



中国临床医学

Chinese Journal of Clinical Medicine

ISSN 1008-6358

CN 31-1794/R

银杏叶提取物通过SIRT6调控NF- κ B和CHOP信号通路改善氧糖剥夺/复氧诱导的心脏微血管内皮细胞损伤

木克达斯·阿布都热合曼, 郭振杨, 葛均波, 李华

引用本文:

木克达斯·阿布都热合曼, 郭振杨, 葛均波, 等. 银杏叶提取物通过SIRT6调控NF- κ B和CHOP信号通路改善氧糖剥夺/复氧诱导的心脏微血管内皮细胞损伤[J]. 中国临床医学, 2025, 32(1): 46-57.

ABDURAHMAN M, GUO Z Y, GE J B, et al. *Ginkgo biloba* extract alleviates oxygen and glucose deprivation/reperfusion injury in cardiac microvascular endothelial cells by regulating NF- κ B and CHOP signaling pathways through SIRT6[J]. Chin J Clin Med, 2025, 32(1): 46-57.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2025.20241262>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

[Circ_0080425通过miR-1182/FGF9轴影响高糖环境下血管内皮细胞功能](#)

Circ_0080425 affects the function of endothelial cells in hyperglycemic environment via miR-1182/FGF9 axis

中国临床医学. 2023, 30(4): 691-696 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2023.20231223>

[PAI-1招募中性粒细胞调控IL-6/STAT3信号通路促进脂多糖诱导的肺细胞损伤](#)

PAI-1 recruits neutrophil enrichments to promote LPS-induced lung cells injury through IL6/STAT3 signaling pathway

中国临床医学. 2022, 29(4): 572-579 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2022.20220507>

[中华猕猴桃根提取物通过let-7f-5p/TARBP2通路减少肝癌细胞炎症因子的分泌](#)

acRoots reduces the secretion of inflammatory cytokine in HCC cells by the let-7f-5p/TARBP2 pathway.

中国临床医学. 2023, 30(S1): <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2023.20231223>

[子痫前期miR-4531/CX3CL1信号轴参与血管损伤的体外研究](#)

Effects of miR-4531/CX3CL1 signaling pathway on the vascular injury in preeclampsia in vitro

中国临床医学. 2024, 31(6): 868-874 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2024.20240857>

[CPSF6调控Notch信号通路促进破骨细胞分化及乳腺癌骨转移](#)

CPSF6 regulates Notch signal pathway to promote osteoclast differentiation and bone metastasis of breast cancer

中国临床医学. 2020, 27(3): 422-427 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20200377>

[肾胺酶减轻高糖诱导的足细胞损伤](#)

Remission effects of renalase on high glucose-induced injury in podocytes

中国临床医学. 2021, 28(4): 603-609 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20210017>

DOI: 10.12025/j.issn.1008-6358.2025.20241262

· 论 著 ·

银杏叶提取物通过 SIRT6 调控 NF- κ B 和 CHOP 信号通路改善氧糖剥夺/复氧诱导的心脏微血管内皮细胞损伤



木克达斯·阿布都热合曼, 郭振杨, 葛均波, 李 华*

复旦大学附属中山医院心内科, 上海 200032

[摘要] **目的** 探讨银杏叶提取物 (*Ginkgo biloba* extract, GBE) 对氧糖剥夺/复氧 (oxygen and glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 条件下心脏微血管内皮细胞 (cardiac microvascular endothelial cells, CMECs) 的作用及其分子机制。**方法** 建立 OGD/R 诱导的 CMECs 损伤模型, 根据不同处理分为 4 组: 常氧空白对照组 (WT 组)、WT+GBE 组、OGD/R 组和 OGD/R+GBE 组。采用流式细胞术检测各组细胞凋亡水平, MitoSox 染色检测细胞氧化应激水平, 划痕实验检测细胞迁移能力, Western 印迹法检测 PERK/eIF2 α /CHOP、核转录因子 κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 及内皮细胞功能相关蛋白标志物的表达水平。**结果** 与 WT 组相比, OGD/R 组的内皮细胞凋亡水平显著上升, 细胞功能损伤明显加重, p-NF- κ B、血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、细胞间黏附分子 1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1) 蛋白表达显著上调 ($P<0.05$), CHOP 信号通路激活明显增强 ($P<0.05$); 经 GBE 干预后, 受损内皮细胞的凋亡明显减少, 氧化应激和炎症水平明显下调, p-NF- κ B 蛋白表达显著减少 ($P<0.05$), CHOP 信号通路明显抑制 ($P<0.05$)。进一步分析发现, GBE 通过促进 SIRT6 表达来调控上述分子, 进而减轻 OGD/R 条件下 CMECs 损伤; 敲低 SIRT6 后, GBE 减轻损伤的程度明显下降。**结论** GBE 通过促进 SIRT6 蛋白表达来调控 NF- κ B 炎症分子及 CHOP 信号通路, 改善 OGD/R 损伤造成的内皮细胞功能障碍、内质网应激和内皮细胞凋亡。

[关键词] 银杏叶提取物; 心脏微血管内皮细胞; 氧糖剥夺/复氧; 内质网应激; SIRT6**[中图分类号]** R 54**[文献标志码]** A

Ginkgo biloba extract alleviates oxygen and glucose deprivation/reperfusion injury in cardiac microvascular endothelial cells by regulating NF- κ B and CHOP signaling pathways through SIRT6

ABDURAHMAN Mukaddas, GUO Zhenyang, GE Junbo, LI Hua*

Department of Cardiology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

[Abstract] **Objective** To explore the effects of *Ginkgo biloba* extract (GBE) on cardiac microvascular endothelial cells (CMECs) under oxygen and glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) condition and its molecular mechanisms. **Methods** An OGD/R-induced injury model was established in CMECs. According to different intervention, CMECs were divided into four groups: normoxia blank control group (WT group), WT + GBE group, OGD/R group, and OGD/R + GBE group. Cell apoptosis was detected by flow cytometry technology in each group. The oxidative stress was examined by MitoSox staining. The migration abilities were measured by scratch assay. The expressions of PERK/eIF2 α /CHOP, nuclear factor kappa B (NF- κ B), and endothelial cell function markers were detected by Western blotting. **Results** Compared with the WT group, the endothelial cell apoptosis level in the OGD/R group significantly increased, with markedly aggravated cellular dysfunction. The expressions of p-NF- κ B, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), and intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) were significantly upregulated ($P<0.05$), and the activation of the CHOP signaling pathway was notably enhanced ($P<0.05$). After intervention with GBE, endothelial cell apoptosis caused by OGD/R injury was significantly reduced, oxidative stress and inflammation levels were markedly downregulated, and the expression of p-NF- κ B was considerably decreased ($P<0.05$), while the CHOP signaling pathway was notably inhibited ($P<0.05$). Furthermore, it was found that GBE could promote expression of SIRT6 to regulate the above molecules, thereby alleviating cardiac microvascular endothelial cell injury under OGD/R condition. On the contrary, when SIRT6 was knocked down, the protective effects were significantly reduced. **Conclusions** GBE improves endothelial cell dysfunction,

[收稿日期] 2024-11-11**[接受日期]** 2024-12-31**[基金项目]** 国家自然科学基金 (82170334). Supported by National Natural Science Foundation of China (82170334).**[作者简介]** 木克达斯·阿布都热合曼, 硕士生. E-mail: 22211210012@m.fudan.edu.cn

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-64041990, E-mail: lihua199988@hotmail.com

endoplasmic reticulum stress, and endothelial cell apoptosis caused by OGD/R injury by promoting the expression of SIRT6 protein, thus regulating the NF- κ B inflammatory pathway and CHOP signaling pathway.

