

银杏叶提取液对缺血再灌注骨骼肌线粒体的保护作用

蓝旭¹ 刘雪梅¹ 葛宝丰¹ 许建中²

(1. 兰州军区总医院骨科研究所, 甘肃 兰州 730050; 2. 第三军医大学西南医院, 重庆)

【摘要】 目的 观察银杏叶提取液对肢体缺血再灌注损伤的影响。方法 制作兔肢体缺血再灌注损伤动物模型, 实验分对照组、再灌注组和治疗组。检测骨骼肌三磷酸腺苷(ATP)水平并观察线粒体超微结构的变化。测定线粒体丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)和线粒体Ca含量。结果 再灌注组和对对照组比较, 以上各项指标差异显著($P < 0.01, P < 0.05$)。银杏叶提取液促进骨骼肌能量代谢、维持线粒体结构完整性、降低线粒体MDA含量、提高线粒体GSH水平并抑制线粒体Ca超载。治疗组各项测定指标较再灌注组比较明显改善($P < 0.01, P < 0.05$)。结论 银杏叶提取液对缺血再灌注骨骼肌线粒体有保护作用。

【关键词】 肢体; 再灌注损伤; 线粒体; 骨骼肌; 中医现代化

Protective effect of Ginkgo Biloba succi on mitochondria of skeletal muscle during ischemia and reperfusion injury LAN Xu, LIU Xue mei, GE Baofeng, et al. Institute of Orthopedics, The General Hospital of Lanzhou Military Command(Gansu Lanzhou, 730050)

【Abstract】 Objective To observe the effect of Ginkgo Biloba succi on ischemia and reperfusion injury of Limb **Methods** The experimental model of ischemia and reperfusion injury of limb was produced in rabbits which were divided into control group, reperfusion group and treatment group. The changes of ATP synthesis and mitochondrial ultrastructure were observed, while the contents of MDA, GSH and Ca in mitochondria were measured respectively. **Results** The indexes of reperfusion group changed significantly as compared with those of control group ($P < 0.01, P < 0.05$). Ginkgo Biloba succi promoted the recovery of energy metabolism, maintained the integrality in mitochondrial structure, reduced the mitochondrial MDA content, increased the level of GSH, inhibited the calcium overload. The indexes of treatment group improved significantly as compared with those of reperfusion group ($P < 0.01, P < 0.05$). **Conclusion** Ginkgo Biloba succi might have the protective effect on muscle cells during ischemia and reperfusion injury of limb.

【Key Words】 Limb; Reperfusion injury; Mitochondria; Skeletal muscle; Modernization of TCM

目前认为缺血再灌注损伤与线粒体功能改变有重要关系^[1]。为了有效改善再灌注损伤过程中的线粒体功能障碍, 我们观察了银杏叶提取液对骨骼肌缺血再灌注损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

1.1.1 试剂 ATP(美国Sigma公司产品); 小牛血清白蛋白(兰州生物制品研究所产品); 对氨基苯磺酸钠(上海试剂公司产品); MDA和GSH试剂盒(南京建成生物医学公司产品); 银杏叶提取液(徐州制药厂产品)。

1.1.2 仪器 Himac CR21 高速低温离心机(日本东芝公司); PE 2100 原子吸收分光光度计(美国PE公司); 毛细管电泳仪(美国Waters公司)。

1.2 动物模型和测定项目

1.2.1 动物模型制作 健康成年家兔 36 只, 体重 2.5~3.5kg。3% 戊巴比妥钠(25mg/kg) 静脉注射麻醉。无菌手术显露左大腿股血管鞘并游离股动静脉, 于腹股沟韧带处用微血管夹阻断股动静脉, 在阻断处以下用橡皮带弹性环扎以阻断侧支循环。6 小时后取下橡皮带及血管夹, 恢复肢体血供。动物随机分 3 组, 每组 12 只。①对照组: 解剖出股动静脉, 不做其它处理。②再灌注组: 缺血 6 小时, 恢复血流再灌注 1 小时。③治疗组: 缺血 6 小时, 恢复血流之前 10 分钟静脉注射银杏叶提取液, 10mg/kg, 再灌注 1 小时。

