

本文引用:杨龙,刘春明,王正飞,等.银杏叶提取物对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制[J].新乡医学院学报,2021,38(11):1011-1016. DOI:10.7683/xyxyxb.2021.11.003.

【基础研究】

银杏叶提取物对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制

杨 龙¹, 刘春明¹, 王正飞¹, 崔 聪²

(1. 郑州市第七人民医院心血管外科, 河南 郑州 450000; 2. 河南省胸科医院心血管外科, 河南 郑州 450000)

摘要: 目的 探讨银杏叶提取物(GBE)对大鼠心肌缺血再灌注损伤(MIRI)的保护作用及其机制。方法 将48只Sprague Dawley大鼠随机分为假手术组MIRI组、低剂量GBE组(L-GBE组)和高剂量GBE组(H-GBE组),每组12只。假手术组和MIRI组大鼠给予2 mL生理盐水灌胃,L-GBE组和H-GBE组大鼠分别给予50、100 mg·kg⁻¹的GBE溶液灌胃,连续给药7 d;MIRI组、H-GBE组和L-GBE组大鼠采用栓线法制备MIRI模型;假手术组大鼠仅开胸,暴露心脏不予冠状动脉结扎。观察大鼠心肌缺血发生前10 min(T₀)、缺血后30 min(T₁)、再灌注30 min(T₂)、再灌注60 min(T₃)、再灌注120 min(T₄)时心率和T₄时J点抬高值。取各组大鼠心肌组织,应用苏木精-伊红染色法检测大鼠心肌组织病理形态学变化。取MI/RI组和H-GBE组大鼠心肌梗死组织,应用Illumina HiSeq 2500测序平台进行微RNA(miRNA)测序,应用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)法检测差异表达miRNAs。利用miRwalk数据库对差异表达miRNAs进行靶基因预测和功能注释,通过基因本体(GO)和京都基因组百科全书数据库(KEGG)对差异表达miRNAs进行生物学过程、细胞组分、分子功能和相关信号通路预测。**结果** 4组大鼠T₀时心率比较差异无统计学意义($F=6.659, P>0.05$)。MIRI组、L-GBE组和H-GBE组大鼠T₁、T₂、T₃、T₄时心率显著低于假手术组,J点抬高值显著大于假手术组($P<0.05$);L-GBE组和H-GBE组大鼠T₁、T₂、T₃和T₄时心率显著高于MIRI组,J点抬高值显著小于MIRI组($P<0.05$);H-GBE组大鼠T₁、T₂、T₃和T₄时心率显著高于L-GBE组,J点抬高值显著小于L-GBE组($P<0.05$)。假手术组大鼠心肌结构完整,细胞间质未见明显炎症浸润和水肿,心肌细胞未发生显著的变性和坏死;MIRI组大鼠心肌组织结构紊乱,心肌细胞肿胀,出现明显的空泡样变性坏死,炎症浸润程度明显增加;与MIRI组相比,H-GBE组和L-GBE组大鼠心肌组织结构紊乱程度降低,炎症浸润减少,水肿程度降低,H-GBE组大鼠心肌组织损伤程度较L-GBE组更低。MIRI组和H-GBE组大鼠心肌梗死组织基因测序共鉴定出1 290个miRNAs,其中miR-144、miR-200b、miR-21、miR-34、miR-146、miR-155和miR-200c 7个miRNAs呈差异表达。测序和qRT-PCR结果均显示,H-GBE组大鼠心肌组织miR-144、miR-200b显著高于MIRI组,miR-21、miR-34、miR-155、miR-146和miR-200c显著低于MIRI组($P<0.05$)。7个差异表达miRNAs主要参与叉头框O信号通路、自噬、Hippo信号通路、轴突导向、肿瘤坏死因子信号通路、神经营养蛋白、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白等信号通路和生物学过程。**结论** MIRI可造成大鼠心功能损伤,GBE通过调控关键miRNAs的表达对MIRI导致的心功能损伤起保护作用。

关键词: 银杏叶提取物;心肌缺血再灌注损伤;微 RNA

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2021)11-1011-06

Protective role and mechanism of Ginkgo biloba extract on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats

YANG Long¹, LIU Chunming¹, WANG Zhengfei¹, CUI Cong²

(1. Department of Cardiovascular Surgery, the 7th People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450000, Henan Province, China;