[Key Words] *Ginkgo biloba* extract; cardiac microvascular endothelial cells; oxygen and glucose deprivation/reperfusion; endoplasmic reticulum stress; SIRT6

心肌缺血-再灌注 (ischemia-reperfusion, I/R) 损伤是多种严重心血管疾病的主要病因, 并逐渐成为导致死亡的重要因素^[1]。该损伤可引发局部及整体的炎症反应, 导致细胞凋亡, 从而损害心脏功能。微循环作为心脏 I/R 损伤的传感器和转换器, 在心肌再灌注损伤的发病机制中发挥着决定性作用, 被视为 I/R 损伤的一个显著特征^[2]。心脏微血管内皮细胞 (cardiac microvascular endothelial cells, CMECs) 位于血液和心肌细胞之间, 是 I/R 损伤中首个受损的区域。通过氧糖剥夺/复氧 (oxygen and glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 干预 CMECs 来模拟 I/R 损伤, 可以引发细胞的多种损伤变化, 包括细胞凋亡增加、炎症加重以及线粒体功能障碍等^[3], 最终导致细胞功能障碍。SIRT6 是 Sirtuins 家族的一员, 具有保护内皮细胞功能的重要作用^[4]。课题组前期研究^[5]表明, SIRT6 能够缓解 OGD/R 引起的内质网应激, 降低内皮细胞的应激水平, 并显著抑制细胞炎症及凋亡的发生。内皮细胞中 SIRT6 的缺失则会增加细胞对缺氧、炎症、氧化应激等损伤的易感性, 加剧内皮细胞功能障碍和凋亡^[6-7]。因此, SIRT6 不仅是内皮细胞功能的守护者, 还是内质网的重要负调节因子, 促进 SIRT6 表达有助于保护内皮细胞的功能^[8]。

银杏叶提取物 (*Ginkgo biloba* extract, GBE) 是一种含有 160 余种成分的植物提取物, 主要有效成分为黄酮苷和总内酯^[9], 其他重要成分包括具有抗氧化作用的银杏内酯 B 及抗衰老成分槲皮素等^[10]。GBE 具有抗氧化、抗炎等多种有益作用^[11], 其制成的银杏蜜环口服液等临床药物, 已被批准用于治疗多种心血管疾病^[12-13]。银杏内酯 B 具有抗氧化和清除自由基的功能, 不仅能够抑制活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 产生, 还能增强超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 等抗氧

化酶的活性, 从而减轻脂质过氧化、保护细胞功能、抑制细胞炎症^[9]。此外, GBE 还可以有效调节活性氮的合成, 进而抑制炎症级联反应的进程^[14]。研究^[15-16]表明, 在缺血性脑血管疾病中, GBE 对神经元及血管内皮起到了重要保护作用。然而, 目前关于其对血管内皮细胞保护机制的研究较少。基于此, 本研究采用 CMECs 细胞建立 OGD/R 模型, 探讨 GBE 对 OGD/R 引起的内皮细胞损伤的保护作用及其机制, 为临床上改善 I/R 期间内皮细胞功能提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 CMECs 细胞购自 ATCC 细胞库, MCB131 培养基及细胞生长因子等购自上海中乔新舟生物科技有限公司, GBE (HY-N12060) 购自美国 MedChem Express 公司。抗体 BIP (ab21685)、BAX (ab32503)、Bcl-2 (ab32124)、SIRT6 (ab191385)、核转录因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) p65 (ab32536)、磷酸化 NF- κ B p65 (p-NF- κ B p65; ab76302)、细胞间黏附分子 1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1; ab53013)、血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1; ab134047)、VE-cadherin (ab33168)、 β -actin (ab8226) 均购自英国 Abcam 公司; 内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS; 32027)、蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, PERK; 3192S)、磷酸化 PERK (p-PERK; 3179S)、真核细胞启动因子 2 α (eukaryotic translation initiation factor 2A, eIF2 α ; 5324S)、磷酸化 eIF2 α (p-eIF2 α ; 3398S)、C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP; 2895S) 均购自美国 CST 公司, Cleaved-Caspase3 (CC3;

19677-1-AP) 购自美国 Proteintech 公司。其中, BAX、Bcl-2、CC3 为细胞凋亡相关标志物; eNOS、VE-cadherin 为内皮功能标志物; ICAM-1、VCAM-1、NF- κ B p65/p-NF- κ B p65 为炎症标志物; BIP、eIF2 α /p-eIF2 α 、PERK/p-PERK、CHOP 为内质网应激标志物。以 β -actin (ab8226) 作为内参。

HRP 标记山羊抗兔 IgG (H+L; WB0177) 和 5 $\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (WB0133) 购自上海威奥生物科技有限公司; RIPA (P0013C) 和 PMSF (ST506) 购自上海碧云天生物技术有限公司。其他材料和试剂: 中国雅酶公司的 PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (PG112)、德国默克公司的 PVDF 膜 (ISEQ00010)、中国 Biosharp 公司的脱脂奶粉 (BS102)、中国思科捷生物技术有限公司的化学发光检测试剂盒 (ED0015-C)、美国 ThermoFisher 公司的 MitoSOX™试剂 (M36008)、美国碧迪公司的 Annexin V-FITC/PI (556547)。

1.2 细胞培养及处理 将 CMECs 细胞培养在含 10% 胎牛血清、1% 抗生素 (青霉素、链霉素) 的培养基中, 置于 37℃、5%CO₂ 的细胞培养箱中培养。细胞生长至培养皿面积的 80%~90% 后, 传代并分为不同处理组: 常氧空白对照组 (WT 组)、常氧+银杏叶提取物组 (WT+GBE 组)、氧糖剥夺/复氧空白对照组 (OGD/R 组)、氧糖剥夺/复氧+银杏叶提取物组 (OGD/R+GBE 组)。建立体外 OGD/R 损伤内皮细胞模型, 2 组 OGD/R 组在不含血清的 MCB131 中培养, 并在 37℃ 的低氧条件 (1%O₂、94%N₂、5%CO₂) 下放置 12 h, 在常氧条件下移至正常介质培养 6 h。另外, WT 组在培养基中分别加入低、中、高浓度的 GBE (0.6、1.3、2.6 mg/mL), 采集细胞样品用于后续实验。

1.3 病毒转染 编码人 shSIRT6 (Ad-shSIRT6) 的腺病毒及其阴性对照由汉恒生物科技 (上海) 有限公司构建。shSIRT6 序列为 5'-GCTACGTTG ACGAGGTCATGA-3', 相应的 Ad-ctrl 感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 100。用含 10% 胎牛血清的 MCB131 培养基, 在 37℃ 培养

箱中培养 CMECs 细胞至细胞密度 60%, 使用 Ad-shSIRT6 转染细胞。转染 6 h 后, 继续在含有 10% 胎牛血清的新鲜培养基中培养至细胞密度 80%~90%。通过 Western 印迹法验证转染效率。

1.4 Western 印迹法 预冷 RIPA、PMSF 混合裂解液 (体积比 100:1), 加入 CMECs 细胞中。在 4℃ 条件下以 12 000 $\times$ g 离心 15 min 提取细胞总蛋白, BCA 蛋白检测试剂盒测定总蛋白浓度。在蛋白样品中按比例加入 5 $\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 于 100℃ 变性 10 min。配制分离、浓缩胶, 依次进行蛋白质样品电泳, 待蛋白样品分离后转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h; 加一抗 (抗体稀释度均为 1:1 000), 4℃ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次 (每次 5 min), 室温下二抗孵育 1 h; 显影, 检测凋亡、炎症及细胞功能的蛋白标志物表达水平。

1.5 划痕实验 通过细胞划痕法计算细胞迁移率, 比较各组细胞划痕面积愈合程度, 评价 GBE 对 CMECs 细胞迁移能力的影响。CMECs 细胞以每孔 1 $\times$ 10⁵ 个细胞的密度接种于 6 孔板内, 待形成完全融合的单层细胞层后, 用 200 μ L 无菌枪头在孔板中划线, 无菌 PBS 洗涤细胞 3 次, 去除脱落细胞碎片, 确保划线后留下的间隙清晰可见。对各组细胞进行相应处理后, 于划痕后即刻 (0 h)、划痕后 24 h 使用显微镜观察划痕上、中、下 3 个点, 拍照记录。

