

• 论著 •

银杏叶提取物对血管内皮细胞的保护作用

廖新学¹, 李欣², 马中富³, 王礼春¹, 杜志民¹, 董吁刚¹, 马虹¹

(中山大学附属第一医院①心内科, ②急诊科, ③普内科, 广东 广州 510080)

【摘要】 目的 观察银杏叶提取物(GBE)对动脉粥样硬化模型大鼠血管内皮细胞的影响,并初步阐明其机制。方法 将 15 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、GBE 组。用高胆固醇饲料喂养 12 周制备动脉粥样硬化大鼠模型。GBE 组给予 GBE 水溶液 $96 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,12 周后取主动脉进行组织病理学检查,以电泳迁移率变动分析法(EMSA)检测核转录因子- κB (NF- κB)活性,用放射免疫法测定血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)水平,用酶联免疫吸附试验测量可溶性血栓调节蛋白(sTM)水平。结果 电镜下显示,模型组血管内皮细胞存在明显的崩解现象,而 GBE 组损伤轻微。与对照组比较,模型组主动脉 NF- κB 活性、血清 TNF- α 、IL-6 和 sTM 水平均显著升高,GBE 组也有升高,但明显低于模型组(P 均 < 0.05)。NF- κB 活性与 TNF- α 、IL-6、sTM 水平呈显著直线相关,sTM 与 TNF- α 、IL-6 呈显著直线相关(P 均 < 0.05)。结论 GBE 可以通过抑制主动脉中 NF- κB 的活性、减轻过度的炎症反应而发挥保护内皮细胞的作用。

【关键词】 内皮细胞; 核转录因子- κB ; 银杏叶提取物

中图分类号:R285.5;R541.4 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2008)03-0152-04

Preventive effect of Ginkgo biloba (银杏叶) extract on endothelial cells in rat models with atherosclerosis

LIAO Xin-xue¹, LI Xin², MA Zhong-fu³, WANG Li-chun¹, DU Zhi-min¹, DONG Xu-gang¹, MA Hong¹.

① Department of Cardiology, ② Department of Emergency, ③ Department of General Internal Medicine, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

Corresponding author: MA Hong (Email:sums-mahong@21cn.com)

【Abstract】 Objective To examine the effect of Ginkgo biloba (银杏叶) extract (GBE) on the endothelial cells in rat models with atherosclerosis and its mechanism. **Methods** Fifteen Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups: high lipids (model) group, GBE group and normal control group. The rats in the model group were fed with high lipids and were sacrificed 12 weeks later. Besides fed with high lipids, the animals in GBE group were also administrated intragastrically with GBE aqueous solution ($96 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). The aortas were harvested for histomorphometry and transmission electron microscope observation after 12 weeks. The nuclear factor- κB (NF- κB) activity was measured by electrophoretic mobility shift assays (EMSA) in aortas. The levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in serum were measured by radio-immunity method and the level of soluble thrombomodulin (sTM) in serum was measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Under electron microscope, the necrosis and apoptosis of aorta endothelial cells were obvious in high lipids group, but the cell damage in GBE group was mild. The level of sTM in the GBE group was significantly higher than that in the normal control group and lower than that in the high lipids group (both $P < 0.05$). The activity of NF- κB , the levels of IL-6 and TNF- α were evidently higher in the high lipids group than those in the normal control group, and in the GBE group, they were also elevated, but obviously lower than those in the model group (all $P < 0.05$). There were positive linear relationships between the NF- κB activity and each of the following levels: TNF- α , IL-6 and sTM (all $P < 0.05$). The level of sTM also had linear relationship with the levels of TNF- α and IL-6 respectively (both $P < 0.05$). **Conclusion** These results indicate that GBE can protect endothelial cells by inhibiting the activity of NF- κB and inflammatory response.

