

实验研究

银杏胶囊防治兔动脉粥样硬化的实验研究

刘宇¹ 顾仁樾¹ 王逸平²

摘要 目的:观察银杏胶囊防治动脉粥样硬化的作用。方法:建立兔动脉粥样硬化模型,分别测定动脉壁血小板源性生长因子-A(PDGF-A)基因表达、血浆脂质过氧化物、红细胞内超氧化物歧化酶、主动脉壁形态学、主动脉壁光镜、透射电镜观察。结果:银杏胶囊下调生长因子 PDGF-A mRNA 表达水平,抗脂质过氧化,提高红细胞内超氧化物歧化酶活性;大体形态、光镜、电镜显示,银杏胶囊能减轻动脉粥样硬化病变程度,减少泡沫细胞层数。结论:银杏胶囊有防治动脉粥样硬化作用。

主题词 动脉粥样硬化/中医药疗法 @ 银杏胶囊

银杏叶为银杏科银杏属(*Ginkgo biloba* L.)植物的叶部,主要成分为萜内酯类及黄酮类化合物。既往的研究表明^[1,2],银杏叶防治心脑血管疾病有多方面的作用。本研究揭示从银杏叶中提取出来的制剂银杏胶囊(百路达)对动脉粥样硬化血小板源性生长因子-A(PDGF-A)的影响。

1 材料

1.1 动物:雄性新西兰大白兔 19 只,体重 2.26 ± 0.18kg,由中国科学院上海药物所实验动物中心提供。实验期间兔由中国科学院上海药物所实验动物中心专人饲养,标准室温、湿度。

1.2 药物及试剂:银杏胶囊(商品名:百路达,上海信谊制药厂生产,批号 960716)购自上海医药有限公司;牛血清白蛋白、胆固醇购自上海生物化学试剂总公司;TRIzol 试剂、SuperScript RTs 试剂盒由 GIBCO BRL 公司提供,硫代巴比妥酸(TBA, Sigma 公司),丙二醛(MDA, Sigma 公司),邻苯三酚(Sigma 公司)。其它试剂购自 Sigma 公司华美公司。IGF-1 引物根据文献^[3]上游:5'-GGAAGCACCGTACAGAGCAGGTCAGGATA 3'下游:3'-CCCGGAGCACCGCGAGGAGGAGGCCAG 5'。扩增片段 110 bp, β -actin 引物根据文献^[4]的上游:5'-AATGAGCTTCGCGTTGCCCC 3',下游:3'-TGCCAGCAGATTCCATCCCCG 5'。扩增片段 567 bp。

2 方法

2.1 分组及实验方法:19 只兔随机分成正常对照组 6 只,高脂模型组 6 只,银杏胶囊组 7 只。参照 Lamberson 等^[5]的方法造成兔实验性动脉粥样硬化模型。实验兔耳缘静脉注射牛血清白蛋白每次 250mg/kg,于当日喂拌于饲料的胆固醇每只 1g/日,共 12 周。银杏胶囊组造模后,同时早晚喂饲各组每日 32.5mg/kg。

