

[文章编号] 1007-3949(2010)18-07-0539-03

• 实验研究 •

# 银杏叶提取物对兔动脉粥样斑块 Bcl-2和 Bax表达的影响

周玲生<sup>1</sup>, 周路坦<sup>2</sup>, 康爱英<sup>1</sup>, 丁可<sup>1</sup>

(1 南阳医学高等专科学校, 河南省南阳市 473000 2 郑州铁路职业技术学院, 河南省郑州市 450052)

[关键词] 银杏叶提取物; 动脉粥样硬化; Bcl-2 Bax

[摘要] 目的 观察银杏叶提取物对家兔动脉粥样斑块 Bcl-2和 Bax表达的影响。方法 将 40只家兔随机分为正常对照组、模型组、立普妥组和银杏叶提取物组, 对比观察各组家兔斑块面积大小及斑块 Bax和 Bcl-2的表达。结果 银杏叶提取物组和立普妥组动脉粥样斑块面积低于模型组 ( $P < 0.01$ ); 免疫组织化学染色显示, 模型组平滑肌细胞内 Bcl-2和 Bax的阳性细胞表达与正常对照组相比增高 ( $P < 0.05$ ), 立普妥组和银杏叶提取物组平滑肌细胞、泡沫细胞 Bax的阳性细胞表达下调, Bcl-2的阳性细胞表达轻度上调, 银杏叶提取物组 Bax/Bcl-2降低。结论 银杏叶提取物可通过下调 Bax/Bcl-2表达而抑制细胞凋亡, 减少内皮细胞受损, 从而抑制动脉粥样硬化的发生。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Effects of Ginkgo Biloba Extract on the Expression of Bcl-2 and Bax in the Rabbit Atherosclerotic Plaque

ZHOU Ling-Sheng<sup>1</sup>, ZHOU Lu-Tan<sup>2</sup>, KANG Ai-Ying<sup>1</sup>, and Ding Ke<sup>1</sup>

(1 Nanyang Medical College, Nanyang, Henan 473000 China; 2 Zhengzhou Railway Vocational and Technical College, Henan, Zhengzhou 450052 China)

[KEY WORDS] Ginkgo Biloba Extract Atherosclerosis Bcl-2 Bax

[ABSTRACT] **Aim** To observe the Ginkgo biloba extract (EGB) on Bcl-2 and Bax expression of rabbit atherosclerotic plaques. **Methods** 40 rabbits were randomly divided into untreated control group, model group, lipitor group and EGB group. The changes of atherosclerotic plaque area and the expressions of Bcl-2 and Bax were observed. **Results** The plaque area of EGB group and lipitor group were less than those of the model group ( $P < 0.01$ ). The positive expressions of Bcl-2 and Bax in model group were higher than those in untreated control group ( $P < 0.05$ ), the positive expressions of Bax of smooth muscle cells and foam cells decreased in lipitor group and EGB group, the positive expressions of Bcl-2 increased, furthermore Bax/Bcl-2 in EGB group decreased. **Conclusion** EGB can decrease the expression of Bax/Bcl-2, reduce endothelial cell damage, thus inhibiting the occurrence of atherosclerosis.

银杏叶提取物 (EGB)是从我国珍贵植物银杏的叶子中提取的有效成分, 具有抗氧化、抗自由基, 改善微循环、降低血液黏度、增加脑血流量、保护脑血管平滑肌细胞和内皮细胞<sup>[1]</sup>等多种药理作用。EGB可能有防治动脉粥样硬化作用<sup>[2]</sup>, 但对动脉粥样斑块 Bcl-2、Bax表达的影响未见报道。立普妥是新一代人工合成的强效他汀类药物, 具有降低血浆总胆固醇、甘油三酯、改善血管内皮功能, 其延缓动脉粥样硬化发展的效果显著<sup>[3]</sup>。本研究采用高脂饮食方法建立兔高脂血症动物模型, 选用 EGB 为干预药物, 并与立普妥比较, 观察两者对家兔动脉粥样斑块面积大小及斑块 Bax 和 Bcl-2 表达的影响, 探

