

银杏提取物对家兔缺血-再灌注心功能和心肌 P-S 及 NOS 表达的影响^{*}

张蓓¹, 秦际德^{2**}, 刘兴德^{2***}

(1. 贵阳医学院附院 超声中心, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院附院 心血管内科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 观察银杏提取物 (GBE) 对心肌缺血-再灌注 (I/R) 家兔心功能及心血管内皮细胞中 P-选择素 (P-S)、一氧化氮合酶 (NOS) 表达的影响。方法: 家兔 (24 只) 随机分为 3 组, 假手术组 (Sham 组)、心肌缺血再灌注组 (I/R 组) 及 GBE 干预组 (GBE 组), 记录各组家兔 I/R 180 min 时的心脏左室收缩压 (LVSP)、左室舒张末压 (LVEDP) 和左室内压最大收缩-舒张变化速率 ($\pm dp/dt_{max}$), 用 RT-PCR 技术检测 P-S、NOS。结果: 与 Sham 组比较, I/R 组 LVSP 和 $\pm dp/dt_{max}$ 显著降低, LVEDP 显著增高, 有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 I/R 组比较, GBE 组 LVSP 和 $\pm dp/dt_{max}$ 显著增高, LVEDP 显著降低, 有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 I/R 组比较, GBE 心血管内皮细胞 P-S 表达显著减少, 而 NOS 表达显著增多, 有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: GBE 能够改善心肌 I/R 家兔的心功能, 这可能与下调血管内皮细胞 P-S 的表达、上调 NOS 的表达有关。

[关键词] 银杏提取物; 心功能; 再灌注损伤; P-选择素; 一氧化氮合酶

[中图分类号] R543.31 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2013)01-0016-03

The Effects of GBE on Cardiac Function and Expression of P-S and NOS during Ischemia/Reperfusion of Myocardium in Rabbits and Its Possible Mechanisms

ZHANG Bei¹, QIN Jide², LIU Xingde²

(1. Ultrasonic Examination Center, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Cardiovascular Medicine, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of *Ginkgo biloba* extract (GBE) on cardiac function and expression of P-selection (P-S) and NOS in vascular endothelium cells of myocardium during ischemia/reperfusion (I/R) in rabbits. **Methods:** Twenty-four rabbits were randomly divided into 3 groups (8 in each): Sham-operated group (Sham), ischemia/reperfusion group (I/R), and GBE intervention group (GBE). Left ventricular systolic pressure (LVSP), left ventricular end-diastolic volume (LVEDP), and maximal changing rate of left ventricular inner ($\pm dp/dt_{max}$) of rabbits in 180min after I/R were recorded. Immunohistochemical method was used to detect expression of P-S ion and NOS in myocardium. **Results:** Of group I/R, LVSP and $\pm dp/dt_{max}$ were significantly lower, and LVEDP was significantly higher than those of group Sham ($P < 0.05$); In group GBE, LVSP and $\pm dp/dt_{max}$ were remarkably higher, but LVEDP was remarkably lower than those in group I/R ($P < 0.05$); Compared with that of group I/R, LVSP and $\pm dp/dt_{max}$ of group GBE increased remarkably, while LVEDP decreased remarkably ($P < 0.05$). Compared with that of group I/R, P-S expression of group GBE decreased remarkably, while eNOS increased remarkably ($P < 0.05$). **Conclusion:** GBE could improve cardiac function during myocardium I/R in rabbits. The mechanisms might be down regulation of P-S expression in vascular endothelium cells, and up regulation of eNOS expression.