2.2 组织总 RNA 提取和 PDGF-A mRNA RT-PCR 测定:根据 GIBCO BRL 公司 TRIzol 试验盒说明书,采用一步法提取总 RNA,紫外分光光度计定量($OD_{260}/OD_{280} > 1.8$)。根据 SuperScript RTs 试验盒说明进行逆转录反应。用 5 μ g 总 RNA 逆转录合成 cDNA。20 μ l 逆转录体系包括:DEPC ddH₂O 9 μ l,总 RNA 2 μ l,100pmol 随机六聚体引物 1 μ l,70℃ 10min,冰浴 5min,然后加入 5 $\times$ 逆转录酶缓冲液 4 μ l,10mM dNTP 1 μ l,100mM DTT 2 μ l,M-MLV 1 μ l(250 μ),42℃ 2min,25℃ 10min,42℃ 50min,70℃ 5min,-20℃ 保存。总 RNA 经 RT 反应后聚合酶链反应(PCR 反应),采用 2 对引物在同一体系中进行 PCR 反应,其中 β -actin 的引物作为内参。10 μ l PCR 反应体系包括:10 $\times$ PCR 缓冲液 1 μ l,50mM MgCl₂ 0.3 μ l,2.5mM dNTP 0.8 μ l,10pmol primer 目的基因正负链各 1 μ l,10pmol β -actin primer 正负链各 1 μ l,RT 产物 1 μ l(100ng),Taq 酶 0.1 μ l(0.1U),ddH₂O 1.8 μ l,振荡混匀,加 10 μ l 液体石蜡,置 DNA 扩增仪上扩增,反应依次进行 94℃ 变性 45s,64℃ 退火 45s,72℃ 延伸 1min,30 次循环,结束后 5%PAG 胶上进行电泳,电泳缓冲液 1 $\times$ TBE。银染显色^[6]取电泳后 PAG 胶,10%乙醇固定 10min,ddH₂O 冲洗 2 次,0.2M HNO₃ 冲洗 2 次,0.012M AgNO₃ 吸附 25min,ddH₂O 冲洗 3 次,0.28M Na₂CO₃,0.018% 甲醛染色,10%冰乙酸固定后,将 PAG 胶放于油泵干燥机上加热抽干约 1 小时,于凝胶图像分析并拍照。

2.3 脂质过氧化物(LPO)、红细胞内超氧化物歧化酶(SOD)的测定:LPO 采用改良的八木国夫法^[7]测定,红细胞内 SOD 测定采用邻苯三酚自氧化抑制法^[8]。

2.4 主动脉壁形态学观察:标本纵形切开,生理盐水

1 上海中医药大学附属龙华医院心内科,上海市宛平南路 725 号(200032)

2 中国科学院上海药物研究所

收稿日期:2001-11-26;修回日期:2002-10-05

冲净后,观察动脉内膜面粥样斑块的大小、部位、范围。硬化分级标准参照余艳辉等^[9]分级;取胸主动脉上段予10%甲醛浸泡固定,常规脱水,透明,包埋,切片,经HE染色,封片,在光镜下观察主动脉粥样硬化变化,并照像。参照汪健等^[10]的方法,评定病变程度。

主动脉壁透射电镜观察,主动脉靠近升主动脉起始段1~2mm³小块组织,4℃2%戊二醛中固定2小时,经二甲砷酸钠缓冲液冲洗后,再固定于1%锇酸溶液中,酒精梯度脱水,经618环氧树脂包埋后,切片厚500Å,经醋酸铅与枸橼酸铅双重染色,透射电镜下观察。

2.5 统计学方法:所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料采用方差分析,计数资料采用Ridit进行数据处理。

3 结果

3.1 各组动物造模前后体重变化的比较:实验过程中,有2只动物死亡,正常对照组、高脂模型组各1只。实验前正常对照组、高脂模型组、银杏胶囊组各组体重(kg)分别是 2.25 ± 0.34 、 2.23 ± 0.15 、 2.17 ± 0.13 ,差异无显著性($P > 0.05$),高脂12周后,各组平均体重较实验前明显增加,正常对照组、高脂模型组、银杏胶囊组各组体重(kg)分别是 3.42 ± 0.31 、 3.25 ± 0.38 、 3.40 ± 0.25 ,但各组与正常对照组比较差异无显著性($P > 0.05$)。

