

银杏叶提取物对急性心肌梗死大鼠心肌细胞的保护作用

朱磊,傅鸣郁,王明光,田静,何秀华,安新江

[摘要]目的:探讨银杏叶提取物(EGb761)对急性心肌梗死(AMI)大鼠心肌细胞的保护作用。方法:雄性SD大鼠30只,随机均分为假手术组(A组)、AMI组(B组)和EGb761组(C组)。C组腹腔注射EGb761(20 mg/kg),A组和B组腹腔注射等容量的生理盐水,每天1次,共3天。实验大鼠于第3天开胸,A组冠脉下穿线但不结扎冠状动脉,B组和C组结扎冠状动脉左前降支,制备AMI模型。实验终点,取腹主动脉血测定血清中超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量,观察各组大鼠心肌细胞凋亡指数(AI)、细胞色素C(Cyt-c)和Caspase-9表达以及线粒体膜电位的变化。结果:与B组相比,C组SOD活性明显增高,MDA含量显著下降,AI及Caspase-9表达明显降低,Cyt-c胞质表达显著减少而线粒体表达显著增加,线粒体膜电位明显升高($P < 0.01$)。结论:EGb761可减少AMI缺血区心肌细胞凋亡,其机制可能与减轻氧化应激,保护线粒体功能,减少Cyt-c释放入胞质有关。

[关键词] 心肌梗死;银杏叶提取物;细胞凋亡;线粒体膜电位;大鼠,Sprague-Dawley

[中国图书资料分类号] R 542.22 **[文献标识码]** A

Protection of *Ginkgo biloba* extract on cardiomyocyte after acute myocardial infarction in rats

ZHU Lei, FU Ming-Yu, WANG Ming-guang, TIAN Jing, HE Xiu-hua, AN Xing-jiang
(Department of Cardiology, Xuzhou Children's Hospital, Xuzhou Jiangsu 221006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of *Ginkgo biloba* extract (EGb761) on cardiomyocyte after acute myocardial infarction (AMI) in rats. **Methods:** Thirty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham group (group A), AMI group (group B), EGb761 group (group C), ten in each group. In group C, EGb 761 (20 mg/kg) was injected intraperitoneally, in group A and group B, normal saline (20 mg/kg) was injected intraperitoneally. All the liquid was injected once a day for 3 days. The animal model was established by ligating left anterior descending coronary artery on the third day. The operation in group A was similar to group B except for ligating the left anterior descending coronary artery. At the end of experiment, the levels of the superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), apoptotic index (AI), mitochondrial membrane potential and the expression of Cyt-c and caspase-9 were measured. **Results:** Compared with group B, the contents of MDA, AI, caspase-9 and cytoplasmic Cyt-c were significantly lower in group C ($P < 0.01$). The level of SOD, the expression of mitochondrial Cyt-c and mitochondrial membrane potential were significantly higher in group C ($P < 0.01$). **Conclusions:** EGb 761 can decrease apoptosis in ischemic myocardium after acute myocardial infarction. The mechanism is possibly that EGb 761 can decrease oxidative stress, protect mitochondrial functions and reduce the release of Cyt-c from mitochondria to cytoplasm.

[Key words] myocardial infarction; *Ginkgo biloba* extract; apoptosis; mitochondrial membrane potential; rats, Sprague-Dawley

已有研究^[1]证实,急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)后缺血有大量心肌细胞凋亡存在,这与氧自由基大量堆积,损伤线粒体有密切关系。线粒体是细胞凋亡的一个关键开关,因此减轻氧化应激损伤,保护线粒体结构和功能,就能够有效地抑制细胞凋亡,从而起到保护心脏的功能。研究^[2]表明,银杏叶提取物能够清除氧自由基,具有较强的抗氧化作用。本实验通过建立大鼠AMI

模型,观察银杏叶提取物(EGb761)对AMI缺血区心肌细胞凋亡的影响,并初步探讨其机制,旨在为其临床应用和基础研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 健康成年雄性SD大鼠30只,由徐州医学院动物中心提供,体重250~300g。超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;细胞凋亡检测试剂盒及免疫组织化学试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司;组织线粒体分离试剂盒购于江苏海门市碧云天生物技术有限公司;细胞色素C(Cyt-c)一抗购于巴傲得生物科技有限公司;线粒体膜电位测定试剂盒购于上

