doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2021.16.001

银杏提取物中银杏酚酸类物质的毒性和药理活性研究进展*

李 颜,郭 澄△

(上海市第六人民医院药剂科,上海 200233)

摘要:目的 进一步研究和开发银杏酚酸类物质。**方法** 查阅相关文献,对银杏提取物中酚酸类物质的毒性及药理活性进行分析及综合评价。**结果** 银杏提取物中酚酸类物质对模型动物具有一定的致敏作用及肝毒性。体外实验表明,其还具有一定的抗肿瘤、抗炎杀菌、神经保护、抗寄生虫、抗氧化等药理活性。**结论** 现有银杏提取物中酚酸类物质的毒性和药理活性研究多为体外实验,全面、合理地开发和利用银杏酚酸类物质还需进一步的体内实验和临床研究。

关键词:银杏提取物;银杏酚酸;毒性;药理活性

中图分类号:R932;R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1006－4931(2021)16－0001－05

Research Progress of Toxicity and Pharmacological Activity of Ginkgolic Acids in Ginkgo Extract

LI Yan, GUO Cheng

(*Department of Pharmacy, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai, China 200233*)

Abstract: Objective To provide a reference for the further development of ginkgolic acids. **Methods** The toxicity and pharmacological activity of ginkgolic acid in ginkgo extract were analyzed and comprehensively evaluated by consulting the relevant literature. **Results** Ginkgolic acids in ginkgo extract had a certain sensitization effect and hepatotoxicity to model animals. *In vitro* tests showed that it also had anti－tumor, anti－inflammatory and bactericidal, neuroprotective, anti－parasite, anti－oxidant and other pharmacological activities. **Conclusion** The existing research reports on the toxicity and pharmacological activity of ginkgolic acids in ginkgo extract are mostly *in vitro*. The comprehensive and rational development and utilization of ginkgolic acids need further *in vivo* and clinical research.

Key words: ginkgo extract; ginkgolic acids; toxicity; pharmacological activity

银杏 *Ginkgo biloba* L. 属裸子植物银杏门唯一现存物种,被誉为植物界的“活化石”,原产于我国,现广泛种植于全世界。银杏始载于《神农本草经》,但对银杏(白果)、银杏叶药用价值的记载始于宋代。元代医家李杲在《食物本草》中最早记载了银杏的毒性和解毒方法,“小儿食之,发惊,多食,立死”“连饮冷白酒几盏,吐出则生”。后世历代医家多认为银杏有毒或小毒[1]。现代的植物化学研究已从银杏叶中发现 160 多种化合物,主要为银杏黄酮类、银杏内酯类和银杏酚酸(GA)类成分[2－3]。近年来的研究显示,银杏叶中药制剂对冠心病、心绞痛、大脑退行性病变及心血管疾病引起的脑功能障碍、老年痴呆等疗效确切,银杏黄酮类和银杏内酯类是其临床疗效的物质基础。其中,GA 类成分一直被认为是引起临床不良反应的主要物质,有致敏性和致突变毒性,故 GA 类的限量是评价银杏叶制剂质量的指标之一,但同时 GA 类成分也具有抗菌、抗炎、抗肿瘤等生物活性[4]。现就近年来对 GA 的研究进行综述,为其全面、合理地开发和利用提供参考,也提醒审慎思考银杏制剂临床使用中出现不良事件的原因。

1 毒性

1.1 致敏、致突变毒性

1998 年,HAUSEN[5]研究了银杏酸类对豚鼠的过敏反应,结果表明,纯酚酸物质可引起过敏,但银杏叶提取物未引起豚鼠过敏。BERG 等[6]对雄性中国仓鼠肺成纤维细胞的黄嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT)的分析结果显示,3 个主要的 GA(13∶0,15∶1,17∶1)无诱变的致突变性效力。

