

银杏叶胶囊对高同型半胱氨酸血症血管内皮细胞凋亡干预的实验研究

项志兵¹ 汪卫东¹ 张莉芬¹ 李俊¹ 王毅¹ 奚希相¹
朱杰¹ 马金苗¹ 贾晶莹² 张丽薇¹ 顾仁越³

摘要 目的 通过银杏叶胶囊对高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy)血管内皮细胞凋亡干预的实验研究,探寻其作用的细胞分子水平靶点。**方法** 选用 Wistar 雄性大鼠制备 HHcy 模型。将 42 只大鼠按随机数字表法分为对照组(10 只)、模型组(11 只)、银杏叶组(11 只)和叶酸组(10 只)。对照组给予 1% 羟甲基纤维素钠溶液灌胃,模型组给予 3% 蛋氨酸混悬液(1.5 g/kg)灌胃,叶酸组给予 3% 蛋氨酸混悬液(1.5 g/kg)加叶酸混悬液(0.06 g/kg)灌胃,银杏叶组给予 3% 蛋氨酸混悬液(1.5 g/kg)加银杏叶混悬液(0.02 g/kg)灌胃。HE 染色观察各组大鼠主动脉组织形态学变化;检测各组大鼠血浆高同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)水平和胸主动脉对不同浓度硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)和乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)的内皮依赖性舒张功能;采用 RT-PCR 测定 c-Fos、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X protein, BAX)、细胞抑制剂-凋亡蛋白 2(cellular inhibitor of apoptosis protein 2, c-IAP2)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)基因表达。**结果** 病理结果显示:模型组主动脉内皮层增厚、内皮细胞水肿脱落,可见少量泡沫细胞,中膜平滑肌细胞肌瘤样增殖,银杏叶组、叶酸组病变较轻。与对照组比较,模型组 Hcy 水平升高($P < 0.05$),模型组 Ach 10^{-6} mol/L、Ach 10^{-4} mol/L 和 SNP $10^{-7} \sim 10^{-3}$ mol/L 不同浓度血管内皮舒张率均降低($P < 0.01$, $P < 0.05$),Bax、c-Fos 及 iNOS 基因表达均增加,c-IAP2 基因表达降低(均 $P < 0.05$)。与模型组比较,银杏叶组及叶酸组 Hcy 水平降低($P < 0.05$);除银杏组 SNP 10^{-6} mol/L 浓度外,银杏叶组和叶酸组其他各浓度 SNP 血管内皮舒张率均增加,银杏叶组和叶酸组浓度为 Ach 10^{-6} mol/L 和 Ach 10^{-4} mol/L 时 Ach 血管内皮舒张率增加(均 $P < 0.05$);银杏叶组和叶酸组 Bax、c-Fos 及 iNOS 基因表达均降低($P < 0.05$),叶酸组 c-IAP2 基因表达增高($P < 0.05$)。**结论** 银杏叶胶囊可降低血浆 Hcy 水平,下调 Bax、c-Fos 及 iNOS 基因表达,从而减少血管内皮细胞凋亡,改善血管内皮功能,延缓动脉粥样硬化的进程。

关键词 银杏叶胶囊;高同型半胱氨酸血症;血管内皮;细胞凋亡

Yinxingye Capsule Intervened Vascular Endothelial Cell Apoptosis of Hyperhomocysteinemia Rats: an Experimental Study XU Zhi-bing¹, WANG Wei-dong¹, ZHANG Li-fen¹, LI Jun¹, WANG Yi¹, XI Xi-xiang¹, ZHU Jie¹, MA Jin-miao¹, JIA Jing-ying², ZHANG Li-wei¹, and GU Ren-yue³ 1 Department of Emergency, Seventh People's Hospital, Shanghai (200137); 2 Experimental Center, Central Hospital of Xuhui District, Shanghai (200031); 3 Department of Cardiology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200032)

