

大鼠颅脑损伤后心肌损害和线粒体锰超氧化物歧化酶活性改变及银杏叶提取物的干预作用

郝春艳¹ 王凤芝² 段虎斌¹

摘要 **目的** 研究大鼠颅脑损伤后心肌损害和心肌线粒体锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)活性的变化及银杏叶提取物(GBE)对其影响。**方法** 采用液压冲击建立颅脑损伤模型和药物干预模型,24 h 动态监测心电图变化,测定血清肌酸磷酸激酶同工酶(CK-MB)的含量和心肌线粒体 Mn-SOD 的活性改变,并观察心肌 HE 染色的病理形态学改变。**结果** 大鼠颅脑损伤后心电图异常发生率显著增高,血清 CK-MB 含量升高($P < 0.05$),心肌细胞线粒体 Mn-SOD 活性降低($P < 0.05$),且心肌细胞线粒体 Mn-SOD 活性与血清 CK-MB 含量呈负相关($r = -0.997$, $P < 0.05$)。GBE 预处理后可以使大鼠颅脑损伤后心电图异常发生率明显降低($P < 0.01$),血清 CK-MB 含量降低($P < 0.05$),心肌细胞线粒体 Mn-SOD 活性升高($P < 0.05$),心肌的病理损伤程度减轻。**结论** 大鼠颅脑损伤可引起明显的心肌损害,颅脑损伤后心肌损害的发生可能与心肌细胞线粒体抗氧化应激水平降低有关,GBE 对大鼠颅脑损伤后心肌损害有保护作用。

关键词 颅脑损伤;心肌损害;锰超氧化物歧化酶;银杏叶提取物

Myocardial Damage and Change of Mitochondrial Mn-Superoxide Dismutase Activity in Craniocerebral Injured Rats and the Interventing Effect of Ginkgo Biloba Extract HAO Chun-yan, WANG Feng-zhi, and DUAN Hu-bin Department of Geriatrics, First Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan (030001)

ABSTRACT **Objective** To investigate the myocardial damage and changes of myocardial mitochondrial Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD) activity in craniocerebral injured rats and the effect of Ginkgo biloba extract (GBE) on them. **Methods** Craniocerebral injured rats model was established by fluid-percussion and treated with GBE. The dynamical changes of electrocardiograph (ECG) in 24 h were monitored, the serum level of MB isoenzyme of creatine kinase (CK-MB) and the change of myocardial mitochondrial Mn-SOD activity as well as the pathologic changes of myocardium (HE staining) were observed. **Results** The occurrence of ECG abnormality obviously increased in the injured rats, accompanied with increased serum CK-MB ($P < 0.05$) and decreased myocardial Mn-SOD levels ($P < 0.05$), and the Mn-SOD activity was negatively correlated with the level of CK-MB ($r = -0.997$, $P < 0.05$). Pretreatment of GBE resulted in the decrease of ECG abnormality occurrence ($P < 0.01$), serum CK-MB level ($P < 0.05$), and degree of myocardial damage, as well as the increase of Mn-SOD activity in post-craniocerebral injured rats. **Conclusions** Craniocerebral injury can result in distinct myocardial damage, which is possibly correlated with the lowering of anti-oxidation stress level of myocardial cellular mitochondria. GBE possesses the protective effect on myocardial damage after craniocerebral injury.

KEYWORDS craniocerebral injury; myocardial damage; Mn-superoxide dismutase; Ginkgo biloba extract

颅脑损伤后可引起多脏器功能的损害,其中心脏病变越来越引起人们的重视。近年来国内外相继报道颅脑损伤后常出现心律失常、心肌缺血和心力衰竭等一系列心肌损害表现,但发生机制尚未阐明。颅脑损

伤后心肌损害的发生可使患者病程延长,加速病情恶化,有时甚至成为导致患者死亡的直接原因,严重影响疗效和预后,临床上尚无理想的预防和治理措施,因此研究颅脑损伤后心脏病变的发病机制、预防和治理具有重要的临床意义。银杏叶提取物(Ginkgo biloba extract, GBE)的有效成分主要为黄酮甙类和银杏内酯类化合物,是一种临床上广泛应用于治疗脑损伤、血管痉挛、缺血性心脏病等心脑血管疾病的天然药物,但其作用机制仍未完全阐明。目前国内外关于颅脑损伤后心

