

银杏二萜内酯葡胺注射液 对大鼠急性脑缺血再灌注损伤的影响

陈春苗, 周军, 陈健, 常秀娟, 张磊磊, 王振中*

(江苏康缘药业股份有限公司, 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏连云港 222001)

[摘要] **目的:**探讨银杏二萜内酯葡胺注射液对线栓法致大鼠急性脑缺血再灌注损伤(MCAO)的保护作用,并探讨其可能的作用机制。**方法:**雄性SD大鼠96只,随机分为假手术组、模型组、尼莫地平($0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组、银杏二萜内酯葡胺注射液高、中、低($4.8, 2.4, 1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)剂量组。所有动物手术前2 d尾静脉注射给药(模型组及假手术组给予生理盐水)。除假手术组,其他动物通过右侧大脑中动脉线栓塞法(MCAO)制作局灶性脑缺血再灌注模型。缺血3 h后,所用动物再次尾静脉注射给药。采用脑组织TTC染色法观察梗死率;放免法测定血清中磷酸肌酸激酶脑型同工酶(CK-BB)、超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量;免疫组化法测定脑组织中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)表达。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠脑梗死率显著增加,神经缺损症状严重;血清中SOD活性降低,MDA,CK-BB含量显著增加;脑组织中Caspase-3表达量显著升高。与模型组比较银杏二萜内酯葡胺注射液中剂量组能显著减少脑梗死率,改善脑神经功能缺损症状;提高SOD活性,减少血清中MDA,CK-BB含量,抑制脑组织中Caspase-3表达。**结论:**银杏二萜内酯葡胺注射液对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有保护作用,作用机制可能与其修复血脑屏障、降低血清CK-BB含量、抗自由基损伤及抑制Caspase-3表达有关。

[关键词] 银杏二萜内酯葡胺注射液; 脑缺血再灌注损伤; 磷酸肌酸激酶脑型同工酶; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)17-0133-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014170133

Protective Effects of Ginkgo Terpene Lactones Meglumine Injection on Focal Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Rats

CHEN Chun-miao, ZHOU Jun, CHEN Jian, CHANG Xiu-juan,
ZHANG Lei-lei, WANG Zhen-zhong*

(Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., State Key Laboratory of New-tech
for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effects of Ginkgo terpene lactones meglumine injection (GTLMI) on cerebral focal ischemia reperfusion injury induced by middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats. **Method:** Ninety six male SD rats were divided into six groups, such as sham, model, nimodipine ($0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and GTLMI ($4.8, 2.4, 1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) groups. All of rats were given corresponding drugs by tail vein injection before modeling. Except the sham group, the cerebral ischemic stroke model was used. The effects of GTLMI on the brain neurological deficit score, and the brain infraction areas percentage were observed. The influence of GTLMI on the activities of superoxide dismutase (SOD), content of malondialdehyde (MDA), creatine kinaes BB isozyme (CK-BB) in blood serum and the activities of Caspase-3 in brain were assayed. **Result:** Compared with MCAO group, GTLMI could obviously reduce the infraction area,

[收稿日期] 20140306(010)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09402203)

[第一作者] 陈春苗, 研究员, 从事心脑血管药理研究, Tel:18261321300, E-mail: maidinglala@163.com

[通讯作者] *王振中, 高级工程师, 创新中药的研发与管理, Tel:13905136437, E-mail: wzhzh-nj@163.net

increase the activities of SOD, and decrease the content of MDA, CK-BB in blood serum and Caspase-3 in brain.

Conclusion: GTLMI can protect the focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats. The mechanisms may be related to recovering the blood brain barrier, decreasing the content of CK-BB, scavenging free radicals and reduction of the expression of Caspase-3.