ABSTRACT Objective To explore targets of Chinese herbal medicine at cellular and molecular levels through an experimental study on Yinxingye Capsule (YC) intervening vascular endothelial cell apoptosis of hyperhomocysteinemia (HHcy) rats. **Methods** The HHcy model was prepared in male Wistar rats. Totally 42 rats were randomly divided into 4 groups, i.e., the control group ($n = 10$), the model group ($n =$

基金项目:山西省科技项目(No. 0410789-1);上海市教委资助项目(No. 06CZ021)

作者单位:1. 上海市第七人民医院急诊科(上海 200137);2. 上海市徐汇区中心医院实验中心(上海 200031);3. 上海中医药大学附属龙华医院心内科(上海 200032)

通讯作者:项志兵, Tel:13917953093, E-mail:xzb6160@163.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2015. 09. 1099

11), the YC group ($n=11$), the folic acid group ($n=10$). Carboxy methyl cellulose (CMC) solution (1%) was administered to rats in the control group by gastrogavage. 3% methionine suspension at 1.5 g/kg was administered to rats in the model group by gastrogavage. 3% methionine suspension at 1.5 g/kg and folic acid suspension at 0.06 g/kg was administered to rats in the folic acid group by gastrogavage. 3% methionine suspension at 1.5 g/kg and YC at 0.02 g/kg was administered to rats in the YC group by gastrogavage. Morphological changes of aortic tissue were observed by hematoxylin eosin (HE) staining. The plasma homocysteine (Hcy) level was detected in each group. The endothelium-dependent diastolic functions of the thoracic aorta on different concentrations of sodium nitroprusside (SNP) and acetylcholine (Ach) were detected. Gene expressions of Bcl-2-associated X protein (BAX), inducible nitric oxide synthase (iNOS), c-Fos, cellular inhibitor of apoptosis protein 2 (c-IAP2) were detected by real time polymerase chain reaction (RT-PCR). Results Pathological results showed that thickening aortic endothelium, swollen and desquamated endothelial cells. Few foam cells could be seen in the model group. Myoma-like proliferation of smooth muscle cells in tunica media could also be seen. These pathological changes were milder in the YC group and the folic acid group. Compared with the control group, plasma Hcy levels increased in the model group ($P<0.05$). The endothelium-dependent diastolic rates at 10^{-6} and 10^{-4} mol/L Ach and 10^{-7} – 10^{-3} mol/L SNP all decreased in the model group ($P<0.01$, $P<0.05$). Gene expressions of Bax, c-Fos, and iNOS increased, but c-IAP2 gene expressions decreased in the model group (all $P<0.05$). Compared with the model group, plasma Hcy levels decreased in the YC group and the folic acid group ($P<0.05$). The endothelium-dependent diastolic rates increased in the YC group and the folic acid group at various SNP concentrations except 10^{-6} mol/L SNP in the folic acid group. The endothelium-dependent diastolic rates increased in the YC group and the folic acid group at 10^{-6} and 10^{-4} mol/L Ach (all $P<0.05$). Gene expressions of Bax, c-Fos, and iNOS decreased in the YC group and the folic acid group, but c-IAP2 gene expression increased in the folic acid group (all $P<0.05$). Conclusion YC could reduce plasma Hcy levels, down-regulate gene expressions of Bax, c-Fos, and iNOS, thereby reducing apoptosis of vascular endothelial cells, improving vascular endothelial function, and delaying atherosclerotic process.

KEYWORDS Yinxingye Capsule; hyperhomocysteinemia; vascular endothelium; apoptosis

高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy)是冠心病的独立危险因素,可引起血管内皮细胞损伤。血管内皮受损是冠心病的发病始动环节,而改善血管内皮损伤是治疗冠心病的关键所在。本研究旨在通过银杏叶胶囊对 HHcy 血管内皮细胞凋亡相关因子及受损内皮功能干预的实验研究,探寻其作用的机制及靶点。

材料与方法

1 动物 42 只 Wistar 雄性大鼠,体重(142 ± 37)g,由中国科学院上海药物所实验动物中心提供,合格证号:斯莱克 SCXK(沪)2007-005。