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30600637)

作者单位:1. 山西医科大学第一医院老年病科(太原 030001);

2. 山西医科大学第二医院内科

通讯作者:段虎斌, Tel: 0351 - 4639000, Fax: 0351 - 4048624,

E-mail: duanhubin@126.com

肌线粒体锰超氧化物歧化酶(Mn-superoxide dismutase, Mn-SOD)活性的变化与心肌损害的关系及 GBE 对其影响尚未见报道。本实验采用液压冲击建立大鼠颅脑损伤模型,研究颅脑损伤后心电图、心肌酶、心肌病理形态的变化和 Mn-SOD 活性的变化,探讨大鼠颅脑损伤后心肌损害的发生机制,并进一步研究 GBE 对其的防治作用。

材料与方法

1 实验动物分组 24 月龄雄性 Wistar 大鼠 63 只(山西医科大学实验动物中心提供),体重(270 ± 30)g,随机分为 3 组:对照组、损伤组和 GBE 组,每组各 21 只。

2 主要试剂与仪器 线粒体 Mn-SOD 测定试剂盒(美国 ADL 公司);血清肌酸磷酸激酶同工酶(CK-MB)检测试剂盒购自北京中山金桥生物技术有限公司;GBE(每支 5 mL,含 17.5 mg 生药,其中 24% 银杏黄酮甙,3.1% 银杏内酯,2.9% 白果内酯,德国威玛舒培博士药厂生产);TKR 2000C 小动物人工呼吸机(江西省特力麻醉呼吸设备有限公司);MODEL01-B 型液压颅脑损伤仪(美国 New Sun 公司);TDS 2012 数字储存示波器(美国 Tektronix 公司);心电图机(Nihon Koden);RM6240BD 多道生理信号采集处理系统(成都仪器厂);脑立体定位仪(ZH-蓝星 B 型,淮北正华生物仪器设备有限公司);Strong 204 台式电钻(韩国 Saeshin 公司)。

3 动物模型制作 用 20% 乌拉坦腹腔注射(1.2 g/kg)麻醉满意后,将大鼠固定在脑立体定位仪上,连接肢体导联生理仪心电图,与多道生理信号采集处理系统连接,记录心电图变化,观察心率、ST 段变化幅度和心律失常等。取正中中线切开头皮并剥离骨膜,切口长 2 cm,暴露右顶骨,台式电钻于冠状缝后 1.5 mm,中线右旁 2.5 mm 处钻一直径为 5 mm 的圆形骨窗,保持硬脑膜完整。脑立体定位仪与液压颅脑损伤仪连接,以 2.5~3.0 标准大气压峰值冲击压力,造成颅脑损伤,硬膜保持完整,骨蜡封闭骨窗。自主呼吸暂停者,立即给予小动物呼吸机治疗,记录液压冲击峰值及时间。对照组仅切开头皮,开骨窗,不造成脑损伤,余同损伤组一致。GBE 组于颅脑损伤前 15 天,每天给大鼠胃饲 GBE 溶液 0.2 mL(含 GBE 0.7 mg)。对照组和损伤组同时胃饲等量生理盐水。

4 大鼠心电图记录 24 h 动态监测大鼠心电图,发现异常后进行心电图描记,ST 段下移或抬高、T 波低平或倒置、Q-T 间期延长、房性或室性心律失常、

心脏传导阻滞等为异常心电图。

5 CK-MB 含量测定 造模后 24 h,经大鼠眼眶取血 2 mL,注入含 7.5% 乙二胺四乙酸(EDTA)40 μL 和抑肽酶 40 μL 的预冷试管(4 $^{\circ}\text{C}$)内,然后 3 000 r/min 低温(4~8 $^{\circ}\text{C}$)离心 10 min,提取上清注入预冷的试管(4 $^{\circ}\text{C}$),转存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱待测。血清 CK-MB 含量测定严格按照试剂盒说明书,其单位以 U/L 表示。