[**Key words**] Ginkgo terpene lactones meglumine injection; cerebral ischemia reperfusion injury; creatine kinase-BB; superoxide dismutase; malondialdehyde; Caspase-3

脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI) 是指因脑缺血致脑组织坏死前, 闭塞的脑血管再通后缺血性损伤进一步加重的现象。CIRI 的发生机制非常复杂。目前认为, 其主要的病理生理过程可能包括炎症反应、氧自由基增多、神经元兴奋性氨基酸毒性、细胞内钙超载、能量代谢障碍、内皮细胞损伤、凋亡基因被激活等多个环节^[1-2]。CIRI 是目前绝大多数缺血性脑血管病发病的主要病理过程。如何防治 CIRI, 寻找有效的治疗药物及措施, 促进脑卒中后中枢神经系统功能的恢复一直是生命科学研究的重点和热点。

国内外研究显示, 银杏提取物具有抑制血小板聚集、抗过敏、抗炎、抗休克, 以及保护心脑血管、促进学习记忆、防治老年痴呆等作用^[3-4]。银杏二萜内酯葡胺注射液主要成分为银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 K 等。辅料为葡甲胺、柠檬酸、氯化钠。具有活血通络之功效, 临床用于脑梗死 (中风病中经络痰瘀阻络证) 的治疗。银杏二萜内酯葡胺注射液对神经元保护作用及其防治脑血管疾病的研究虽已有报道, 但确切机制尚不甚明了。本研究拟探讨银杏二萜内酯葡胺注射液对脑缺血再灌注的保护作用及其可能的作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂 银杏二萜内酯葡胺注射液 (江苏康缘药业股份有限公司, 批号 130201), 尼莫地平注射液 (江苏济川制药有限公司, 批号 13040501), 水合氯醛 (国药集团化学试剂有限公司, 批号 20120409), 氯化三苯基四氮唑 (TTC, Sigma 公司, 批号 122015), 磷酸肌酸激酶脑型同工酶 (CK-BB) 放免试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 放免试剂盒、丙二醛 (MDA) 放免试剂盒及 Caspase-3 放免试剂盒 (均由北京华英生物技术研究提供), 其他试剂均为市售分析纯。

1.2 动物 SD 大鼠, 雄性, SPF 级, 6 月龄, 体重 280 ~ 320 g, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 合格证号 SCXK (沪) 2008-0016。动物饲养于屏障环境中, 12/12 h 明暗交替, 温度 22 ~ 25 °C, 相

对湿度 50% ~ 60%, 动物自由进食饮水, 适应 7 d 后开始试验。

1.3 仪器 TSQ-280 型恒温培养振荡器 (上海精宏实验设备有限公司), 5804R 型冷冻离心机 (Eppendorf 公司), BS224S 型电子天平 (赛多利斯科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 分组与给药 大鼠随机分为 6 组: 假手术组、模型组、尼莫地平注射液 (0.4 mg·kg⁻¹) 组、银杏二萜内酯葡胺注射液 (4.8, 2.4, 1.2 g·kg⁻¹) 组, 每组 16 只。所有动物于造模前 2 d、再灌注后尾静脉注射给予相应药物 (假手术组和模型组于相同时限注射等容量生理盐水)。

2.2 模型制备 采用 Longa 等方法^[5], 将长 60 mm, 直径 0.24 mm 的尼龙线一端用硅橡胶涂圆, 自然干燥, 显微镜下观测, 取栓头直径约 0.31 mm 的线栓用于试验, 并在距球端 18.0 mm 处标记, 75% 乙醇消毒后备用。除假手术组外, 其他各组大鼠禁食 12 h 后以 10% 水合氯醛 (350 mg·kg⁻¹) 麻醉, 仰位固定于手术台, 颈部正中切口, 分离出右侧颈总动脉行大脑中动脉阻断, 尼龙线插入深度约为 18 mm, 1.5 h 后, 将线栓栓头拔出至颈内动脉和颈外动脉分叉处, 造成血流再灌注 (再灌 24 h)。假手术组手术方法同模型组, 但不阻断大脑中动脉。