3.2 各组PDGF-A mRNA表达,血浆LPO、SOD、动脉粥样硬化程度比较:动脉粥样硬化组织PDGF-A mRNA表达分析显示,高脂模型组比正常对照组动脉粥样硬化组织PDGF-A mRNA表达明显增加($P < 0.01$),银杏胶囊组治疗后比高脂模型组PDGF-A mRNA表达明显降低($P < 0.05$)。高脂模型组动脉粥样硬化血浆LPO比正常对照组明显增高($P < 0.01$),高脂模型组SOD较正常对照组明显降低($P < 0.05$),银杏胶囊组治疗后均显著降低动脉粥样硬化血浆LPO($P < 0.05$),明显升高SOD($P < 0.05$)。动脉粥样硬化形态学分析显示,肉眼观察正常对照组主动脉壁光滑,无异常隆起、斑块,高脂模型组均有块状黄色隆起,多呈融合状态,严重者几乎覆盖主动脉至腹主动脉,银杏胶囊组见线状、少量融合状斑块,多位于主动脉弓部,降主动脉开口处。在粥样硬化分级程度,银杏胶囊组明显低于高脂模型组($P < 0.05$),见附表。

3.3 光镜观察:正常对照组血管壁内膜光滑,层次清晰。高脂模型组动脉内膜呈新月形隆起,内膜下大量含脂质泡沫细胞增生,散在性个别细胞膨大崩解、液化,伴平滑肌细胞增生和少量炎性细胞浸润。银杏胶囊组内膜下平滑肌细胞增生减轻,泡沫细胞层数减少。病变

程度银杏胶囊组动脉粥样硬化病变程度明显减轻,银杏胶囊组轻度病变4例,中度病变3例,重度病变0例;高脂模型组轻度病变4例,中度病变3例,重度病变0例;两组比较有显著性差异($P < 0.05$)。透射电镜观察正常对照组主动脉内皮细胞紧密连续,内皮细胞下间隙狭小,主动脉中膜平滑肌胞质内有少量线粒体、内质网等细胞器,胞质内含较多肌丝、致密体。高脂模型组内皮细胞呈节段囊状膨大,表面不规则隆起,细胞内饮泡增多,中膜平滑肌侵入内膜,内质网扩张,高尔基体增多,合成型平滑肌细胞明显增多,肌丝分布减少,内膜下见多层泡沫细胞,并见胞质内脂滴、髓样小体、基质增多等,银杏胶囊组病变明显减轻,内膜下泡沫细胞层数减少,平滑肌细胞增生减轻,脂滴含量减少,增生的平滑肌细胞胞浆内内质网、高尔基体、线粒体较少,肌丝含量较多,收缩型平滑肌细胞较多。

4 讨论

PDGF因首先在血小板中发现有促进细胞增殖的效应,而被命名为血小板源性生长因子。机体的多种细胞(如单核巨噬细胞、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、胚胎细胞、原巨核细胞、造血源细胞及转化细胞等)有合成和/或分泌PDGF或PDGF样物质的能力。PDGF具有致分裂活性和趋化性,促进多种细胞血管平滑肌细胞、成纤维细胞的分裂增殖,诱导血管平滑肌细胞和成纤维细胞的趋化性,在动脉粥样硬化的血管平滑肌细胞迁移和增殖中起着重要作用^[11,12]。Fuster等^[13]进一步在细胞培养中观察到,大量的丝裂原能刺激血管平滑肌细胞增殖,间接引起血管平滑肌细胞迁移,但只有PDGF能直接引起血管平滑肌细胞迁移。PDGF还可激活循环血液中的单核细胞,使单核细胞粘附聚集进入血管壁形成泡沫细胞。PDGF刺激血管平滑肌细胞膜表面的低密度脂蛋白(LDL)的受体活性,提高动脉内膜细胞对LDL的反应性,促进血管平滑肌细胞通过受体途径或其它途径摄取LDL,同时加速胆固醇合成酯化^[14],抑制受体介导的从细胞内排出胆固醇的作用,与泡沫细胞形成密切相关。因此PDGF在动脉粥样硬化的发生、发展中起着特殊作用。本实验中观察到主动脉壁动脉粥样硬化组织中PDGF-A mRNA表达比正常对照组的主动脉血管壁明显增多,与以往的研究^[15,16]人动脉斑块中的血管平滑肌细胞、内皮细胞、单核细胞表达PDGF mRNA明显增加一致。本研究证实银杏胶囊通过下调PDGF-A mRNA转录水平,影响血管平滑肌细胞增殖及迁移,干预动脉粥样硬化的发生、发展。