*[基金项目] 贵州省高层次人才科研条件特助经费资助项目, TZJF(2006)12 号

** 贵阳医学院 2007 级硕士研究生 (现工作单位: 河南商丘市第一人民医院心内科一病区)

*** 通信作者 E-mail: lxd@gmc.edu.cn

[Key words] *Ginkgo biloba* extract; cardiac function; reperfusion injury; P-selection; nitric-oxide synthase

冠心病心肌缺血事件最有效的治疗措施是尽快开通闭塞的血管使血运重建。然而血运重建往往对缺血的心肌产生进一步的损伤即心肌缺血-再灌注 (ischemia/ reperfusion, I/R) 损伤, I/R 可导致再灌注心律失常、梗死面积扩大、心肌凋亡等后果。I/R 损伤心肌有多因素作用, 其中内皮功能的损伤起着重要的作用^[1]。银杏是现存种子植物中最古老的孑遗植物, 在我国药用已有 5 000 多年的历史。较多的临床及基础研究证明银杏的主要提取物 (*Ginkgo biloba* extract, GBE) 具有缩小急性心肌梗死范围、减轻梗塞程度、减轻心肌 R/I 损伤、改善心梗患者心脏功能的作用^[2]。本研究于 2010 年 6 ~ 10 月通过对在家兔心肌缺血再灌注诱导内皮细胞损伤模型予银杏达莫干预, 测量 P-选择素 (P-selection, P-S) 和一氧化氮合酶 (nitricoxide synthase, NOS) 的变化, 旨在探讨银杏达莫对损伤的心肌内皮细胞的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

银杏达莫注射液由贵州益佰制药股份公司提供 (批号: 080510), P-选择素试剂盒 (南京建成生物工程研究所)、NOS 试剂盒 (南京建成生物工程研究所), BL-420E 生物机能实验系统 (成都泰盟科技有限公司生产)。

1.2 试验动物模型及分组

选用健康新西兰大白兔 24 只, 雌雄不拘, 由贵阳医学院实验动物中心提供, 体重 2.0 ~ 2.5 kg。家兔随机分为 3 组, 每组 8 只。假手术组 (Sham 组): 开胸后在冠状动脉左前降支 (LAD) 穿线但不结扎冠状动脉, 穿线 30 min 后即给予静脉滴注生理盐水 30 ml。缺血再灌注组 (I/R 组): 结扎左前降支 30 min 后松开结扎线进行心肌再灌注, 同时

给予静脉滴注生理盐水 30 ml, 再灌注时限 180 min; GBE 干预组: 结扎左前降支 30 min 后松开结扎线进行心肌再灌注, 同时给予银杏达莫 (2.20 ml/kg) 加入生理盐水 30 ml 静脉滴注, 再灌注时限 180 min^[3]。

1.3 家兔心功能指标的检测

对 I/R 组、GBE 组家兔于实验终点用 BL-420E 生物机能实验系统记录心脏血流动力学指标 LVSP、LVEDP 及 $\pm dp/dt_{max}$; 对 Sham 组于冠状动脉下穿线 210 min 后进行上述心脏血流动力学指标测定。

1.4 心肌 P-S 和 NOS 表达的检测

缺血再灌注结束后处死动物, 取各组家兔左心室结扎处以下的心室肌组织缺血区缺血半暗带心肌标本约 100 mg, 置于液氮中, 用 1 ml Trizol 液进行匀浆, 严格按照说明规定操作步骤提取左心室组织的总 RNA, 对总 RNA 进行 RT-PCR 扩增, 根据试剂盒说明书检测 P-选择素 mRNA 的表达及心肌 NOS 表达。

1.5 统计学处理

实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 11.5 软件进行统计分析, 多组间比较采用 ANOVA 方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 GBE 对家兔 I/R 心肌 LVSP、LVEDP 和 $\pm dp/dt_{max}$ 的影响

与 Sham 组比较, I/R 组 LVSP 和 $\pm dp/dt_{max}$ 显著降低, LVEDP 显著增高, 有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 GBE 组的 LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$ 和 LVEDP 无显著变化; 与 I/R 组比较, GBE 组 LVSP 和 $\pm dp/dt_{max}$ 显著增高, LVEDP 显著降低, 有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 GBE 对家兔 I/R 心肌 LVSP、LVEDP 和 $\pm dp/dt_{max}$ 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effects of GBE on LVSP, LVEDP and $\pm dp/dt_{max}$ of rabbit myocardium during I/R