1.6 线粒体 ROS 检测 为了测量线粒体 ROS 的产生, 在不同干预情况下使用 MitoSOX™试剂对细胞进行评估。将指示剂溶解在 DMSO 中, 用无血清培养基稀释至终浓度 5 μ mol/L。将处理过的细胞在 37℃ 下放置 15 min, 用温热的 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 并在落射荧光显微镜下成像。

1.7 细胞凋亡的流式细胞术分析 采用 Annexin V-FITC/PI 双重染色, 分析不同处理下的细胞凋亡。收集细胞, 用冰冷的 PBS 洗涤 2 次, 以 1 $\times$ 10⁶ 个细胞/mL 的浓度重新悬浮在 400 μ L (1 $\times$) 结合缓冲液中。随后, 在室温、黑暗条件下, 将细胞悬浮液以 Annexin V-FITC (5 μ L) 和 Propidium Iodide (2 μ L) 溶液标记凋亡细胞, 染

色 15 min, 并进行流式细胞术分析。

1.8 统计学处理 采用 Graphpad Prism 9.0、ImageJ 软件进行统计分析 & 绘图, 正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 GBE 抑制 OGD/R 造成的内皮细胞凋亡及功能损伤 细胞凋亡标志物检测结果 (图 1A) 显示: 与 OGD/R+GBE 组相比, OGD/R 组凋亡标志物 CC3、BAX 蛋白表达显著升高, 凋亡抑制因子 Bcl-2 表达显著降低 ($P < 0.05$)。流式细胞术结果 (图 1B) 显示: 与 WT 组相比, OGD/R 组细胞凋亡水平显著增加; 而 GBE 干预后, 细胞凋亡明显减少 ($P < 0.05$)。细胞功能检测和划痕实验结果显示: OGD/R 组细胞的 VE-cadherin 蛋白和 eNOS 蛋白表达量明显低于 OGD/R+GBE 组 ($P < 0.05$, 图 1C); 与 WT 组相比, OGD/R 组细胞迁移能力明显减弱; 而 OGD/R+GBE 组细胞迁移能力强于 OGD/R 组 (图 1D)。

2.2 GBE 减轻 OGD/R 引起的内皮细胞炎症与氧化应激 细胞炎症水平检测结果 (图 2A) 显示: 与 OGD/R 组相比, OGD/R+GBE 组 ICAM-1、VCAM-1、p-NF- κ B p65 蛋白表达量显著下调 ($P < 0.05$)。MitoSOX 染色检测内皮细胞氧化应激水平, 结果 (图 2B) 显示: OGD/R 诱导后细胞氧化应激水平明显升高; 而 OGD/R+GBE 组细胞的氧化应激作用被抑制。

2.3 GBE 抑制 OGD/R 诱导的内质网应激 细胞内质网应激水平结果 (图 3) 显示: GBE 干预后, BIP、CHOP、p-PERK 和 p-eIF2 α 蛋白表达量降低 ($P < 0.05$), 内质网应激水平明显降低。

2.4 GBE 在常氧或缺氧状态下可促进 SIRT6 表达 采用不同剂量 GBE 在常氧下干预 CMECs 并检测 SIRT6 蛋白表达量, 结果 (图 4A) 显示: 低、中、高剂量的 GBE 均能显著促进 SIRT6 表达 ($P < 0.05$), 然而, 中、高剂量组 SIRT6 蛋白表达差异无统计学意义, 因此选择中剂量作为干预剂量。4 组 OGD/R 处理下 CMECs 的 SIRT6 蛋白

表达水平 (图 4B) 显示: 无论是在常氧还是缺氧状态下, GBE 均促进 SIRT6 蛋白表达上调 ($P < 0.05$)。为进一步检测 GBE 对 OGD/R 诱导的内皮细胞的作用机制, 构建 SIRT6 敲低 CMECs 细胞系 (图 4C), 以进一步验证 SIRT6 与 GBE 之间的相互作用。

2.5 SIRT6 敲低减弱 GBE 对细胞凋亡和内皮细胞功能的保护作用 与 OGD/R 组相比, OGD/R+shSIRT6 组的 BAX 和 CC3 蛋白表达明显升高, Bcl-2 蛋白表达显著下降 ($P < 0.05$, 图 5A), OGD/R+shSIRT6 组的细胞凋亡水平显著升高 ($P < 0.05$, 图 5B)。经 GBE 处理后, OGD/R+shSIRT6+GBE 组的细胞凋亡水平较 OGD/R+shSIRT6 组下降, 但仍显著高于 OGD/R+GBE 组。与 OGD/R 组相比, OGD/R+shSIRT6 组 VE-cadherin 和 eNOS 表达显著降低 ($P < 0.05$, 图 5C); 细胞迁移能力明显减弱 (图 5D)。经 GBE 处理后, OGD/R+shSIRT6+GBE 组的内皮细胞功能和细胞迁移能力稍高于 OGD/R+shSIRT6 组, 但仍低于 OGD/R+GBE 组。

2.6 SIRT6 敲低减弱 GBE 对内皮细胞炎症的抑制作用 SIRT6 敲低后, OGD/R+shSIRT6 组细胞 ICAM-1、VCAM-1 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达较 OGD/R 组明显增加 ($P < 0.05$, 图 6A), MitoSOX 检测也表现出更严重的氧化应激损伤 (图 6B)。经 GBE 处理后, OGD/R+shSIRT6+GBE 组 ICAM-1、VCAM-1 以及 p-NF- κ B p65 蛋白表达下调, 氧化应激损伤减弱, 但细胞炎症水平及氧化应激损伤仍高于 OGD/R+GBE 组。

2.7 SIRT6 敲低减弱 GBE 对内质网应激的保护作用 结果 (图 7A) 显示, 与 OGD/R 组相比, OGD/R+shSIRT6 组 BIP、p-PERK、p-eIF2 α 、CHOP 蛋白表达显著增加 ($P < 0.05$)。经 GBE 处理后, OGD/R+shSIRT6+GBE 组内质网应激损伤程度较 OGD/R+shSIRT6 组减弱, 但仍高于 OGD/R+GBE 组 ($P < 0.05$)。综上, GBE 通过 SIRT6 抑制 NF- κ B 和 PERK/eIF2 α /CHOP 通路, 减轻 OGD/R 诱导的血管内皮细胞氧化应激、凋亡、炎症以及内质网应激损伤 (图 7B)。