2 药物 银杏叶胶囊(0.2 g/粒,由上海信谊百路达药业有限公司提供,批号:091204);叶酸片(5 mg/片,由上海辛帕斯制药有限公司提供,批号:090801);1%羧甲基纤维素钠溶液(Carboxy Methyl Cellulose, CMC, 由中国医药集团上海化学试剂公司提供,批号:F20090626);蛋氨酸(Met, 由德国德固

赛公司提供,批号:15112008W2)。

3 试剂及仪器 主要试剂硝普钠(sodium nitroprusside, SNP),由北京双鹤现代医药技术有限责任公司提供,批号:060205;乙酰胆碱(acetylcholine, Ach),由 Sigma 公司提供,批号:20060223。主要仪器:自动器官浴槽(型号 13206, 西班牙, Letica Scientific Instruments), PowerLab 实时生理多导记录系统(ML840, 澳大利亚, AD Instruments)。

4 动物分组及给药方法 42 只 Wistar 雄性大鼠,按随机数字表法分为对照组(10 只)、模型组(11 只)、银杏叶组(11 只)和叶酸组(10 只)。参照王禄增等^[1]和 Wang G 等^[2]方法制备 HHcy 大鼠模型。3%蛋氨酸混悬液的配制方法:300 mg 蛋氨酸加 1 mL 1% CMC 液。叶酸混悬液配制方法:1.2 mg 叶酸加 1 mL 1% CMC 液。银杏叶混悬液配制方法:4 mg 银杏叶加 1 mL 1% CMC 液。对照组给予 1% CMC 液 2 mL 灌胃,模型组给予 3% 蛋氨酸混悬液(1.5 g/kg)灌胃,叶酸组给予 3% 蛋氨酸混悬液

(1.5 g/kg)加叶酸混悬液(0.06 g/kg)灌胃,银杏叶组给予3%蛋氨酸混悬液(1.5 g/kg)加银杏叶混悬液(0.02 g/kg)灌胃,各组均每天灌胃1次,各组均饲养12周。模型组1只因灌胃致营养不良而死亡,银杏叶组1只因灌胃后呕吐窒息而死,死亡率4.8%。

5 检测指标与检测方法

5.1 标本采取 12周末Wistar雄性大鼠40只于腹主动脉取血,分别加入不抗凝、2%乙二胺四乙酸钠(edetate disodium,EDTA-Na)、0.109 mol/L枸橼酸钠的离心管内,于4℃冰箱贮存,在4 h内离心(10 min,3 000 r/min)得上清标本,置于-20℃冰箱贮存备用。取血后处死动物,分离主动脉起始部至腹主动脉处,立即分离胸主动脉6~8 mm制成5 mm的动脉环备用,取主动脉弓起始部及胸主动脉3~4 mm 10%福尔马林液中固定备用,剩余部分-80℃贮存以备实时荧光定量PCR(Real time PCR, RT-PCR)测定。

5.2 病理学观察 取主动脉弓起始部及胸主动脉段各3~4 mm 10%福尔马林液中固定,常规脱水,透明,包埋,切片,予苏术素-伊红(hematoxylin eosin staining, HE)染色后,在光学显微镜下进行组织学观察,观察有无明显的动脉粥样硬化病变。

5.3 血清Hcy水平检测 采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)方法在上海市徐汇区中心医院实验中心检测。本方法批内CV<8.79%,批间CV<6.87%。正常的血清Hcy空腹参考值为5~15 μmol/L。

5.4 血管内皮依赖性舒张功能 参照文献[3],采用Wistar雄性大鼠离体胸主动脉环张力测定方法。每组取6只(对照组1只由于实验中挂线松脱而未完成测定),处死后将制成5 mm的动脉环放入每格充氧20 mL Krebs-Henseleit液的管内,用5% CO₂/95% O₂起泡混合,37℃水浴。动脉环给予1.0 g的张力,平衡60 min。平衡后,先予10 μL 1 μmol/L苯肾上腺素(phenylephrine, PE),然后通过对10⁻⁷~10⁻³ mol/L硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)和10⁻⁶~10⁻³ mol/L Ach的反应,测定内皮依赖性血管舒张率。