2.3 指标检测

2.3.1 行为学评分^[5] 大鼠于造模后 4, 24 h, 提尾悬空离地面约 35 cm, 观察两前肢状况; 将大鼠置于水平地面, 推动其双肩, 观察两侧抵抗力的差异; 将大鼠置于地面, 观察其行走情况。行为完全正常, 0 分; 提尾悬空时, 大鼠手术对侧前肢表现腕肘屈曲、肩内旋、肘外展、紧贴胸壁, 1 分; 大鼠置于地面, 推手术侧肩向对侧移动时阻力降低, 2 分; 大鼠置于地面, 其围绕手术对侧转圈者, 3 分; 损伤极其严重, 已无法自助活动者, 4 分。分数越高, 说明其神经行为损伤越严重。

2.3.2 TTC 染色法观察大鼠脑梗死率 动物腹主动脉取血后, 立即取脑, 去除嗅球、小脑和低位脑干

后称湿重,置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱 20 min,沿冠状切成 6 片。迅速将脑片置 5 mL、含有 2% TTC 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中避光温孵 30 min,每隔 7~8 min 翻动 1 次。染色后,正常组织呈枚红色,缺血组织呈白色。温孵后拍照,用 Image-Pro Plus 软件对梗死区面积及梗死区和正常区面积进行统计,求出脑梗死率^[6]。

脑梗死率 = 梗死区总面积/全脑总面积 $\times 100\%$

2.3.3 SOD,MDA,CK-BB 检测 实验组大鼠再灌注 24 h 后,腹腔主动脉取血分离血清,按试剂盒说明书操作测定血清中 SOD,MDA,CK-BB。

2.3.4 测定 Caspase-3 的表达 大鼠再灌注 24 h 后,麻醉,断头取脑,将脑组织置于 4% 的多聚甲醛溶液固定,按免疫组化法试剂盒说明测定平均吸

光度。

2.4 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS 17.0 统计软件进行分析,多组间均数比较采用单因素方差分析,两组间样本均数比较采用 q 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 MCAO 大鼠的神经行为学评分及脑血管梗死率的影响 脑缺血 4,24 h 再灌注后,与模型组比较,银杏二萜内酯葡胺注射液高、中剂量组和尼莫地平组能明显降低 MCAO 大鼠的神经行为学评分,显著改善大鼠缺血再灌注后的行为障碍,明显减少梗死百分比,结果表明,银杏二萜内酯葡胺注射液可降低大鼠神经损伤,降低脑梗死率,见表 1。

表 1 银杏二萜内酯葡胺注射液对脑缺血再灌注大鼠神经行为学、脑梗死面积的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	神经功能学评分/分		梗死率/%
		再灌注 4 h	再灌注 24 h	
假手术	-	-	-	-
模型	-	$2.78 \pm 1.17^{2)}$	$2.71 \pm 1.02^{2)}$	$25.46 \pm 7.27^{2)}$
尼莫地平	4×10^{-4}	$1.44 \pm 1.26^{3)}$	$1.39 \pm 1.12^{4)}$	$13.66 \pm 5.55^{4)}$
银杏二萜内酯	4.8	$1.90 \pm 1.08^{3)}$	$1.62 \pm 0.94^{3)}$	$15.98 \pm 4.43^{4)}$
	2.4	$1.97 \pm 0.85^{3)}$	$1.77 \pm 0.82^{3)}$	$16.64 \pm 8.21^{4)}$
	1.2	2.36 ± 1.25	2.13 ± 1.14	19.22 ± 7.65

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.2 对 MCAO 大鼠血清生化指标的影响 与假手术组比较,模型组大鼠血清中 MDA 含量增加($P < 0.05$),SOD 活性减弱($P < 0.05$);与模型组比较,尼莫地平组大鼠的 SOD 活性增强,MDA 含量显著降低,差异显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。银杏二萜内酯葡胺注射液高、中剂量组大鼠的 SOD 活性显著提高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),MDA 的含量明显减少