[收稿日期] 2010-08-31

[作者单位] 江苏省徐州市儿童医院 内科, 221006

[作者简介] 朱磊(1985-), 硕士, 住院医师。

[通讯作者] 安新江, 硕士研究生导师, 副教授, 主任医师。

海杰美基因医药科技有限公司;荧光分光光度计由徐州医学院麻醉学实验室提供;EGb761 购于德国威玛舒培博士药厂。

1.2 动物分组及模型制备 30 只大鼠随机均分成假手术组(A 组)、AMI 组(B 组)和 EGb761 处理组(C 组)。A、B 组实验前 3 天腹腔注射生理盐水 20 mg/kg,每天 1 次。C 组给予 EGb761 20 mg/kg,方法同上。所有大鼠于第 3 天注射药物后制备 AMI 动物模型。10% 水合氯醛(0.35 ml/100 g)腹腔注射麻醉大鼠,胸骨左缘 0.5 cm 处纵行切口 3 cm,依次切开皮肤、浅筋膜和深筋膜,钝性分离胸大肌和前锯肌,从 3、4 肋间进胸。选择左心耳下方 2 mm 处 5-0 带线缝合针穿过心肌表层结扎。以心电图 ST 段弓背向上抬高 >0.2 mV, T 波高耸,心肌颜色变暗,作为模型成功的标志。A 组不结扎冠状动脉,其余处理相同。结扎冠状动脉左前降支 6 h 后,由腹主动脉取血测定血清中 SOD 活性和 MDA 含量;取心脏标本备用。

1.3 SOD 和 MDA 的测定 采用化学比色法,按试剂盒说明书测定 SOD 活性和 MDA 含量。

1.4 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡 严格按照 TUNEL 凋亡试剂盒说明书操作。每张切片于梗死区和非梗死区交界处随机选取 5 个高倍视野,分别计数凋亡心肌细胞和心肌细胞总数,以凋亡心肌细胞占心肌细胞总数的百分比作为凋亡指数(apoptotic index, AI)。

1.5 浆膜下线粒体(SSM)的分离 按组织线粒体分离试剂盒使用说明书提取线粒体,并保存备用。

1.6 Western blot 测定胞质和线粒体中 Cyt-c 的表达 实验终点,取新鲜心肌组织 0.1 g,严格按照组织线粒体分离试剂盒操作步骤提取胞质和线粒体蛋白。应用 BCA 蛋白定量试剂盒(Pierce, UK)进行蛋白定量。以每个样品的总蛋白为 20 μ g 上样,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜至 PVDF 膜上,一抗封闭 4 $^{\circ}$ C 过夜,二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, NBT/BCIP 显色。Image J 图像分析仪进行半定量分析。

1.7 免疫组织化学 S-P 法检测 Caspase-9 表达 免疫组织化学染色后,在高倍显微镜下拍摄图片,采用 Image Pro Plus 6.0 软件分析各组阳性染色平均吸光度值。

1.8 荧光分光光度计检测线粒体膜电位 心肌标本采集后,参照活体组织线粒体内膜功能(膜电位)荧光测定试剂盒说明书和 Xu 等^[3]介绍的方法检测线粒体膜电位。

1.9 统计学方法 采用方差分析和 q 检验。

2 结果

在大鼠 AMI 模型制作和实验过程中,大鼠死亡 3 只,故最后进入终点分析的实验动物数量为 27 只,其中 A 组 9 只, B 组 9 只, C 组 9 只。

2.1 各组 SOD、MDA 的变化 B 组大鼠血清 SOD 水平显著低于 A 组($P < 0.01$),而 AMI 组 MDA 含量较 A 组明显升高($P < 0.01$),说明急性心肌缺血导致组织的抗氧化能力显著降低。与 B 组比较, C 组血清 SOD 活性水平高, MDA 含量低,差异有统计学意义($P < 0.01$)(见表 1)。