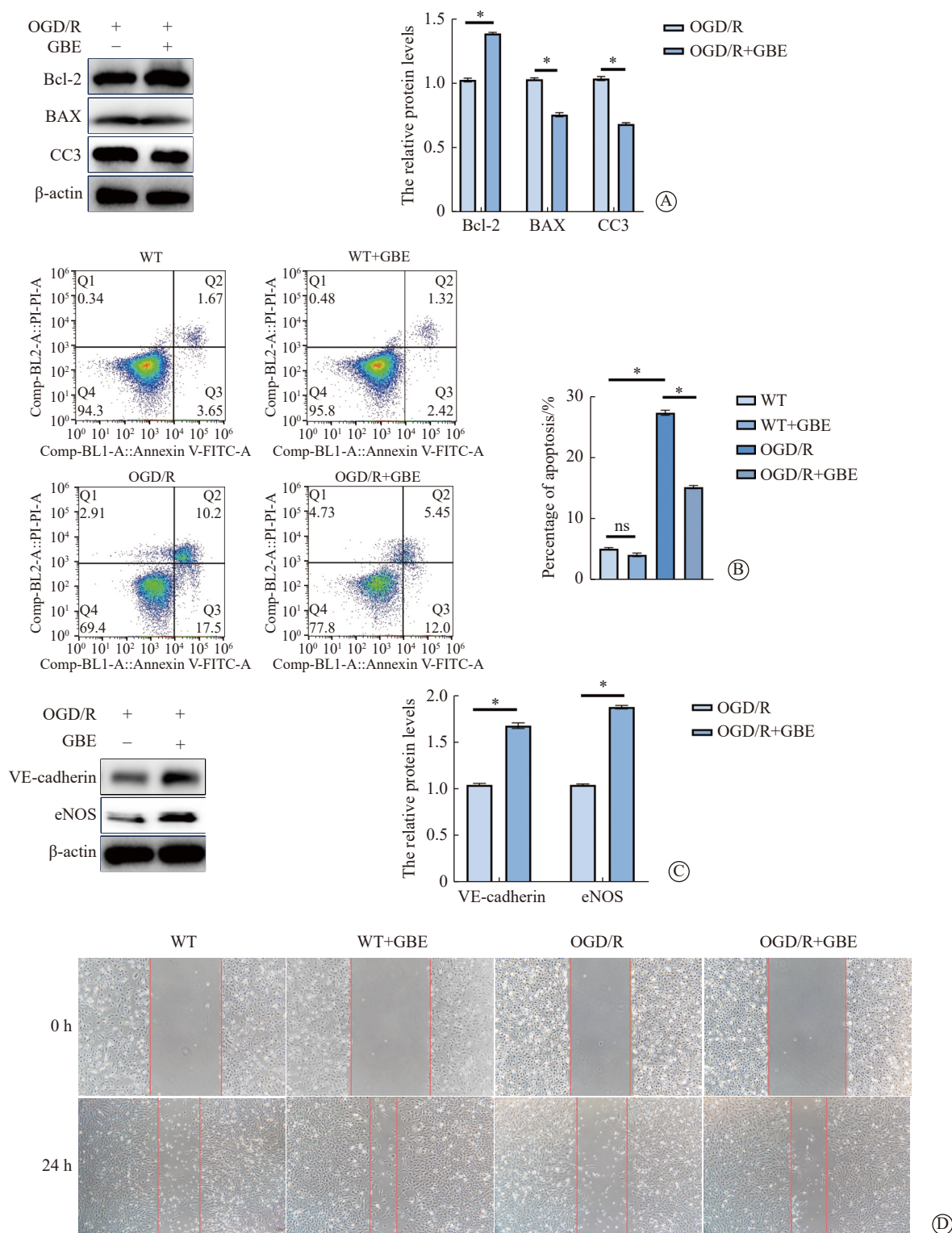


图1 GBE在OGD/R条件下对CMECs细胞凋亡水平、细胞功能和迁移能力的影响

Figure 1 Effect of GBE on cell function, apoptosis and migration of CMECs under OGD/R condition

A: The apoptosis of CMECs was tested by Western blotting. B: The apoptosis of CMECs was tested by flow cytometry. C: Cell function was detected by Western blotting. D: Migration ability was detected by cell scratch assay. GBE: *Ginkgo biloba* extract; OGD/R: oxygen and glucose deprivation/reperfusion; CMECs: cardiac microvascular endothelial cells; WT: wild-type control; Bcl-2: B-cell lymphoma-2 protein; BAX: Bcl-2-associated X protein; CC3: Cleaved Caspase-3; eNOS: endothelial nitric oxide synthase. $n=3$, $\bar{x} \pm s$, $^{ns}P>0.05$, $^{*}P<0.05$.

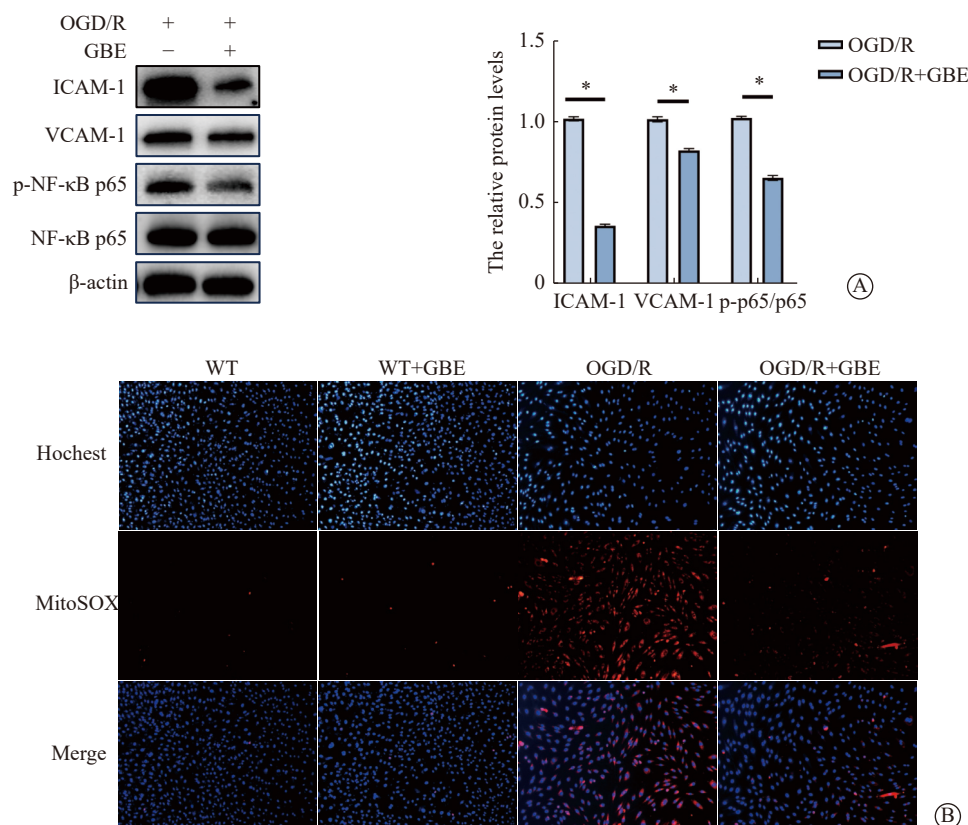


图2 GBE在OGD/R条件下对CMECs细胞炎症和氧化应激的影响

Figure 2 Effect of GBE on inflammation and oxidative stress of CMECs under OGD/R condition

A: Cellular inflammation was detected by Western blotting. B: Mitochondrial reactive oxygen species levels were determined by using mitochondrial superoxide indicators in CMECs. The nucleus of normal cells is round and light blue with darker blue particles. MitoSOX reacts with superoxide ions and is oxidized to produce strong red fluorescent products. GBE: *Ginkgo biloba* extract; OGD/R: oxygen and glucose deprivation/reperfusion; CMECs: cardiac microvascular endothelial cells; WT: wild-type control; ICAM-1: intercellular cell adhesion molecule-1; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1; NF-κB: nuclear factor-kappa B. Scale bars=40 μm. $n=3$, $\bar{x} \pm s$, * $P<0.05$.