讨 EGB 对兔动脉粥样斑块形成的干预机制及作用效果, 为心脑血管病的防治提供可靠的实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

新西兰纯种雄性家兔 40 只, 3~4 月龄, 体重  $1.5 \pm 0.2$  kg 由武汉万千嘉禾实验动物养殖有限公司提供, 动物合格证号 SCXK(鄂)2004-0006。

### 1.2 药品与试剂

EGB 含银杏苦内酯  $\geq 6\%$ , 总黄酮  $\geq 24\%$ , 购自四川广松制药有限公司; 立普妥购自河南省南阳市医药公司; SABC 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.3 仪器和设备

(2/2)VI 普通 IV 类 B 型脱水机 (孝感宏业 TS-12L); 显微镜摄像机 (日本 JNCTK-C921EC); 光学显微镜 (日本 OLYMPUS CX31); Hm200 切片机 (德

[收稿日期] 2009-12-14 [修回日期] 2010-07-10

[基金项目] 河南省教育厅自然科学研究计划项目 (2010C310009)

[作者简介] 周玲生, 副教授, 研究方向为动脉粥样硬化, E-mail 为 3336310@163.com。周路坦, 硕士, 讲师, 研究方向为眼科药理学。康爱英, 教授, 研究方向为动脉粥样硬化。

国 mICROMGBH); CS摊片机; TBA-120FR 生化分析仪 (TOSHIBA)。

#### 1.4 动物模型的建立及分组

适应性喂养一周后,将 40 只家兔随机分组:正常对照组:标准饲料;④模型组:高脂饲料(标准饲料 + 1.5% 胆固醇 + 5% 猪油);⑤立普妥组:高脂饲料 + 立普妥 1.0 mg/(kg·d) 研碎,用生理盐水稀释灌胃;EGB 组:高脂饲料 + EGB 0.05 g/(kg·d),蒸馏水稀释后灌胃。上述各组兔均限食量,每兔每日 100 g 自由饮水,分组喂养 8 周。

#### 1.5 腹主动脉斑块面积测定

动物处死后,打开腹腔,立即取腹主动脉处段血管,在硅胶板上清除脂肪等粘附物,用酒精清洗血迹。剪开腹主动脉,暴露动脉内层,以苏丹Ⅲ染色,通过计算机扫描管壁内层得到斑块面积占整个内膜面积的百分比。

#### 1.6 免疫组织化学检测

自降主动脉起始处,取降主动脉 3 cm 行石蜡切片,ABC 法进行 Bcl-2 和 Bax 的免疫组织化学染色,DAB 显色。每张切片分别沿斑块的表面及深层随机选取四个视野,观察、摄片并计数阳性表达细胞,以 HPIAS-1000 分析系统结合细胞计数法进行半

定量分析。

#### 1.7 统计学方法

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间进行  $t$  检验,组间差异用  $F$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般体征变化

实验期间各组动物一般体征如毛发的光洁度、活动状况无明显差异,情况较好,模型组两只家兔死亡,EGB 组一只家兔死亡。

### 2.2 兔腹主动脉斑块面积变化

肉眼下,正常对照组主动脉内膜光滑、白色、平坦,未见明显苏丹Ⅲ着色区;模型组主动脉内膜苏丹Ⅲ染色阳性区广泛,有明显粥样斑块形成,成灰黄色颗粒状、不规则或椭圆形;立普妥组和 EGB 组斑块面积显著少于模型组。HE 染色显示,正常对照组血管内膜光滑,与外膜平行,连续性好;模型组血管内膜明显增厚,斑块突出于内膜面,内膜中有大量巨噬细胞浸润,内有脂质沉积,形成泡沫细胞,管腔变窄;而立普妥组和 EGB 组血管内膜轻度增厚,其厚度及病变程度较模型组减轻(图 1 和表 1)。

