

银杏叶提取物对血管平滑肌细胞凋亡的影响及相关因素

梁新剑,董少红,罗林杰,李 军

(深圳市人民医院,广东深圳 518020)

摘要: 目的 观察银杏叶提取物(ginkgo biloba extract, Egb)对血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)凋亡的影响,初步探讨其可能机制。方法 采用组织贴块法培养胎儿主动脉 VSMC。在不同 Egb 浓度及培养时间下,检测各组细胞凋亡率,并检测 Fas 及 Bcl-2 的表达量。结果 凋亡细胞比率结果显示, Egb 组凋亡细胞比率明显增加,在浓度为 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时间为 24 h 组的凋亡细胞比率最高,而且最高值已经达到了 35.50% \pm 0.63%; Fas 蛋白阳性细胞率与 Egb 浓度和时间的增加呈现一定的正相关。Fas 蛋白阳性细胞率在 6 h 组为 5.67% \pm 1.04%, 24 h 组增加为 11.00% \pm 0.56% 左右, Egb 在浓度为 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时间为 24 h 组比率最高达到 33.20% \pm 1.22%; Bcl-2 蛋白阳性细胞率与 Egb 浓度和作用时间呈现明显的负相关, Egb 组在浓度为 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时间为 24 h 组比率降低到 8.33% \pm 0.87%。结论 Egb 可以诱导 VSMC 的凋亡; Egb 诱导 VSMC 的凋亡过程与 Fas 表达增加和 Bcl-2 的表达减少有着直接的联系。

关键词: 平滑肌细胞; 银杏叶提取物; 凋亡细胞性

中图分类号: R33 文献标志码: A 文章编号: 1007-9688(2016)01-0089-03

Experiment on the influence of ginkgo biloba extract on apoptosis of vascular smooth muscle cell

LIANG Xin-jian, DONG Shao-hong, LUO Lin-jie, LI Jun

(Shenzhen People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518020, China)

Abstract: Objectives To observe the effect of ginkgo biloba extract (Egb) on vascular smooth muscle cell (VSMC) apoptosis, and to preliminary discuss its possible mechanism. **Methods** Fetal aortic VSMC was cultured by tissue piece holding method. Cell apoptosis rate in different incubation duration and concentration of Egb was tested. Fas and expression of Bcl-2 were also detected. **Results** Ratio of apoptotic cells in Egb group significantly increased, the highest ratio was in concentration of 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with incubation duration of 24 h group which reached 35.50% \pm 0.63%. Fas protein positive-cell rate was positively correlated with concentration and incubation duration of Egb. Rate of Fas protein positive cell in 6 h group was 5.67% \pm 1.04%, in 24 h group increased to 11.00% \pm 0.56%; the highest rate of Fas protein positive cell was in concentration of 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with duration of 24 h group which reached to 33.20% \pm 1.22%. Bcl-2 protein positive-cell rate was negatively correlated with Egb concentration and incubation duration, the lowest Bcl-2 protein positive-cell rate was in Egb concentration of 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with incubation duration of 24 h group which reached to 8.33% \pm 0.87%. **Conclusions** Egb can induce the apoptosis of VSMC, which is directly correlated with the increasing expression of Fas and decreasing expression of Bcl-2.

Key words: smooth muscle cells; ginkgo biloba extract; apoptotic cells

银杏是银杏科植物,国内、外许多学者都对其化学成分及药理作用进行了深入研究,其中银杏叶的研究最引人注目,银杏叶的化学成分复杂,黄酮类、萜内酯类和聚异戊烯醇类物质是银杏叶发

挥药理活性的主要成分。银杏叶提取物(ginkgo biloba extract, Egb)为现代制药工艺从传统中药银杏叶中提取出的有效成分,近年来的研究显示 Egb 具有抑制血小板异常聚集、抗血栓形成、提高超氧化物歧化酶活性、抗自由基等作用,但 Egb 对血管平滑肌细胞的影响研究较少。为了深入了解 Egb 对机体的影响和作用,为临床制药和用药提

作者简介:梁新剑(1978-),男,主治医师,研究方向为冠心病介入治疗。

供依据,笔者进行了 Egb 对胎儿血管平滑肌细胞影响的相关研究,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

本次研究使用到的试剂主要有:鼠抗人 α -actin 单克隆抗体 (Neumark, US) 和商品名为金纳多的 Edg。用到的主要仪器为:Fas-Fitc 标记流式细胞仪检测试剂盒 (Pharmingen), Annexin-V Fitc 标记联合碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 凋亡检测试剂盒 (Imunotech)。

