

·实验报告·

银杏内酯 B 对心肌缺血再灌注损伤大鼠保护作用的研究

孟剑锋

(河北省邢台市人民医院, 河北 邢台 054031)

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1004-745X(2017)11-1977-03

doi: 10.3969/j.issn.1004-745X.2017.11.028

【摘要】 目的 观察银杏内酯 B 对心肌缺血再灌注损伤大鼠的保护作用并初步探讨其可能的作用机制。方法 采用夹闭左冠状动脉前降支的方法制备大鼠心肌缺血再灌注模型; 设假手术组、模型组和银杏内酯 B (15、30、60 mg/kg) 组, 每组 20 只。监测各组大鼠心电图波动变化; 通过高频率超声影像系统检测舒张末期左室内径 (LVIDd) 和收缩末期左室内径 (LVIDs)、短轴缩短率 (FS)、射血分数 (EF)、每搏输出量 (SV); TTC 染色法检测心肌梗死面积, 生化分析法测定血清中心肌酶含量; HE 染色法观察心肌组织病理变化; 末端标记法 (TUNEL) 观察细胞凋亡状况。结果 与模型组比较, 银杏内酯 B (15、30、60 mg/kg) 组心电图明显改善, 以银杏内酯 B 60 mg/kg 组最为显著; 银杏内酯 B (30、60 mg/kg) 组 LVIDd、LVIDs 显著减小 ($P < 0.05$), FS 显著提高 ($P < 0.01$), EF、SV 显著升高 ($P < 0.01$); 心肌组织梗死面积显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 血清心肌酶 (AST、CPK、LDH) 含量显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 心肌组织病变明显改善, 心肌组织凋亡细胞数明显减少、凋亡指数 (AI) 显著降低 ($P < 0.01$)。结论 银杏内酯 B 对心肌缺血再灌注损伤具有一定的保护作用。

【关键词】 银杏内酯 B 心肌缺血再灌注 心电图 超声 凋亡

银杏叶为我国传统中药品种,《本草纲目》和《中药志》中均有记载,其性味甘,苦,涩平,具有益心敛肺、化湿止泻之功效。现代药学研究发现,萜内酯类化合物为银杏叶的主要有效成分,包括银杏内酯 A、B、C、M 和白果内酯。研究表明银杏内酯为血小板活化因子 (PAF) 拮抗剂,活性最强的为银杏内酯 B (GB),既往研究发现银杏内酯 B 具有抗凋亡、抗氧化等多种药理学作用^[1-4]。本实验通过建立心肌缺血再灌注损伤大鼠模型,通过监测心电图波动、血液流变学、梗死面积、心肌酶含量、组织病变以及细胞凋亡等指标变化,探讨银杏内酯 B 对心肌缺血再灌注损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 实验用大鼠品系 SD 大鼠,清洁级,雄性,鼠龄 8 周龄,体质量 220~260 g,购自河北省实验动物中心,动物许可证号: SCXK(冀)2013-1-003。

1.2 药物与试剂 银杏内酯 B 购自美国 Sigma 公司; TTC 购自美国 Sigma 公司; TUNEL 试剂盒购自南京建成生物工程研究所; AST、CPK、LDH 试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.3 分组与造模 将 100 只实验用大鼠随机分为假手术组、模型组、银杏内酯 B (15、30、60 mg/kg) 组,每组 20 只。参照徐叔云等^[5]报道的实验方法,通过夹闭左冠状动脉前降支 30 min 的方法建立心肌缺血再灌

注损伤大鼠模型,实验过程实施心电图监测,心电图示 ST 段抬高或 T 波高耸为心肌缺血,夹闭 30 min 后恢复血流灌注,抬高的 ST 段降低或高耸的 T 波得以恢复表示心肌再灌注成功。假手术组行手术通路但不夹闭冠状动脉。

1.4 给药方法 银杏内酯 B (15、30、60 mg/kg) 组腹腔注射给药治疗,每日 1 次,疗程 7 d。假手术组、模型组同步腹腔注射生理盐水,每日 1 次。各组均造模后即刻给药。

