

银杏叶总提取物对 H_2O_2 诱发的心肌细胞损伤的保护作用郭 健¹, 刘 义², 李延平², 宋文东³, 梁伟钧^{1*}

(1. 广东医学院附属医院 心血管内科, 广东 湛江 524023; 2. 广东医学院 广东天然药物研究与开发重点实验室, 广东 湛江 524023; 3. 广东海洋大学, 广东 湛江 524000)

摘要:目的 研究银杏叶总提取物 (GBE) 对 H_2O_2 诱发的心肌细胞损伤的保护作用。方法 采用胰酶消化法获取大鼠乳鼠心肌细胞, 用 H_2O_2 损伤心肌细胞, 制备心肌缺血再灌注损伤实验模型, 实验组加入 GBE 使其终质量浓度分别为 50、100、150 mg/L, 阳性对照组加入异博定, 用紫外分光光度法、硫代巴比妥酸法、黄嘌呤氧化酶法分别测定细胞培养液中乳酸脱氢酶 (LDH) 活性、丙二醛 (MDA) 水平及超氧化物歧化酶 (SOD) 活性; 测定线粒体中琥珀酸脱氢酶 (SDH)、细胞色素 C 氧化酶 (CCO) 比活力; 透射电镜观察细胞的超微结构。结果 与对照组相比模型组 LDH 活性和 MDA 水平均明显升高 ($P < 0.05, 0.001$), SOD 则明显降低 ($P < 0.01$), 而 GBE 各组能减少 LDH 和 MDA 的产生呈剂量依赖关系; SDH 和 CCO 比活力在 H_2O_2 组明显下降 ($P < 0.001$), GBE 组改变不明显; 150 mg/L GBE 对细胞线粒体有明显的保护作用。结论 银杏叶提取物对 H_2O_2 诱发的心肌细胞损伤有显著的保护作用, 其机制可能与维持细胞中线粒体的能量代谢有关。

关键词: 银杏叶总提取物 (GBE); 心肌细胞; H_2O_2

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)12-1864-04

银杏 *Ginkgo biloba* L. 系落叶乔木作为药物在我国已有 5 000 多年的历史。《中国药典》中记载银杏叶有润肺、平喘、止痛等功效。银杏叶总提取物 (*Ginkgo biloba* extract, GBE) 主要成分为银杏类黄酮和萜内酯, 具有扩张血管、抗炎、抗肿瘤、调血脂等作用^[1]。在体外实验中可直接灭活各类氧自由基、抑制脂质过氧化作用^[2,3]。过氧化氢 (H_2O_2) 是体内氧化代谢的中间产物, 同时又是一种活性氧。当 H_2O_2 的浓度积累到一定程度时会对心肌细胞产生损伤作用。目前认为 H_2O_2 是心肌细胞损伤的重要发病机制, 对氧化应激的防护一直是心血管病理生理和治疗学十分重要的课题。本实验利用离体乳鼠心肌细胞为载体研究 GBE 对 H_2O_2 诱发的心肌细胞损伤的保护作用及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物: 出生 1~3 d 的 Wistar 大鼠, 雌雄不拘, 由广东医学院动物实验中心提供。

1.2 试剂与仪器: GBE 粉剂购于中国药品生物制品检定所, 使用前用培养液配制, 滤过除菌待用; 异博定片剂购于广东华南药业有限公司; 胎牛血清、DMEM (低糖) 培养液、胰蛋白酶购于 Gibco 公司; 琥珀酸脱氢酶 (SDH) 比活力测试盒、细胞色素 C 氧化酶 (CCO) 比活力测试盒、葡聚糖凝胶、 H_2O_2 、

hepes、glucose、L-glutamine 购于 Sigma 公司; 乳酸脱氢酶 (LDH) 测试盒、丙二醛 (MDA) 测试盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 测试盒购于南京建成生物工程研究所; Lowry 法蛋白质测定试剂盒购于上海申能博彩生物科技有限公司。

1.3 大鼠乳鼠心肌细胞离体培养: 参考 Harary 法^[4]略有改进分离心肌细胞。取出生 1~3 d 的 Wistar 大鼠乳鼠, 无菌条件下取出心脏, 放入预冷的 D-hank's 瓶皿内洗去残余血液, 剪掉心房, 将洗净的心室肌放入大离心管内, 用眼科剪快速剪碎, 0.06% 胰蛋白酶分次消化成单细胞悬液, 离心收集沉淀, 用含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液悬浮分散细胞, 调整细胞密度约为 $1 \times 10^6/L$ 接种到 25 mL 培养瓶中, CO_2 孵育 (5% $CO_2, 37^\circ C$) 培养。90 min 后翻转培养瓶, 取培养液接种到新培养瓶中。由于成纤维细胞较心肌细胞更易于贴壁, 用此法可使大部分成纤维细胞贴壁, 剩下富含心肌细胞的培养液。48 h 换培养液, 倒置显微镜下观察细胞全部贴壁, 相互连接成片, 形成同步搏动, 细胞生长状态良好, 即可进行下一步实验。