6 心肌线粒体 Mn-SOD 活性测定 大鼠采血后断髓处死,取出心脏称重,用冰冷生理盐水制成匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心,3 500 r/min 离心 10 min,取上清液,将此上清液再 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心,10 000 r/min 离心 10 min,沉淀为线粒体。沉淀用 Tri 缓冲液(TBS,主要成分:三羟甲基氨基甲烷,Trishydroxymethylaminomethane, Usage 用作缓冲剂)悬浮, -20 $^{\circ}\text{C}$ 贮存,待 Mn-SOD 测定, Mn-SOD 活性测定严格按照试剂盒说明书进行,其活力单位以 U/mg 表示。

7 大鼠心肌病理形态学观察 大鼠心肌组织分别进行脱水、包埋,制成蜡块,切片厚度为 4 μm ,常规苏木素-伊红(HE)染色方法染色,采用图像分析系统照相。

8 数据统计分析 应用 SPSS 12.0 软件包进行处理,计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较采用方差分析,计数资料用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 具有统计学意义。对两变量(血清 CK-MB 含量和心肌线粒体 Mn-SOD 活性)进行相关性分析。

结 果

1 各组大鼠血清 CK-MB 含量比较(表 1) 损伤组大鼠血清 CK-MB 含量较对照组升高,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。GBE 组 CK-MB 较损伤组降低,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2 各组大鼠心肌线粒体 Mn-SOD 活性比较(表 1) 损伤组大鼠心肌线粒体 Mn-SOD 活性较对照组降低,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。GBE 组较损伤组升高,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组血清 CK-MB 含量和心肌线粒体 Mn-SOD 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血清 CK-MB 含量 (U/L)	心肌线粒体 Mn-SOD 活性 (U/mg)
对照	21	225.21 $\pm$ 86.42	142.18 $\pm$ 11.27
损伤	21	557.79 $\pm$ 178.25*	96.75 $\pm$ 7.54*
GBE	21	241.56 $\pm$ 98.74 $^{\Delta}$	136.24 $\pm$ 10.41 $^{\Delta}$

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与损伤组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

经直线相关分析显示:心肌线粒体 Mn-SOD 活性和血清 CK-MB 含量呈负相关 ($r = -0.997, P < 0.05$)。心肌线粒体 Mn-SOD 活性越低,血清 CK-MB 含量越高;反之,心肌线粒体 Mn-SOD 活性越高,血清 CK-MB 含量越低。GBE 组可使颅脑损伤后心肌线粒体 Mn-SOD 活性增高,血清 CK-MB 含量降低,心肌损害减轻。

3 各组大鼠 24 h 动态监测心电图变化比较(表 2) GBE 组大鼠发生心电图异常为 5 只(23.8%),损伤组 14 只(66.7%),GBE 组心电图异常发生率较损伤组显著减少,两组比较差异有统计学意义($\chi^2 = 6.151, P = 0.006$)。GBE 组心电图异常类型与损伤组比较,心律失常、ST-T 异常和 Q-T 间期延长的发生率明显减少。

表 2 各组大鼠24 h动态心电图变化比较 [n(%)]						
组别	n	心电图正常	心电图异常类型			
			心律失常	ST-T 异常改变	Q-T 间期延长	心脏传导阻滞
损伤	21	7(33.3)	7(33.3)	3(14.3)	3(14.3)	1(4.8)
GBE	21	16(76.2)	3(14.3)	1(4.8)	1(4.8)	0

4 各组大鼠心脏病理形态学改变(图 1) 对照组大鼠心肌组织 HE 染色光镜下可见心肌细胞排列规则,染色均匀正常(图 1A);损伤组可见心肌细胞排列紊乱,心肌细胞溶解、变性,肌纤维局灶坏死,广泛的间质水肿,空泡变性,染色不均匀(图 1B);GBE 组心肌损害程度较损伤组减轻(图 1C)。

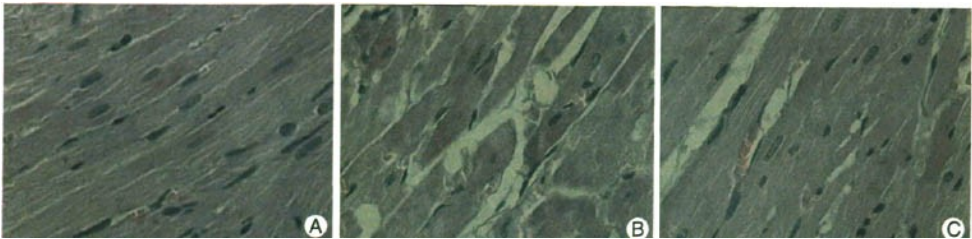
讨 论

颅脑损伤是神经外科常见疾病,具有很高的致死率和致残率,颅脑损伤后常出现心律失常、心肌缺血、心肌梗死或心力衰竭等一系列心肌损害表现,包括相应的心电图、心肌酶、组织病理学改变等^[1,2],这不仅可使患者病情加重,病程延长,甚至可以直接导致患者的死亡,而且使颅脑损伤处理上变得更加复杂,严重影

