基础研究 文章编号:0253-3626(2010)02-0224-03

银杏叶提取物对异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌肥厚的影响

苟怀宇[1],陈艳秋[1],黄 晶[2],邓昌明[2],刘地川[2],江永红[2]
(1.重庆市渝北区人民医院心内科,重庆 401120;2.重庆医科大学附属第二医院心内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究银杏叶提取物(Extract of ginkgo biloba,EGb)对异丙肾上腺素(Isoprenaline,Iso)诱导的大鼠心肌肥厚的影响。方法:大鼠 30 只分为正常对照组、ISO 模型组和 EGb 治疗组。测定全心重量指数(Heart weight/Body weight,HW/BW)、左心室重量指数(Left ventricle weight index,LVI);检测左心室心肌组织中丙二醛(Malondialdehyde,MDA)和超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)、谷光苷肽过氧化酶(Glutathione-SH pexoxidase,GSH-Px)、一氧化氮合成酶(Nitric oxide synthetase,NOS)活性。结果:ISO 模型组的 HW/BW、LVI、左心室 MDA 含量和诱生型 NOS(Inducible nitric oxide synthase,iNOS)活性显著高于正常对照组($P<0.05$),SOD、GSH-Px 及结构型 NOS(Constitutive nitric oxide synthase,cNOS)活性比正常对照组低($P<0.05$);EGb 治疗组左心室 MDA 含量、iNOS 活性和心脏重量指数比 ISO 模型组低($P<0.05$),SOD、GSH-Px 和 cNOS 活性明显高于 ISO 模型组($P<0.05$)。结论:EGb 对 ISO 诱导的心肌肥厚的发生有预防作用。

【关键词】银杏叶提取物;异丙肾上腺素;心肌肥厚
【中国图书分类法分类号】R541.6+1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-09

Effect of EGb on cardiac hypertrophy induced by isoproterenol in rat

GOU Huai-yu, et al
(*Department of Cardiology, the People's Hospital of Yubei District in Chongqing*)

【Abstract】*Objective*: To study the effect of EGb on cardiac hypertrophy induced by isoproterenol in rats. *Methods*: 30 rats were randomly divided into 3 groups: normal control group, ISO model group and EGb treatment group. The ratio of HW/BW and LVI were measured. MDA content of left ventricle and the level of SOD, GSH-Px and NOS activities in left ventricle were determined. *Results*: Compared with normal control group, the ratio of HW/BW, LVI and the content of MDA and iNOS activity in left ventricle were significantly increased ($P<0.05$); The SOD, GSH-Px and cNOS activities were obviously decreased in the ISO model group ($P<0.05$). The left ventricular MDA and iNOS activity and the ratio of HW/BW, LVI were significantly lower in EGb treatment group than those in ISO model group ($P<0.05$). The SOD, GSH-Px and cNOS activities were markedly higher than those in ISO model group. *Conclusion*: EGb can prevent the cardiac hypertrophy induced by isoproterenol.

【Key words】Extract of ginkgo biloba; Isoproterenol; Cardiac hypertrophy

心肌肥厚是心血管疾病独立危险因素,与冠心病、心源性猝死、充血性心力衰竭等密切相关。大量研究表明,银杏叶对心脑血管疾病的防治作用与抗氧化活性密切相关[1],其提取物(Extract of ginbgo biloba,EGb)被广泛用于心脑血管疾病[2,3]。但 EGb 是否能抗心肌肥厚尚未见报道。本研究采用异丙肾上腺素(Isoprenaline,ISO)致大鼠心肌肥厚模型,探讨 EGb 对心肌肥厚作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 SD 大鼠 30 只,雌雄不限,体重 180~260 g,购于重庆医科大学实验动物中心。

1.2 药品和试剂

银杏叶提取物质(商品名舒血宁注射液,每 5 ml 含 EGb 17.5 mg,黑龙江省珍宝岛制药公司生产),盐酸异丙肾上腺素注射液(上海禾丰制药有限公司生产);丙二醛(Malondialdehyde,MDA)、一氧化氮合酶(Nnitric oxide synthetase,NOS)、谷光苷肽过氧化酶(Glutathione-SH pexoxidase,GSH-Px)及超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)(南京建成生物工程研究所)。

1.3 大鼠心肌肥厚模型建立

大鼠按体重随机分成 3 组:正常对照组(10 只)、ISO 模型组(10 只)和 EGb 治疗组(10 只)。后面 2 组按参考文献[4]建立大鼠心肌肥厚模型:大鼠背部皮下注射 ISO 5 mg/(kg·d),连续 7 d,自由进食,给水;正常对照组大鼠背部皮下注射等