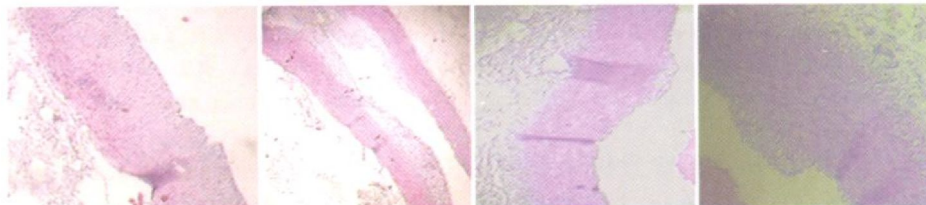


图 1 兔腹主动脉组织病理学 ( $\times 10$ ) 从左至右分别为正常对照组、模型组、立普妥组、EGB 组。

表 1 EGB 对家兔腹主动脉斑块面积的影响

分 组	n	斑块面积比	内膜斑块厚度 ( $\mu\text{m}$ )
模型组	8	42.86% $\pm$ 17.57%	30.14 $\pm$ 13.36
EGB 组	9	21.67% $\pm$ 5.88% <sup>a</sup>	22.17 $\pm$ 15.43 <sup>a</sup>
立普妥组	10	18.98% $\pm$ 8.16% <sup>a</sup>	21.56 $\pm$ 14.37 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与模型组比较。

### 2.3 Bcl-2 和 Bax 在斑块中的表达

正常对照组动脉壁平滑肌细胞内偶见 Bcl-2 和 Bax 阳性细胞表达;模型组平滑肌细胞内可见 Bcl-2 和 Bax 较多阳性细胞表达,粥样斑块下平滑肌细胞亦有少量表达;而立普妥组和 EGB 组平滑肌细胞、泡沫细胞 Bax 的阳性细胞表达下调, Bcl-2 的阳性细

胞表达轻度上调, EGB 组 Bax/Bcl-2 降低(图 2、3 和表 2)。

表 2 兔主动脉 Bcl-2、Bax 阳性细胞计数 ( $\bar{x} \pm s$  个/400 倍视野)

分 组	n	Bcl-2	Bax	Bax/Bcl-2
正常对照组	10	5.82 $\pm$ 0.79	11.75 $\pm$ 1.22	2.02
模型组	8	7.10 $\pm$ 0.82 <sup>a</sup>	14.10 $\pm$ 1.41 <sup>a</sup>	1.99
立普妥组	10	8.79 $\pm$ 0.63 <sup>b</sup>	10.54 $\pm$ 1.22 <sup>b</sup>	1.20
EGB 组	9	8.11 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>	11.0 $\pm$ 1.01 <sup>b</sup>	1.36 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.05$  与正常对照组比较; b 为  $P < 0.05$  与模型组比较。