1.5 标本采集与检测 1) 超声检测。各组随机取 10 只大鼠,采用 Vevo770 高分辨率超声影像系统于取材前行超声检测。于左侧胸骨旁取左室乳头肌水平短轴切面,测量舒张末期左室内径 (LVIDd)、收缩末期左室内径 (LVIDs)、短轴缩短率 (FS)、射血分数 (EF)、每搏输出量 (SV),所有检测指标均取连续 3 个心动周期的平均值。2) TTC 染色法测定心肌组织梗死面积。取心脏组织置 -20 °C 冻存 20 min 后切片,2% TTC 溶液 (恒温 37 °C、避光) 孵育 15 min,灰白色为梗死区,采用医用图像分析系统分析心肌组织梗死面积。3) 血清中心肌酶含量的测定。经腹主动脉取血并离心 (1500 r/min, 10 min) 取血清,通过生化分析仪测定血清中心肌酶 (AST、CPK、LDH) 含量。4) 心肌组织病变及心肌细胞凋亡的观察。取心脏组织并置于 4% 多聚甲醛溶液中 72 h 进行固定,经常规脱水、石蜡包埋、切片和脱蜡水化处

理后,HE 染色并通过倒置光学显微镜观察心肌组织病变,TUNEL 染色后通过倒置光学显微镜观察各组大鼠心肌细胞凋亡状况。凋亡指数(AI)计算:每张 TUNEL 染色切片选取不重叠的 6 个视野,分别计数每个视野中的细胞总数和凋亡细胞数,各组取平均值后计算 AI;AI(%)=(阳性细胞数/细胞总数)×100%

1.6 统计学处理 应用 SPSS15.0 统计软件。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数两两比较采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组心电图监测结果比较 与假手术组大鼠比较,模型组及银杏内酯 B 各剂量组大鼠结扎左冠状动脉前降支后出现左心室前壁呈灰白,而后逐渐呈现紫绀的症状,心电图示 ST 段抬高或 T 波高耸,提示急性心肌梗死大鼠模型造模成功。经银杏内酯 B 干预治疗 7 d 后,缺血再灌注损伤大鼠心电图波形明显改善,其中银杏内酯 B 60 mg/kg 组心电图波形基本恢复正常。见图 1。

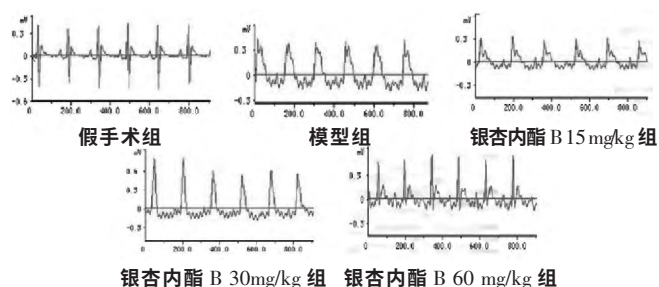


图 1 各组大鼠心电图

2.2 各组大鼠超声检测结果比较 见表 1。与假手术组大鼠比较,模型组大鼠 LVIDd、LVIDs 显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),FS、EF、SV 显著降低($P < 0.01$);而与模型组比较,银杏内酯 B 30、60 mg/kg 组 LVIDd、LVIDs 显著减小($P < 0.05$),FS 显著提高($P < 0.01$),EF、SV 显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠超声检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LVIDd(mm)	LVIDs(mm)	FS(%)	EF(%)	SV(μL)
假手术组	10	6.68±0.25	3.90±0.28	42.95±7.16	72.81±7.34	190.25±24.80
模型组	10	7.23±0.27 [*]	6.18±0.39 ^{**}	15.34±3.28 ^{**}	29.37±4.50 ^{**}	78.14±17.65 ^{**}
银杏内酯 B 15 mg/kg 组	10	7.01±0.30	5.92±0.43	18.71±4.15	33.74±4.83	86.40±19.27
银杏内酯 B 30 mg/kg 组	10	6.87±0.22 ^Δ	5.47±0.35 ^Δ	26.08±5.42 ^{ΔΔ}	36.29±5.16 ^Δ	107.53±18.24 ^Δ
银杏内酯 B 60 mg/kg 组	10	6.74±0.26 ^Δ	5.03±0.31 ^{ΔΔ}	28.62±5.83 ^{ΔΔ}	46.03±7.24 ^{ΔΔ}	119.02±21.51 ^{ΔΔ}

与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。下同。

2.3 各组心肌组织梗死面积测定结果比较 见表 2。模型组心肌组织梗死面积较假手术组显著升高($P < 0.01$);银杏内酯 B 30、60 mg/kg 组梗死面积与模型组比较,