1.2 细胞培养方法

取水囊引产胎儿。无菌条件下取得主动脉平滑肌层。参考 Campbell^[1]酶消化组织贴块法获得血管平滑肌原代细胞。置于 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养。2~3 周后呈致密细胞层。细胞生长过程呈现“峰与谷”的特点,通过鼠抗人 α -actin 免疫组化法确认细胞为血管平滑肌细胞。实验所用的细胞样本全部为 3~10 代传代细胞。

1.3 细胞分组方法

细胞分组的过程选取 3 个血管平滑肌细胞,为了获得增殖静止,预先使用含 1%小牛血清的 DMEM 进行培养,接着使用含 20%小牛血清的 DMEM 促使血管平滑肌细胞再次进入增殖周期,随后分别加入不同浓度的 Egb 溶液进行培养。浓度设定分别为:0(对照组)、200、400、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。分别测量 6 h、12 h、24 h 组细胞的凋亡率。

1.4 凋亡细胞比率测量方法

胰酶消化法收集细胞,以 Fitc 标记的 Annexin-V 5 μL 染色并加 PI 10 μL 后,上流式细胞仪测量凋亡细胞比率。Annexin-V+/PI-象限区认定为凋亡细胞。

1.5 Fas 蛋白阳性细胞率测量方法

胰酶消化法收集细胞,离心弃上清。加入 Fitc 标记的 Fas 单抗 5 μL 染色后,上流式细胞仪测量 Fas 表达量。

1.6 Bcl-2 蛋白阳性细胞率测量方法

胰酶消化法收集细胞,离心弃上清。加入 Fitc 标记的 Bcl-2 单抗 5 μL 染色后,上流式细胞仪测量 Bcl-2 表达量。

1.7 统计学分析

数据采用 SPSS 19.0 进行处理。计量资料用 ($\bar{x}\pm s$) 表示,组间对比用 *t* 检验。计数资料用率表示,组间对比用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计

学意义。

2 结果

2.1 不同 Egb 浓度及时间组凋亡细胞比率比较

从空白对照组的实验结果来看,凋亡细胞比率随着时间的延长而增加,不同时间点之间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$),24 h 组为 $2.17\%\pm 0.15\%$ 。Egb 组凋亡细胞比率比对照组明显增加,Egb 在浓度为 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时间为 24 h 组凋亡细胞比率最高,而且最高达到了 $35.50\%\pm 0.63\%$ 。随着时间的延长、Egb 浓度的增加,其细胞凋亡率的增加,组间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$),详见表 1。

表 1 不同 Egb 浓度及时间组 VSMC 凋亡细胞率比较 [% , $\bar{x}\pm s$]

时 间	0/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	200/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	400/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	800/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
6 h	0.67 \pm 0.15	2.70 \pm 0.26	3.77 \pm 0.25	6.67 \pm 0.42
12 h	1.67 \pm 0.15	6.57 \pm 0.12	15.53 \pm 0.83	23.57 \pm 0.51
24 h	2.17 \pm 0.15	10.20 \pm 0.40	28.23 \pm 0.35	34.43 \pm 0.65
F 值	94.009	1137.423	3747.998	4173.626
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

2.2 不同 Egb 浓度及时间组 Fas 蛋白阳性细胞率比较

实验结果表明 Fas 蛋白阳性细胞率与 Egb 浓度和时间的增加呈现一定的正相关关系。从空白对照组的数据来看,蛋白阳性细胞率在 6 h 组为 $5.67\%\pm 1.04\%$,24 h 组增加到 $11.00\%\pm 0.56\%$,在 Egb 浓度为 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时间为 24 h 组比率最高,达到 $33.20\%\pm 1.22\%$ 。不同 Egb 浓度及时间组 Fas 蛋白阳性细胞率比较,差异有统计学意义 ($P<0.05$),详见表 2。

表 2 不同 Egb 浓度及时间组 Fas 表达率比较 [% , $\bar{x}\pm s$]

时 间	0/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	200/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	400/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	800/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
6 h	5.67 \pm 1.04	9.80 \pm 1.40	12.70 \pm 0.80	20.87 \pm 0.93
12 h	8.27 \pm 1.04	12.73 \pm 0.91	17.73 \pm 0.86	28.23 \pm 1.21
24 h	11.00 \pm 0.56	16.93 \pm 2.45	25.17 \pm 1.45	33.20 \pm 1.22
F 值	87.443	1096.417	3698.002	4030.019
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

2.3 不同 Egb 浓度及时间组 Bcl-2 蛋白阳性细胞率比较

实验数据显示 Bcl-2 蛋白阳性细胞率与 Egb 浓度和作用时间呈现明显的负相关关系。通过对空白对照的对比发现,空白对照组 6 h 的 Bcl-2

蛋白阳性细胞率为 34.57%±1.50%，到 24 h 减少为 20.97%±1.46%，组间比较差别具有统计学意义 ($P<0.05$)。不同 Egb 浓度及时间组 Bcl-2 蛋白阳性细胞率比较，详见表 3。