1.4 实验分组: 实验分为 6 组, 每组 6 瓶细胞。对照组; 模型组: 加入 H_2O_2 , 终质量浓度为 100 $\mu mol/L$, 继续培养 3 h; GBE 3 个剂量组: 培养液中加入 GBE

收稿日期: 2008-04-09

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2005B94201002)

作者简介: 郭 健 (1981-), 女, 黑龙江牡丹江人, 硕士研究生, 主要从事心血管相关疾病研究。E-mail: plliu78@sina.com

* 通讯作者 梁伟钧

使其终质量浓度分别为 50、100、150 mg/L,继续培养 12 h;阳性对照组:将异搏定加入培养液中使其为终质量浓度 40 μ g/L,继续培养 12 h。

1.5 细胞培养液中 LDH 漏出量、MDA 水平及 SOD 活性的测定:分别取各实验组的细胞培养液,用紫外分光光度法测定 LDH 活性;硫代巴比妥酸法测定 MDA 水平;黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性。

1.6 Lowry 法测定细胞线粒体中的蛋白量:消化、离心收集细胞,加入线粒体分离介质,用超声波震荡器将其制备成匀浆,2 300 r/min 离心 10 min,取上清,9 200 r/min 再离心 20 min,取沉淀,制成线粒体悬液。用 Lowry 法蛋白质定量测定试剂盒测细胞线粒体悬液中蛋白的量。

1.7 线粒体中 SDH、CCO 比活力的测定:分别用 SDH 和还原型细胞色素 C 试剂盒测细胞线粒体悬液中 SDH 比活力及 CCO 比活力。

1.8 超微结构:用细胞刮刀将细胞刮下,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清收集细胞,4 $^{\circ}$ C,2.5% 戊二醛固定 10 min,再 2 000 r/min 离心 10 min。常规乙醇、丙酮逐级脱水,环氧树脂包埋,超薄切片,铅、铀双重染色,透射电镜观察并摄片。

1.9 数据处理:采用 SPSS 10.0 软件进行分析,各组间进行方差分析,并进行 q 检验。

2 结果

2.1 GBE 对心肌细胞培养液中 LDH、MDA 及 SOD 的影响:结果见表 1。与对照组相比模型组 LDH 活性及 MDA 水平均有明显的升高 ($P<0.05, 0.001$),说明 H_2O_2 所造成的缺氧/复氧能使心肌细胞产生明显的氧化应激反应,而 GBE 各实验组 LDH 活力均出现显著的下降 ($P<0.001$),MDA 水平虽有不同程度的上升但上升幅度随着给

表 1 GBE 对心肌细胞培养液中 LDH 和 SOD 活性以及 MDA 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of GBE on LDH and SOD activities, MDA level in cardiomyocytes culture fluid ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ ($mg\cdot L^{-1}$)	LDH/ ($U\cdot mg^{-1}$)	MDA/ ($g\cdot L^{-1}$)	SOD/ ($U\cdot mg^{-1}$)
对照	—	6 492.0 $\pm$ 825.6	1.018 $\pm$ 0.278	17.728 $\pm$ 0.368
模型	—	7 302.5 $\pm$ 1554.7*	2.601 $\pm$ 0.538***	14.055 $\pm$ 0.201**
异搏定	0.04	3 352.2 $\pm$ 525.7***	1.720 $\pm$ 0.221*	16.382 $\pm$ 0.184
GBE	50	4 250.2 $\pm$ 921.2***	2.117 $\pm$ 0.255***	17.200 $\pm$ 0.369
	100	4 138.0 $\pm$ 818.4***	2.025 $\pm$ 0.339**	17.362 $\pm$ 0.524
	150	2 221.5 $\pm$ 150.0***	1.673 $\pm$ 0.277*	17.362 $\pm$ 0.479

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group

药浓度的增加呈下降趋势;模型组能明显减少 SOD 的量 ($P<0.01$),而 GBE 各组则无明显的变化。结果表明,GBE 能够抵制 MDA 的产生,增加 SOD 活性,保护心肌细胞免受氧化应激的损伤。