2. Department of Cardiovascular Surgery, Henan Provincial Chest Hospital, Zhengzhou 450000, Henan Province, China)

Abstract: Objective To investigate the protective role of Ginkgo biloba extract (GBE) on myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) in rats and its mechanism. **Methods** Forty-eight Sprague Dawley rats were randomly divided into sham operation group, MIRI group, low-dose GBE group (L-GBE group) and high-dose GBE group (H-GBE group), with 12 rats in each group. Rats in the sham operation group and MIRI group were given 2 mL normal saline by gavage; rats in the L-GBE group and H-GBE group were given 50, 100 mg · kg⁻¹ GBE solution by gavage, respectively, continuous administration for 7 days; MIRI models of rats were established by suture method in the MIRI group, L-GBE group and H-GBE group; the rats in the sham operation group were only opened the chest and exposed the heart without coronary artery ligation. The heart rate of rats at 10 min before myocardial ischemia (T₀), 30 min after ischemia (T₁), 30 min after reperfusion (T₂), 60 min after reperfusion

DOI:10.7683/xyxyxb.2021.11.003

收稿日期:2020-12-25

基金项目:河南省医学科技攻关项目(编号:2018020550)。

作者简介:杨 龙(1986-),男,河南郑州人,硕士,主治医师,主要从事心血管外科。

(T_3), 120 min after reperfusion (T_4) and the J-point elevation value at T_4 were observed. The myocardial tissue of rats in each group was taken and the pathomorphological changes of myocardial tissue were detected by hematoxylin-eosin staining. The myocardial infarction tissues of rats in the MIRI group and H-GBE group were taken, and microRNA (miRNA) was sequenced by Illumina Hiseq 2500 sequencing platform, the differentially expressed miRNAs were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). The miRwalk database was used for target gene prediction and functional annotation of differentially expressed miRNAs, and the biological process, cell composition, molecular function and related signal pathways of differentially expressed miRNAs were predicted through gene ontology (GO) and Kyoto genome encyclopedia database (KEGG). **Results** There was no significant difference in heart rate of rats at T_0 among the four groups ($F=6.659$, $P>0.05$). The heart rate of rats at T_1 , T_2 , T_3 and T_4 in the MIRI group, L-GBE group and H-GBE group was significantly lower than that in the sham operation group, and the J-point elevation value was significantly higher than that in the sham operation group ($P<0.05$); the heart rate at T_1 , T_2 , T_3 and T_4 in the L-GBE group and H-GBE group was significantly higher than that in MIRI group, and the J-point elevation value was significantly lower than that in the MIRI group ($P<0.05$); the heart rate at T_1 , T_2 , T_3 and T_4 in the H-GBE group was significantly higher than that in the L-GBE group, and the J-point elevation value was significantly lower than that in the L-GBE group ($P<0.05$). In the sham operation group, the myocardial structure of rats was intact, there was no obvious inflammatory infiltration and edema in the intercellular matrix, and there was no significant degeneration and necrosis of cardiomyocytes; in the MIRI group, myocardial tissue structure of rats was disordered, myocardial cells swelled, obvious vacuolar degeneration and necrosis appeared, and the degree of inflammatory infiltration increased significantly; compared with the MIRI group, the degrees of myocardial tissue disorder, inflammatory infiltration and edema were decreased in the L-GBE group and H-GBE group; the degree of myocardial tissue injury in the H-GBE group was significantly lower than that in the L-GBE group. A total of 1 290 miRNAs in myocardial infarction tissues of rats were identified by gene sequencing in MIRI group and H-GBE group, in which the miR-144, miR-200b, miR-21, miR-34, miR-146, miR-155 and miR-200c were differentially expressed. The sequencing and qRT-PCR results showed that the levels of miR-144 and miR-200b in myocardial tissue of rats in the H-GBE group were significantly higher than those in the MIRI group, and the levels of miR-21, miR-34, miR-155, miR-146 and miR-200c were significantly lower than those in the MIRI group ($P<0.05$). The seven differentially expressed miRNAs were mainly involved in forkhead box O signal pathway, autophagy, Hippo signal pathway, axon guidance, tumor necrosis factor signal pathway, neurotrophic protein, mammalian rapamycin target protein and other signal pathways and biological processes. **Conclusion** MIRI can cause cardiac function injury of rats, GBE can protect cardiac function injury caused by MIRI by regulating the expression of key miRNAs.