($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);低剂量组未见明显疗效。

与假手术组比较,模型组血清中 CK-BB 活性明显增加;与模型组比较尼莫地平组、银杏二萜内酯葡胺注射液高、中剂量组血清 CK-BB 活性明显降低($P < 0.01$),差异有显著性;低剂量组未见明显疗效,见表 2。

3.3 对大鼠脑部 Caspase-3 表达的影响 免疫组化

表 2 银杏二萜内酯葡胺注射液对脑缺血再灌注大鼠血清中 SOD,MDA,CK-BB 的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	CK-BB/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
假手术	-	13.41 ± 1.93	6.87 ± 2.75	1.99 ± 1.02
模型	-	$9.87 \pm 3.28^{1)}$	$8.64 \pm 2.18^{1)}$	$24.36 \pm 5.44^{2)}$
尼莫地平	4×10^{-4}	$12.26 \pm 2.44^{3)}$	$6.51 \pm 0.49^{4)}$	$9.85 \pm 3.24^{4)}$
银杏二萜内酯	4.8	$13.52 \pm 1.23^{4)}$	$6.75 \pm 2.26^{4)}$	$12.27 \pm 3.58^{4)}$
	2.4	$12.28 \pm 2.58^{3)}$	$6.16 \pm 1.87^{3)}$	$12.57 \pm 4.42^{4)}$
	1.2	11.81 ± 3.22	$6.77 \pm 1.68^{3)}$	22.14 ± 6.43

结果显示,与假手术组比较,模型组 Caspase-3 表达增多,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,尼莫地平注射液组、银杏二萜内酯葡胺注射液中剂量组 Caspase-3 表达有所减少,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);但高、低剂量组未见明显改变。见表 3,图 1。

4 讨论

肌酸激酶(CK)含有 3 种同工酶,由 B 和 M 型两个亚单位组成的二聚体。脑组织中几乎全部是 CK-BB,在正常情况下,CK-BB 在血液及脑脊液中含量很低且不能通过完整的血脑屏障^[7-9]。当脑缺血引起细胞损伤后,细胞膜通透性增加,这些酶即可释

放到细胞间隙,再扩散进入脑脊液,通过受损的血脑屏障进入血液,它可较好反应脑神经元和胶质细胞损伤程度,可作为颅内神经细胞损害的特异性生活指标和分子标志^[7-9]。血液中 CK-BB 活性的高低,能反应脑损伤的实际范围或程度,损伤越重,CK-BB 释放越多。

进而改变线粒体通透性,释放相应的凋亡因子。Caspases 是细胞凋亡过程中最重要的蛋白酶,凋亡的最后实施是通过 Caspases 的激活而实现的。Caspases 的激活表现为“瀑布式”的级联反应,而 Caspase-3 是 Caspases 级联反应中下行的最关键的凋亡执行蛋白酶,在各种程序启动的凋亡程序中起最后的枢纽作用,它的激活可通过裂解 DNA 依赖性蛋白激酶等,改变其结构,促使细胞凋亡^[10]。本实验表明,银杏二萜内酯葡胺注射液(2.4 g·kg⁻¹)可通过降低 Caspase-3 的表达来抑制脑缺血再灌注后神经细胞的凋亡。

本研究表明银杏二萜内酯葡胺注射液对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有保护作用,作用机制可能与其修复血脑屏障、降低血清 CK-BB 活性、抗自由基损伤及抑制 Caspase-3 表达有关。

[参考文献]

[1] Candelario-Jalil E. Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for the development of novel neurotherapeutics [J]. *Curr Opin Investing Drugs*, 2009,10(7):644.

[2] Christophe M, Nicolas S. Mitochondria: a target for neuroprotective interventions in cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Curr Pharm Des*,2006,12(6):739.