1.2.2 骨骼肌 ATP 含量检测^[2] 取左小腿腓肠肌 50mg 在 10 秒内放入液氮中, 经高氯酸处理并匀浆后用毛细管电泳法检测 ATP 含量。

1.2.3 骨骼肌线粒体生化指标检测^[2] 部分骨骼肌匀浆用差速离心法提取线粒体, 采用双缩脲法进行蛋白定量, 取线粒

体悬液 200~ 300μl 用分析纯浓硝酸和高氯酸加热消化, 定容后用原子吸收分光光度计火焰法测定总 Ca 含量。丙二醛 (MDA) 和还原型谷胱甘肽 (GSH) 水平用相应试剂盒检测。

1.2.4 骨骼肌线粒体超微结构观测^[2] 实验各组动物每组随机抽取兔 6 只, 取部分腓肠肌按透射电镜技术制备超薄切片。电镜下(20000 倍)对含线粒体的骨骼肌摄片 20 张, 将照片上测试格(20×24= 480 点)经光学放大 2 倍供定量测试。根据形态学计量方法对骨骼肌胞浆内线粒体体积和面积进行相对测量。以胞浆为参照系, 测量线粒体的体密度(V_v: 单位体积参考空间内某相成分所占的体积)、面密度(S_v: 单位体积包容空间内某相成分所具有的表面积)和比表面(S_s: 某相成分的表面积与其体积之比)。

1.3 统计学方法 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间计量资料比较用 Excel 97 软件行 *t* 检验。

2 结果

2.1 骨骼肌能量代谢指标的变化 对照组、再灌注组和治疗组的 ATP 含量分别为 (9.753 ± 1.362) μmol/g、(3.985 ± 1.126) μmol/g 和 (7.536 ± 1.235) μmol/g。再灌注组合成 ATP 的能力显著低于对照组 (*P* < 0.01), 而治疗组 ATP 含量明显高于再灌注组 (*P* < 0.01)。

2.2 骨骼肌线粒体生化指标的变化 再灌注组与对照组比较, 线粒体 MDA 和 Ca 含量显著升高, 而线粒体 GSH 水平显著降低 (*P* < 0.01)。使用银杏叶提取液后, 线粒体 MDA 和 Ca 含量显著降低, 而线粒体 GSH 水平显著升高 (*P* < 0.01)。结果见表 1。

表 1 实验各组动物骨骼肌线粒体 MDA、GSH、Ca 的变化

组别	MDA(μmol/mg)	GSH(μmol/mg)	Ca(μmol/mg)
对照组	5.986 ± 1.151	0.0829 ± 0.0116	115.36 ± 21.53
再灌注组	15.021 ± 2.135 ^a	0.0352 ± 0.0039 ^a	228.97 ± 26.55 ^a
治疗组	8.923 ± 1.356 ^b	0.0628 ± 0.0065 ^b	155.11 ± 18.02 ^b

注: 与对照组比较, ^a*P* < 0.01; 与再灌注组比较, ^b*P* < 0.01。

2.3 骨骼肌线粒体超微结构的变化 再灌注组与对照组比较, 线粒体的体密度和面密度明显升高, 而线粒体比表面明显降低 (*P* < 0.01, *P* < 0.05), 提示线粒体明显肿胀。使用银杏叶提取液后, 线粒体的体密度和面密度明显降低, 而线粒体比表面明显升高 (*P* < 0.01), 说明线粒体肿胀明显改善。结果见表 2。

表 2 实验各组动物骨骼肌线粒体计量指标的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	V _v	S _v	S _s
对照组	0.032 ± 0.011	0.083 ± 0.042	2.962 ± 0.685
再灌注组	0.126 ± 0.077 ^a	0.166 ± 0.085 ^b	1.496 ± 0.392 ^a
治疗组	0.038 ± 0.012 ^c	0.108 ± 0.036 ^c	2.887 ± 0.536 ^c

注: 与对照组比较, ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01; 与再灌注组比较, ^c*P* < 0.05

