI3K/Akt signals in vitro [J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47: 1569-1576
- [19] Chauhan D, Li G, Sattler M, et al. Superoxide-dependent and -independent mitochondrial signaling during apoptosis in multiple myeloma cells [J]. *Oncogene*, 2003, 22: 6296-6300
- [20] Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, et al. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96: 5752-5757
- [21] La Piana G, Marzulli D, Consalvo MI, et al. Cytochrome c-induced cytosolic nicotinamide adenine dinucleotide oxidation, mitochondrial permeability transition, and apoptosis [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 410: 201-211
- [22] Taneja N, Tjalkens R, Philbert MA, et al. Irradiation of mitochondria initiates apoptosis in a cell free system [J]. *Oncogene*, 2001, 20: 167-177
- [23] Kukreja RC, Xi L. eNOS phosphorylation: a pivotal molecular switch in vasodilation and cardioprotection [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42: 280-282
- [24] Fehske CJ, Leuner K, Muller WE. Ginkgo biloba extract (EGb761) influences monoaminergic neurotransmission via inhibition of NE uptake, but not MAO activity after chronic treatment [J]. *Pharmacol Res*, 2009, 60: 68-73
- [25] Kampkotter A, Pielarski T, Rohrig R, et al. The Ginkgo biloba extract EGb761 reduces stress sensitivity, ROS accumulation and expression of catalase and glutathione S-transferase 4 in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Pharmacol Res*, 2007, 55: 139-147
- [26] Shi C, Zhao L, Zhu B, et al. Protective effects of Ginkgo biloba extract (EGb761) and its constituents quercetin and ginkgolide B against beta-amyloid peptide-induced toxicity in SH-SY5Y cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 181: 115-123
- [27] Li S, Tang D, Xue Z, et al. Biphasic effect of EGb761 on simulated ischemia-induced rat BMSC survival in vitro and in vivo [J]. *Life Sci*, 2011, 88: 853-863
- [28] Shen J, Lee W, Gu Y, et al. Ginkgo biloba extract (EGb761) inhibits mitochondria-dependent caspase pathway and prevents apoptosis in hypoxia-reoxygenated cardiomyocytes [J]. *Chin Med*, 2011: 6-8
- [29] Song S, Liu N, Liu W, et al. The effect of pretreatment with calcitonin gene-related peptide on attenuation of liver ischemia and reperfusion injury due to oxygen free radicals and apoptosis [J]. *Hepatogastroenterology*, 2009, 56: 1724-1749
- [30] Vajdovich P. Free radicals and antioxidants in inflammatory processes and ischemia-reperfusion injury [J]. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2008, 38: 31-123
- [31] Yildirim A, Onol FF, Haklar G, et al. The role of free radicals and nitric oxide in the ischemia-reperfusion injury mediated by acute bladder outlet obstruction [J]. *Int Urol Nephrol*, 2008, 40: 71-77
- [32] Shen J, Wang J, Zhao B, et al. Effects of EGb 761 on nitric oxide and oxygen free radicals, myocardial damage and arrhythmia in ischemia-reperfusion injury in vivo [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1406: 228-236