1.2 肝毒性

LIU 等[7]通过大鼠原代肝细胞和 HepG2 细胞系模型研究Ⅰ相代谢酶对 GA(15∶1)毒性的影响,结果发现 GA(15∶1)对被 CYP1A 和 CYP3A 代谢后的代谢产物具有更强的细胞毒性。JIANG 等[8]以代谢组学方法结合生化测定研究,结果表明,GA(15∶1)可影响模型小鼠肝脏的氧化应激和嘌呤代谢水平,且具有剂量依赖性。YAO 等[9]的研究结果显示,参与 GA(17∶1)的药物代谢酶为 CYP1A2,CYP3A4,UGT1A6,UGT1A9,UGT2B15; 从

*基金项目:国家自然科学基金[81873042]。

第一作者:李颜,女,硕士,主管中药师,研究方向为中药饮片的质量控制与临床应用,(电子信箱)lycft@163.com。

△通信作者:郭澄,男,博士研究生,主任药师,研究方向为临床药学,(电子信箱)gboss@126.com。

MMT实验结果看，GA(17∶1)对HepG2细胞的毒性作用呈时间和浓度依赖性，但对原代肝细胞的毒性低于HepG2细胞，同时也表明CYP1A－和CYP3A介导的代谢增加了GA(17∶1)的毒性。

1.3 其他

德国学者分别在2001年和2002年研究了银杏提取物的神经毒性作用，结果显示，GA浓度依赖性地诱导鸡胚胎体外培养的神经细胞死亡，表现为染色质浓缩、核缩和蛋白质合成抑制剂放线菌酮损失减少，提示细胞死亡，可能的原因是激活蛋白磷酸酶type－2C[10-11]。HECKER等[12]研究了GA对人角质形成细胞系HaCaT和恒河猴肾小管上皮细胞系LLC－MK2的影响，结果显示，GA可能抑制溶酶体酶的形成，诱导乳酸脱氢酶的释放，从而引起HaCaT细胞凋亡。BERG等[6]采用雄性中国仓鼠肺成纤维细胞(V79)评价3个主要GA成分(13∶0，15∶1，17∶1)的细胞毒性，结果显示，24 h内在高于50 mmol/L浓度条件下孵化时，细胞毒性与浓度呈依赖关系。YAO等[13]研究了GA(15∶1)对MDCK细胞的致坏死作用及可能的机制，发现GA(15∶1)诱导细胞周期停滞在G_0/G_1和G_2/M期，影响DNA合成和细胞有丝分裂，最终诱发肾毒性。RYCKEWAERT等[14]通过体外实验和计算方法对GA的毒性机制进行研究，结果显示，GA能调节SIRT活性，其特异性抑制谱和细胞毒与非特异性抑制剂(SIRT1和SIRT2)相当，且不同于SIRT1特异性抑制剂EX－527，非特异性SIRT抑制被认为是其体外细胞毒性的新机制。

2 药理活性

2.1 抗肿瘤

不同学者对GA在抑制肿瘤方面进行了体外研究，包括肺癌、结肠癌、肝癌、胃癌和肾癌。研究结果发现，GA可通过调节不同的信号通路影响肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移。