作者介绍:苟怀宇(1975-),男,主治医师,硕士,研究方向:冠心病诊断和治疗。

体积的生理盐水；EGb 治疗组于造模式第 2 d 开始分别腹腔注射 EGb 50 mg/(kg·d)，连续 60 d；正常对照组和 ISO 模型组大鼠每天腹腔注射相同体积的生理盐水。

1.4 心肌肥厚指数测定

末次给药后禁食 12 h，大鼠称体重（Body weight，BW）后处死，取出心脏去除大血管，心外膜脂肪组织，用生理盐水清洗，吸干后称全心重量（Heat weight，HW），剪除心房和右心室称左心室重量（Left ventricle weigh，LVW）。计算心重指数（HW/BW）和左心室重量指数（LVW/BW 即 Left ventricle weight index，LVI）。

1.5 左心室 MDA 含量和 SOD、GSH-Px、NOS 活性测定

按试剂盒说明规定，分别测定左心室 MDA 含量和 SOD、GSH-Px、NOS 活性测定 。

1.6 病理形态学检查

取心尖部心肌组织，立即置于 4%多聚甲醛中固定，乙醇梯度脱水，常规石蜡包埋，石蜡切片（6 μm）做 HE 染色。在 HE 染色切片中，测量 400 倍光镜下每个心肌细胞跨核的最窄直径和心肌细胞横截面积（Cross section area，CSA）。

1.7 统计学处理

数据用（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间比较用单因素方差分析，两组间比较采用配对 t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 EGb 对大鼠心脏重量指数的影响

ISO 模型组大鼠 HW/BW 和 LVI 的值明显高于正常对照组（$P<0.05$）；EGb 治疗组的 HW/BW 和 LVI 明显低于 ISO 模型组（$P<0.01$）。见表 1。

2.2 EGb 对左心室心肌组织 MDA 含量及 SOD、GSH-Px 活性的影响

ISO 模型组大鼠左心室心肌组织的 MDA 含量明显高于正常对照组（$P<0.05$），SOD、GSH-Px 活性显著低于正常对照组（$P<0.01$）；EGb 治疗组大鼠左心室心肌组织 MDA 明显低于 ISO 模型组（$P<0.05$），SOD、GSH-Px 活性显著高于 ISO 对照组（$P<0.05$）。见图 1 和图 2。

2.3 EGb 对左心室心肌组织 iNOS 和 cNOS 活性的影响

ISO 模型组大鼠左心室心肌组织 iNOS 活性显著高于正常对照组，cNOS 活性显著低于正常对照组（$P<0.01$）；EGb 治疗组大鼠左心室心肌组织 iNOS 活性显著低于 ISO 模型组，cNOS 活性显著高于 ISO 模型组（$P<0.01$）。见表 2。

2.4 光镜观察

光镜下观察正常对照组左心室心肌细胞形态正常，心肌纤维排列整齐，未见心肥组织纤维化，见图 3；ISO 模型组与正常对照组相比，心肌纤维束较宽大，组织可见大量的纤维化，心肌细胞直径和细胞横截面积（CSA）明显增大（$P<0.05$），见图 4；EGb 治疗组与 ISO 组相比，心肌心肥厚程度明显减轻，组织中纤维化明显减少，心肌细胞直径和心肌细胞横截面积（CSA）明显减少（$P<0.05$），见图 5 和表 3。

3 讨 论

心肌肥厚发生的机制十分复杂，血流动力学、神经内分泌异常等因素参与心肌肥厚发生发展。本试验中大鼠皮下注射 ISO 后，由于心率加快而导致心室舒张期缩短而导致心肌供血不足，但缺血再灌注损伤可引起氧自由基爆发式产生[5]。氧自由基的堆积可促进心肌肥厚及纤维化，引起心肌胶原重建及间质重塑[6,7]。EGb 有效成分之一的银杏黄酮，其分子之中含有还原性羟基（-OH）功能基团，可直接发挥抗氧化作用。EGb 另有效成分黄酮类中槲皮素可直接清除氧自由基和过氧华氢，拮抗自由基对不饱各脂肪酸的破坏，抑制氧自由基反应和降低脂质过氧化物含量及提高氧化物歧化酶的活性[8,9]。表明 EGb 可直接通过抗氧自由基而防止心肌肥厚。