【Key words】 endothelial cell; nuclear factor- κB ; Ginkgo biloba extract

基金项目:广东省科技计划基金资助项目(2004B30601016, 2006B36004010);广东省自然科学基金资助项目(5001676)

通讯作者:马虹,教授,Email:sums-mahong@21cn.com

作者简介:廖新学(1965-),男(汉族),广东省人,医学博士,副教授。

血管内皮细胞作为组织与血液之间的防线,其损伤和功能障碍是导致动脉粥样硬化发生发展的重要环节。核转录因子- κB (NF- κB)是一核转录因子,激活后进入细胞核调节多种蛋白质的表达,是调节

一系列重要因子产生的“基因开关”，调节着多种生长因子、趋化因子、黏附分子、细胞因子的表达^[1]。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)是两种具有代表性的炎症因子，过度表达时可导致机体的免疫病理损伤，在动脉粥样硬化发生发展中起了重要作用。银杏叶提取物(GBE)含银杏黄酮苷、银杏内酯和白果内酯等多种活性物质，近年在临床上被广泛用于治疗缺血性心血管疾病^[2-3]。我们的既往研究发现，该药具有一定的内皮细胞保护作用，并且这种作用可能与抑制炎症反应有关。本研究旨在复制动脉粥样硬化模型，检测 NF- κ B 活性及其下游炎症因子 TNF- α 、IL-6 水平的改变，以观察 GBE 保护内皮细胞的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 动物与分组:健康 SD 大鼠 15 只(由中山大学动物实验中心提供)，体重 250 g 左右，雌雄不拘，按随机数字表法分为 3 组：①对照组：予以普通饮食；②模型组：饲以高胆固醇饲料(由 2%胆固醇，1%胆酸钠，10%炼猪油及 87%普通饲料配制而成)，未用药干预；③GBE 组：在饲以高胆固醇饲料的基础上给予 GBE 96 mg · kg⁻¹ · d⁻¹，蒸馏水稀释后灌胃。各组均自由进食，饮水不限，实验时间 12 周。

1.2 电镜观察:取大鼠靠近主动脉根部的降主动脉经多聚甲醛水溶液固定、磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗、锇酸后固定、乙醇丙酮梯度脱水后包埋，超薄切片，常规醋酸铀-枸橼酸铅染色，在透射电镜下观察。

1.3 可溶性血栓调节蛋白(sTM)检测:经心脏取血，枸橼酸钠抗凝，离心取上清液。用双抗体夹心酶联免疫吸附试验测定 sTM 浓度，操作按说明书要求进行。

1.4 NF- κ B 活性检测

1.4.1 细胞核提取物制备:取降主动脉组织，用预冷匀浆介质混合后，制成组织匀浆。参照 Schreiber 方法^[4]提取核蛋白。以考马斯亮蓝法检测核提取蛋白浓度。

1.4.2 电泳迁移率变动分析法(EMSA):探针采用 NF- κ B 一致性的双链寡核苷酸序列(5'-AGTTGAGGGGACTTCCAGGC-3')，5'端以 [γ -³²P] ATP (北京亚辉公司)标记，标记和纯化过程按 Gel Shift Assay System 试剂盒(美国 Promega 公司)说明书进行。经聚丙烯酰胺凝胶对电泳带进行密度扫描，以面积×密度表示 NF- κ B 活性。

1.4.3 特异性鉴定:设空白对照、特异性竞争对照及非特异性竞争对照。空白对照为反应混合物中不

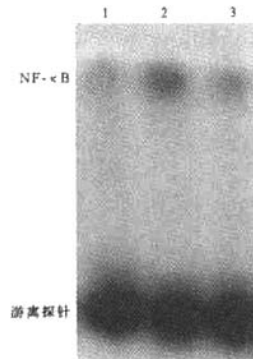
加细胞核提取物。特异性竞争对照为先加入 50 倍浓度未标记的 NF- κ B 探针，5 min 后再加入核素标记的探针。非特异性竞争对照为先加入 50 倍浓度未标记的激活蛋白-1(AP-1)一致性双链寡核苷酸，5 min 后再加入核素标记的 NF- κ B 探针。