表 3 不同 Egb 浓度及时间组 Bcl-2 表达率比较 [%， $\bar{x}\pm s$]

时 间	0/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	200/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	400/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	800/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
6 h	34.57±1.50	29.17±0.81	24.97±0.60	21.33±1.07
12 h	31.53±0.85	19.90±0.87	15.23±1.91	12.37±0.55
24 h	20.97±1.46	15.37±1.36	9.87±0.64	8.33±0.87
F 值	17.950	93.823	25.614	71.669
P 值	0.001	0.000	0.000	0.000

3 讨 论

介入治疗降低了冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)患者的病死率,提高了患者的生活质量,但支架内再狭窄一直困扰着介入医生。虽然药物支架及药物球囊的问世降低了再狭窄的发生率,但是冠状动脉再狭窄是一个包含有平滑肌细胞增殖及凋亡以及血管重构、血管炎症、血管内皮细胞增殖等多种复杂的病理生理过程,而血管平滑肌细胞的凋亡不足可能对其有着重要的影响。有研究发现血管平滑肌细胞在经皮冠状动脉腔内血管成形术(PTCA)后 24 h 即开始增殖,48 h 达到高峰,3~4 d 内处于增殖状态的血管平滑肌细胞开始向内膜迁移^[2]。伴随血管平滑肌细胞的增殖,血管平滑肌细胞凋亡也开始加速^[3]。因此,血管平滑肌细胞凋亡受阻可能是血管再狭窄发病机制中的一个重要环节。Fas 蛋白在多种组织细胞中存在。有研究表明一氧化氮供体可以通过上调 Fas 的表达量诱导培养的平滑肌细胞凋亡^[4]。

影响平滑肌细胞凋亡现象的重要作用因数为 Bcl-2 的表达减少。通过对人的原发型动脉粥样硬化以及再狭窄两个过程研究发现,Bcl-2 的表达存在于两种损伤过程中,而且只存在于中膜的血管壁中^[6]。有研究发现牛主动脉平滑肌细胞凋亡与对照组相比,前者的凋亡细胞 Bcl-2 表达量明显少于后者。Egb 是从银杏树的果实以及叶子的丙酮溶液中提取获得,研究表明 Egb 可以诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡^[7],同时又可以保护肾小管上皮细胞,对抗过氧化氢的诱导凋亡作用^[8]。本研究在体外培养的条件下,证实 Egb 可以诱导血管平滑肌细胞凋亡后,进一步检测 Fas 及 Bcl-2 表达率,研究结果显示,Egb 诱导血管平滑肌细胞凋亡

的机制可能通过其对 Fas 及 Bcl-2 的影响产生。

本研究结果显示,Egb 在浓度为 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时间为 24 h 组凋亡细胞比率最高,而且最高值已经达到了 35.50%±0.63%。随着时间的延长,Egb 浓度的增加,其细胞凋亡率的增加具有统计学意义 ($P<0.05$);而从 Fas 蛋白表达情况来看,Fas 蛋白阳性细胞率在 6 h 组为 5.67%±1.04%,24 h 组增加为 11.00%±0.56%左右,Egb 在浓度为 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时间为 24 h 组 Fas 蛋白阳性细胞率最高达到 33.20%±1.22%,组间比较差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。Bcl-2 蛋白阳性细胞率在 6 h 时为 34.57%±1.50%,到 24 h 减少为 20.97%±1.46%,组间比较差异具有统计学意义 ($P<0.05$),提示 Bcl-2 蛋白阳性细胞率与时间及 Egb 浓度呈负相关。该研究结论与董少红等^[9]的研究相一致,也进一步明确了 Egb 对血管平滑肌细胞的影响及作用。

虽然药物支架及可吸收支架应用于临床带来很多获益,但再狭窄始终是介入医生不能回避的话题。我们不应忘记的是再狭窄涉及到多方面的病理生理改变,我们的研究揭示诱导血管平滑肌细胞凋亡可能是一个新的方向。

参考文献:

- [1] CAMPBELL J H, CAMPBELL G R. Culture techniques and their applications to studies of vascular smooth muscle techniques in clinical research[J]. Clin Sci, 1993, 85(12): 501-502.
- [2] WILLIAMS H, JOHNSON J L, JACKSON J L, et al. MMP-7 mediates cleavage of N-cadherin and promotes smooth muscle cell apoptosis[J]. Cardiovasc Res, 2010, 87(1): 137-146.
- [3] CHEN C H, HO Y C, HO H H, et al. Cysteine-rich protein 2 alters p130Cas localization and inhibits vascular smooth muscle cell migration[J]. Cardiovasc Res, 2013, 100(3): 461-471.
- [4] LI L, CHEN H Z, ZHANG Z Q, et al. Up-regulation of Fas ligand expression by sirtuin 1 in both flow-restricted vessels and serum-stimulated vascular smooth muscle cells [J]. Chin Med Sci J, 2013, 28(2): 65-71.
- [5] ORLANDI, FRANCESCONI A, COCCHIA D, et al. Phenotypic heterogeneity influences apoptotic susceptibility to retinoic acid and cis-platinum of rat arterial smooth muscle cells in vitro: implications for the evolution of experimental intimal thickening[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21(9): 1118-1123.
- [6] WANG T, DONG C M, SUSAN C, et al. Overexpression of soluble Fas attenuates transplant arteriosclerosis in rat aortic allografts[J]. Circulation, 2002, 106(19): 1536-1542.