本研究观察到 ISO 模型组大鼠心肌组织中的脂质过氧物 MDA 含量明显升高，氧自由基清除酶 SOD、GSH-Px 活性显著降低，大鼠心重指数和左心室重量指数明显增加，提示氧化应激与心肌肥厚的形成密切相关。当应用 EGb 后，心肌组织的 SOD、GSH-Px 活性明显提高，MDA 含量明显降低，大

表 1 EGb 对 ISO 致大鼠心肌肥厚心脏重量指数的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	HW/BW	LVI
正常对照组	3.18 ± 0.51	2.28 ± 0.35
ISO 模型组	3.85 ± 0.33*	2.81 ± 0.32*
EGb 治疗组	3.10 ± 0.25**	2.31 ± 0.31**

*表示与正常对照组比较：$P<0.05$，**表示与 ISO 模型组比较：$P<0.01$

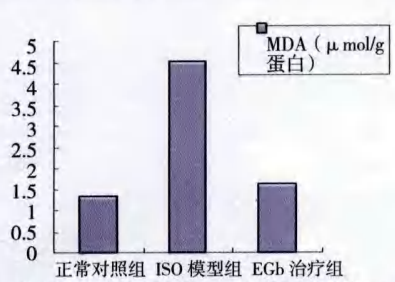


图 1 3 组左心室心肌组织 MDA 含量比较（μmol/g 蛋白）

表 2 EGb 对左心室心肌组织 iNOS 和 cNOS 活性的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	iNOS(10^3U/g 蛋白)	cNOS(10^3 U/g 蛋白)
正常对照组	0.33 ± 0.09	0.79 ± 0.11
ISO 模型组	0.99 ± 0.18##	0.41 ± 0.15##
EGb 治疗组	0.55 ± 0.14*	0.97 ± 0.15**

ISO 模型组与正常组比较：## 表示 $P<0.01$，EGb 治疗组与 ISO 模型比较：* 表示 $P<0.05$，** 表示 $P<0.01$

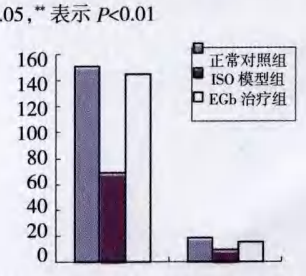


图 2 3 组左心室心肌组织 SOD、GSH-Px 活性比较（10^3 U /g 蛋白）

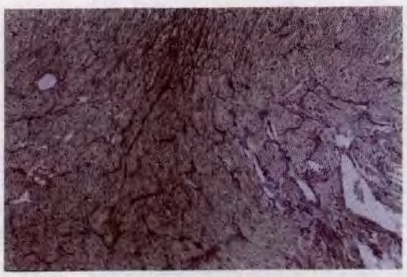


图 3　正常对照组左心室心肌细胞形态

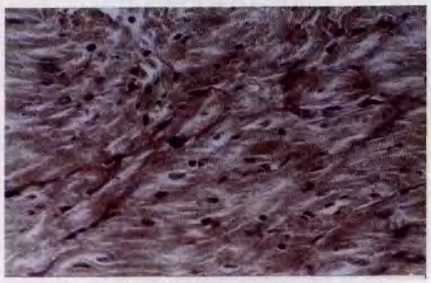


图 5　EGb 治疗组左心室心肌细胞形态

鼠心重指数和左心室重量指数明显降低，心肌间质纤维减少，心肌细胞直径减少及 CSA 减少，表明 EGb 可通过抗氧化作用而防止心肌肥厚。

NO 在心肌肥厚发生发展中有重要作用，长期抑制 NO 的合成会导致与周围血压无关的心肌肥厚；适量的 NO 可抑制心肌细胞增殖，抑制心肌肥厚、纤维变性和心脏重构[10,11]。NO 合成酶分为诱导型和结构型两种。诱导型一氧化氮合酶（iNOS）在心肌缺血缺氧等因素刺激下可产生大量的 NO，它与 O^{2-} 反应生成具有细胞毒性的氧化剂过氧化亚硝酸盐（$ONOO^-$），加重心肌损伤[12]；而结构型一氧化氮合酶（cNOS）（包括 nNOS 和 eNOS）本身可抑制心肌黄嘌呤氧化酶的活性，其产生的 NO 可使心肌收缩下降，对抗肾上腺素能受体被激活所产生的正性肌力作用，防止过量的儿茶酚胺对心肌的损害；可调节细胞外基质蛋白质含量而抑制左心室重构和功能失调；还可使平均血压、心肌肥厚指数和心肌细胞横截面积下降，从而预防心肌肥厚的发生[13,14]。