上皮间质转化(EMT)是肿瘤细胞转移的关键环节。BAEK等[15]研究发现，GA(15∶1)可抑制A549和H1299肺癌细胞的增殖、侵袭和迁移。其抑制了EMT相关基因[牵连蛋白、波形蛋白、N－钙黏蛋白(N－cadherin)，基质金属蛋白酶(MMP)－9，MMP－2，Twist，Snail]的表达，并抑制了转化生长因子－β(TGF－β)诱导的EMT，但不影响A549和H1299细胞中各种上皮标记蛋白(Occludin和E－cadherin)的表达。这些研究表明，GA(15∶1)通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路来抑制肺癌的侵袭和迁移，并为控制肿瘤细胞的转移、扩散提供潜在的治疗性化合物来源。信号转导和转录激活因子3(STAT3)是致癌转录因子，可调节涉及多种血液恶性肿瘤包括多发性骨髓的进展。BAEK等[16]的研究显示，GA(17∶1)表现出减弱STAT3激活的作用，表明其在癌症中有潜在的治疗作用。QIAO等[17]的研究结果表明，GA可减少SW480结肠癌细胞增殖，并抑制迁移，且呈浓度依赖性。进一步研究发现，GA通过诱导腺苷酸激活蛋白激酶(AMPK)激活和抑制侵袭相关蛋白的表达来实现。LIU等[18]研究发现，GA对结肠癌细胞的增殖、迁徙和入侵有抑制作用，GA可引起肿瘤细胞G_0/G_1期阻滞并引发内源性细胞凋亡和ROS调节的自噬，认为GA可作为治疗结肠癌的潜在药物。LI等[19]的研究结果显示，GA可抑制侵袭相关分子(MMP－2和MMP－9)的表达，同时抑制HepG2细胞EMT，进一步深入研究发现，其作用机制为下调HGF/c－Met信号通路。LORENTE等[20]的研究结果显示，GA作为一种SUMO蛋白修饰抑制剂，通过增加TRIB3的表达和减少SUMO1复合物的形成诱导自噬介导的肿瘤细胞死亡，从而达到抑制肿瘤细胞的作用。LIANG等[21]研究发现，GA可通过诱导细胞凋亡和抑制活性氧簇(ROS)调控的STAT3/JAK2信号转导抑制胃癌细胞的生长。ZHU等[22]研究发现，在体内外GA均可通过影响肾细胞癌(RCC)细胞(786－O和A498)G_1期阻滞其活性和增殖。GA还可减少RCC细胞的侵袭和迁移。表皮生长因子受体(EGFR)是GA的重要靶蛋白，GA可显著抑制肾癌的EGFR的信号传导，从而发挥其抗肾癌的作用。

2.2 抗炎杀菌

肠出血性大肠杆菌(EHEC)感染是世界性难题，目前尚无有效治疗方法。生物膜的形成与EHEC感染密切相关，也是抗药性的机制。LEE等[23]研究发现，5 μg/mL的GA(15∶1，17∶1)及100 μg/mL的银杏叶提取物在聚苯乙烯和玻璃表面，以及尼龙膜上均能抑制EHEC生物膜的形成；转录分析结果表明，GA(15∶1)抑制了EHEC中的curli基因和prohage基因表达；此外，还发现GA和银杏叶提取物可抑制3种金黄色葡萄球菌菌株生物膜的形成。该研究结果表明，植物次生代谢产物GA是生物膜抑制剂的重要资源。HUA等[24]使用绿色荧光蛋白(GFP)标记的细胞株研究了GA(15∶1)的抗菌活性及其潜在作用机制，推测GA(15∶1)是通过抑制解淀粉芽孢杆菌的蛋白质活性达到抗菌作用；同时发现，革兰阴性细菌细胞壁中某些成分可拦截GA(15∶1)大量渗透，这也是其对革兰阴性菌无明显抗菌作用的主要原因之一。LI等[25]研究了GA对氧化低密度脂蛋白(ox－LDL)引起的人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)氧化的缓和作用，并明确了其分子机制，结果表明，GA的抗炎特征是通过抑制NF－κB通路减低诱导型一氧化氮(iNOS)和环氧合酶2(COX－2)并激发细胞因子实现的。GERSTMEIER等[26]研究了GA对脂质介质(LMs)生

物合成的影响，结果发现，GA 在基于 mPGES 的药效虚拟筛选和细菌刺激人 M1 和 M2 样巨噬细胞的实验中表现为促炎性 LMs 生物合成酶的有效多靶点抑制剂，该结果有助于解释 GA 复杂的药理作用和毒理学特征。ZHANG 等[27]研究了 GA 抗 ox－LDL 诱导的人微血管内皮细胞（HMEC－1）和人外周单个核细胞（nPBMCs）的氧化和炎性反应，结果表明，GA 可提高 ox－LDL 处理后的细胞活性，且显著降低细胞内的 ROS 和促炎性细胞因子，进一步发现 GA 通过 NF－κB 途径发挥抗炎作用。