2.2 GBE 对心肌细胞线粒体中 SDH、CCO 比活性的影响:结果见表 2。模型组与对照组相比 SDH 及 CCO 活性均有明显下降 ($P<0.001$),GBE 50、100 mg/L 实验组也有不同程度的降低 ($P<0.05$),但与模型组相比其减少幅度较小;150 mg/L GBE 实验组 SDH 及 CCO 比活性与对照组无明显差异。结果表明 GBE 能改善心肌细胞中线粒体的能量代谢。

表 2 GBE 对心肌细胞线粒体中 SDH、CCO 比活性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of GBE on SDH and CCO specific activities in mitochondria of cardiomyocytes ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ ($mg\cdot L^{-1}$)	SDH 比活性/ ($U\cdot min^{-1}\cdot mg^{-1}$)	CCO 比活性/ ($U\cdot min^{-1}\cdot mg^{-1}$)
对照	—	0.914 $\pm$ 0.137	12.629 $\pm$ 0.850
模型	—	0.542 $\pm$ 0.074***	6.433 $\pm$ 1.318***
异搏定	0.04	0.635 $\pm$ 0.101*	13.519 $\pm$ 2.653
GBE	50	0.650 $\pm$ 0.149*	8.894 $\pm$ 1.694*
	100	0.657 $\pm$ 0.103*	9.277 $\pm$ 1.370*
	150	0.951 $\pm$ 0.140	14.196 $\pm$ 1.495

与对照组比较: * $P<0.05$ *** $P<0.001$

* $P<0.05$ *** $P<0.001$ vs control group

2.3 GBE 对心肌细胞超微结构的影响:正常培养乳鼠心肌细胞(图 1-A),细胞核大,核膜清晰,核周围部较密集。胞浆较少,线粒体大小正常,结构完整,细胞膜结构清晰,表面可见有突起。模型组心肌细胞,细胞核固缩成高电子密度的团块状,核膜溶解;细胞膜断裂,细胞内膜空泡变形,细胞呈坏死早期变化(图 1-B)。GBE 50 mg/L 组,细胞核及线粒体明显肿胀,细胞膜结构尚完整,胞浆内可见大量空泡(图 1-C)。GBE 100 mg/L 组,细胞核及线粒体肿胀,细胞膜结构完整,胞浆内可见有空泡(图 1-D)。GBE 150 mg/L 组,细胞核大小正常,核仁清晰可见;线粒体大小及结构基本正常;细胞膜结构完整,细胞之内有少量脂滴颗粒(图 1-E)。

说明高浓度 GBE 能保护 H_2O_2 诱发的心肌细胞损伤,中浓度和低浓度 GBE 对 H_2O_2 诱发的心肌细胞保护作用不明显。

3 讨论

心肌缺血是目前严重威胁人类的常见病、多发病。近年来,用对缺血心肌再灌注的治疗技术,挽救了大量心肌缺血病人的生命,但再灌注本身也可引

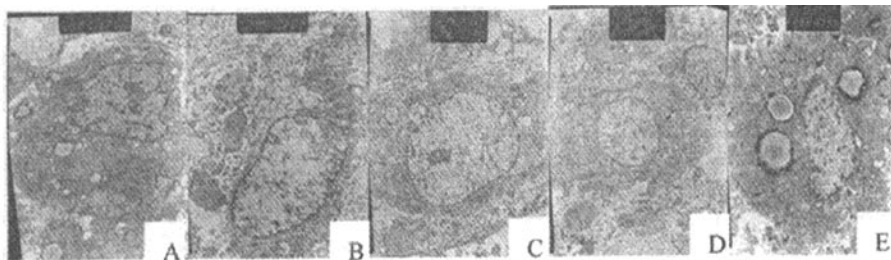


图 1 GBE 对心肌细胞保护的超微结构特征

Fig. 1 Ultrastructural features of injured cardiomyocytes protected by GBE

起心肌损伤而影响其疗效^[5]。心肌缺血时导致氧化应激状态,造成心肌内消除活性氧的保护机制发生改变,产生大量的自由基,进而诱导心肌细胞损伤。心脏疾病时,细胞内活性氧水平的增加和抗氧化剂水平的降低能直接诱导细胞损伤。有研究证实通过外源性活性氧 H_2O_2 ,能建立 H_2O_2 诱导心肌氧化应激的细胞模型^[6]。