3 讨论

肢体经历一段时期的缺血, 在血供完全恢复后, 可出现比缺血时更为严重的损伤。目前认为主要是再灌注时氧自由基过量生成导致膜结构脂质过氧化和膜通透性增高原因造成肢体损伤进一步加重^[3]。本实验结果进一步证明, 肢体缺血

再灌注早期出现的线粒体功能障碍是再灌注损伤的重要机制之一。线粒体是细胞能量代谢中心, 线粒体合成 ATP 为细胞活动提供能量^[4]。线粒体作为一个最重要的细胞器, 在维持细胞生理功能中发挥重要作用, 尤其在缺血再灌注损伤发生及发展过程中起到中心环节的作用^[5]。线粒体是对再灌注损伤最敏感的细胞器, 其损伤表现为跨膜电位耗散, 细胞能量代谢障碍, 细胞进入不可逆的死亡过程^[6]。缺血再灌注过程中, 线粒体 MDA 和 Ca 含量升高, 说明线粒体的缺血再灌注损伤主要是由于氧自由基和钙超载引起的; 而线粒体内抗氧化物质 GSH 水平下降, 则使损伤进一步加重; 线粒体计量指标观察结果提示线粒体明显肿胀, 骨骼肌病理损害严重。线粒体受损使细胞氧化磷酸化功能障碍, 细胞合成 ATP 的能力降低。所以减轻或防止线粒体损伤对保护缺血再灌注骨骼肌细胞有重要意义。

现代药理学研究表明银杏叶提取液抗缺血再灌注损伤的机制是^[7]: ①银杏叶提取液是一种高效的氧自由基清除剂, 可有效拮抗再灌注时氧自由基对细胞的损伤; ②银杏叶提取液能有效维持骨骼肌细胞内 Ca²⁺-ATP 酶的活性及细胞内外的 Ca²⁺ 平衡, 防止病理状态下钙超载造成的细胞损伤; ③银杏叶提取液能有效减少再灌注过程中粒细胞聚集和炎性介质的释放。本实验治疗组给予银杏叶提取液后, 一方面线粒体 MDA 和 Ca 含量下降, 说明银杏叶提取液能减轻氧自由基造成的损害和线粒体钙超载; 另一方面, 银杏叶提取液在一定程度上能增加线粒体的 GSH 水平, 增强其抗损伤能力。由于这两方面原因, 银杏叶提取液能维持线粒体结构的完整性和细胞正常的氧化磷酸化, 促进再灌注骨骼肌细胞 ATP 合成能力的恢复, 减轻肢体缺血再灌注损伤。由于客观条件限制, 本实验未能采用多种剂量及多时相点干预给药, 而只能根据文献采用比较公认的适宜剂量, 所以未能详尽阐述其量效关系, 有待以后进一步探讨。

参考文献

- 1 Abe K, Hayashi N, Terada H. Effect of endogenous nitric oxide on energy metabolism of rat heart mitochondria during ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26(3-4): 379-387.
- 2 方福德, 周吕, 丁濂. 现代医学实验技巧全书. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1995. 316-536.
- 3 Korompilias AV, Chen LE, Seaber AV, et al. Studies of ischemiareperfusion injury in skeletal muscle: efficacy of 21-minosteroids on microcirculation and muscle contraction after an extended period of warm ischemia. *J Orthop Res*, 1997, 15(4): 512.
- 4 Grattagliano I, Vendemiale G, Lauterburg BH. Reperfusion injury of the liver: role of mitochondria and protection by glutathione ester. *J Surg Res*, 1999, 86(1): 2-8.
- 5 Hirata T, Fukuse T, Kawashima M, et al. High energy phosphates, mitochondria and reperfusion injury in isolated rat lungs. *Transplant Proc*, 1998, 30(7): 3377-3379.
- 6 Pierre S, Jamme I, Droy Le faix MT, et al. Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects Na, K-ATPase activity during cerebral ischemia in mice. *Neuroreport*, 1999, 10(1): 47-51.
- 7 Mazzanti G, Mascellino MT, Battinelli L, et al. Antimicrobial investigation of semipurified fractions of Ginkgo biloba leaves. *J Ethnopharmacol*, 2000, 71(1-2): 83-88. (收稿: 2001-07-31 编辑: 房世源)