1.5 TNF- α 、IL-6 水平测定:用放射免疫法测定血清 TNF- α 、IL-6 水平，试剂盒购自解放军总医院科技开发中心放射免疫所，操作按说明书进行。

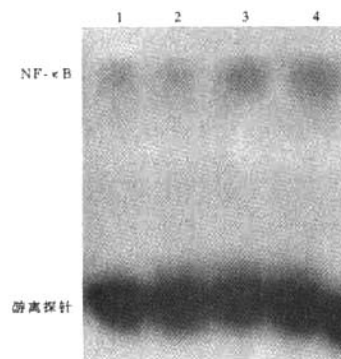
1.6 统计学处理:使用 SPSS 10.0 统计软件。检测数据以均数±标准差(\bar{x} ±s)表示，多组间比较采用 one-way ANOVA 方法分析， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 NF- κ B、TNF- α 、IL-6 和 sTM 水平比较(图 1, 图 2; 表 1):模型组和 GBE 组的 NF- κ B 活性及 TNF- α 、IL-6、sTM 水平均明显高于对照组，而 GBE 组各指标水平显著低于模型组(P 均 < 0.05)。



1~3 依次为对照组、模型组、GBE 组
图 1 EMSA 检测各组大鼠主动脉 NF- κ B 活性



1~4 依次为空白对照、特异性竞争对照、非特异性竞争对照、模型组大鼠标本
图 2 EMSA 检测 NF- κ B 特异性鉴定

2.2 NF- κ B、TNF- α 、IL-6、sTM 间的关系(表 2):

相关性分析显示,模型组 NF-κB、TNF-α、IL-6 与 sTM 间呈显著正相关。线性回归分析发现,NF-κB 与 TNF-α、IL-6、sTM 间以及 TNF-α、IL-6 与 sTM 间均呈直线关系(P 均<0.05)。

表 1 各组大鼠主动脉 NF-κB 活性及血清 TNF-α、IL-6、sTM 水平比较(̄x±s)

组别	动物数	NF-κB 活性(×10 ⁴)	TNF-α(μg/L)	IL-6(μg/L)	sTM(mmol/L)
对照组	5	0.82±0.14	4.67±0.84	236.50±62.18	0.89±0.21
模型组	5	1.74±0.18 ^a	10.31±0.64 ^a	598.35±137.61 ^a	5.16±1.42 ^a
GBE 组	5	1.28±0.16 ^{ab}	7.56±0.53 ^{ab}	412.55±98.42 ^{ab}	2.68±0.38 ^b

注:与对照组比较,^aP<0.05;与模型组比较,^bP<0.05

表 2 模型组 NF-κB、TNF-α、IL-6、sTM 之间的关系

相关指标	回归方程	r 值	P 值
NF-κB/TNF-α	Y=0.000 3X+4.869 9	0.773 7	<0.05
NF-κB/IL-6	Y=0.020 6X+2.392 1	0.729 7	<0.05
NF-κB/sTM	Y=0.000 3X+0.023 2	0.805 2	<0.05
sTM/TNF-α	Y=0.868 2X-3.791 1	0.879 8	<0.05
sTM/IL-6	Y=0.012 5X-2.308 1	0.840 2	<0.05

2.3 组织病理学观察(彩色插页图 3,图 4):模型组血管内皮细胞存在明显的崩解现象,内弹力膜断裂,单核细胞浸润。GBE 组内皮完整存在,个别细胞存在异染色质增多、凋亡等病变,弹力膜完整,鲜见单核细胞浸润。

3 讨论

内皮细胞为扁平或多角形细胞,单层覆盖于血管内膜表面,正常条件下广泛参与调节血管紧张度、免疫反应、脂质代谢及内皮下基质合成等生理活动。内皮细胞作为组织与血液之间的防线,其损伤是导致许多疾病发生发展的重要环节。TM 是由血管内皮细胞合成并附于内皮细胞膜表面的凝血酶受体,当血管内皮细胞受损时,TM 便从细胞膜中脱落释放到血中使 sTM 水平增高,Blann 等^[5]认为 sTM 是内皮损伤的黄金标准。

脂质代谢紊乱是动脉粥样硬化发生发展的重要原因之一,斑块形成过程中伴随着一定程度的内皮细胞损伤,这些损伤既是冠心病高危因素作用于内皮细胞的结果,也进一步促发了冠心病的形成^[6]。

在动脉粥样硬化形成过程中,NF-κB 通路是炎症反应产生的关键环节之一。多种冠心病危险因素都可通过溶血磷脂酰胆碱途径激活细胞内蛋白激酶 C(PKC),通过 NF-κB 的游离活化从而激活基因的转录反应,由此而过度生成的 TNF-α、IL-6、IL-1、E-选择素、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管黏附分子-1(VCAM-1)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)等因子,促使单核细胞和平滑肌细胞迁移、黏附、增生,并形成泡沫细胞。泡沫细胞崩解后释放出的脂质