组别	n	LVSP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	$\pm dp/dt_{max}$ (mmHg/S)	$- dp/dt_{max}$ (mmHg/S)
Sham	8	134.61 \pm 4.24	7.44 \pm 1.58	7 085.13 \pm 575.32	-5 188.37 \pm 677.01
I/R	8	116.88 \pm 7.01 ⁽¹⁾	10.33 \pm 1.63 ⁽¹⁾	5 421.72 \pm 762.95 ⁽¹⁾	-3 872.96 \pm 768.78 ⁽¹⁾
GBE	8	128.27 \pm 9.49 ⁽²⁾	7.75 \pm 1.74 ⁽²⁾	6 411.54 \pm 559.38 ⁽²⁾	-4 465.20 \pm 470.16 ⁽²⁾

⁽¹⁾ 与 Sham 组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与 I/R 组比较, $P < 0.05$

2.2 GBE 对心肌 I/R 家兔冠状动脉血管内皮 P-S 和 NOS 表达的影响

与 I/R 组比较,GBE 组冠状动脉血管内皮细胞 P-S 表达显著减少,而 NOS 表达显著增多,有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 GBE 对心肌 I/R 家兔冠状动脉血管内皮 P-S 和 NOS 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Effect of GBE on P-S and NOS in coronary artery endothelium cell of I/R rabbits

组别	n	P-S	NOS
I/R	8	125.96 ± 27.16	122.89 ± 26.40
GBE	8	106.19 ± 14.24 ⁽¹⁾	142.30 ± 12.75 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ 与 I/R 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

3.1 GBE 对心肌 I/R 家兔心功能的影响

心肌 I/R 损伤可引起心肌组织结构和心肌功能障碍,表现为心肌静止张力增加,发展张力低下,心肌收缩功能降低。血流动力学指标在一定程度反应了左心功能。本研究中与 Sham 组比较,I/R 组 LVSP 和 $\pm dp/dtmax$ 显著降低,LVEDP 显著增高,表明缺血再灌注后家兔心肌心功能明显降低。使用银杏达莫后,与 I/R 组比较,GBE 组 LVSP 和 $\pm dp/dtmax$ 显著增高,LVEDP 显著降低。表明家兔急性心肌缺血后,在心肌再灌注之前或其后给予 GBE 能显著改善心肌 I/R 家兔的心功能,提示临床上急性心肌梗死患者在血运重建之前或血运重建之后给予银杏制剂可能会改善由于血运重建而导致的心功能降低。

3.2 GBE 对心肌 I/R 家兔冠状动脉血管内皮 P-S 表达的影响

P-S 是由血管内皮细胞分泌的,具有多种功能,在生理情况下,P-S 介导的细胞黏附是机体正常防御、生理止血得以存在和维持的重要基础;缺血再灌注损伤中缺氧、氧自由基、胶原、去甲肾上腺素及其它炎症介质均可以促进 P-S 在血小板或内皮细胞上表达,在血栓形成过程中,P-S 起着始动作用,单核细胞黏附于缺损处的血小板,促使纤维沉积;在炎症反应中,受伤的内皮内膜下表达 P-S,与循环中的白细胞捆绑、结合,抵抗高的血流切应力,促进白细胞释放组织因子和炎症因子,有利于其它黏附分子的共同作用,使细胞间的黏附由可逆

转为不可逆^[4]。因此,在血栓形成、炎症反应中,P-S 介导的白细胞与血小板、内皮细胞的黏附起着重要作用,P-S 是衡量血小板活化状态的直接敏感指标^[5]。研究发现,P-S 介导的中性粒细胞与内皮细胞的相互作用在 I/R 损伤中起重要作用,这一切使得心肌组织中大血管血流恢复,但局部微循环灌注仍存在不足,造成心肌的缺血再灌注损伤^[6]。