5.5 Bax、c-Fos、c-IAP2、iNOS 基因表达 采用RT-PCR测定。(1)组织总RNA的提取在均浆管中加入1 mL Trizol (Invitrogen)反复研磨至均浆均匀后倒入1.5 mL无RNA酶的EP管中;加入0.2 mL的氯仿,剧烈振荡30 s,室温静置5 min,4℃离心,12 000 r/min,15 min;吸取水相层,加入0.5 mL预冷的异丙醇,室温静置10 min,4℃离心,

12 000 r/min,10 min,弃上清;沉淀用75%乙醇洗涤1次,4℃离心,7 500 r/min,5 min,弃上清;剩余的乙醇晾干,然后加入适量DEPC处理过的无菌水(50~100 μL),65℃水浴10 min使RNA充分溶解;紫外分光光度仪检测RNA的纯度和浓度,OD₂₆₀/OD₂₈₀值应1.8~2.0,后将RNA置入-80℃冰箱保存或直接逆转录。(2)逆转录cDNA的合成按下列体系配制逆转录混和反应液,反应液配制在冰上操作,具体配方:5×逆转录缓冲液4 μL,dNTP Mixture(各10 mmol/L)2 μL,逆转录酶(5 U/μL)1 μL,RNA酶抑制剂(40 U/μL)0.5 μL,Oligo(dT)18引物(50 pmol/μL)1 μL,总RNA(1 μg/μL)1 μL,DEPC处理水10.5 μL,总体积20 μL。混匀后按如下条件进行反转录合成:室温放置10 min,42℃反转录1 h,4℃冷却2 min。(3)Bd相关x蛋白Bax、c-Fos、c-IAP2、iNOS及α-IkB定量检测:运用Primer Premier 5.0进行引物序列设计,金唯智合成序列如下(见表1)。根据SYBR RT-PCR试剂盒(TaKaRa Shuzo, Otsu, Japan)说明书在PCR反应管内加入下列组分(冰上操作):2×SYBR Premix Ex Taq 10 μL,上游引物(10 μmol/L)0.4 μL,下游引物(10 μmol/L)0.4 μL,R0X Reference Dye II 0.4 μL,灭菌水6.8 μL,cDNA 2 μL,总体积20 μL。体系配置好后混匀,离心,反应条件如下:95℃10 s,95℃5 s,60℃34 s(重复2、3步骤40个循环),72℃10 min,Melt Curve,基因表达水平用倍数变化来表示(2^{-ΔΔCt}法)。

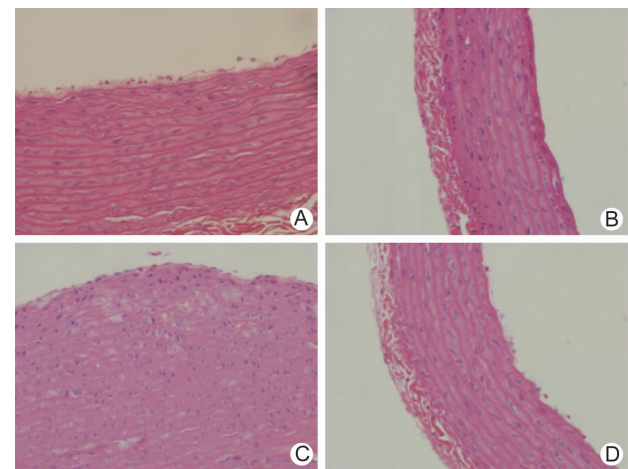
表1 引物序列

基因	引物序列	产物大小 (bp)
iNOS	上游:5'-ACCTACTTCTCTGGACATCAC-3'	338
	下游:5'-ACCCAAACACCAAGGTCATG-3'	
Bax	上游:5'-CCGAGAGGTCTTCTTCCGGG-3'	317
	下游:5'-TGGAAGAAGATGGGCTGAG-3'	
c-Fos	上游:5'-ATGATGTTCTCGCGTTTCA-3'	348
	下游:5'-TGACATGGTCTTCACTACTC-3'	
c-IAP2	上游:5'-AAAGTTTCGGAAGATGTCGT-3'	459
	下游:5'-TGTATAACGCAGGGTCAAT-3'	
β-actin	上游:5'-AGTGTGACGTTGACATCCGT-3'	276
	下游:5'-GCAGCTCAGTAACAGTCCGC-3'	