形成脂质核心,从而使病变进入不可逆阶段并形成粥样斑块^[7]。有研究发现,NF-κB 受细胞氧化还原状态控制,活性氧是 NF-κB 的一种激活剂,其产生是 NF-κB 活化的关键步骤^[8];抑制 NF-κB 活化可以延缓冠状动脉粥样硬化形成^[9]。本实验中模型组 NF-κB 的活性明显增强,并伴随着 TNF-α、IL-6 和 sTM 升高,表明动脉粥样硬化形成过程中存在过度的炎症反应,进而导致了内皮细胞的损伤。

GBE 含银杏黄酮苷、银杏内酯和白果内酯等多种活性物质,具有清除氧自由基、防止细胞老化和脂质过氧化对细胞膜损伤、对抗血小板活化因子、改善微循环等多种药理作用^[10-11]。本研究表明,GBE 能抑制 NF-κB 激活,减少 TNF-α、IL-6 生成,降低 sTM 水平,从而可以减弱单核/巨噬细胞和平滑肌细胞的过度反应,保护内皮细胞,这也可能是其防治动脉粥样硬化作用的主要机制之一。

参考文献

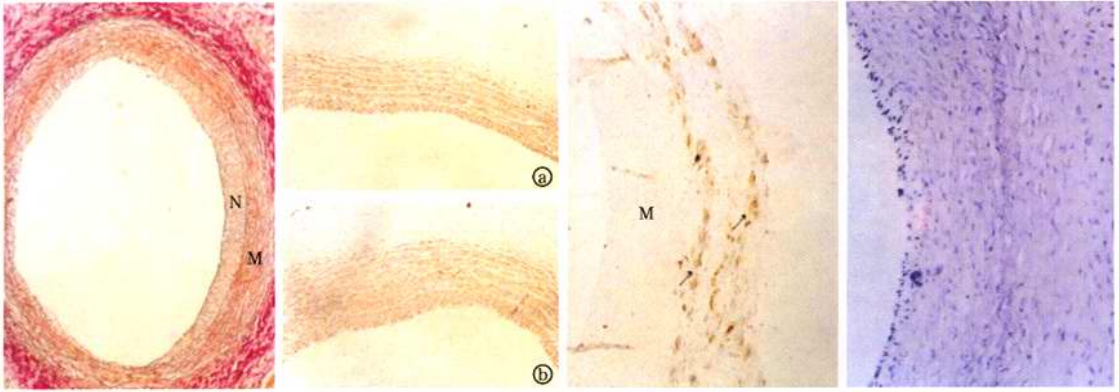
- [1] 李欣,廖晓星. NF-KB 在动脉粥样硬化中作用的研究进展[J]. 中国实用医药杂志,2002,2:1165-1167.
- [2] 何思平,马捷敏. 银杏叶提取物对不稳定型心绞痛患者 C-反应蛋白的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志,2007,14(3):151-153.
- [3] 席东焱,林治库,赵纯平,等. 银杏叶片对高黏血症血液流变性血小板及内皮细胞功能的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志,2001,8(4):251.
- [4] Schreiber E,Matthias P,Müller M M, et al. Rapid detection of octamer binding proteins with "mini-extracts", prepared from a small number of cells[J]. Nucleic Acids Res,1989,17(15):6419.
- [5] Blann A D,Taberner D A. A reliable marker of endothelial cell dysfunction; does it exist[J]? Br J Haematol,1995,90(2):224-228.
- [6] 李欣,廖新学,廖晓星,等. 银杏叶提取物对动脉粥样硬化的防治作用研究[J]. 中华急诊医学杂志,2004,13(9):609-611.
- [7] Galle J,Quaschnig T,Seibold S, et al. Endothelial dysfunction and inflammation; what is the link[J]? Kidney Int Suppl,2003(84):S45-49.
- [8] 涂自智,肖卫民,刘梅冬,等. 核转录因子-κB 在热休克预处理抑制过氧化氢所致心肌细胞损伤中的作用[J]. 中国危重病急救医学,2005,17(7):412-416.
- [9] 林梅瑟,陈碧新,赵志光,等. 姜黄素对动脉粥样硬化家兔核转录因子-κB 的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志,2007,14(2):95-98.
- [10] Chen J W,Chen Y H,Lin F Y, et al. Ginkgo biloba extract inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced reactive oxygen species generation, transcription factor activation, and cell adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2003,23(9):1559-1566.
- [11] 蒋军广,谭伟丽,王丽华,等. 银杏叶提取物对老年肺心病患者抗脂质过氧化损伤的影响[J]. 中国危重病急救医学,2006,18(4):246-247.