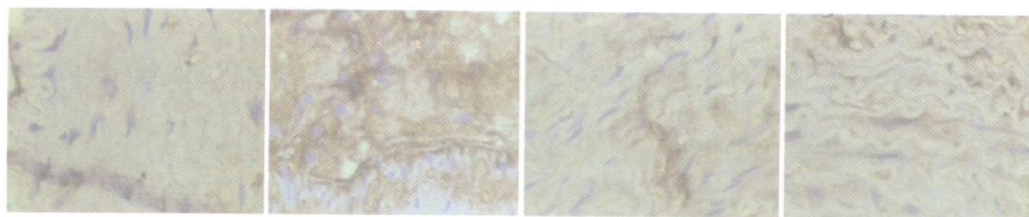


图 2. 兔主动脉 Bcl-2 在斑块中的表达 (×400) 从左至右分别为正常对照组、模型组、立普妥组、EGB 组。

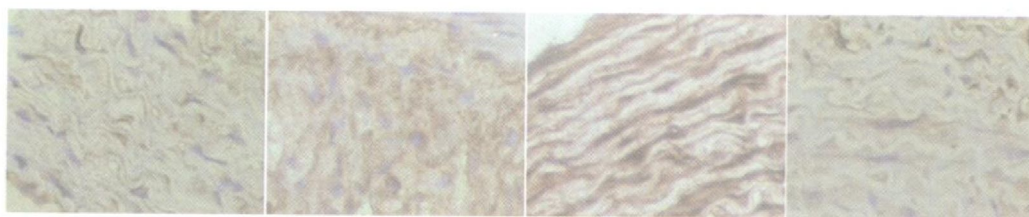


图 3. 兔主动脉 Bax 在斑块中的表达 (×400) 从左至右分别为正常对照组、模型组、立普妥组、EGB 组。

### 3 讨论

本研究用高脂饲料成功建立了动脉粥样硬化模型,腹主动脉内皮下脂质浸润,脂斑形成等病理改变。EGB组和立普妥组腹主动脉斑块面积较模型组明显减小,说明 EGB 能预防脂质斑块的形成,在一定程度上能抑制动脉粥样硬化的发生发展。研究发现, EGB 可降低 VCAM-1 和 ICAM-1 在心血管内皮细胞中的表达,抑制多种炎症因子刺激下的单核细胞内皮黏附,并能减轻细胞内活性氧的形成,从而多途径抑制动脉粥样硬化的形成<sup>[4-5]</sup>。

目前研究已认识到多种机制参与了动脉粥样硬化的发生,包括细胞凋亡引起的内皮细胞受损是血管发生粥样硬化的始动因素。细胞的凋亡过程受 Bcl-2 和 Bax 基因表达比例的影响, Bcl-2 和 Bax 均属于 Bcl-2 基因家族,是最重要的细胞凋亡控制基因, Bcl-2 是抗凋亡基因,又称为“抗死亡基因”,具有抑制细胞凋亡的作用, Bax 是促凋亡基因。Bax 与 Bcl-2 结合后,可使 Bcl-2 失活,细胞凋亡与否取决于抑制细胞凋亡的 Bcl-2 族蛋白与促凋亡的 Bax 族蛋白的比例,高水平的 Bcl-2 相对于低水平 Bax 就抑制凋亡,反之则促进凋亡<sup>[6-7]</sup>。本研究发现, EGB 组斑块内 Bax 和 Bcl-2 的表达较正常血管组织增

强, Bax 阳性细胞可散见于血管内膜及中膜,而 Bcl-2 在中膜亦见表达,说明 EGB 可下调 Bax 的阳性细胞表达,上调 Bcl-2 的阳性细胞表达,通过下调 Bax/Bcl-2 而抑制凋亡,减少内皮细胞受损,从而抑制血管发生粥样硬化。

银杏叶作为天然中药材在我国资源丰富,其在抗动脉粥样硬化中的作用越来越受到人们的关注,但尚待详细而深入的研究其复杂的药理作用机制。

#### [参考文献]

- [1] 姚碧文. 银杏叶药理研究进展 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2005, 15 (3): 391-392
- [2] 石军民. 银杏叶药理研究进展 [J]. 国际医药卫生导报, 2008, 14 (21): 122-124
- [3] 董丽. 立普妥对模型血症的疗效观察 [J]. 中国冶金工业医学杂志, 2008, 3: 296
- [4] Chen YH, Lin SJ, Chen YL, et al. Anti-inflammatory effects of different drugs/agents with antioxidant property on endothelial expression of adhesion molecules [J]. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2006, 6 (4): 279-304
- [5] 范乐明. 动脉粥样硬化炎症机制的再认识 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13 (3): 249-253
- [6] 黄秀榕, 祁明信, 汪朝阳, 等. 4种归肝经明目中药对晶状体上皮细胞凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 的调控 [J]. 中国临床药理学和治疗学, 2004, 9 (3): 322-325
- [7] 门保忠, 周定标, 张笑明, 石怀银, 等. 不同类型颈动脉粥样斑块 Bcl-2/Bax 的基因表达 [J]. 中国医学科学院学报, 2005, 4: 241-244 (此文编辑 文玉珊)