显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠血清心肌酶含量及心肌梗死面积比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AST(U/L)	CPK(U/L)	LDH(U/L)	心肌梗死面积(%)
假手术组	10	278.36±54.02	529.29±85.08	619.54±94.16	0
模型组	10	583.63±109.51 ^{**}	1085.70±244.26 ^{**}	1084.57±186.47 ^{**}	43.92±6.12
银杏内酯 B 15 mg/kg 组	10	543.71±102.75	934.83±190.46	1084.57±186.49	39.71±6.48
银杏内酯 B 30 mg/kg 组	10	439.07±85.16 ^Δ	840.50±183.42 ^Δ	815.32±120.73 ^Δ	32.04±6.13
银杏内酯 B 60 mg/kg 组	10	393.46±78.40 ^{ΔΔ}	781.32±169.15 ^Δ	762.93±108.24 ^{ΔΔ}	21.83±4.89

2.4 各组心肌酶含量比较 见表 2。模型组血清心肌酶(AST、CPK、LDH)含量较模型组均显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,银杏内酯 B 30、60 mg/kg 组血清 AST、CPK、LDH 含量均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.5 各组心肌组织病变观察结果比较 见图 2。经 HE 染色后观察病理切片,假手术组心肌组织结构、细胞形态均未见明显异常;模型组心肌组织呈现肌原纤维断裂、排列紊乱,心肌细胞呈空泡变性,细胞质着色不均,胞核深染等病理性改变;与模型组比较,银杏内酯 B 15、30、60 mg/kg 组心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌组织病变呈现不同程度改善,以银杏内酯 B 60 mg/kg 组效果最为显著。

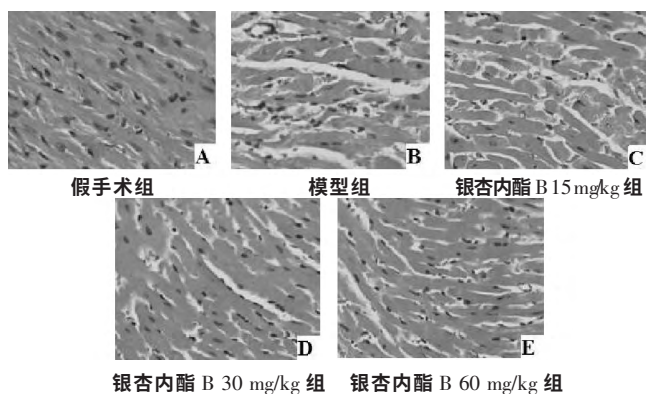


图 2 各组大鼠心肌组织形态(HE 染色,200 倍)

2.6 心肌细胞凋亡状况观察结果 经 TUNEL 染色后观察,模型组心肌细胞凋亡数量较假手术组明显增多;与模型组比较,银杏内酯 B 15、30、60 mg/kg 组心肌细胞凋亡数量明显减少,以银杏内酯 B 60 mg/kg 组最为显著,见图 3。模型组心肌细胞 AI[(57.42±9.76)%]较假手术组 AI(0)显著升高($P < 0.01$);银杏内酯 B 15、30、60 mg/kg 组 AI 分别为 (46.08±7.93)%、(39.32±7.58)%、(26.72±5.89)%;与模型组比较,银杏内酯 B 30、60 mg/kg 组 AI 显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

随着高血压、高血脂等基础疾病发病率的提高,冠状动脉粥样硬化性心脏病(CHD)以及由其所引发的急

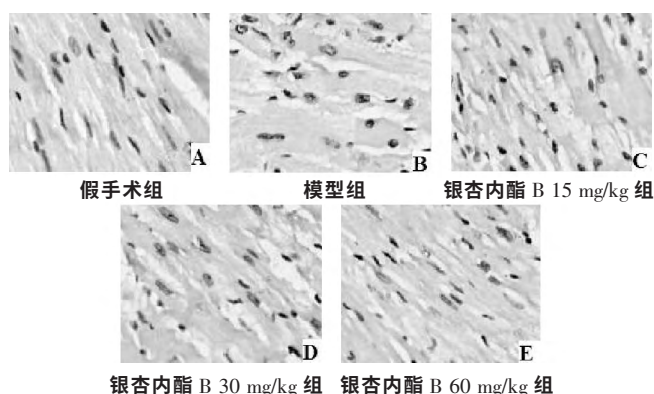


图3 各组大鼠心肌细胞凋亡状况(TUNEL,400倍)