本研究中,与 I/R 组比较,GBE 组冠状动脉血管内皮细胞 P-S 表达显著减少,提示 GBE 可能通过抑制 P-S 的表达而改善心肌 I/R 家兔的心功能。

3.3 GBE 对心肌 I/R 家兔冠状动脉血管内皮 NOS 表达的影响

NOS 有 3 种亚型,神经型 NOS-nNOS,内皮型 NOS-eNOS,诱导型 NOS-iNOS。Gok 等^[7]的研究表明,在大鼠心肌缺血再灌注损伤时,eNOS 有抗损伤作用,心肌梗死时,eNOS 的活性增强。目前发现 eNOS 存在于多种细胞中,内皮细胞在切应力、低氧和其他介质作用下,NOS 和 L-精氨酸合成的 NO,NO 是反映内皮细胞功能的比较敏感的指标,其可以抑制血小板和中性粒细胞的聚集,消除体内过多的氧自由基,抑制内皮素-1 的缩血管效应,从而导致血管舒张并抑制血管平滑肌增殖,直接调节血管张力,抑制血小板激活、聚集及血管内皮黏附,激活 cGMP 依赖的蛋白激酶产生各种生物活性,对心肌缺血再灌注损伤的内皮细胞产生较好的保护作用^[8]。NOS 的活性可提高 NO 生成量,舒张冠状动脉血管,进而改善心肌缺血,改善心功能。

本研究中,与 I/R 组比较,GBE 组冠状动脉血管内皮 NOS 表达显著增多,提示 GBE 可能通过增加 eNOS 表达而改善心肌 I/R 家兔的心功能。

综上所述,银杏达莫注射液具有显著的保护内皮细胞的作用,其对减少心肌缺血再灌注诱导内皮细胞损伤可能是通过抑制 P-S 的表达,增加 eNOS 表达,从而保护血管内皮功能,减轻 R/I 对心肌的损伤,改善心脏功能。银杏达莫注射液对减轻心肌缺血再灌注损伤可能具有较大的价值。

4 参考文献

- [1] 王彩歌,王永霞. 心肌缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 世界中西医结合杂志,2012(8):734-736.
- [2] 裴东. 银杏达莫注射液对急性心肌梗死缺血-再灌注损伤的防护作用[J]. 临床和实验医学杂志,2010(15):1146-1147.

(下转第 23 页)

miR-200b 的启动子区域存在 Smad3 的结合位点, Smad3 可能作为转录激活剂而促进 miR-200a 及 miR-200b 的转录。本课题组前期研究及其他学者研究也发现,随着肝纤维化的不断发展,细胞因子 TGF- β 产生逐渐增多,可通过与细胞膜上的特异性受体结合后使激活 Smad 蛋白(Smad_{2/3})及共同通路型 Smad 蛋白(Smad₄)活化并转入核内,调节相关基因(如胶原蛋白 I 等)的转录,引起 ECM 大量沉积,出现肝纤维化^[9-11]。在肾纤维化研究中发现,TGF- β 可以增加系膜细胞 miRNA-192 的表达^[12]。还有研究发现大鼠肝硬化时 miR-21 表达明显增加,通过体外培养 HSC,进一步发现 miR-21 可以通过干扰 Smad7 的表达,从而促进 TGF- β 介导的肝纤维化^[13]。因此,有理由相信,肝纤维化发生时 miR-141 表达的增高可能与 TGF- β /Smad 信号通路活化的调控有关,但有关 miR-141 上调的分子机制有待进一步研究与证实。