2.3 神经保护

银杏叶标准提取物 EGb761 被用于治疗阿尔茨海默病所致记忆力下降、精神分裂症、痴呆症等神经和精神方面的疾病。GA 对记忆力的影响目前仍未知。MANGO 等[28]通过电生理分析了 GA 对海马长时程增强和突触传递的影响，发现 GA 对 Aβ 引起的神经递质损伤释放和突触可塑性具有神经保护作用。α－突触核蛋白（α－syn）集聚而成的胞浆内涵体（Lewy bodies）的积聚是帕金森病的主要病理特征，也能引起多巴胺能神经元变性。VIJAYAKUMARAN 等[29]在 SH－SY5Y 神经母细胞瘤细胞和大鼠原代皮层神经细胞上观察了 GA 对 α－syn 聚集体清除率的影响，结果显示，GA 能促进 α－syn 聚集体的自噬性清除，提示可能在疾病治疗中具有潜在作用。

2.4 抗寄生虫

隐孢子虫是一种原生动物寄生虫，能引起免疫缺陷性腹泻和免疫功能低下性危及生命的腹泻。WU 等[30]通过体外细胞研究发现，GA 类物质对人腺癌（HCT－8）细胞株中隐孢子虫活性有一定的抑制作用，5.0 μg/mL 的 GA 作用 48 h 后培养基中隐孢子虫的数量明显减少，提示 GA 可作为治疗隐孢子虫疾病的潜在候选药物。CHIDIEBERE 等[31]研究了 GA（15∶1）在 HCT－8 细胞株中抗隐孢子虫的活性，以 NTZ（Nitazoxanide）作阳性对照药物，研究发现，GA 单体碳链的长度是影响抗隐孢子虫活性的重要因素，推测较长的烷基链有更高的膜渗透性，从而使药物运输更有效。

2.5 治疗糖尿病

YOON 等[32]利用 C2C12 肌肉细胞和 3T3－L1 前脂肪细胞筛选了 658 种天然化合物对破坏胰岛素信号通路的蛋白酪氨酸磷酸酶（PTP）的影响，结果显示，GA 作为 PTPN9 和 DUSP9 的双重靶向抑制剂，可通过激活 AMPK 信号传导增加 3T2L1 和 C2C12 细胞的葡萄糖摄取，提示 GA 可作为治疗 2 型糖尿病的候选药物。

2.6 抗氧化

泛素化作用于老化/氧化应激中下游环节。CHHUNCHHA 等[33]研究发现，GA 可全面抑制晶状体上皮细胞中的异常类泛素化而减轻氧化应激，并明确了其作用机制是通过改变 Sp1/Prdx6 的失调来实现的。

2.7 其他

甘氨酸受体（GlyRs）属五聚体环受体操作通道的超家族，参与许多生理功能，包括运动、视觉和疼痛。MALEEVA 等[34]通过 CHO－K1 和 N2a 细胞研究了银杏酚酸对甘氨酸受体的作用，结果显示，GA 是 α_1GlyRs 的新型选择性增强剂[34]。LIU 等[35]研究发现，作为泛素化的抑制剂，GA 在间充质干细胞分化（MSCs）中有一定活性，在经过 GA 预处理的小鼠骨髓基质细胞分化中能增强成脂前基因的表达，且在成脂培养基中培养后分化为脂肪细胞的效率更高；但在脂肪细胞形成后期添加 GA 时，脂肪细胞的成熟明显受到抑制，同时多个脂肪生成基因的表达显著下调，提示了 GA 在细胞治疗方面的潜能。BORENSTEIN 等[36]研究了 GA 在体外通过抑制融合蛋白和病毒蛋白抑制单纯疱疹病毒 1 型（HSV－1）的合成，显示出对 GA 非包膜腺病毒也有抑制作用；同时，在感染后给予 GA 同样可抑制 HSV－1 和 CMV 的复制，表明 GA 具有靶向蛋白质和 DNA 合成的二级机制。鉴于 GA 对病毒感染的有效作用，即使在感染开始后，也可用于急性感染（如感染新型冠状病毒、埃博拉病毒、寨卡病毒、甲型流感病毒、麻疹病毒）和用于一些病毒的积极治疗（如 HSV－1、HSV－2、水痘带状疱疹病毒）。