Key words: ginkgo biloba extract; myocardial ischemia-reperfusion injury; microRNA

心血管疾病在人群中的发病率和病死率始终位居所有疾病的前 3 位, 是危害全球人类健康的重要疾病^[1-2]。目前, 药物溶栓及介入治疗等措施使冠状动脉血流再恢复灌注是较为有效的治疗手段。然而, 再灌注可能存在溶栓后心律失常和局部出血等心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)。MIRI 常伴随细胞氧化应激过程, 使心肌血管微环境中多种有害产物堆积, 诱导心肌细胞发生凋亡和坏死。

银杏叶提取物 (ginkgo biloba extract, GBE) 的主要成分黄酮及银杏内酯, 具有清除氧自由基、促进血管平滑肌舒张作用, 对心肌梗死具有重要的防治作用^[3-4]。微 RNA (microRNA, miRNA) 在生物体内可与相应靶基因的 3' 非编码区特异性结合, 进而引起靶基因的降解或抑制其翻译蛋白产物的表达。研究表明, miRNAs 可通过靶向细胞存活或凋亡通路中的关键分子, 如 B 淋巴细胞瘤-2 凋亡调控因子、热休克蛋白 70、磷脂酰肌醇 3 激酶和去乙酰化酶 1 等

基因影响心肌细胞的生物学功能^[5-6], 导致这些基因在 MIRI 患者的血清及心肌组织中特异性表达^[7], 因此, miRNAs 可能成为 MIRI 的早期防治重要生物标志物。因此, 本研究通过构建大鼠 MIRI 模型, 观察 GBE 对 MIRI 大鼠心肌组织中 miRNA 表达的影响, 以期探讨 GBE 在 MIRI 发生、发展过程中的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 无特定病原体级 8 周龄雄性 Sprague Dawley 大鼠 48 只, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 出售许可证号: SCXK (京) 2019-0006, 动物质量合格证编号: 1100111911006370, 体质量 250 ~ 300 g, 自由饮水摄食, 饲养于通风良好、温度和湿度适宜的实验室, 12 h/12 h 光照昼夜节律。本研究中的所有实验动物操作符合实验动物伦理学委员会的动物实验标准。

1.2 仪器与试剂 40 g · L⁻¹ 多聚甲醛购自上海尚

炫生物公司,苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司,GBE(货号:CP2015)购自绍兴东灵保健食品有限公司, Fast7500 实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)仪购自美国 ABI 公司, miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒和 miRcute 增强型荧光定量检测试剂盒购自北京天根生物科技有限公司; BL-420S 型生物机能实验系统购自成都泰盟科技有限公司,石蜡切片机购自北京六一仪器公司,紫外可见分光光度计购自西安禾普生物科技有限公司,全自动生物化学分析仪购自深圳迈瑞生物电子有限公司,光学显微镜购自日本Olympus公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组和模型构建 48 只大鼠常规饲养 1 周后按随机区组设计原则分为假手术组、MIRI 组、低剂量 GBE(low-dose GBE, L-GBE)组和高剂量 GBE(high-dose GBE, H-GBE)组,每组 12 只。假手术组和 MIRI 组大鼠给予 2 mL 生理盐水灌胃, L-GBE 组和 H-GBE 组大鼠分别给予 50、100 mg · kg⁻¹的 GBE 溶液灌胃,每次给药前 12 h 对大鼠进行禁食不禁水处理,连续给药 7 d,最后一次给药为造模前 2 h。MIRI 组、L-GBE 组和 H-GBE 组大鼠参照文献[8]采用栓线法制备大鼠 MIRI 模型:于大鼠胸骨左缘 3~4 肋间切开胸壁暴露出心脏,将左冠状动脉前降支进行结扎,结扎线由直径 2 mm 的 PE 管中穿出。PE 管的一端用来阻断冠状动脉血流,另一端采用动脉夹进行固定;以心电图 ST 段开始呈弓背向上为缺血梗死标志,肉眼可见血管支配区心室肌颜色由苍白变成紫绀色,持续 30 min 后松开结扎线,恢复血流再灌注 120 min。假手术组大鼠仅开胸、暴露心脏,不予冠状动脉结扎。造模过程中 MIRI 组、L-GBE 组、H-GBE 组大鼠分别死亡 3、2、1 只。

1.3.2 大鼠心脏功能检测 应用生物机能实验系统检测 4 组大鼠心肌缺血发生前 10 min(T₀)、缺血后 30 min(T₁)、缺血再灌注 30 min(T₂)、缺血再灌注 60 min(T₃)、缺血再灌注 120 min(T₄)的心率,并记录 T₄ 时 J 点抬高值。

1.3.3 大鼠心脏组织取材和 HE 染色 正常组大鼠麻醉后采集心脏组织标本, MIRI 组、L-GBE 组和 H-GBE 组根据实验需求取大鼠心肌梗死组织约 1 cm × 1 cm × 1 cm,置于 40 g · L⁻¹多聚甲醛中固定,用流水冲洗 1 h,脱水、透明、浸蜡和包埋后,连续