表 1 3 组 SOD 和 MDA 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	SOD(U/ml)	MDA(μ mol/L)
A	9	213 \pm 14 [#]	4.2 \pm 0.4 [#]
B	9	173 \pm 16 [*]	6.6 \pm 0.7 [*]
C	9	187 \pm 13 ^{**}	5.4 \pm 0.6 ^{**}
F	—	19.90	42.77
P	—	<0.01	<0.01
MS _{组内}	—	207.000	0.337

q 检验:与 A 组比较^{*} $P < 0.01$;与 B 组比较[#] $P < 0.01$

2.2 各组大鼠心肌细胞 AI 及线粒体膜电位的比较

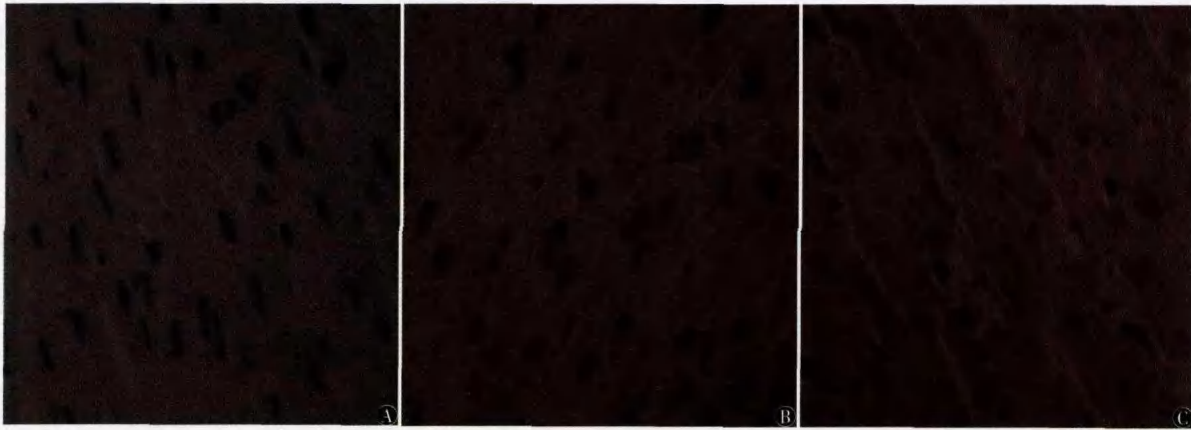
B 组可见大量凋亡细胞,与 A 组比较差异具有统计学意义($P < 0.01$); C 组凋亡细胞阳性率明显降低,与 B 组比较差异具有统计学意义($P < 0.01$)。与 A 组相比,其余 2 组线粒体膜电位明显降低;与 B 组相比, C 组膜电位增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)(见表 2 及图 1)。

表 2 3 组缺血区心肌细胞凋亡率及线粒体膜电位的比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	细胞凋亡率(%)	线粒体膜电位
A	9	1.28 \pm 0.49 [#]	0.77 \pm 0.04 [#]
B	9	23.13 \pm 0.58 [*]	0.39 \pm 0.03 [*]
C	9	16.26 \pm 0.47 ^{**}	0.53 \pm 0.04 ^{**}
F	—	4 696.64	270.24
P	—	<0.01	<0.01
MS _{组内}	—	0.266	0.001

q 检验:与 A 组比较^{*} $P < 0.01$;与 B 组比较[#] $P < 0.01$

2.3 Western blot 检测各组 Cyt-c 表达 与 A 组相比,其余 2 组线粒体 Cyt-c 水平降低,胞质 Cyt-c 水平升高;与 B 组相比, C 组胞质 Cyt-c 水平降低,线粒体 Cyt-c 水平增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)(见表 2 及图 2)。