本研究显示，ISO 模型大鼠 iNOS 的活性升高，cNOS 活性下降；应用 EGb 后，心肌局部中 cNOS 的活性升高，而 iNOS 活性下降。表明 EGb 可通过增加 cNOS 活性，抑制 iNOS 的活性，而防止心肌肥厚。

本研究表明，EGb 能通过清除氧自由基、抗氧化及增加 cNOS 活性，对 ISO 模型大鼠肥厚心肌的发生和发展进行干预和保护。但于，心肌肥厚机制十分复杂，而且 EGb 还具有降血脂和血粘度、抗血小板活化因子、防止内皮功能失调、抗心律失常及提高机体免疫细胞功能等多种作用[8]。故 EGb 对心肌肥厚的影响机制还需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Rodriguez M, Ringstad L, Schafer P, et al. Reduction of herosclerotic nanoplaque formation and size by Ginkgo biloba (EGb 761) in cardiovascular high-risk patients[J]. Atherosclerosis, 2007, 192(2): 438-444.

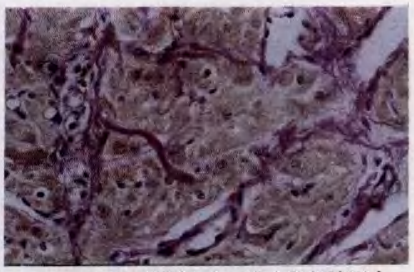


图　4 ISO 模型组左心室心肌细胞形态

表 3　3 组大鼠心肌细胞直径和心肌细胞横截面积（CSA）比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	心肌细胞直径（μm）	CSA（μm^2）
正常对照组	16.33 ± 1.51	516.21 ± 93.23
ISO 模型组	25.79 ± 2.42*	1052.24 ± 43.05*
EGb 治疗组	21.63 ± 2.51**	841.35 ± 85.14**

* 表示与正常对照组比较 $P<0.05$；** 表示与 ISO 组比较 $P<0.05$

[2] Mahadevan S, Park Y. Multifaceted therapeutic benefits of Ginkgo biloba L: chemistry, efficacy, safety, and uses[J]. J Food Sci, 2008, 73(1): 14-19.

[3] Vellas B, Andrieu S, Ousset P J, et al. The GuidAge study: methodological issues. A 5-year double-blind randomized trial of the efficacy of EGb 761 for prevention of Alzheimer disease in patients over 70 with a memory complaint[J]. Neurology, 2006, 67(9 Suppl 3): 6-11.

[4] Borges J, Silva J J, Gomes M, et al. Tonin in rat heart with experimental hypertrophy[J]. Am J Physiol, 2003, 284(6): 2263-2268.

[5] Kutala V, Khan M, Angelos M, et al. Role of oxygen in postischemic myocardial injury[J]. Antioxid-Redox-Signal, 2007, 9(8): 1193-1206.

[6] Sun Y. Oxidative stress and cardiac repair/remodeling following infarction[J]. Am J Med Sci, 2007, 334(3): 197-205.

[7] Seddon M, Looi Y H, Shah A M. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure[J]. Heart, 2007, 93(8): 903-907.

[8] 谭华炳，贺　琴. 银杏叶提取物保护心血管系统功能的作用[J]. 中国临床康复, 2006, 20(5): 155-157.

[9] Schneider R, Welt K, Aust W, et al. Cardiac ischemia and reperfusion in spontaneously diabetic rats with and without application of EGb 761: I. cardiomyocytes[J]. Histol-Histopathol, 2008, 23(7): 807-817.

[10] Zhang P, Xu X, et al. Inducible nitric oxide synthase deficiency protects the heart from systolic overload-induced ventricular hypertrophy and congestive heart failure[J]. Cir Res, 2007, 100(7): 1089-1098.

[11] Wenzel S, Rohde C, Wingerning S, et al. Lack of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide formation favors hypertrophy in adult ventricular cardiomyocytes[J]. Hypertension, 2007, 49(1): 193-200.

[12] Yin G, Du K, Gu F, et al. Early-phase endotoxic shock-induced myocardial injury increases iNOS and selectin expression in macaque primate[J]. Heart Lung Circ, 2007, 16(2): 85-92.

[13] Masano T, Kawashima S, Toh R, et al. Beneficial effects of exogenous tetrahydrobiopterin on left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats: the possible role of oxidative stress caused by uncoupled endothelial nitric oxide synthase[J]. Circ J, 2008, 72(9): 1512-1519.

[14] Shah A. Divergent roles of endothelial nitric oxide synthase in cardiac hypertrophy and chamber dilatation[J]? Cardiovasc Res, 2005, 66(3): 421-422.

（责任编辑：冉明会）