切片并固定;经体积分数 100%、95%、90%、85% 和 80% 梯度乙醇及二甲苯浸泡脱蜡后置于苏木精染液中,伊红染液染色后,脱水透明并封片,在光学显微镜下(×200)观察心肌组织形态学变化。其余心脏组织放入液氮中迅速冷冻用于后续基因测序和 qRT-PCR 检测。

1.3.4 MIRI 组和 H-GBE 组大鼠心肌组织中 miRNA 测序 分别取 MIRI 组和 H-GBE 组 3 只大鼠心肌梗死组织进行 miRNA 测序。测序平台为 Illumina Hiseq 2500,利用 R 语言 edgeR 包将各组数据分别计算出各个样本基因的表达量、均值和基因变化倍数(foldchange),转换为 log₂(foldchange)后,以 P < 0.05 且 log₂(foldchange)的绝对值 > 1.2 为标准,筛选出差异表达基因。

1.3.5 qRT-PCR 法检测 MIRI 组和 H-GBE 组大鼠心肌组织中差异表达 miRNA 的相对表达量 将 MIRI 组和 H-GBE 组大鼠心肌梗死组织加入 TRIzol 并进行研磨,随后加入 200 μL 氯仿,反复剧烈摇晃后,室温放置 5 min。4℃ 下 12 000 × g 离心 15 min,吸取三层匀浆最上层约 400 μL 无色上清,置于另一无酶离心管内;加 500 μL 异丙醇,混匀上下摇晃,在室温放置 10 min,4℃ 下 12 000 × g 离心 10 min,将上清弃掉。加体积分数 75% 乙醇 1 mL,上下颠倒后在 4℃ 下 7 500 × g 离心 5 min,将上清弃掉。在滤纸上将开口的离心管倒置 10 min 后,加 20 μL 的无酶水促使离心管内沉淀溶解;吸取 1.0 μL 溶解液,在核酸蛋白分析仪上测定 RNA 浓度。根据 A₂₆₀/A₂₈₀ 值,确定是否存在 DNA 或者蛋白污染。经 miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒进行加尾后,使用 miRcute 增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒在 Fast7500 qRT-PCR 仪进行检测,以 U6 为内参,采用 2^{-ΔΔC_t}法计算 miRNAs 的相对表达量。实验重复 3 次,取均值。

1.3.6 差异表达 miRNAs 靶基因预测和信号通路富集分析 使用 miRwalk 数据库(<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de>)对特异性 miRNAs 进行靶基因预测和功能注释,通过基因本体(gene ontology, GO)和京都基因组百科全书数据库(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)对上述获得的差异表达基因进行生物学过程、细胞组分、分子功能和相关信号通路预测,筛选标准为 P < 0.05,容错率(false discovery rate, FDR) < 5%。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 22.0 软件进行数据

统计与分析,应用 Shapiro-Wilk 检验验证数据的正态性,正态性连续型变量以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用方差分析,2 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

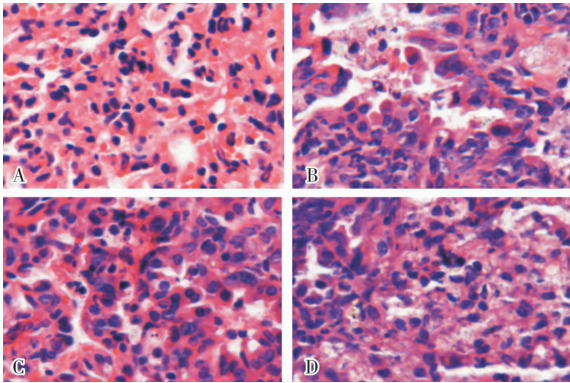
2 结果

2.1 4 组大鼠心率和 J 点抬高值比较 结果见表 1。4 组大鼠 T_0 时心率比较差异无统计学意义 ($F =$ 表 1 4 组大鼠心率及 J 点抬高值比较