6 统计学方法 采用SPSS 17.0软件包进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单向方差分析,方差齐时用LSD法,方差不齐时用Tampane's T2法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠组织形态学变化(图 1) 模型组大鼠 8 只出现主动脉内皮层增厚、内皮细胞水肿脱落,内皮下出现少量泡沫细胞,中膜平滑肌细胞肌瘤样增殖,病变向管腔内明显突出。银杏叶组 7 只出现内皮层增厚、内皮细胞水肿、脱落,其中 2 只出现中膜平滑肌细胞肌增殖,病变向管腔内稍隆起。叶酸组 5 只出现内皮层增厚、内皮细胞水肿、脱落。对照组有 2 只出现轻微内皮细胞水肿。



注:A 为对照组;B 为模型组;C 为银杏叶组;D 为叶酸组
图 1 各组大鼠主动脉组织形态学变化 (HE 染色,×40)

2 各组大鼠血清 Hcy 水平比较(表 2) 与对照组比较,模型组 Hcy 水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,银杏叶组及叶酸组 Hcy 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 各组血清 Hcy 水平比较 ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$)		
组别	<i>n</i>	Hcy 水平
对照	9	8.49 ± 1.87
模型	9	$61.13 \pm 40.16^*$
银杏叶	9	$34.46 \pm 27.89^\Delta$
叶酸	8	$31.25 \pm 21.17^\Delta$

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $^\Delta P < 0.05$;叶酸组缺失 2 只,其余组各缺失 1 只,是由于血标本溶血而舍弃

表 3 各组大鼠 SNP 血管内皮舒张率比较 (%, $\bar{x} \pm s$)						
组别	<i>n</i>	舒张率				
		10 ⁻⁷ mol/L	10 ⁻⁶ mol/L	10 ⁻⁵ mol/L	10 ⁻⁴ mol/L	10 ⁻³ mol/L
对照	5	27.1 ± 14.6	28.9 ± 15.7	28.0 ± 13.9	32.0 ± 19.6	34.5 ± 20.0
模型	6	15.0 ± 10.8 *	15.2 ± 10.2 *	13.8 ± 8.7 *	14.3 ± 9.1 *	10.3 ± 6.5 *
银杏叶	6	28.0 ± 9.8 ^Δ	27.8 ± 9.2	30.4 ± 13.7 ^Δ	29.8 ± 14.4 ^Δ	33.1 ± 20.0 ^Δ
叶酸	6	28.7 ± 11.4 ^Δ	28.7 ± 15.9 ^Δ	28.9 ± 14.9 ^Δ	31.7 ± 15.3 ^Δ	33.1 ± 22.0 ^Δ

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $^\Delta P < 0.05$

3 各组大鼠 SNP 血管内皮舒张率比较(表 3) 与对照组比较,模型组 SNP $10^{-7} \sim 10^{-3} \text{ mol/L}$ 不同浓度血管内皮舒张率均降($P < 0.01$)。与模型组比较,除银杏叶组 SNP 10^{-6} mol/L 浓度外,银杏叶组和叶酸组其他各浓度 SNP 的血管内皮舒张率均增加($P < 0.05$)。

4 各组大鼠 Ach 血管内皮舒张率比较(表 4) 与对照组比较,模型组 Ach 10^{-6} 、 10^{-4} mol/L 浓度血管内皮舒张率均降($P < 0.05$);与模型组比较,银杏叶组和叶酸组浓度为 Ach 10^{-6} 和 10^{-4} mol/L 时 Ach 血管内皮舒张率均增加($P < 0.05$)。