A:A 组;B:B 组;C:C 组

图 1 TUNEL 法检测各组心肌细胞凋亡

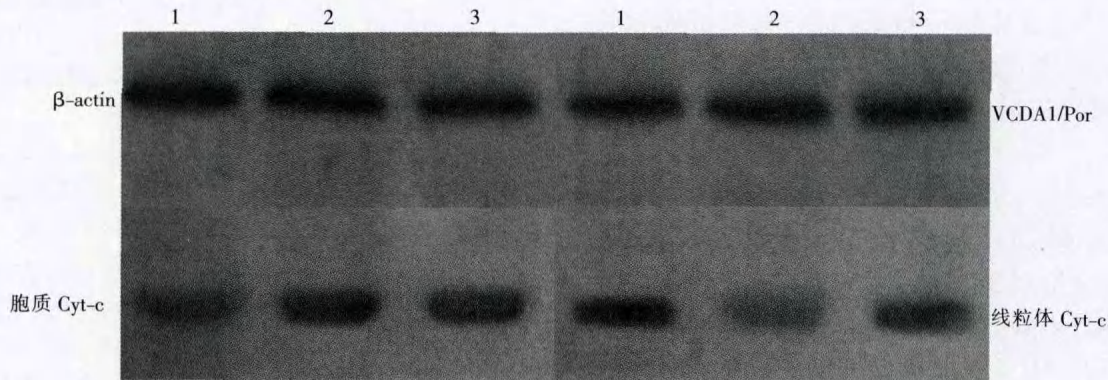
表 3 Western blot 检测各组 Cyt-c 表达的比较

分组	n	胞质相对灰度值	线粒体相对灰度值
A	9	0.574 ± 0.030 [#]	0.984 ± 0.027 [#]
B	9	0.906 ± 0.021 [*]	0.664 ± 0.035 [*]
C	9	0.785 ± 0.053 ^{*#}	0.723 ± 0.051 ^{*#}
F	—	203.64	190.29
P	—	<0.01	<0.01
MS _{组内}	—	0.01	0.01

q 检验:与 A 组比较 *P<0.01;与 B 组比较#P<0.01

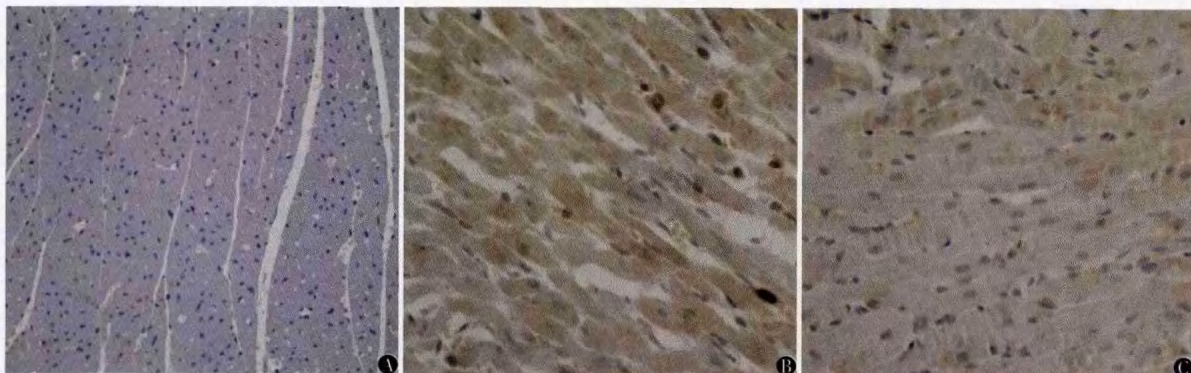
2.4 免疫组织化学检测各组 Caspase-9 表达的比较

用平均吸光度值(optical density, OD)代表各组心肌组织 Caspase-9 表达情况。A 组很少有 Caspase-9 表达(见图 3A),B 组 Caspase-9 表达明显增加(见图 3B),EGb 干预显著减少了 B 组 Caspase-9 表达(见图 3C)。A 组和 C 组 OD 值分别为 0.021 ± 0.003、0.079 ± 0.004,明显低于 B 组的 0.142 ± 0.002(P < 0.05, F = 2 555.1, MS_{组内} = 0.001)。



1:A 组;2:B 组;3:C 组

图 2 Western blot 检测各组 Cyt-c 表达



A:A 组;B:B 组;C:C 组

图 3 免疫组织化学检测各组 Caspase-9 表达水平

3 讨论

细胞凋亡已被证明是心肌缺血后心肌损伤的重要形式,在AMI早期阻断凋亡信号转导途径,减少细胞凋亡成为保护缺血心肌的一种有效途径^[4]。心肌缺血时心肌组织中不但氧自由基增多,而且清除自由基的能力亦下降,造成氧自由基大量堆积,介导氧化应激损伤。有研究^[5]证实,线粒体是细胞凋亡的一个关键开关,几乎所有致细胞凋亡的刺激因素都会诱发线粒体结构破坏和功能障碍。线粒体膜电位对维持线粒体的正常功能是必要的,一旦线粒体膜电位耗损,细胞就会进入不可逆凋亡过程;如能抑制线粒体膜电位下降,则可能阻抑细胞凋亡的发生,说明线粒体膜电位下降为凋亡的特征性改变。同时,对凋亡的进一步研究^[6-7]发现,在各种凋亡因子作用下线粒体可向胞质释放一些凋亡相关因子,启动凋亡反应,其中最重要的就是Cyt-c。Cyt-c从线粒体释放入胞质被认为是各种死亡模型诱导细胞凋亡中的重要环节。一旦胞质中出现Cyt-c,其可与Caspase-9和Apaf-1形成凋亡小体,激活Caspase-9,后者进一步切割活化下游凋亡执行者Caspase-3,Caspase-3则通过作用于核酸内切酶,造成胞核内DNA受损,导致心肌细胞发生凋亡,而减少线粒体释放Cyt-c,可以减少细胞凋亡和缺血心肌梗死面积^[8]。