响患者预后。本实验中大鼠颅脑损伤后各种心律失常、ST-T 改变等心电图异常发生显著增加,血清心肌酶 CK-MB 含量升高,心肌组织切片观察显示形态学发生心肌细胞溶解、变性,肌纤维局灶坏死等病理学改变,证实颅脑损伤后有心肌损害的发生。

心肌组织富含线粒体,线粒体既是细胞呼吸和能量代谢的重要场所,又是自由基产生的主要部位。Mn-SOD 存在于线粒体内,能较好地抵御氧自由基和其他自由基对细胞质膜的毒性,是清除体内超氧自由基的特异酶^[3]。当 Mn-SOD 活性减低时,对自由基的清除能力降低,进而使细胞内自由基的水平增高,因此体内 Mn-SOD 的变化与体内自由基的水平密切相关^[4]。本实验结果显示大鼠颅脑损伤后出现心肌损害,心肌线粒体 Mn-SOD 活性降低,提示颅脑损伤后心肌细胞抗氧化应激能力降低,发生的心肌损害与自由基水平升高有关。许多研究已证明心肌损害程度愈严重,血清 CK-MB 含量升高愈明显。

根据本实验研究结果,我们认为自由基损伤机制可能参与了颅脑损伤后心肌损害的发生。颅脑损伤后原发机械损伤和继发的缺血缺氧等损害可引起心肌组织内 ATP 生成减少,线粒体氧化磷酸化功能障碍,从而使线粒体 Mn-SOD 活性降低,抗氧化应激能力减弱,对自由基清除能力减低,进而自由基水平升高,其损伤效应增加导致细胞膜脂质过氧化、肌纤维蛋白功能抑制等心肌损害,引起心肌细胞结构和功能的改变,如心肌组织病理形态变化、心电图异常、心肌酶释放增加等。同时自由基可以促进其他细胞因子和组织因子的生成和释放,进一步加重心肌组织损伤。心肌损害可并发组织灌注不足,使细胞缺血缺氧而自由基生成增多,自由基生成增多可加重细胞损伤,两者相互影响,促进心肌损伤的发生和发展,因此,自由基损伤是颅脑损伤后心肌损害极为重要的发病机制和环节,为临床上颅脑损伤后心肌损伤的防治提供了新的思路。



注:A 为对照组;B 为损伤组;C 为 GBE 组

图 1 各组大鼠心脏病理形态学改变(HE 染色, ×400)

GBE 是一种作用广泛的天然药物,其有效成分主要为黄酮甙类和银杏内酯类化合物,具有清除自由基,拮抗血小板活化因子,保护血管内皮细胞,扩张冠状动脉,改善血液循环等多种作用^[5]。此外,GBE 还可以改善血液流变学、降低血液黏度^[6],目前临床上广泛应用于心脑血管疾病的治疗,如缺血性心脏病、脑损伤、血管痉挛等。研究证明 GBE 对组织细胞的保护作用主要与清除自由基,抑制血浆和组织中脂质过氧化物的产生,保护线粒体膜功能有关^[7]。有研究表明颅脑损伤后心肌酶值增高和心电图异常越明显,心肌损害程度越重,而心肌损伤的程度与颅脑损伤的预后存在平行关系^[8]。因此对颅脑损伤在进行原发病治疗的同时,必须同时高度关注心肌受损的情况,并予以及时的心肌保护治疗。

本研究结果表明 GBE 可以升高大鼠颅脑损伤后心肌线粒体 Mn-SOD 活性,增强颅脑损伤后心肌细胞的抗氧化应激能力,减少心肌酶 CK-MB 释放和心电图异常的发生,减轻心肌细胞损伤的程度,对颅脑损伤后的心肌有保护作用,进而可以改善预后。