(收稿日期:2008-02-04 修回日期:2008-05-03)

(本文编辑:李银平)

赤芍对球囊损伤术后血管内膜单核细胞趋化蛋白-1基因表达的影响

(正文见138页)



M:中膜; N:增生内膜
图1 模型组内膜增生情况
(弹力及胶原纤维双重染色, ×40)

①:赤芍高剂量组; ②:模型组
图4 球囊损伤术后α-sm-actin
表达(免疫组化, ×200)

M:中膜; 箭头示:巨噬细胞阳性着色
图5 模型组球囊损伤术后RAM-11
表达(免疫组化, ×100)

图6 模型组球囊损伤术后
MCP-1 mRNA表达
(原位杂交, ×200)

银杏叶提取物对血管内皮细胞的保护作用

(正文见152页)

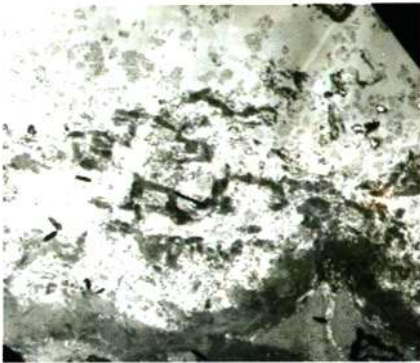


图3 模型组透射电镜下血管内皮改变
(醋酸铀-枸橼酸铅, ×40 000)

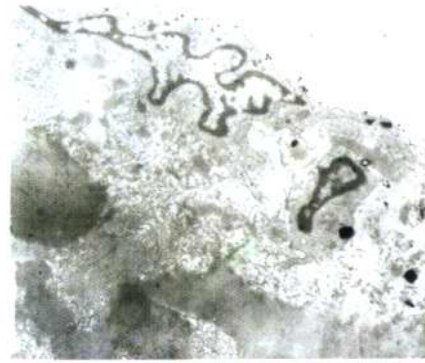
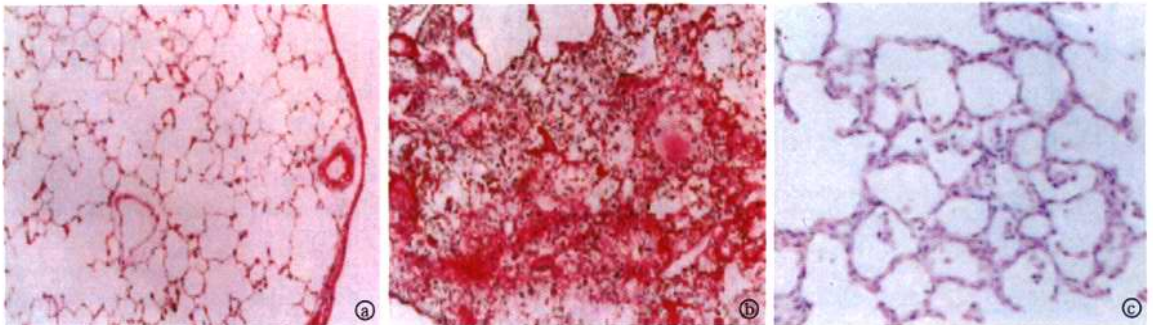


图4 GBE组透射电镜下血管内皮改变
(醋酸铀-枸橼酸铅, ×80 000)

血必净注射液对内毒素性肺损伤治疗作用的实验研究

(正文见181页)



①:对照组; ②:ALI组; ③:血必净组
图1 各组大鼠肺组织病理学观察(HE, ×100)