Tab.1 Comparison of heart rate and J-point elevation value of rats among the four groups							
组别	n	心率/(次·min ⁻¹)					J 点抬高值/mV
		T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	
假手术组	12	385.31 ± 23.33	378.28 ± 21.57	352.74 ± 18.34	360.15 ± 26.32	364.33 ± 24.15	0.082 ± 0.009
MIRI 组	9	342.18 ± 24.53	224.12 ± 33.36 ^a	235.32 ± 26.63 ^a	260.82 ± 25.53 ^a	262.33 ± 31.35 ^a	0.153 ± 0.011 ^a
L-GBE 组	10	376.98 ± 24.13	262.31 ± 29.45 ^{ab}	281.33 ± 30.03 ^{ab}	291.35 ± 27.72 ^{ab}	303.46 ± 31.70 ^{ab}	0.116 ± 0.020 ^{ab}
H-GBE 组	11	384.61 ± 20.64	284.32 ± 21.51 ^{abc}	299.19 ± 31.86 ^{abc}	308.76 ± 28.68 ^{abc}	315.27 ± 34.63 ^{abc}	0.093 ± 0.013 ^{abc}
F		6.659	234.667	199.524	212.091	131.245	68.636
P		>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与假手术组比较^a $P < 0.05$;与 MIRI 组比较^b $P < 0.05$;与 L-GBE 组比较^c $P < 0.05$ 。

2.2 4 组大鼠心肌组织病理形态学变化 结果见图 1。假手术组大鼠心肌结构完整,细胞间质未见明显炎症浸润和水肿,心肌细胞未发生显著的变性和坏死。MIRI 组大鼠心肌组织结构紊乱,心肌细胞肿胀,出现明显的空泡样变性坏死,炎症浸润程度明显增加。与 MIRI 组相比,H-GBE 组和 L-GBE 组大鼠心肌组织紊乱程度降低,炎症浸润减少,水肿程度降低,H-GBE 组大鼠心肌组织损伤程度较 L-GBE 组更低。



A:假手术组;B:MIRI 组;C:L-GBE 组;D:H-GBE 组。
图 1 4 组大鼠心肌组织病理形态学 (HE 染色, ×200)
Fig.1 Pathomorphology of myocardium of rats in the four groups (HE staining, ×200)

2.3 MIRI 组和 H-GBE 组大鼠心肌组织中差异表达 miRNAs 筛选结果 结果见图 2。MIRI 组和 H-GBE 组大鼠心肌梗死组织共鉴定出 1 290 个 miRNAs,其中 miR-144、miR-200b、miR-34、

6.659, $P > 0.05$)。MIRI 组、L-GBE 组和 H-GBE 组大鼠 T_1 、 T_2 、 T_3 、 T_4 时心率显著低于假手术组,J 点抬高值显著大于假手术组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);L-GBE 组和 H-GBE 组大鼠 T_1 、 T_2 、 T_3 和 T_4 时心率显著高于 MIRI 组,J 点抬高值显著小于 MIRI 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);H-GBE 组大鼠 T_1 、 T_2 、 T_3 和 T_4 时心率显著高于 L-GBE 组,J 点抬高值显著小于 L-GBE 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

miR-146、miR-21、miR-155 和 miR-200c 呈差异表达。H-GBE 组大鼠心肌组织中 miR-144、miR-200b 显著高于 MIRI 组,miR-21、miR-34、miR-146、miR-155 和 miR-200c 显著低于 MIRI 组 ($P < 0.05$)。

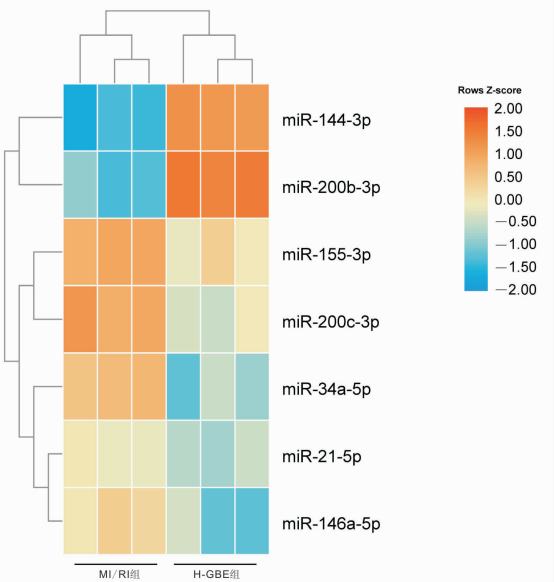


图 2 MIRI 组和 H-GBE 组大鼠心肌组织 miRNAs 差异表达热图

Fig. 2 Heatmap of differentially expressed miRNAs in myocardium of rats between the MIRI group and H-GBE group

2.4 MIRI 组和 H-GBE 组大鼠心肌组织差异表达 miRNAs 相对表达量比较 结果见表 2。H-GBE 组大鼠心肌组织中 miR-144、miR-200b 相对表达量显著高于 MIRI 组,miR-34、miR-155、miR-21、miR-146 和 miR-200c 相对表达量显著低于 MIRI 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 MIRI 组和 H-GBE 组大鼠心肌组织 miRNAs 相对表达量比较