3 讨论

在脑 I/R 损伤中, GBE 被证实可通过增加血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 活性, 降低神经功能障碍, 减少梗死面积, 从而保护神经元细胞^[17-18]。在体外脑血管 OGD/R 损伤模型中, GBE 可以减少神经元细胞死亡^[19-20]。另外, GBE 可能通过降低 miR-122 表达, 阻碍干扰素 α (interferon-α, IFN-α) 诱导的人脑血管外膜成纤维细胞的凋亡并促进其增殖^[21]。在心肌 OGD/R 诱导下, GBE 抑制被激活的 Caspase 通路, 从而抑制心肌细胞死亡及凋亡^[22]。以上研究表明, GBE 在心脑血管疾病中对不同细胞具有抑制凋亡和保护功能的作用, 尤其在 I/R 损伤过程中发挥了重要的保护作用。血管内皮细胞作为血

管的第一道屏障, 可与血管内的有害物质直接接触, 从而促进细胞凋亡及其功能受损^[23]。因此, 本研究选用 CMECs 建立体外 OGD/R 模型, 深入探究 GBE 对 I/R 损伤内皮的影响。结果显示, OGD/R 诱导后的细胞凋亡增多, ICAM-1、VCAM-1、p-NF-κB p65 蛋白表达增加, 内质网应激水平升高。此外, 内皮细胞功能受损, 内皮细胞迁移能力减弱, 内皮功能标志物 VE-cadherin 和 eNOS 蛋白表达水平降低。然而, GBE 干预可有效抑制 OGD/R 造成的内皮细胞凋亡, 降低 BAX、CC3 蛋白表达, 减轻内皮细胞氧化应激损伤, 促进 VE-cadherin、eNOS 的表达, 保护内皮细胞功能, 降低 BIP、p-PERK、CHOP 表达水平, 减轻内质网应激。

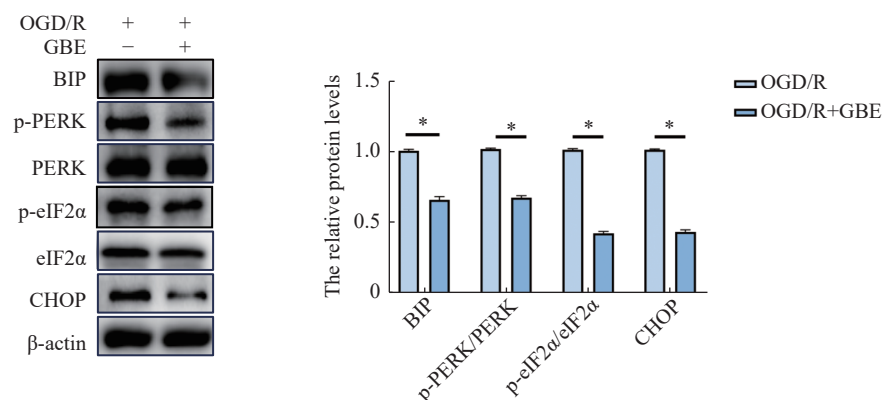


图3 GBE在OGD/R条件下对CMECs细胞内质网应激水平的影响

Figure 3 Effect of GBE on endoplasmic reticulum stress of CMECs under OGD/R condition

Western blotting and statistical analysis of the protein expression of BIP, p-PERK/PERK, p-eIF2α/eIF2α and CHOP in CMECs under OGD/R. GBE: *Ginkgo biloba* extract; OGD/R: oxygen and glucose deprivation/reperfusion; CMECs: cardiac microvascular endothelial cells; BIP: immunoglobulin heavy chain-binding protein; PERK: protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase; p-PERK: phosphorylated PERK; eIF2α: eukaryotic translation initiation factor 2A; p-eIF2α: phosphorylated eIF2α; CHOP: C/EBP-homologous protein. $n=3$, $\bar{x} \pm s$, * $P < 0.05$.

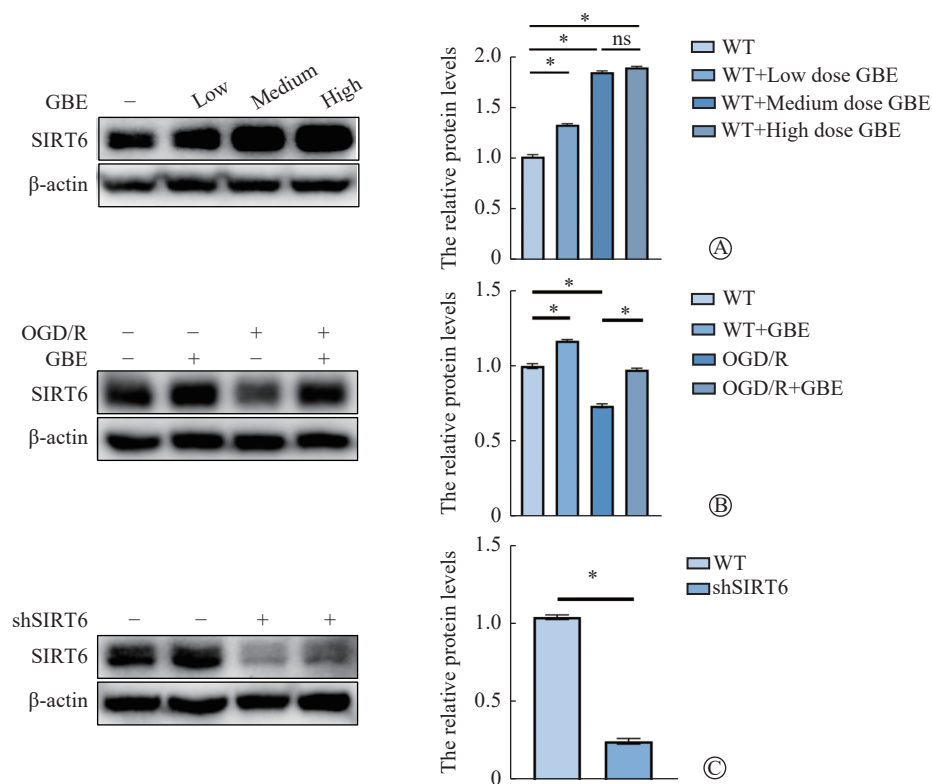


图4 GBE对CMECs细胞SIRT6蛋白表达水平的影响

Figure 4 The effect of GBE on expression of SIRT6 in CMECs

A: The relative protein levels of SIRT6 in CMECs at different concentrations of GBE (low dose: 0.6 mg/mL, medium dose: 1.3 mg/mL, high dose: 2.6 mg/mL). B: The relative protein levels of SIRT6 in CMECs under OGD/R condition. C: The relative protein levels of SIRT6 in SIRT6-knockdown CMECs. GBE: *Ginkgo biloba* extract; CMECs: cardiac microvascular endothelial cells; WT: wild-type control; OGD/R: oxygen and glucose deprivation/reperfusion. $n=3$, $\bar{x} \pm s$, ^{ns} $P > 0.05$, * $P < 0.05$.