3 思考

银杏制剂临床使用的安全性是药学工作者关注的重点。GA 具有致敏性和致突变毒性，GA 的限量也是评价银杏制剂质量的关键指标之一。1997 年，德国卫生部规定银杏叶制剂中 GA 含量应低于 5 μg/g；《中国药典》自 2010 年版起规定银杏叶提取物中总酚酸不得超过 10 μg/g。GA 是一组混合物，包括 5 种成分，即银杏新酸（13∶0）、银杏酸（15∶1）、十七烷二烯银杏酸（17∶2）、氢化银杏酸（15∶0）和十七烷二烯银杏酸（17∶1）。其中，银杏新酸（13∶0）、银杏酸（15∶1）和十七烷二烯银杏酸（17∶1）占总酚酸的 90%[3]。但对 GA 的毒性研究仍集中在体外的细胞毒性研究，对制剂中 GA 引起人体的毒性损伤尚未见报道。银杏制剂临床需长期服用，GA 的体内代谢情况及是否有蓄积性毒性的研究报道也缺乏。此外，对 GA 药理活性研究是目前研究的热点，特别是其抗肿瘤作用的研究。研究结果提示，GA 可作为潜在的抗肿瘤药物，同样是体外细胞药理学的研究结果，全面、合理地开发和利用 GA 类制剂需做进一步的体内和临床研究。

GA 的研究文献分析，结合回顾性的临床试验分析[37]提示，对银杏提取物制剂致临床不良事件原因的思考除制剂所含成分外，还需考虑患者联合用药时发生的药物相互作用。银杏内酯 A 和 B 能促进肝代谢酶 CYP3A4 转录和蛋白表达，并增加其对底物的代谢能力，黄酮类

成分(槲皮素和山柰酚)可抑制CYP3A4活性,尤其是抑制体内硝苯地平的代谢,且随着黄酮摄入的增加,其程度进一步加强,导致不良反应(头痛、头晕、心率加快、虹膜出血)的发生[38]。也有学者发现,银杏对CYP2C19有明显的诱导作用,可提高奥美拉唑代谢物的血药浓度,但未见其引发不良事件的报道[39]。由于银杏类制剂并非CYP家族的强诱导或强抑制类制剂,根据已有文献和临床观察,对硝苯地平等药物合用引发的不良反应需重点关注[38]。