Tab.2 Comparison of relative expression of miRNAs in myocardium of rats between the MIRI group and H-GBE group								
($\bar{x} \pm s$)								
组别	<i>n</i>	miR-144	miR-200b	miR-34	miR-155	miR-21	miR-146	miR-200c
MIRI 组	3	1.05 ± 0.08	1.01 ± 0.02	1.03 ± 0.04	1.00 ± 0.02	1.01 ± 0.05	1.00 ± 0.03	1.01 ± 0.03
H-GBE 组	3	2.54 ± 0.33	1.88 ± 0.05	0.37 ± 0.03	0.52 ± 0.05	0.62 ± 0.04	0.28 ± 0.02	0.48 ± 0.04
<i>t</i>		2.273	1.863	-2.315	-1.527	-1.421	-3.193	-1.706
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.5 差异表达 miRNAs 靶基因预测和信号通路富集分析 结果见图 3。使用 miRwalk 数据库对上述 7 个差异表达 miRNAs 进行靶基因预测,共富集到 3 401 个靶基因;对靶基因进行 KEGG 信号通路分析发现,7 个差异表达 miRNAs 主要参与叉头框 O (forkhead Box O,FoxO)信号通路、自噬、Hippo 信号通路、轴突导向、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor,TNF)信号通路、神经营养蛋白、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)等信号通路和生物学过程。

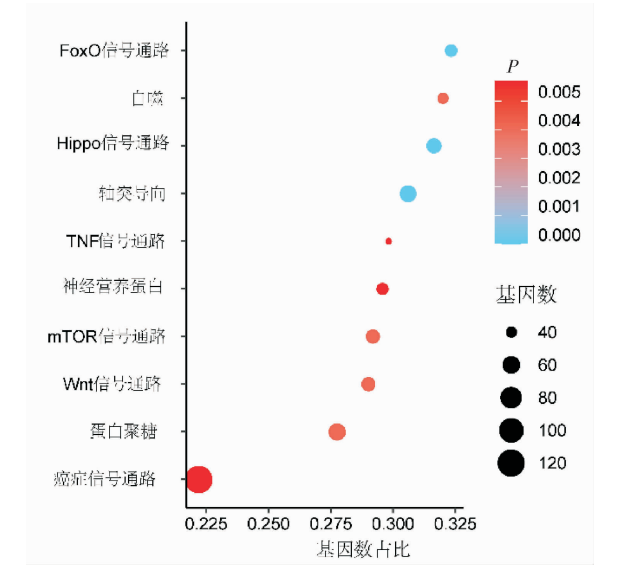


图 3 差异表达 miRNAs 的 KEGG 信号通路
Fig.3 KEGG signaling pathway of differentially expressed miRNAs

3 讨论

全球每年因心血管疾病死亡患者约占全球总死亡人数的 1/3,而心肌梗死由于其病情进展迅速,成为心血管疾病防治的重点和难点。目前研究普遍认为,MIRI 过程是由多种类型的分子、不同的细胞、多个组织共同参与的一个复杂调控过程^[9-10]。随着对心肌缺血再灌注研究的不断深入,目前已基本清楚该过程的发生与炎症浸润、氧化应激损伤、血管内皮细胞缺氧坏死和细胞凋亡等因素有关^[11-12]。但尚缺乏参与调控上述生物学过程全面且高效的药物。近年来,GBE 被发现在防治心脑血管疾病中具有较高的药用价值。GBE 主要药用成分为总黄酮及银

杏内酯,其中总黄酮在抗氧化、清除自由基和调控免疫应答等过程具有重要作用,而银杏内酯则可通过活血化瘀改善心血管疾病^[13-14]。本研究结果显示,MIRI 组、L-GBE 组和 H-GBE 组大鼠 T₁、T₂、T₃、T₄ 时心率显著低于假手术组,J 点抬高值显著大于假手术组;L-GBE 组和 H-GBE 组大鼠 T₁、T₂、T₃ 和 T₄ 时心率显著高于 MIRI 组,J 点抬高值显著小于 MIRI 组;H-GBE 组大鼠 T₁、T₂、T₃ 和 T₄ 时 HR 显著高于 L-GBE 组,J 点抬高值显著小于 L-GBE 组。假手术组大鼠心肌结构完整,细胞间质未见明显炎症浸润和水肿,心肌细胞未发生显著的变性和坏死。MIRI 组大鼠心肌组织结构紊乱,心肌细胞肿胀,出现明显的空泡样变性坏死,炎症浸润程度明显增加。与 MIRI 组相比,H-GBE 组和 L-GBE 组大鼠心肌组织紊乱程度降低,炎症浸润减少,水肿程度降低,H-GBE 组大鼠心肌组织损伤程度较 L-GBE 组更低。这一结果说明,MIRI 导致了大鼠心功能损伤,GBE 可逆转 MIRI 导致的大鼠心功能损伤,高剂量 GBE(100 mg · kg⁻¹)作用更为显著,较为适合 GBE 对 MIRI 大鼠模型的药物功能学研究。