表 4 各组大鼠 Ach 血管内皮舒张率比较 (%, $\bar{x} \pm s$)					
组别	<i>n</i>	舒张率			
		10^{-6} mol/L	10^{-5} mol/L	10^{-4} mol/L	10^{-3} mol/L
对照	5	22.7 ± 16.7	25.6 ± 16.6	22.4 ± 13.8	7.5 ± 2.6
模型	6	$12.0 \pm 8.3^*$	20.4 ± 10.6	$12.1 \pm 7.6^*$	7.8 ± 2.5
银杏叶	6	$24.8 \pm 10.6^\Delta$	18.3 ± 8.6	$25.3 \pm 12.6^\Delta$	7.8 ± 4.0
叶酸	6	$26.9 \pm 9.9^\Delta$	23.6 ± 18.8	$24.0 \pm 10.1^\Delta$	9.7 ± 5.5

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $^\Delta P < 0.05$;对照组 1 只由于实验中挂线松脱而未完成测定

5 各组 Bax、c-Fos、c-IAP2 及 iNOS 基因表达比较(表 5,图 2) 与对照组比较,模型组 Bax、c-Fos 及 iNOS 基因表达均增加($P < 0.05$),c-IAP2 基因表达降低($P < 0.05$)。与模型组比较,银杏叶组和叶酸组 Bax、c-Fos、iNOS 基因表达均降低($P < 0.05$),叶酸组 c-IAP2 基因表达增加($P < 0.05$)。

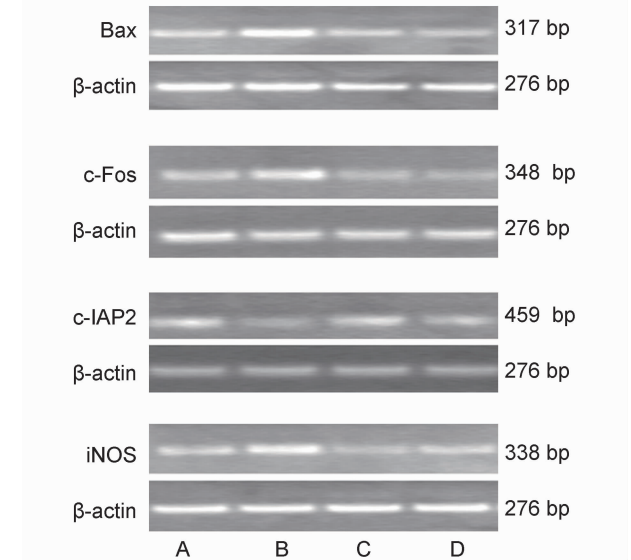
讨 论

有研究表明,冠心病的发病与冠状动脉内皮受损和功能异常密切相关^[4]。冠状动脉血管内皮受损不仅是冠心病的发病始动环节,而且对冠心病的发展和预后也起着重要的作用。血管内皮细胞凋亡在冠心病动脉粥样硬化的形成和进展中具有关键性的作用,为目前研究的热点。因此减少内皮细胞凋亡和修复损伤血管内皮是防治冠心病的重要靶点。血管内皮细胞凋亡主要有细胞内和细胞外两大途径:死亡受体(death

表 5 各组 Bax、c-Fos、c-IAP2 及 iNOS 基因表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bax	c-Fos	c-IAP2	iNOS
对照	0.73 ± 0.23 (8)	0.86 ± 0.29 (8)	1.38 ± 0.55 (7)	1.01 ± 0.25 (8)
模型	1.43 ± 0.37 (8) *	1.40 ± 0.43 (7) *	0.80 ± 0.30 (8) *	1.54 ± 0.28 (8) *
银杏叶	0.99 ± 0.43 (8) Δ	0.85 ± 0.43 (8) Δ	0.70 ± 0.32 (6)	0.64 ± 0.31 (6) Δ
叶酸	1.05 ± 0.37 (8) Δ	1.06 ± 0.39 (7) Δ	1.44 ± 0.32 (7) Δ	0.73 ± 0.26 (8) Δ