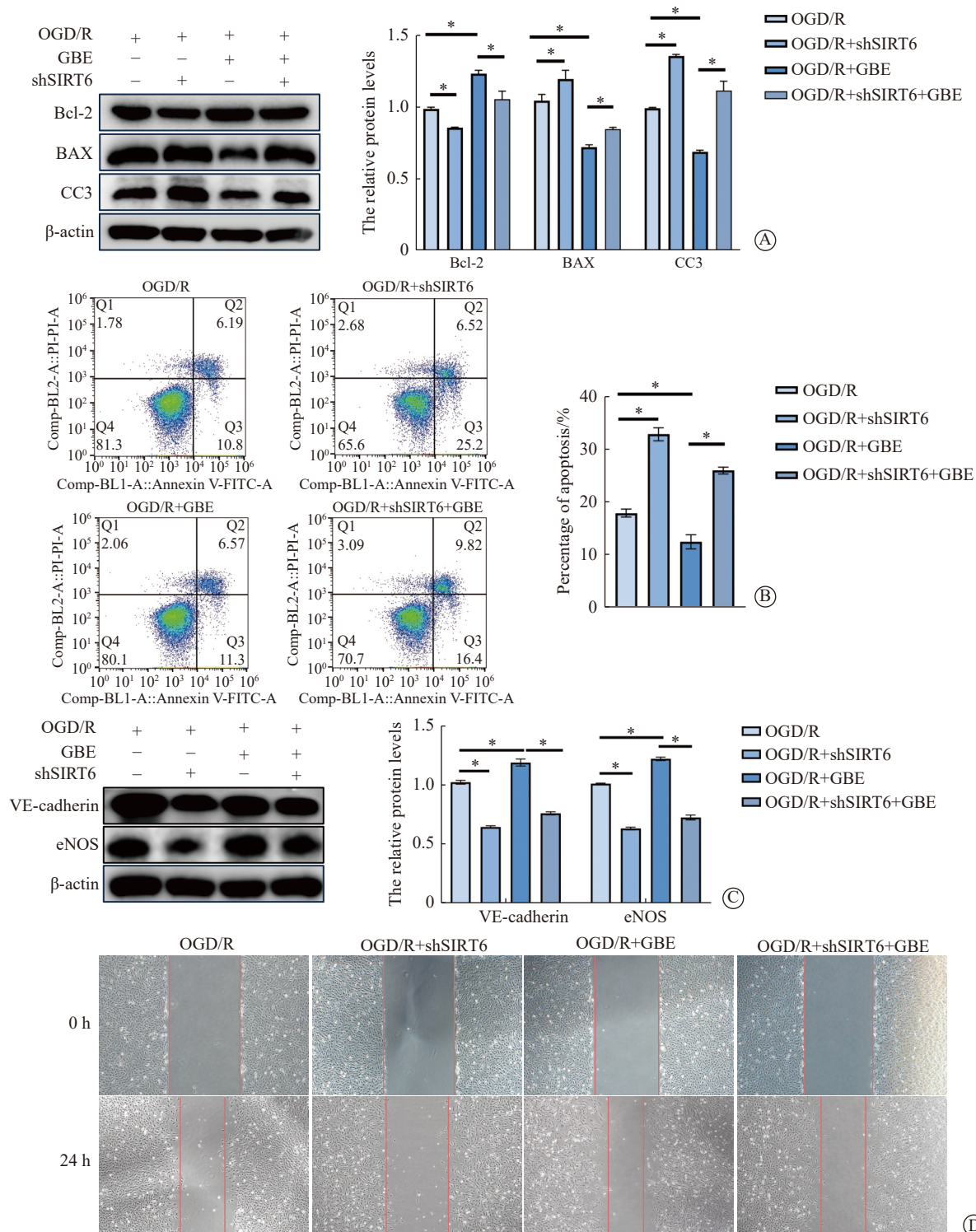


图5 GBE对SIRT6敲低CMECs细胞凋亡、细胞功能和迁移能力的影响

Figure 5 Effect of GBE on cell function, apoptosis and migration of SIRT6-knockdown CMECs

A: The apoptosis of SIRT6-knockdown CMECs was tested by Western blotting. B: The apoptosis of SIRT6-knockdown CMECs was tested by flow cytometry. C: Cell function was detected by Western blotting. D: Migration ability was detected by cell scratch assay. GBE: *Ginkgo biloba* extract; CMECs: cardiac microvascular endothelial cells; OGD/R: oxygen and glucose deprivation/reperfusion; Bcl-2: B-cell lymphoma-2 protein; BAX: Bcl-2-associated X protein; CC3: Cleaved Caspase-3; eNOS: endothelial nitric oxide synthase. $n=3$, $\bar{x} \pm s$, $*P<0.05$.

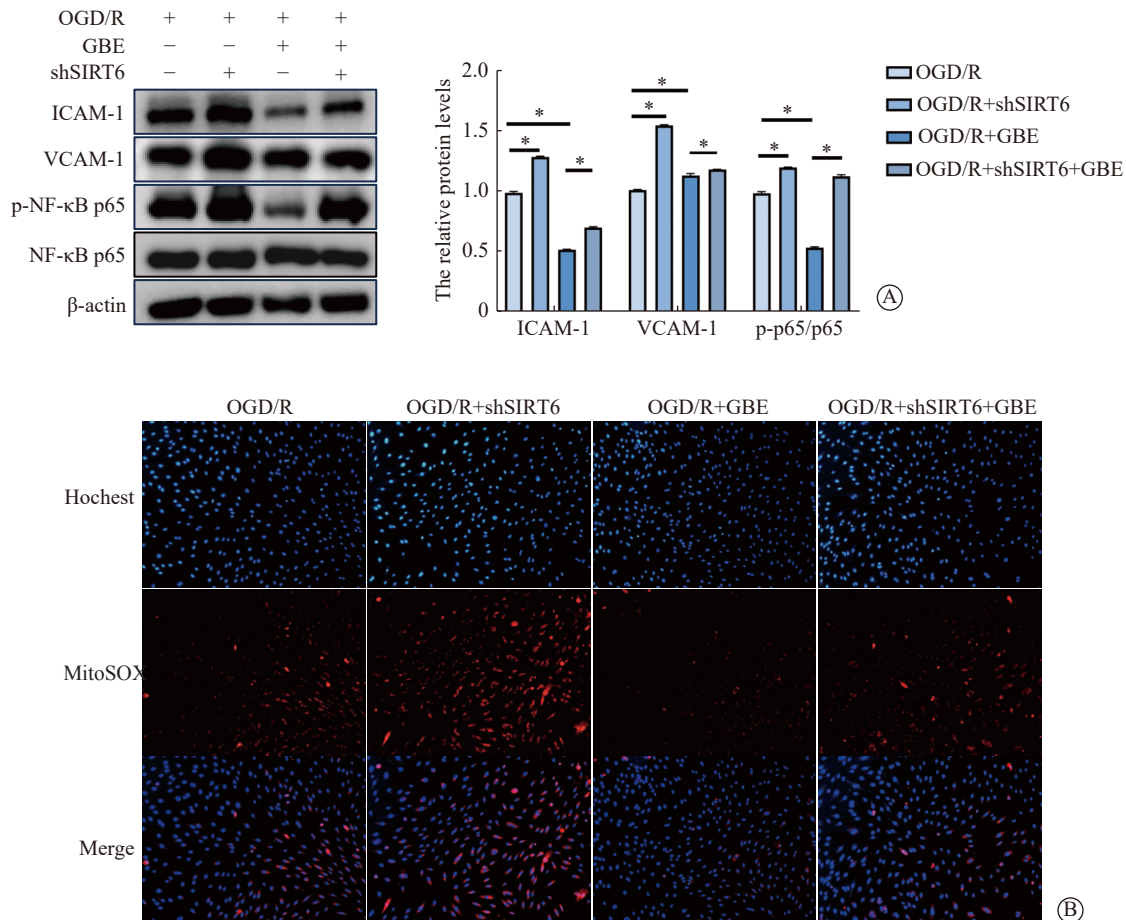


图6 GBE对SIRT6敲低CMECs细胞炎症与氧化应激水平的影响

Figure 6 Effect of GBE on inflammation and oxidative stress of SIRT6-knockdown CMECs

A: The protein expression of endothelial inflammation markers was detected by Western blotting. B: Mitochondrial reactive oxygen species levels were determined by using mitochondrial superoxide indicators in CMECs. GBE: *Ginkgo biloba* extract; CMECs: cardiac microvascular endothelial cells; OGD/R: oxygen and glucose deprivation/reperfusion; ICAM-1: intercellular cell adhesion molecule-1; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1; NF-κB: nuclear factor-kappa B. Scale bars=40 μm. $n=3$, $\bar{x} \pm s$, * $P<0.05$.