细胞在生理条件下不断产生氧自由基,同时机体存在着清除和抑制自由基产生的系统。在再灌注损伤的病理条件下,心肌细胞易产生过量的活性氧自由基,活性氧自由基和细胞膜脂质发生反应,启动自由基连锁反应,引发细胞膜的脂质过氧化反应,造成心肌细胞的严重损伤,心肌细胞培养液中 LDH 活性的高低是细胞膜脂质过氧化损伤程度的显著标志。细胞处于氧化应激状态能产生大量的 MDA,且使 SOD 活性降低。MDA 是氧自由基脂质导致过氧化的代谢性产物,反映体内氧自由基的生成水平及其对组织的损伤程度。在心肌细胞的氧化应激中氧自由基大量合成,攻击细胞膜中的不饱和脂肪酸,造成 MDA 大量增加,储存的 SOD 因清除大量的超氧阴离子而消耗减少,从而导致氧化和抗氧化系统失衡,清除自由基的能力降低,引起心血管组织的进一步损伤。自由基造成对心血管损伤的程度主要与 MDA 水平、SOD 活性变化有关。测定细胞培养液中的 LDH、MDA、SOD 可以直观反应细胞受氧化损伤的程度,以及药物对此的保护作用。本实验表明 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 能损伤心肌细胞,产生氧化应激,表现为 LDH、MDA 的水平上升 ($P < 0.05$, 0.001) 和 SOD 活性下降 ($P < 0.01$),造成自由基增多与脂质过氧化损伤。而加入不同浓度的 GBE 可以有效地抑制 LDH 活性的升高 ($P < 0.001$),对 MDA 水平的升高有抑制作用,GBE 对 LDH 及 MDA 的作用呈剂量依赖关系,同时能有效地维持 SOD 活性。提示 GBE 可能通过增强机体消除自由基的能力,抵制脂质过氧化反应,而达到对心肌的保

护作用。

线粒体是一种结构和功能复杂而敏感的重要细胞器,是细胞能量产生的主要部位,是细胞的活力及生存和死亡的调节中心。心肌细胞耗氧量增大,对氧依赖性强,线粒体是氧化磷酸化的重要场所,因此其功能的损害将直接影响心肌的功能。线粒体是生成氧自由基的主要场所,由于线粒体功能受损后,从呼吸链逃逸的自由基将大量增加,这将加重氧自由基的暴发生成,从而进一步促进氧化应激反应^[7]。SDH 和 CCO 是线粒体内膜呼吸链的关键酶,其活性的改变直接影响着细胞能量代谢的过程,进而影响整个心肌细胞功能^[8]。改善线粒体中 SDH 和 CCO 活性有助于维持线粒体呼吸及能量代谢功能。本实验表明,模型组 SDH、CCO 比活性与对照组相比有显著下降 ($P < 0.001$),而 150 mg/L GBE 能使 SDH 和 CCO 比活性升高,与对照组比较无明显性差异。说明 GBE 能有效地维持心肌细胞中线粒体能量代谢功能,有助于改善心肌细胞的氧化应激状态。

在离体培养的大鼠心肌细胞缺血再灌注损伤模型中,加入不同浓度的 GBE 能明显降低细胞的氧化应激反应,保护心肌细胞;GBE 保护心肌细胞的作用可能与其能维持细胞中线粒体正常呼吸及能量代谢功能有关。

参考文献:

- [1] 陈维洲, 张培智. 银杏叶提取物的药理和临床研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志, 1999, 18(9): 315-317.
- [2] Haramako N, Aggarwal S, Kawabeta T, et al. Effect of natural antioxidant *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) on myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Free Radic Biol Med*, 1994, 6(6): 789-794.
- [3] Pincelail J, Dupuis M, Nasr C, et al. C Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of *Ginkgo biloba* extract [J]. *Experientia*, 1989, 45: 708-712.
- [4] Harary I, Barbave F. *In vivo* studies of single isolated beating heart cells [J]. *Science*, 1960, 131: 1674-1675.
- [5] 关怀敏, 刘璇云, 王生彦, 等. 炎症反应在心肌缺血再灌注损伤的意义及药物干预 [J]. 中国循环杂志, 1998, 13(3): 149-150.

- [6] 曹纯章, 杨绍娟, 卜丽莎, 等. 过氧化氢诱导心肌细胞凋亡性和非凋亡性死亡的研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(5): 457-461.
- [7] Sugawara T, Chen P H. Reactive oxygen radicals and

pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2003, 5(5): 597-607.