性心肌梗死(AMI)发病率逐年升高,严重危害着人类的生命健康^[6-7]。及时通过药物或介入手术溶栓以实现血流恢复灌注是目前临床上治疗 AMI 的主要方案,但缺血再灌注损伤并发症严重影响着 AMI 预后。缺血再灌注损伤病理机制非常复杂,既往研究发现心功能异常、氧化应激损伤、炎症反应以及继发性心肌细胞凋亡是缺血再灌注损伤发生发展的重要病理机制^[8-12],这也为我们研发能够有效降低缺血再灌注损伤的新型药物提供了思路。

心电图 ST 段抬高或 T 波高耸是急性心梗死的典型表现,本研究采用结扎左冠状动脉前降支的方法制备急性心肌梗死大鼠模型,造模过程全程实施心电图监测,发现结扎左冠状动脉前降支后出现左心室前壁呈灰白、紫绀的症状,心电图示 ST 段抬高或 T 波高耸,提示造模成功。该造模方法操作简单、成功率高且与临床 AMI 症状接近,是目前 AMI 动物实验研究常用的造模方法^[13]。银杏内酯 B 是我国传统中药银杏叶的主要活性成分之一,具有抗凋亡、抗氧化、抗炎等多种药理学作用^[1-4,14-15]。本实验研究发现:经银杏内酯 B 治疗能够有效改善心肌缺血再灌注损伤大鼠心电图波形,有效降低 LVIDd 和 LVIDs,提高 FS、EF、SV;显著降低血清心肌酶(AST、CPK、LDH)含量,改善心肌组织病变,减小心肌组织梗死面积,提示银杏内酯 B 对心肌缺血再灌注损伤具有一定的保护作用。

参 考 文 献

[1] Nie ZG, Peng SY, Wang WJ. Effects of Ginkgolide B on lipopolysaccharide-induced TNF α production in mouse

peritoneal macrophages and NF- κ B activation in rat pleural polymorphonuclear leukocytes[J]. Acta Pharm Sin, 2004, 39: 415-418.

- [2] Zhou LE, Wang WJ, Bai JY, et al. Effects of Ginkgolide B on arachidonic acid metabolizing enzymes and level of intracellular calcium in rat polymorphonuclear leukocytes[J]. Acta Pharm Sin, 2001, 36(2): 92-95.
- [3] Kitamoto S, Egashira K. Endothelial dysfunction and coronary atherosclerosis[J]. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord, 2004, 4(1): 13-22.
- [4] 郝莉, 徐玉英, 田新红, 等. 银杏内酯 B 对阿尔茨海默病大鼠海马 c-fos、Caspase-3 和 Caspase-8 的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 15(7): 798.
- [5] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 45.
- [6] 张苏明, 郭冠军, 彭钰, 等. 高血压患者非杓型心率与冠心病发病率的关系[J]. 心血管康复医学杂志, 2016, 25(1): 150.
- [7] 詹美恩, 陈开, 汤文信, 等. 188 例早发冠心病患者危险因素及冠脉病变特点临床分析[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(6): 1137.
- [8] 李娟莉, 苏式兵. 三七总皂苷对大鼠急性心肌梗死的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(1): 68-72.
- [9] 任宏强, 赵利, 王忠, 等. 复方丹参滴丸对急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡和凋亡相关蛋白的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(12): 1084-1088.
- [10] 张卫萍, 邓杨阳, 任建勋, 等. 淫羊藿总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤氧化应激干预机制的研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(18): 3400-3405.
- [11] 吴锦波, 吴平生. 心肌缺血/再灌注损伤与细胞凋亡[J]. 医学综述, 2011, 17(19): 2961-2963.
- [12] 郭庆军, 王桂敏, 张秀秀. 淫羊藿苷预处理对心肌缺血再灌注损伤炎症反应的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(11): 2034-2038.
- [13] 许官学, 石蓓, 盛瑾, 等. 改良大鼠急性心肌梗死模型的制备方法[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(14): 3367-3370.
- [14] 孙文佳, 孙杰, 陈北冬, 等. 银杏内酯 B 抑制高糖诱导内皮细胞 TLR4 及炎症蛋白表达[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(5): 636.
- [15] 刘永刚, 李芳君, 王婧, 等. 银杏内酯 B 对大鼠脑缺血-再灌注损伤炎症反应的影响[J]. 中药材, 2010, 33(4): 578-580.

(收稿日期 2017-05-06)