参考文献

[1] 郑伟然,韩兆忠,王正宽,等. 银杏类制剂安全性研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2019,21(3):437-443.
[2] 杨 扬,周 斌,赵文杰. 银杏叶史话:中药/植物药研究开发的典范[J]. 中草药,2016,47(15):2579-2591.
[3] 王荞薇,谢媛媛,王义明,等. 银杏叶中银杏酚酸类成分含量测定方法研究[J]. 中国药学杂志,2015,50(2):167-173.
[4] 刘平平,潘苏华. 银杏叶制剂中银杏酚酸研究进展[J]. 中国中药杂志,2012,37(3):274-277.
[5] HAUSEN BM. The sensitizing capacity of ginkgolic acid in guinea pigs[J]. American Journal of Contact Dermatitis, 1998, 9(3): 146-148.
[6] BERG K, BRAUN C, KRUG I, et al. Evaluation of the cytotoxic and mutagenic potential of three ginkgolic acids[J]. Toxicology, 2015,327:47-52.
[7] LIU ZH, ZENG S. Cytotoxicity of ginkgolic acid in HepG2 cells and primary rat hepatocytes[J]. Toxicology Letters, 2009, 187(3): 131-136.
[8] JIANG L, SI ZH, LI MH, et al. ^{1}H NMR-based metabolomics study of liver damage induced by ginkgolic acid(15∶1) in mice[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2017, 136: 44-54.
[9] YAO QQ, LI L, XU MC, et al. The metabolism and hepatotoxicity of ginkgolic acid(17∶1) *in vitro*[J]. Chin J Nat Med, 2018, 16(11):829-837.
[10] BARON-RUPPERT G, LUEPKE NP. Evidence for toxic effects of alkylphenols from *Ginkgo biloba* in the hen's egg test (HET)[J]. Phytomedicine, 2001, 8(2):133-138.
[11] AHLEMEYER B, SELKE D, SCHAPER C, et al. Ginkgolic acids induce neuronal death and activate protein phosphatase type-2C[J]. European Journal of Pharmacology, 2001, 430(1):1-7.
[12] HECKER H, JOHANNISSON R, KOCH E, et al. In vitro evaluation of the cytotoxic potential of alkylphenols from *Ginkgo biloba* L. [J]. Toxicology, 2002, 177(2/3):167-177.
[13] YAO QQ, LIU ZH, XU MC, et al. Mechanism for ginkgolic(15∶1)-induced MDCK cell necrosis: Mitochondria and lysosomes damages and cell cycle arrest[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2017, 15(5):375-383.
[14] RYCKEWAERT L, SACCONNAY L, CARRUPT PA, et al. Non-specific SIRI inhibition as a mechanism for the cytotoxicity of ginkgolic acids and urushiols[J]. Toxicology Letters, 2014, 229(2):374-380.
[15] BAEK SH, LEE JH, KIM C, et al. Ginkgolic acid inhibits invasion and migration and TGF-β-induced EMT of Lung cancer cells through PI3K/Akt/mTOR inactivation[J]. Journal of Cellular Physiology, 2016, 232(2):346-354.
[16] BAEK SH, LEE JH, KIM C, et al. Ginkgolic acid C17:1, derived from Ginkgo biloba Leaves, Suppresses Constitutive and Inducible STAT3 Activation through Induction of PTEN and SHP-1 Tyrosine Phosphatase[J]. Molecules, 2017, 22(2):276.
[17] QIAO LN, ZHENG JB, JIN XZ, et al. Ginkgolic acid inhibits the invasiveness of colon cancer cells through AMPK activation[J]. Oncology Letters, 2017, 14(5):5831-5838.
[18] LIU YX, YANG B, ZHANG LR, et al. Ginkgolic acid induces interplay between apoptosis and autophagy regulated by ROS generation in colon cancer[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 498(1):246-253.
[19] LI H, MENG XF, ZHANG D, et al. Ginkgolic acid suppresses the invasion of HepG2 cells via downregulation of HGF/c-Met signaling[J]. Oncology Reports, 2019, 41:369-376.
[20] LORENTE M, GARCIA CA, SALVADOR N, et al. Inhibiting SUMO1-mediated SUMOylation induces autophagy-mediated cancer cell death and reduces tumor cell invasion via RAC1[J]. Journal of Cell Science, 2019, 132(20):jcs234120.
[21] LIANG JR, YANG H. Ginkgolic acid (GA) suppresses gastric cancer growth by inducing apoptosis and suppressing STATS/JAK2 signaling regulated by ROS[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020, 125:109585.
[22] ZHU C, NA N, SHENG HB, et al. Ginkgolic acid inhibits the growth of renal cell carcinoma cells via inactivation of the EGFR signaling pathway[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2020, 19:2949-2956.
[23] LEE JH, KIM YG, RYU SY, et al. Ginkgolic acids and *Ginkgo biloba* extract inhibit Escherichua colio157:H7 and *Staphylococcus aureus* biofilm formation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 174:47-55.
[24] HUA ZB, WU CE, FAN GJ, et al. The antibacterial activity and mechanism of ginkgolic acid C15∶1[J]. BMC Biotechnology, 2017, 17(1):5.
[25] LI J, LI AH, LI M, et al. Ginkgolic acid exerts an anti-inflammatory effect in human umbilical vein endothelial cells induced by ox-LDL [J]. Pharmazie, 2018, 73(7):408-412.
[26] GERSTMEIER JA, SEEGERS JL, WITT FJ, et al. Ginkgolic acid is a multi-target inhibitor of key enzymes in pro-inflammatory lipid mediator biosynthesis[J]. Frontiers in Pharmacology, 2019, 10:797.
[27] ZHANG J, YAN JG. Protective effect of ginkgolic acid in attenuationg LDL induced inflammation human peripheral blood mononuclear cells via altering the NF-κB signaling pathway[J]. Frontiers in Pharmacology, 2019, 10:1241.