参 考 文 献

- [1] Dujardin KS, McCully RB, Wijedicks EF, et al. Myocardial dysfunction associated with brain death: clinical, echocardiographic and pathologic features [J]. Heart Lung Transplant, 2001, 20(3):350-357.
- [2] 许志强,蒋晓江,陈曼娥,等. 脑心综合征发生机制的实验研究 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2002, 10(6):327-329.
- Xu ZQ, Jiang XJ, Chen ME, et al. Experimental study on mechanism of cerebral - cardiac syndrome [J]. J Brain Nerv Dis, 2002, 10(6):327-329.
- [3] Matsuda Y, Higashiyama S, Kijima Y, et al. Human liver manganese superoxide dismutase. Purification and crystallization, subunit association and sulfhydryl reactivity [J]. Eur J Biochem, 1990, 194(3):713-720.
- [4] 郭长春,袁静,李涵葳,等. 高浓度吸氧对大鼠脑组织抗氧化能力的影响 [J]. 现代医院, 2008, 8(1):2-4.
- Guo CC, Yuan J, Li HW, et al. Effects of high-concentration oxygenation on rat cerebral antioxidant ability [J]. Modern Hosp, 2008, 8(1):2-4.
- [5] Chen JX, Zeng H, Chen X, et al. Induction of hemeoxygenase-1 by Ginkgo biloba extract but not its terpenoids partially mediated its protective effect against lysophosphatidylcholine-induced damage [J]. Pharmacol Res, 2001, 43(1):63-69.
- [6] Hariu H, Hirohashi Y, Torigoe T, et al. Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of inhibitor of apoptosis protein family, Livin/Mi-IAP in lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(3):1000-1009.
- [7] 陈维洲,张培智. 银杏叶提取物的药理和临床研究进展 (上) [J]. 中国新药与临床杂志, 1999, 18(5):315-317.
- Chen WZ, Zhang PZ. Advances in pharmacological and clinical research of Ginkgo biloba extract (I) [J]. Chin J New Drugs Clin Res, 1999, 18(5):315-317.
- [8] 王治瑜,唐振刚. 重型颅脑损伤对心肌的影响 [J]. 中国误诊学杂志, 2006, 6(3):481-482.
- Wang ZY, Tang ZG. Effects on the myocardium of severe craniocerebral trauma [J]. Chin J Misdiagn, 2006, 6(3):481-482.

(收稿:2009-06-26 修回:2009-10-06)

第四次全国中西医结合诊断学学术交流会议征文通知

为了促进全国中西医结合诊断学的学术发展和成果交流,不断提高临床诊断的学术水平,中国中西医结合学会拟定于 2010 年 7 月在内蒙古自治区呼和浩特市召开第四次全国中西医结合诊断学学术交流会。现将会议征文有关事宜通知如下。

1 征文内容 (1)中西医结合诊法客观化研究及理论探讨。(2)中医病证结合诊断标准研究探讨。(3)中西医结合诊法在疾病诊断中的经验介绍。(4)中医舌、脉、经络等诊法对人体健康风险预测评估研究。(5)中西医结合诊断仪器研制的思路及应用研究(含仪器展示)。(6)中医四诊客观化在疲劳等“未病”防治中的临床应用研究。

2 征文要求 来稿应为未公开发表的、具有一定学术水平和应用价值的论文全文(3 000 字以内)及论文摘要(500 字以内,包括目的、方法、结果、结论 4 部分),并写明作者姓名、工作单位、通讯地址、邮政编码、联系电话及电子邮箱。论文一律用 Word 文档格式排版,宋体,小 4 号字,1.5 倍行距,用 A4 纸打印。请自留底稿,恕不退稿。来稿请寄:黑龙江省哈尔滨市南岗区解放军第 211 医院(邮编:150080)刘珊收,请在信封左下角注明“中西医结合诊断会议征文”字样。电子邮件形式投稿请发送至:liushan_hrb@hotmail.com;linaimin39@163.com;如未收到回复,请您重新发送。

3 截稿日期 2010 年 5 月 31 日(以邮戳或 E-mail 发送时间为准)。

4 联系人及电话 王淑英 0451-58806133; 刘珊 0451-57752409