[3] MacIennan K M, Darlington C L, Smith P F. The CNS effects of Ginkgo biloba extracts and Ginkgolide B [J]. *Prog Neurobiol*, 2007, 67 (3):235.

[4] 王璇,张慧灵,顾振纶,等. 银杏内酯药理作用的研究进展[J]. *中草药*,2005,36(11):1741.

[5] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*,1989,20(1):84.

[6] Szydłowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity [J]. *Cell Calcium*,2010,47(2):122.

[7] Wen H, Watry D D, Marcondes M C, et al. Selective decrease of claudin-5 [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(19):8408.

[8] 姜丹,张乐,马军,等. 银杏叶注射液对脑缺血再灌注大鼠脑组织琥珀酸脱氢酶和肌酸激酶同工酶活性的影响[J]. *中国临床保健杂志*,2010,13(4):389.

[9] Johansson P. Markers of cerebral ischemia after cardiac surgery [J]. *Cardiothorac Vase Anesth*, 1996, 10(1):120.

[10] 闫凤霞,高维娟,钱涛,等. 黄芪注射液对缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元 caspase-3 表达的影响[J]. *中国药理学通报*,2010,26(7):901.

[责任编辑 聂淑琴]

表 3 银杏二萜内酯葡胺注射液对脑缺血再灌注大鼠脑中 Caspase-3 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	吸光度
假手术	-	7 896 ± 951 ⁴⁾
模型	-	9 377 ± 485 ²⁾
尼莫地平	4 × 10 ⁻⁴	9 377 ± 485 ²⁾
银杏二萜内酯	4.8	8 669 ± 1 007
	2.4	8 125 ± 776 ³⁾
	1.2	8 819 ± 446

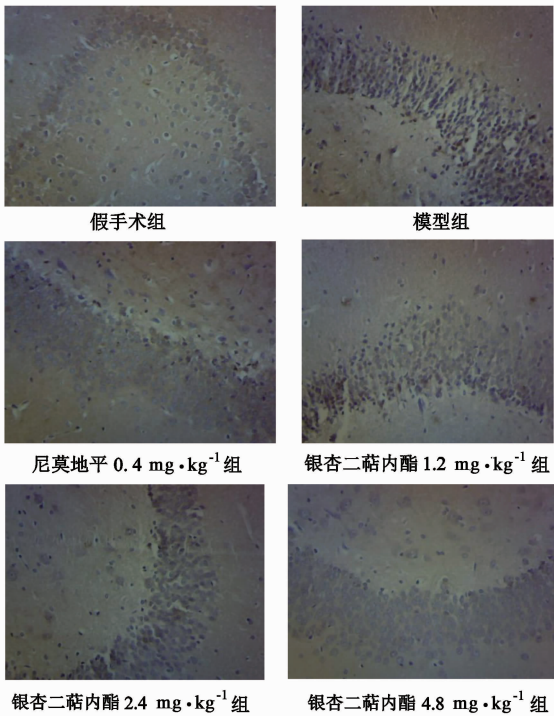


图 1 银杏二萜内酯葡胺注射液对脑缺血再灌注大鼠脑中 Caspase-3 表达的影响(免疫组化染色,×400)

脑梗死发生时,因缺血缺氧,病灶内脑细胞膜通透性增加,CK-BB 被释放到细胞间隙,再由此扩散入脑脊液中,并通过受损的血脑屏障进入血液。本实验研究表明,假手术组动物血清中 CK-BB 活性极低,模型组 CK-BB 活性明显升高,其升高水平与脑组织损伤程度基本一致,而银杏二萜内酯葡胺注射液高、中剂量组 CK-BB 活性较模型组明显降低,表明银杏二萜内酯葡胺注射液可通过修复血脑屏障,降低血清中 CK-BB 活性来减轻脑缺血再灌注损伤。

脑缺血发生后,SOD 活性降低,MDA 含量升高,大量氧化产物降低线粒体膜电位,诱导 Ca²⁺ 内流,