体内外实验发现,EGb761能够捕获多种氧自由基,具有较强的抗氧化作用。有实验^[9]表明,EGb761通过抑制自由基的大量释放,并能增加SOD的活性,使自由基清除量增加,对脑缺血损伤有明显的保护作用。MDA是脂质过氧化的分解产物之一,其值间接反映机体组织细胞受自由基损伤程度;SOD为细胞内一种抗氧化酶,它可以通过歧化作用清除超氧阴离子,保护机体免受氧自由基损伤,其值可间接反映机体清除氧自由基的能力。本实验显

示,EGb761能显著降低AMI损伤大鼠血浆中MDA的含量,提高SOD的活性,减轻氧化应激损伤,保护心肌细胞线粒体结构和功能,减少细胞色素C的释放,减少心肌细胞凋亡,为其在临床上治疗AMI患者提供了实验数据和理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] Factor VM, Laskowska D, Jensen MR, *et al.* Vitamin E reduces chromosomal damage and inhibits hepatic tumor formation in a transgenic mouse model [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(5):2196-2202.
- [2] Liu XP, Luan JJ, Christopher EG. Comparison of the antioxidant activity amongst ginkgo biloba extract and its main components [J]. *Chinese Medicinal Materials*, 2009, 32(5):736-740.
- [3] Xu M, Wang Y, Ayub A. Mitochondrial K(ATP) channel activation reduces anoxic injury by restoring mitochondrial membrane potential [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 281(3):1295-1303.
- [4] Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, *et al.* Apoptosis in relevant clinical situations: contribution of apoptosis in myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 45(3):630-641.
- [5] Gill C, Mestril R, Samali A, *et al.* Losing heart: the role of apoptosis in heart disease—a novel therapeutic target [J]. *FASEB J*, 2002, 16(2):135-146.
- [6] Prunier F, Kawase Y, Gianni D, *et al.* Prevention of ventricular arrhythmias with sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump overexpression in a porcine model of ischemia reperfusion [J]. *Circulation*, 2008, 118(6):614-624.
- [7] Sukoyan GV, Kavazde IK. Effect of nadin on energy supply system and apoptosis in ischemia-reperfusion injury to themyocardium [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2008, 146(3):321-324.
- [8] Qian LP, Zhu SS, Cao JL, *et al.* Isoflurane preconditioning protects against ischemia-reperfusion injury partly by attenuating cytochrome c release from subsarcolemmal mitochondria in isolated rat hearts [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(7):813-820.
- [9] 李建军, 张晓雷, 王小姗, 等. 银杏叶提取物(EGb761)对鼠脑缺血半暗带神经细胞凋亡及超微结构的影响 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2008, 33(4):400-402.

(本文编辑 刘璐)

关于本刊启用稿件在线处理系统的通知

为了加快稿件处理速度,缩短稿件出版周期,方便广大作者投稿及查询稿件处理情况,本刊已开通稿件在线处理系统(<http://xuebao.bbmc.edu.cn>),请作者尽可能应用稿件在线处理系统进行投稿、查稿。本刊稿件在线处理系统的在线办公中心设有作者在线投稿、作者在线查稿、专家在线审稿、编委在线审稿、编辑远程办公和主编在线办公六部分。作者第一次通过该系统向本刊投稿请先注册,并记住注册的用户名和密码。注册登录后就可以向本刊投稿。也可以通过您已注册的用户名和密码登录作者在线查稿,了解稿件处理状态。请不要重复注册,否则可能导致您信息查询不完整。

《蚌埠医学院学报》编辑部