已有研究显示^[1,2],银杏叶制剂通过抑制NADPH

附表 各组 PDGF-A mRNA 表达, 血浆 LPO、SOD, 动脉粥样硬化程度的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	标本数	PDGF-A mRNA	LPO(nmol/ml)	SOD(U/gHb)	硬化分级
正常对照组	5	0.38±0.05	1.82±0.23	3198.20±335.11	0
高脂模型组	5	1.16±0.18**	3.62±0.39**	2399.40±573.76	3.20±0.45
银杏胶囊组	7	0.85±0.07△	2.66±0.35△	3655.1±529.05△	1.86±0.69*

与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与高脂模型组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

氧化酶的活性,清除氧自由基,抗脂质过氧化作用;且通过抗血小板功能,抑制血小板活性。脂质过氧化作用是在不饱和脂肪酸中发生的一系列自由基反应,产生 LPO。LPO 能修饰 LDL 和 HDL,氧化修饰的 LDL 促进单核细胞和平滑肌细胞对 LDL 的吞噬,减少胆固醇的清除,加速泡沫细胞的形成^[17,18],这些都和动脉粥样硬化的初始病变密切相关。机体可通过保护性酶系统 SOD 等参与自由基的清除,中止自由基的反应,而减轻 LPO 损伤。本实验观察到,银杏胶囊明显降低动脉粥样硬化的血浆 LPO,升高 SOD。因此清除氧自由基,减少 LPO 形成,增加抗氧化能力,以及保护内皮细胞的功能,是银杏胶囊干预动脉粥样硬化的另一机制。从银杏胶囊对动脉粥样硬化形态学进一步证实,银杏胶囊明显减少黄色斑块隆起,硬化程度分级明显减轻,HE 染色后光镜观察,内膜下泡沫细胞层数减少,平滑肌细胞增生减轻,偶见炎性细胞浸润,病变程度明显减轻。电镜观察,内皮细胞改变减轻,泡沫细胞减少,收缩型平滑肌细胞较多,平滑肌细胞胞浆内内质网、高尔基体、线粒体较少,肌丝含量较多,细胞分化程度较好。总之,银杏胶囊可能通过多种途径防治动脉粥样硬化形成。

参考文献

- 1 赵保路. 银杏叶提取物抗氧化和防治心脑血管疾病的作用机理研究. 中华老年心脑血管病杂志, 2000, 2(1): 65-68.
- 2 张立. 银杏叶制剂药理研究进展. 中国中医基础医学杂志, 2000, 6(9): 68-69.
- 3 Harris DE, Warshaw DM, Periasamy M. Nucleotide sequences of the rabbit alpha-smooth-muscle and beta-non-muscle actin mRNAs. Gene. 1992, 112(2): 265-272.
- 4 Braissant O, Wahli W. A simplified in situ hybridization protocol using non-radioactively Labelled probes to detect-abundant and rare mRNA on tissue sections. Biochemica, 1998, 1: 10-16.
- 5 Lamberson HV Jr, Fritz KE. Immunological enhancement of atherogenesis in rabbits. Arch Pathol, 1974, 98(1): 9-16.
- 6 J. 萨姆布鲁克, EF. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1996: 886.
- 7 董伟, 李新建. 血浆脂质过氧化物荧光测定. 基础医学与临床, 1990, 10(4): 49-51.
- 8 黄维嘉, 陈宏福, 黄天禄. 邻苯三酚自氧抑制法测定人红细胞超氧化物歧化酶. 中华医学检验杂志, 1989, 12(4): 206-209.
- 9 余艳辉, 廖湘萍, 李智, 等. 兔高脂蛋白血症模型建立及动脉粥样斑块形成的方法. 中国药理学通报, 1998, 14(5): 473-474.
- 10 汪建, 卢泳才, 郭肇峰, 等. 高脂兔过氧化脂质代谢与 PGI₂/TXA₂ 平衡. 中华医学杂志, 1987, 67(5): 2761-2765.
- 11 Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The Biology of PDGF. Cell, 1986, 46(2): 155-169.