SIRT6在维持内皮细胞功能方面具有关键意义^[24-25]，其活性失调与多种疾病发生发展相关，涵盖心血管疾病、神经退行性疾病、代谢性疾病以及癌症^[7,26]。在脑血管内皮细胞中，敲低SIRT6可显著加重I/R小鼠的内皮细胞凋亡和血脑屏障损伤^[27]。相反，上调SIRT6表达可促进叉头框蛋白A2（forkhead box A2, FOXA2）脱乙酰化，抑制细胞凋亡，减轻脑I/R损伤^[28]。此外，SIRT6过表达还可通过激活核因子E2相关因子2（nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2）通路抑制内皮细胞炎症^[29]。课题组既往研究^[5]证实，SIRT6过表达可以抑制OGD/R引起的内皮细胞功能障碍，以及内质网应激水平。

基于既往研究成果，课题组推测SIRT6可能

是GBE发挥效应的潜在靶点。为验证这一推测，本研究构建了SIRT6敲低的CMECs细胞系，并在常氧和OGD/R条件下进行GBE干预。结果显示，GBE在常氧和OGD/R条件下均可促进SIRT6蛋白表达上调。在OGD/R诱导下，SIRT6敲低导致细胞氧化应激水平加剧，细胞凋亡标志物表达增加，内皮细胞功能严重受损，内质网应激水平升高。GBE干预SIRT6敲低CMECs细胞后，细胞凋亡和氧化应激水平降低，内皮细胞迁移能力得到改善，细胞功能损伤减轻。然而，GBE对SIRT6敲低内皮细胞的作用明显低于对正常内皮细胞的作用，表明GBE通过SIRT6发挥对内皮细胞的保护作用，SIRT6敲低后，GBE对内皮细胞的保护作用减弱。

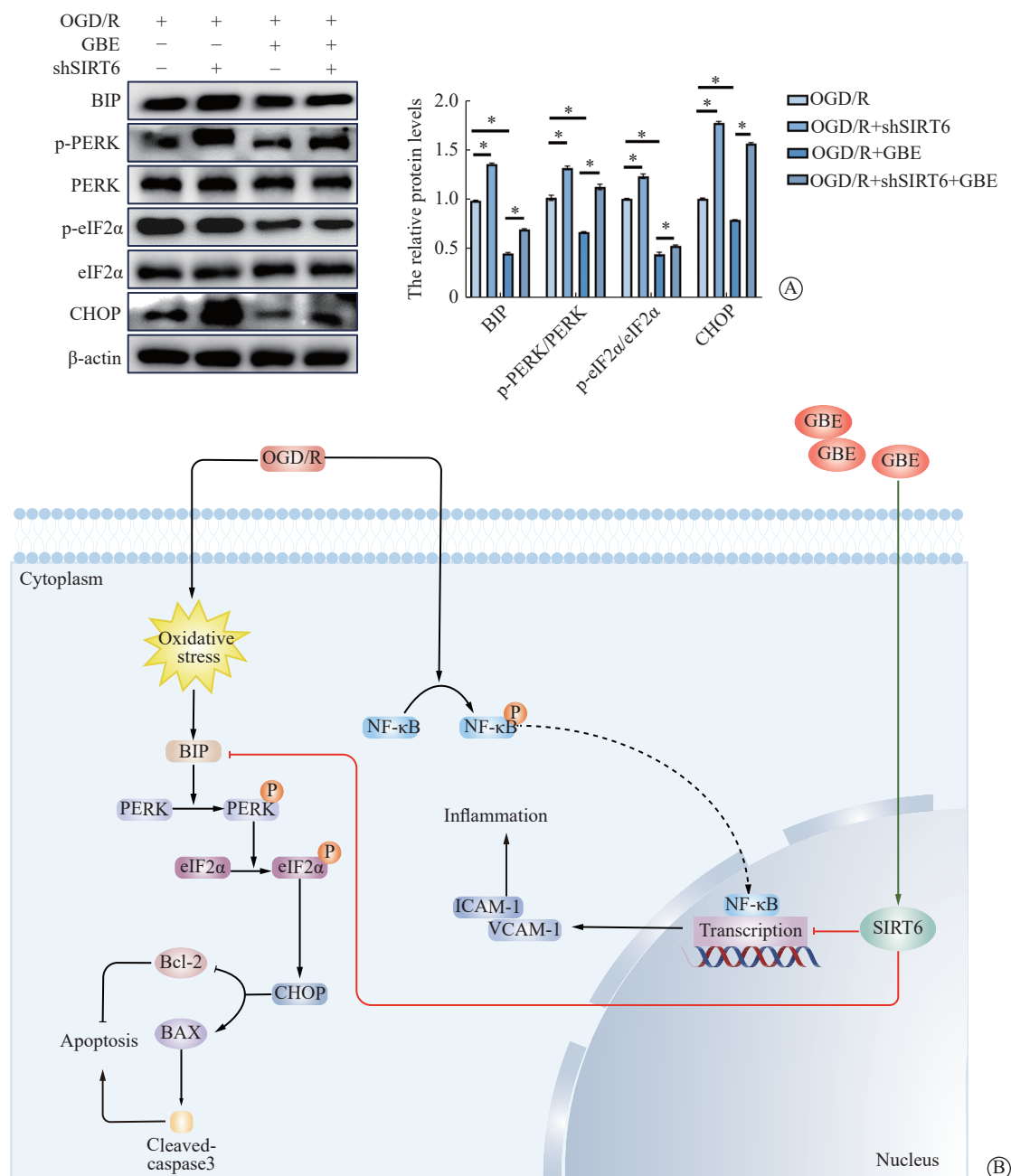


图7 GBE对SIRT6敲低CMECs细胞内质网应激水平的影响

Figure 7 Effect of GBE on endoplasmic reticulum stress of SIRT6-knockdown CMECs

A: Western blotting and statistical analysis of the protein expression of BIP, p-PERK/PERK, p-eIF2α/eIF2α and CHOP in CMECs under OGD/R condition. B: Diagram of the molecular mechanism of GBE in ischemia/reoxygenation injury in CMECs. GBE: *Ginkgo biloba* extract; CMECs: cardiac microvascular endothelial cells; OGD/R: oxygen and glucose deprivation/reperfusion; BIP: immunoglobulin heavy chain-binding protein; PERK: protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase; p-PERK: phosphorylated PERK; eIF2α: eukaryotic translation initiation factor 2A; p-eIF2α: phosphorylated eIF2α; CHOP: C/EBP-homologous protein; Bcl-2: B-cell lymphoma-2 protein; BAX: Bcl-2-associated X protein; ICAM-1: intercellular cell adhesion molecule-1; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1; NF-κB: nuclear factor-kappa B. $n=3$, $\bar{x} \pm s$, * $P<0.05$.

综上所述，本研究首次明确了 GBE 通过 SIRT6 蛋白调节 NF-κB 通路和 CHOP 通路，抑制

OGD/R 引起的内皮细胞凋亡，减轻内皮细胞炎症与氧化应激，进而保护心脏微血管内皮细胞功

能。这一发现为 GBE 在心血管疾病治疗中的应用提供了新的理论依据,为后续研究提供了新的方向。未来研究将进一步探讨 GBE 与 SIRT6 之间的具体分子机制,以及如何更有效地利用 GBE 来保护心血管系统。

伦理声明 无。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献 木克达斯·阿布都热合曼: 实施研究, 资料收集, 数据统计, 撰写论文; 郭振杨: 实施研究, 资料收集, 修改论文; 葛均波、李华: 设计课题, 指导研究, 修改论文。