综上所述,肝纤维化是肝脏受到慢性损伤时的过度修复反应,造成肝小叶重建,假小叶和结节形成,因此有关肝纤维化发病机制的深入研究是临床上有效防治肝纤维化进一步发展的理论基础。miR-141 作为转录后调控领域的新成员,具有强大的基因调控能力,关于 miR-141 在肝纤维化发生发展中的作用及其调控机制等诸多方面的研究将有助于加深对肝纤维化发病分子机制的认识,可能对肝纤维化治疗和临床药物开发产生不可估量的作用。

4 参考文献

- [1] Chiang DJ, Pritchard MT, Nagy LE. Obesity, diabetes mellitus, and liver fibrosis[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011(5):697-702.
- [2] Banaudha KK, Verma M. The role of microRNAs in the management of liver cancer[J]. *Methods Mol Biol*, 2012(863):241-251.
- [3] 苏娟,张庆瑜. miR-200 及其作用机制[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2011(7):486-489.
- [4] 熊明霞. microRNA 在肾间质纤维化中作用的研究[J]. 南京医科大学博士论文, 2010.
- [5] 温静静,谢汝佳,韩冰,等. 肝纤维化大鼠肝细胞内质网形态及 GRP78 表达的研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2011(11):2210-2213.
- [6] Yoshiki Murakami, Fumihiko Matsuda, Masami Tanaka, et al. The progression of liver fibrosis is related with Overexpression of the miR-199 and 200 Families [J]. *PLoS ONE*, 2010(1):16081.
- [7] Burk U, Schubert J, Wellner U, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells[J]. *EMBO Rep*, 2008(9):582-589.
- [8] Ahn SM, Cha JY, Kim J, et al. Smad3 regulates E-cadherin via miRNA-200 pathway [J]. *Oncogene*, 2011(10):484.
- [9] 罗新华,程明亮,杨勤,等. 人肝纤维化组织中 TGF- β /Smads 家族细胞转导信号通路的研究[J]. *肝脏*, 2008(2):118-120.
- [10] 包剑锋,施军平,徐珊. 肝纤维化大鼠转化生长因子 β_1 /Smad 蛋白的动态表达及意义[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2011(5):334-337.
- [11] Chen YL, Li ZY. The relationship between TGF- β_1 , PDGF-BB, CTGF and chronic hepatitis B with fibrosis [J]. *Chin J Diffic Compl Cas*, 2010(1):19-20.
- [12] Kato M, Putts S, Wang M, et al. TGF-beta activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN[J]. *Nat Cell Biol*, 2009(7):881-889.
- [13] 王瑾,孙世波,孙铁为,等. 微小 RNA-21 对肝纤维化影响的初步研究[J]. *中华肝脏病杂志*, 2009(1):74-75.

(2012-10-10 收稿, 2012-12-18 修回)

编辑:张丽君

(上接第 18 页)

- [3] 周绪锋,盛洪广,徐国海. 银杏叶提取物在心肌缺血/再灌注损伤保护中的应用[J]. *国际麻醉与复苏杂志*, 2007(3):52-53.
- [4] 李玲. 机能学实验教程[M]. 上海:第二军医大学出版社, 2007(8):45-48.
- [5] 刘焕星,陈梅. 健康体检者血小板参数、P-选择素、PAC-1 测定与年龄的相关性分析[J]. *山东医药*, 2010(23):20-22.
- [6] 耿美容,辛晓敏. P-选择素测定在急性心肌梗死患者溶栓治疗中的应用价值[J]. *临床检验杂志*, 2008(5):380.
- [7] Gok S, Vatansever S, Vural K, et al. The role of ATP sensitive K⁺ channels and of nitric oxide synthase on myocardial ischemia/reperfusion-induced apoptosis [J]. *Acta Histochem*, 2006(2):95-104.
- [8] Christopher A, Duplessis, Fothergill D. Investigating the potential of statin medications as a nitric oxide(NO) release agent to decrease decompression sickness: A review article [J]. *Medical Hypotheses*, 2008(70):560-566.

(2012-11-06 收稿, 2013-01-05 修回)

编辑:张丽君