miRNA 广泛参与心血管疾病的发生、发展。近期大量研究集中关注 GBE 缓解缺血再灌注过程^[15-16],但研究该过程参与的关键 miRNA 较少,且缺少 GBE 干预后心肌组织 miRNA 变化的全谱性研究。本研究基因测序结果显示,MIRI 组和 H-GBE 组大鼠心肌梗死组织共有 1 290 个 miRNAs 表达,其中 miR-144、miR-200b、miR-34、miR-155、miR-21、miR-146 和 miR-200c 呈差异表达;利用 miRwalk 数据库对上述 7 个差异表达 miRNA 进行靶基因预测,共富集到 3 401 个靶基因,对靶基因进行 KEGG 信号通路分析发现,7 个差异表达 miRNA 主要参与 FoxO 信号通路、自噬、Hippo 信号通路、轴突导向、TNF 信号通路、神经营养蛋白、mTOR 信号通路和生物学过程。本研究 qRT-PCR 检测结果显示,H-GBE 组大鼠心肌组织中 miR-144 相对表达量显著高于 MIRI 组,说明 GBE 可能通过增加 miR-144 的表达对 MIRI 导致的心功能损伤起保护作用。MiR-200 是一个多功能 miRNA 家族,由 miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-141 和 miR-429 组成^[15],但其在 MIRI 中的相关作用尚不清楚。有研究发现,miR-200b 和 miR-200c 在血管内皮细胞和平滑肌细胞中的水平

受活性氧介导^[16];本研究结果显示,H-GBE组大鼠心肌组织 miR-200b 相对表达量显著高于 MIRI 组,miR-200c 相对表达量显著低于 MIRI 组,提示心肌在缺血再灌注过程中产生的活性氧可能会影响 miR-200b 和 miR-200c 的表达,而 GBE 可能通过提高 miR-200b 或降低 miR-200c 的水平抑制 MIRI 造成的心肌损伤。MiR-21 和 miR-146 可通过靶向蛋白酪氨酸磷酸酶 1B,激活 caspase-3 和 caspase-8 而抑制 MIRI 诱导的细胞凋亡,发挥抗凋亡作用^[17-18]。本研究结果显示,H-GBE 组大鼠心肌组织中 miR-21 和 miR-146 相对表达量显著低于 MIRI 组,提示 GBE 可能通过抑制大鼠心肌组织中 miR-21 和 miR-146 表达水平促进损伤的心肌细胞凋亡,进而增强心肌组织自我修复,保护心肌组织。miR-34 被发现在链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠模型中高表达,通过靶向沉默调节蛋白保护 MIRI 所致的心肌细胞凋亡^[19]。MiR-155 在 MIRI 发生、发展过程中可通过促进心肌梗死组织浸润的白细胞释放,在缺血诱导的心肌缺氧条件下可增加活性氧的产生^[20-21]。本研究结果显示,H-GBE 组大鼠心肌组织中 miR-34 和 miR-155 相对表达量显著低于 MIRI 组,说明 GBE 可能通过调控 miR-34 和 miR-155 控制心肌梗死组织的活性氧水平,进而影响受损的心肌细胞凋亡过程,从而对心功能发挥保护作用。

综上所述,miRNAs 在 MIRI 发生、发展过程中具有重要作用,而 GBE 可通过影响心肌组织 miRNA 的表达水平对 MIRI 起保护作用。本研究只在 miRNA 水平进行了 GBE 对大鼠心肌 MIRI 组织的相关探索,尚缺乏进一步的机制研究。随后的研究可从这些关键 miRNA 入手,探索 GBE 保护 MIRI 的相关机制可能具有重要意义。

参考文献:

[1] VOGEL B,CLAESSEN B E,ARNOLD S V,et al. ST-segment elevation myocardial infarction[J]. *Nat Rev Dis Primers*,2019,5(1):39.

[2] MOKHTARI-ZAER A,MAREFATI N,ATKIN S L,et al. The protective role of curcumin in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *J Cell Physiol*,2018,234(1):214-222.