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$;()内数据为动物只数



注:A 为对照组;B 为模型组;C 为银杏叶组;D 为叶酸组
图 2 各组 Bax、c-Fos、c-IAP2 及 iNOS 基因表达比较

receptor) 主要是 Fos 激活 caspase-3 的表达;细胞内途径主要是 Bax 激活 Caspase-9 的表达。

有研究证实 Hcy 升高与心血管疾病有关,是心血管疾病的一个独立危险因素^[5-8]。Hcy 是促进血管内皮细胞凋亡的独立因素之一。Hcy 可引起内皮细胞损伤,导致动脉粥样硬化机制可能是:(1)自身氧化作用:有研究发现 Hcy 可引起内皮细胞的氧化应激蛋白 GRP78 的表达增加和谷胱甘肽过氧化物酶的表达及其活性的减少,细胞氧化还原能力的改变,减少细胞对超氧化物解毒的能力,增加超氧阴离子、过氧化氢和其他超氧化物,引起蛋白质损伤,酶、受体功能障碍^[9-12]。此外,血管氧化应激可减少核转录因 κB 抑制蛋白 (inhibitor kappa B α , α -I κ B) mRNA 的表达,促使 α -I κ B 蛋白磷酸化,启动细胞内核转录因子 Kappa (nuclear factor kappa B, NF- κ B),进一步上调 iNOS mRNA 的合成,增强 iNOS 的活性,产生过量的 NO,使循环中白细胞移行黏附于血管壁,致使血管内皮受损。(2)血管内皮功能紊乱:越来越多的证据证实 Hcy 通过氧化作用灭活 NO 致使血管内皮功能紊乱^[13]。(3)改变内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 基因表达,诱导细胞凋亡^[14,15]。实验研究认为

Hcy 通过上调 p53-Noxa、Bax、c-Fos 的表达,下调细胞抗凋亡蛋白 c-IAP2 的表达,诱导细胞凋亡^[16-18]。

本实验观察到模型组血清 Hcy 较对照组明显升高($P < 0.05$)。组织形态学光镜下观察模型组可见主动脉内皮层增厚、内皮细胞水肿脱落、内皮下出现少量泡沫细胞,中膜平滑肌细胞肌瘤样增殖,病变向管腔内明显隆起。内皮功能测定结果显示模型组内皮舒张功能明显受损。证实过量的蛋氨酸可造成 HHcy,HHcy 可使皮舒缩功能紊乱,促使动脉粥样硬化和血栓形成。

国内外对银杏叶的有效成分的活性及作用机制进行了的基础和动物实验研究,证实银杏叶具有广泛的药理作用:拮抗血小板活化因子,抗氧化作用、清除自由基,改善血管内皮舒缩功能,减轻平滑肌细胞的增殖,延缓动脉粥样硬化进程^[19,20]。

本实验观察结果显示银杏叶组、叶酸组血清 Hcy 水平均降低,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);银杏叶组与叶酸组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。同时内皮功能的测定结果显示说明两组均改善血管内皮舒张功能,降低 Bax、c-Fos、iNOS 基因表达($P < 0.05$),而叶酸组 c-IAP2 基因表达增加($P < 0.05$)。但两组之间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明两者均可以改善 HHcy 引起的内皮损伤和舒缩功能紊乱。

本研究结果显示银杏叶胶囊有降低血清 Hcy 水平的作用,通过下调 c-Fos 的表达,减少细胞转录调节因子核蛋白 Fos 表达,抑制促凋亡调节蛋白 Bax 表达,抑制 HHcy 血管内皮细胞凋亡。同时有可能通过上调 α -I κ B 的表达,促使 α -I κ B 蛋白去磷酸化,细胞内 NF- κ B 减少,下调 iNOS mRNA 的合成,抑制 iNOS 表达,NO 生成减少,改善血管内皮受损,减缓粥样斑块的进程。

参 考 文 献

[1] 王禄增,张梅英,季勇,等. Wistar 大鼠实验性动脉粥样硬化的研究[J]. 中国实验动物学报, 2002, 10(2):