参考文献

- [1] ALGOET M, JANSSENS S, HIMMELREICH U, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury and the influence of inflammation[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2023, 33(6): 357-366.
- [2] YU H, KALOGERIS T, KORTHUIS R J. Reactive species-induced microvascular dysfunction in ischemia/reperfusion[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 135: 182-197.
- [3] ZHOU H, TOAN S. Pathological roles of mitochondrial oxidative stress and mitochondrial dynamics in cardiac microvascular ischemia/reperfusion injury[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(1): 85.
- [4] YEPURI G, RAMASAMY R. Significance and mechanistic relevance of SIRT6-mediated endothelial dysfunction in cardiovascular disease progression[J]. *Circ Res*, 2019, 124(10): 1408-1410.
- [5] GUO Z Y, YU X T, ZHAO S, et al. SIRT6 deficiency in endothelial cells exacerbates oxidative stress by enhancing HIF1 α accumulation and H3K9 acetylation at the E α 1 promoter[J]. *Clin Transl Med*, 2023, 13(8): e1377.
- [6] GUO Z Y, LI P, GE J B, et al. SIRT6 in aging, metabolism, inflammation and cardiovascular diseases[J]. *Aging Dis*, 2022, 13(6): 1787-1822.
- [7] LIU G, CHEN H Y, LIU H, et al. Emerging roles of SIRT6 in human diseases and its modulators[J]. *Med Res Rev*, 2021, 41(2): 1089-1137.
- [8] BANG I H, KWON O K, HAO L H, et al. Deacetylation of XBP1s by sirtuin 6 confers resistance to ER stress-induced hepatic steatosis[J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51(9): 1-11.
- [9] 冯锦辉, 毛祥正, 贺燕玲, 等. 银杏叶对心脑血管疾病药理作用的研究进展[J]. *陕西中医药大学学报*, 2024, 47(5): 136-140.
- FENG J H, MAO X Z, HE Y L, et al. Research progress on the pharmacological effects of *Ginkgo biloba* on cardiovascular and cerebrovascular diseases[J]. *J Shaanxi Univ Trad Chin Med*, 2024, 47(5): 136-140.
- [10] DEEPIKA, MAURYA P K. Health benefits of quercetin in age-related diseases[J]. *Molecules*, 2022, 27(8): 2498.
- [11] XUE G, MENG N, ZHAO Y T, et al. The qualitative and quantitative profiling for quality assessment of Yinxing Mihuan Oral Solution and the stability study on the focused flavonol glycosides[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2022, 219: 114937.
- [12] 丁海强, 胡林, 杨柳, 等. 银杏蜜环对 ACS 患者血清基质金属蛋白酶及其抑制物水平的影响[J]. *江西医药*, 2023, 58(10): 1114-1118.
- DING H Q, HU L, YANG L, et al. Effect of *Ginkgo biloba* honey ring on serum matrix metalloproteinase and its inhibitor levels in patients with ACS[J]. *Jiangxi Med J*, 2023, 58(10): 1114-1118.
- [13] HUANG Z T, WAN C Q, WANG Y Y, et al. Anti-cognitive decline by yinxing-mihuan-oral-liquid via activating CREB/BDNF signaling and inhibiting neuroinflammatory process[J]. *Exp Aging Res*, 2021, 47(3): 273-287.
- [14] 夏江, 姜京京, 王晓玲, 等. 银杏叶提取物抗炎活性成分及作用机制研究进展[J]. *药学研究*, 2024, 43(5): 473-479.
- XIA J, JIANG J J, WANG X L, et al. Research progress on anti-inflammatory active ingredients and action mechanism of *Ginkgo biloba* extract[J]. *J Pharm Res*, 2024, 43(5): 473-479.
- [15] 逯波, 王雅滨, 刘磊. 银杏叶提取物治疗缺血性脑血管病的作用机理[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2015, 21(7): 912-914.
- LU B, WANG Y B, LIU L. Mechanism of *Ginkgo biloba* extract in treating ischemic cerebrovascular disease[J]. *J Basic Chin Med*, 2015, 21(7): 912-914.
- [16] 杨雨鸣, 赵勇, 王景霞, 等. 银杏叶提取物通过 UCP2/SIRT3 通路改善大鼠脑缺血-再灌注损伤[J]. *神经解剖学杂志*, 2023, 39(2): 187-193.
- YANG Y M, ZHAO Y, WANG J X, et al. *Ginkgo biloba* extract ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats via UCP2/SIRT3 pathway[J]. *Chin J Neuroanat*, 2023, 39(2): 187-193.
- [17] SALEEM S, ZHUANG H A, BISWAL S, et al. *Ginkgo*

- biloba* extract neuroprotective action is dependent on heme oxygenase 1 in ischemic reperfusion brain injury[J]. *Stroke*, 2008, 39(12): 3389-3396.
- [18] 陈 娇,周 娟,王 娟,等. 丁苯酞软胶囊联合银杏叶提取物注射液治疗急性脑梗死患者临床效果观察[J]. 临床军医杂志, 2023, 51(7): 713-715.
- CHEN J, ZHOU J, WANG J, et al. Clinical effect of butylphthalate softgel capsule combined with *Ginkgo biloba* extract injection on patients with acute cerebral infarction[J]. *Clin J Med Off*, 2023, 51(7): 713-715.
- [19] 毕晓晨,孔晓彬,赵 娜,等. 银杏叶提取物调控PI3K/AKT 信号通路对人脑血管外膜成纤维细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(11): 1556-1559.
- BI X C, KONG X B, ZHAO N, et al. Effects of *Ginkgo biloba* extract regulating PI3K/AKT signaling pathway on proliferation and apoptosis of human cerebral vascular adventitia fibroblasts[J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2024, 40(11): 1556-1559.
- [20] 任雅芳,禹 萌,张洪涛,等. 银杏叶提取物对人脑血管外膜成纤维细胞增殖和凋亡的影响及其与 miR-122 的调控关系[J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(17): 4279-4283.
- REN Y F, YU M, ZHANG H T, et al. Effects of *Ginkgo biloba* extract on the proliferation and apoptosis of human cerebral vascular adventitial fibroblasts and its regulatory relationship with miR-122[J]. *Chin J Gerontol*, 2024, 44(17): 4279-4283.
- [21] YANG X H, ZHENG T Z, HONG H, et al. Neuroprotective effects of *Ginkgo biloba* extract and Ginkgolide B against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation and glucose injury in a new in vitro multicellular network model[J]. *Front Med*, 2018, 12(3): 307-318.
- [22] SHEN J G, LEE W, GU Y, et al. *Ginkgo biloba* extract (EGb761) inhibits mitochondria-dependent caspase pathway and prevents apoptosis in hypoxia-reoxygenated cardiomyocytes[J]. *Chin Med*, 2011, 6: 8.
- [23] WANG X L, SHEN Y, SHANG M, et al. Endothelial mechanobiology in atherosclerosis[J]. *Cardiovasc Res*, 2023, 119(8): 1656-1675.
- [24] JIN Z, XIAO Y F, YAO F, et al. SIRT6 inhibits cholesterol crystal-induced vascular endothelial dysfunction via Nrf2 activation[J]. *Exp Cell Res*, 2020, 387(1): 111744.
- [25] ZHENG Z H, WANG B, LV X H, et al. Protective effect of SIRT6 on cholesterol crystal-induced endothelial dysfunction via regulating ACE2 expression[J]. *Exp Cell Res*, 2021, 402(1): 112526.
- [26] GARCIA-VENZOR A, TOIBER D. SIRT6 through the brain evolution, development, and aging[J]. *Front Aging Neurosci*, 2021, 13: 747989.
- [27] LIBERALE L, GAUL D S, AKHMEDOV A, et al. Endothelial SIRT6 blunts stroke size and neurological deficit by preserving blood-brain barrier integrity: a translational study[J]. *Eur Heart J*, 2020, 41(16): 1575-1587.
- [28] FANG C N, LIU X R, ZHANG F X, et al. Baicalein inhibits cerebral ischemia-reperfusion injury through SIRT6-mediated FOXA2 deacetylation to promote SLC7A11 expression[J]. *eNeuro*, 2024, 11(10): ENEURO.0174-24.2024.
- [29] HE Y H, YANG G D, SUN L J, et al. SIRT6 inhibits inflammatory response through regulation of NRF2 in vascular endothelial cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 99: 107926.

[本文编辑] 殷 悦

引用本文

木克达斯·阿布都热合曼, 郭振杨, 葛均波, 等. 银杏叶提取物通过 SIRT6 调控 NF- κ B 和 CHOP 信号通路改善氧糖剥夺/复氧诱导的心脏微血管内皮细胞损伤[J]. 中国临床医学, 2025, 32(1): 46-57.

ABDURAHMAN M, GUO Z Y, GE J B, et al. *Ginkgo biloba* extract alleviates oxygen and glucose deprivation/reperfusion injury in cardiac microvascular endothelial cells by regulating NF- κ B and CHOP signaling pathways through SIRT6[J]. *Chin J Clin Med*, 2025, 32(1): 46-57. DOI: [10.12025/j.issn.1008-6358.2025.20241262](https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2025.20241262)