[3] 陈天然. 银杏叶提取物主要成分对人凝血酶作用机制研究[D]. 郑州:郑州大学,2019.

[4] 杨志晖. 重复正加速度暴露对高脂血症大鼠血管内皮功能的影响及药物干预研究[D]. 重庆:第四军医大学,2016.

[5] JIA Z,ZHAO B,LIU S,et al. Embryo transcriptome and miRNA analyses reveal the regulatory network of seed dormancy in *Ginkgo biloba*[J]. *Tree Physiol*,2021,41(4):571-588.

[6] SHERIF I O,AL-MUTABAGANI L A,SARHAN O M. *Ginkgo bi-*

loba extract attenuates methotrexate-induced testicular injury in rats: cross-talk between oxidative stress, inflammation, apoptosis, and miRNA-29a expression [J]. *Integr Cancer Ther*,2020,19:1872188246.

[7] MAO D,LI H,ZHANG L,et al. Bilobalide alleviates IL-17-induced inflammatory injury in ATDC5 cells by downregulation of microRNA-125a [J]. *J Biochem Mol Toxicol*,2019,33(12):e22405.

[8] YUAN L,FAN L,LI Q,et al. Inhibition of miR-181b-5p protects cardiomyocytes against ischemia/reperfusion injury by targeting AKT3 and PI3KR3 [J]. *J Cell Biochem*,2019,120(12):19647-19659.

[9] 李泽信,王霄,王迎,等. 漆黄素对小鼠缺血再灌注肝脏炎症性损伤的保护作用[J]. *新乡医学院学报*,2020,37(11):1018-1022.

[10] 赵欣,裴科阳,谭军. 腺苷预处理对大鼠局灶性脑缺血再灌注后线粒体活性氧含量及线粒体呼吸链复合体 I、III 活性和脑组织总抗氧化能力的影响 [J]. *新乡医学院学报*,2019,36(4):305-308.

[11] 王朋朋,李志娟,邢适颖,等. VEGF 对小鼠急性心肌梗死后心肌细胞缺血损伤的保护作用[J]. *中国循证心血管医学杂志*,2020,12(9):1071-1074.

[12] 赵梦男,田沛茹,邱莉,等. 凝血酶激活的纤溶抑制物与冠心病关系研究[J]. *预防医学*,2020,32(12):1208-1212.

[13] 罗祥敏,雷芳,陈伟,等. 银杏叶提取物中组分定性检测及含量测定[J]. *化学试剂*,2021,43(2):191-195.

[14] 刘玥,刘艳飞,田晋帆,等. 银杏叶提取物预处理对 2 型糖尿病大鼠心肌梗死后心血管保护效应研究[J]. *中国中西医结合杂志*,2017,37(9):1100-1104.

[15] D'AGOSTINO M,MARTINO F,SILENO S,et al. Circulating miR-200c is up-regulated in paediatric patients with familial hypercholesterolaemia and correlates with miR-33a/b levels: implication of a ZEB1-dependent mechanism [J]. *Clin Sci (Lond)*,2017,131(18):2397-2408.

[16] MAGENTA A,CIARAPICA R,CAPOGROSSI M C. The emerging role of miR-200 family in cardiovascular diseases [J]. *Circ Res*,2017,120(9):1399-1402.

[17] FENG M,LI Z,WANG D,et al. MicroRNA-210 aggravates hypoxia-induced injury in cardiomyocyte H9c2 cells by targeting CXCR4 [J]. *Biomed Pharmacother*,2018,102:981-987.

[18] WU M Y,YIANG G T,LAI T T,et al. The oxidative stress and mitochondrial dysfunction during the pathogenesis of diabetic retinopathy [J]. *Oxid Med Cell Longev*,2018,2018:3420187.

[19] HUANG X,GAO Y,QIN J,et al. The mechanism of long non-coding RNA MEG3 for hepatic ischemia-reperfusion: mediated by miR-34a/Nrf2 signaling pathway [J]. *J Cell Biochem*,2018,119(1):1163-1172.

[20] WEI Y,YAN X,YAN L,et al. Inhibition of microRNA155 ameliorates cardiac fibrosis in the process of angiotensin II-induced cardiac remodeling [J]. *Mol Med Rep*,2017,16(5):7287-7296.

[21] CHEN H,LIU G M,ZHANG L,et al. MicroRNA-155 affects oxidative damage through regulating autophagy in endothelial cells [J]. *Oncol Lett*,2019,17(2):2237-2243.

(本文编辑:周二强)