- 113–115.
- [2] Wang G, Woo CW, Sung FL, et al. Increased monocyte adhesion to aortic endothelium in rats with hyperhomocysteinemia: role of chemokine and adhesion molecules [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(11): 1777–1783.
- [3] 夏耀宗, 喻本思, 段敏敏, 等. 血管钙化对大鼠离体胸主动脉环张力的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(18): 3025–3027.
- [4] Liu CG, Yang YH, Peng DL, et al. Hyperhomocysteinemia as a metabolic disorder parameter is independently associated with the severity of coronary heart disease [J]. *Saudi Med J*, 2015, 36(7): 839–846.
- [5] Jacob J, Joseph L. Methoxistasis: integrating the roles of homocysteine and folic acid in cardiovascular pathobiology [J]. *Nutrients*, 2013, 5(8): 3235–3256.
- [6] Kevin LS, Anne LS. Homocysteine imbalance: a pathological metabolic marker [J]. *Adv Nutr*, 2012, 3(6): 755–762.
- [7] Drewes YM, Poortvliet RK, Blom JW, et al. Homocysteine levels and treatment effect in the prospective study of pravastatin in the elderly at risk [J]. *J Am Geriatr Soc*, 2014, 62(2): 213–221.
- [8] Ankrah A, Buscombe J, Sathekge MM. Association between plasma homocysteine and myocardial SPECT abnormalities in patients referred for suspected myocardial ischaemia [J]. *Cardiovasc J Afr*, 2012, 23(6): 313–317.
- [9] Song S, Kertowidjojo E, Ojaimi C, et al. Long-term methionine-diet induced mild hyperhomocysteinemia associated cardiac metabolic dysfunction in multiparous rats [J]. *Physiol Rep*, 2015, 3(5): e12292.
- [10] Steed MM, Tyagi SC. Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(7): 1927–1943.
- [11] Bao XM, Wu CF, Lu GP. Atorvastatin inhibits homocysteine-induced dysfunction and apoptosis in endothelial progenitor cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(4): 476–484.
- [12] 沈晓君, 何航. 葛根素对 HCY 诱导的血管内皮细胞凋亡及 GRP78 表达的影响 [J]. *中国药理与临床*, 2009, 25(4): 12–15.
- [13] Jia F, Wu C, Chen Z, et al. AMP-activated protein kinase inhibits homocysteine-induced dysfunction and apoptosis in endothelial progenitor cells [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2011, 25(1): 21–29.
- [14] Zhang C, Kawauchi J, Adachi MT, et al. Activation of JNK and transcriptional repressor ATF3/LRF1 through the IRE1/TRAF2 pathway is implicated in human vascular endothelial cell death by homocysteine [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289(3): 718–724.
- [15] Jia SJ, Lai YQ, Zhao M, et al. Homocysteine-induced hypermethylation of DDAH2 promoter contributes to apoptosis of endothelial cells [J]. *Pharmazie*, 2013, 68(4): 282–286.
- [16] Lee SJ, Kim KM, Namkoong S, et al. Nitric oxide inhibition of homocysteine-induced human endothelial cell apoptosis by down-regulation of p53-dependent Noxa expression through the formation of S-nitrosohomocysteine [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(7): 5781–5788.
- [17] Beauchamp MC, Renier G. Homocysteine induces protein kinase C activation and stimulates c-Fos and lipoprotein lipase expression in macrophages [J]. *Diabetes*, 2002, 51(4): 1180–1187.
- [18] Ma S, Zhang H, Sun W, et al. Hyperhomocysteinemia induces cardiac injury by up-regulation of p53-dependent Noxa and Bax expression through the p53 DNA methylation in ApoE (-/-) mice [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2013, 45(5): 391–400.
- [19] Zhou W, Chai H, Lin PH, et al. Clinical use and molecular mechanisms of action of extract of *Ginkgo biloba* leaves in cardiovascular diseases [J]. *Cardiovasc Drug Rev*, 2004, 22(4): 309–319.
- [20] 李淑琴, 武宇洲, 祖秀光, 等. 银杏叶提取物对老年冠心病患者冠脉血流和内皮功能的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2008, 31(10): 712–714.

(收稿: 2013-10-30 修回: 2015-05-25)