- [8] 岳平, 傅世英, 黄水麟, 等. 再灌注损伤心肌线粒体呼吸酶系的变化 [J]. 中华心血管病杂志, 1991, 19(1): 19-38.

壮药依肝达含药血清对 2215 细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg 的影响

梁宁, 邓家刚, 韦松基*

(广西中医学院, 广西 南宁 530021)

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒 (HBV) 引起的, 以肝脏炎性病变为主的一种传染性疾病。尽管已有干扰素及核苷类等各种抗 HBV 药物, 但其疗效均不理想。目前, 中药抗 HBV 已成为国内外的研究热点。壮药依肝达是通过长期的民间临床观察而拟定的治疗急性慢性乙型肝炎和肝硬化的验方, 主要由壮族民间草药饭汤子、田基黄、三姐妹等组成, 具有清热解毒、利湿退黄和促进肝功能恢复之功效, 临床疗效显著。本实验以 2215 细胞株为研究对象, 采用中药血清药理学方法, 研究依肝达的体外抗 HBV 作用。

1 材料

1.1 动物: 昆明种小鼠, 雌雄各半, 体质量 (18~22) g, 动物使用许可证: SYKG 桂 2003—2005, 由广西医科大学实验动物中心提供。

1.2 细胞: 2215 细胞株, 广西中医学院新药开发中心惠赠。

1.3 药品与试剂: 依肝达, 由广西中医学院壮医药学院壮药教研室提取制备 (取组方药材饭汤子、田基黄、三姐妹以 3:5:3 的比例按常规水提法提取); 阿德福韦酯片 (ADF): 天津药物研究院药业有限公司产品, 批号 20070804; MEM 培养基: 美国 Gibco 公司; 胎牛血清: 美国 Gibco 公司; HBsAg 和 HBeAg 酶联免疫检测试剂盒: 北京万泰有限公司, 批号 20080302。

1.4 主要仪器与设备: CO₂ 孵箱 (美国 Thermo Forma 公司); 自动酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); 培养瓶 (美国 Promega 公司产品); 96 孔板 (美国 Corning 公司)。

2 方法

2.1 依肝达含药血清的制备: 18~20 g 小鼠, 随机

分为 3 组, 每组 3 只。对照组: 等量的蒸馏水; 阳性组 (ADF): 20 mg/kg; 依肝达组: 40 g/kg。各组动物在同样条件下饲养, 均以每日 2 次, 早晚各 1 次空腹 ig 给药, 连续给药 3 d。于末次给药 (禁食不禁水) 后 1 h, 摘眼球取血, 分离血清, 经 56 °C 30 min 灭活处理, 培养液分别稀释至 40%、20%, 再经 0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌后, 置 -20 °C 冰箱保存备用。

2.2 ELISA 法定量检测 HBsAg 和 HBeAg: 将 2215 细胞用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养液置于 37 °C、5% CO₂ 环境中的孵养箱中培养, 每天在倒置显微镜下观察其生长情况, 2~3 d 换培养液 1 次, 约 7~10 d 长满培养瓶。在长满 2215 细胞的培养瓶中, 用 0.25% 胰酶消化液进行消化成为单个细胞悬液, 取少量消化后的细胞置于细胞计数板进行计数。调其浓度为含 1×10^5 /mL 细胞, 接种于 96 孔板, 每孔加 100 μL, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。在接种 2215 细胞 24 h 后加 40%、20% 含药血清 (终末体积分数为 20%、10%), 每种体积分数设 3 孔, 于第 4 天换含相同体积分数的含药血清, 维持 8 d, 于第 8 天时收集培养液, 同时采用酶联免疫吸附实验 (ELISA) 法测定 HBsAg、HBeAg。结果以抑制率表示。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组 A 值} - \text{给药组 A 值}}{\text{对照组 A 值}} \times 100\%$$

2.3 统计学处理: 采用 SPSS 13.0 统计软件分析数据, 组间比较采用方差分析, 各均数两两比较。

3 结果

实验结果表明, 依肝达含药血清 (20%、10%) 明显降低 2215 细胞分泌的 HBsAg、HBeAg 抗原水平 ($P < 0.01$), 与阳性组无明显差别, 结果见表 1。

收稿日期: 2008-06-06

基金项目: 科技部“十一五”支撑项目 (2006BAI06A17-03)

作者简介: 梁宁 (1974—), 女, 广西容县人, 讲师, 硕士, 主要从事民族药研究与开发工作。E-mail: liangning_ron@163.com

* 通讯作者 韦松基 E-mail: weisongji@126.com