(下转第 95 页)

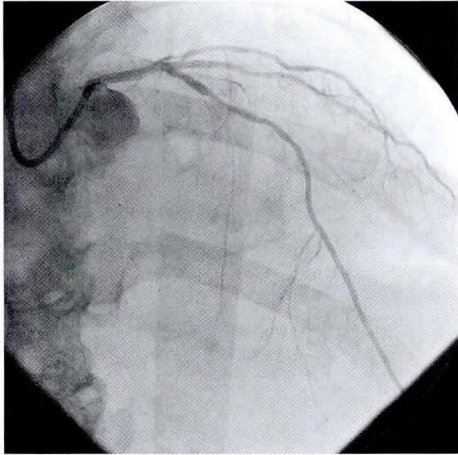


图 11 冠状动脉造影图像(十一)

床后果^[1]。常见成因包括支架球囊绑载不牢、病变钙化扭曲、预扩张欠充分、指引导管与冠状动脉口同轴性差等。目前, 支架脱载后处理措施主要有微型线圈摘取器摘取法、多根导丝缠绕、小球囊低压膨胀回撤、支架挤压法、外科取出术或紧急冠状动脉旁路移植(CABG)等^[2]。本例患者支架脱载原因考虑为左前降支近、中段钙化严重, 虽 2.0 mm 球囊成功 PTCA, 但预扩张仍不充分, 在支架无法到位的情况下反复推送, 从而导致支架推送杆脱离。因担心支架脱落于指引导管内, 同时左前降支近端钙化明显, 无法排除支架脱载于导管内, 予撤出导管导丝确认安全后, 再次造影提示支架部分进入 D1。因 D1 近端直径约 2.0~2.5 mm, 故

计划行支架挤压法。操作中送入导丝成功穿过脱载支架至 D1 远端, 但直径 1.25 mm 球囊未能进入支架(考虑导丝部分进入支架网眼)。送入第二根导丝计划行多根导丝缠绕或支架挤压法, 却再次侥幸穿过脱载支架, 并成功送入直径 1.25 mm 球囊, 分别以直径 1.25 mm、2.0 mm、2.5 mm 多球囊分段依次原地释放支架。接着处理左前降支病变时, 将 D1 突入左前降支的支架贴至血管一侧, 保证左前降支主干血流。本例患者虽成功完成手术, 但存在侥幸因素: (1) 双导丝及球囊成功进入脱载支架内; (2) D1 血管尚匹配直径 2.5 mm 的支架。

本案例的经验教训: (1) 支架植入前, 需充分正确判断靶血管病变解剖特点, 选择恰当的支架、指引导管及导丝, 并进行充分的预扩张, 尤其是严重钙化扭曲病变; (2) 支架脱载发生后时, 需冷静地考虑包括冠状动脉旁路移植术在内的多种措施, 积极处理, 以免继发严重后果。

参 考 文 献:

- [1] HONG Y M, LEE S R. A case of guide wire fracture with remnant filaments in the left anterior descending coronary artery and aorta[J]. Korean Circ J, 2010, 40(9): 475-477.
- [2] BRILAKIS E S, BEST P J, ELESBER A A. Incidence, retrieval methods, and outcomes of stent loss during percutaneous coronary intervention: a large single-center experience[J]. Catheter Cardiovasc Interv, 2005, 66(3): 333-340.

(收稿日期: 2015-06-17)

(上接第 91 页)

- [7] KATAOKA H, KUME N, MIYAMOTO S, et al. Oxidized LDL modulates bax/bcl-2 through the lectinlike OX-LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cell[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21(16): 955-960.
- [8] 刘彦彤, 成凡, 付慧. Egb761 对 U87 胶质瘤细胞的促凋亡作用[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(10): 2270-2272.
- [9] 陈军宁, 温海滨, 谭宁. 银杏叶提取物 Egb761 对过氧化氢

诱导的肾小管上皮细胞凋亡的抑制作用研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 19(22): 2751-2755.

- [10] 董少红, 梁新剑. 银杏叶提取物对入血管平滑肌细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(6): 1243-1244.

(收稿日期: 2015-05-26)