- 12 Majesky MW, Reidy MA, Bowen-Pope DF, et al. PDGF ligand and receptor gene expression during repair of arterial injury. J Cell Biol, 1990, 111(5Pt1): 2149-2158.
- 13 Fuster V, Badimon JJ, Badimon L, et al. Clinical - pathological correlations of coronary disease progression and regression. Circulation, 1992, 86(Suppl 1): 1-11.
- 14 Chait A, Ross R, Albers JJ, et al. PDGF stimulates activity of low density lipoproteins receptors. Proc Natl Acad Sci USA, 1980, 77(7): 4084-4088.
- 15 Krettek A, Fager G, Lindmark H, et al. Effect of phenotype on the transcription of the genes for PDGF isoforms in human smooth muscle cells, monocyte-derived macrophages, and endothelial cells in vitro. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17(11): 2897-2903.
- 16 Wilcox JN, Smith KM, Williams LT, et al. PDGF mRNA detection in human atherosclerotic plaques by in situ hybridization. J Clin Invest, 1988, 82(8): 1134-1143.
- 17 Heinecke JW, Baker L, Rosen H, et al. Superoxide-mediated modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. J Clin Invest, 1986, 77(3): 757-761.
- 18 Szczeklik A, Gryglewski RJ. A possible role of oxidized LDL in atherosclerosis. Klin Labor, 1992, 38: 24-32.

新药保健品研发、申报、政策咨询服务

中医杂志社东方岐黄科技服务中心多年来致力于为各界提供专业化服务, 依托优质资源, 信誉卓著, 现特向制药行业和保健品生产企业提供全方位的新药及新保健食品研发、申报、政策咨询等服务, 其宗旨是降低企业成本、缩短新品开发周期、规避项目投资风险、提高企业效率。业务内容包括:

1. 中药新药的研制与报批: 将按照企业要求, 对其组方和剂型邀请新药评审专家进行咨询和调整, 联合国内权威中药研究机构进行预试试验、临床前研究及资料总结, 申报临床批文, 进行临床管理并组织临床总结, 申报新药证书、生产批准文号及后期的转正等。
2. 西药新药的临床前研究与报批: 将根据企业所确立的项目内容, 查询专业情况, 联合国内权威西药研究机构进行临床前研究及资料总结, 申报临床批文, 进行临床管理并组织临床总结, 申报新药证书、生产批准文号及后期的转正等。
3. 中药保护品种的申报: 根据中药品种保护条例的有关要求, 对企业拟申报品种的相关申请资料进行规范整理和补充, 并代理申报, 直至获得保护证书。
4. 仿制药品的申报: 根据国家药监局新药管理有关规定, 对已通过 GMP 认证企业的拟仿制品种提供全程的技术服务, 直至获得证书。
5. 保健食品、化妆品、消毒产品的申报: 按照卫生部对健康相关产品的管理规定, 对企业拟生产的上述产品自处方起提供全面的技术咨询和服务, 直至获证。
6. 进口药品、医疗器械、保健品、化妆品的代理申报: 按照国家药监局、卫生部的相关规定, 对国外企业或国内代理经销的进口产品的申请资料安排具体检验事宜, 进行规范整理和补充, 并代理申报, 直至获得进口证书。此类工作将依照国家有关政策, 按程序申报直至获得相关结果。热忱欢迎广大医药界朋友与本中心联系!

地址: 北京东直门内南小街 16 号中医杂志社, 邮编: 100700, 电话: (010) 64013009, 传真: (010) 86472013。

网址: www.jtcm.net.cn, E-mail: jtcm@public3.bta.net.cn