

银杏叶内酯 N 对实验性大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用

张现涛¹, 梁军², 刘红霞², 韩光程³, 马舒伟^{2*}

(1. 广东省中药研究所, 广州 510009; 2. 齐齐哈尔大学化学与化学工程学院制药工程系, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 3. 黑龙江天宏药业有限公司, 哈尔滨 150025)

[摘要] 目的: 探讨银杏叶内酯 N (ginkgolide N, GN) 对实验性大鼠大脑局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用。方法: 采用栓线法阻断大鼠大脑中动脉缺血 2 h 后再灌注 22 h 模型, 探讨银杏内酯 N 对模型大鼠神经缺损症状、脑梗死百分比、脑组织含水率、超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量及大脑皮层神经元细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 水平影响。结果: 与假手术组相比, 缺血再灌注组神经缺损评分、含水率、梗死率、脑组织 MDA 含量增加、SOD 活性降低及 $[Ca^{2+}]_i$ 显著升高($P < 0.01$); 与脑缺血再灌注组相比, GN 高、中、低剂量组, 阳性对照组脑组织 MDA 含量减少、SOD 活性升高、 $[Ca^{2+}]_i$ 显著下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), GN 高、中剂量组, 阳性对照组大鼠神经缺损评分、脑含水率、脑梗死率显著降低($P < 0.01$); GN 各剂量组间结果亦有显著差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论: GN 对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠具有保护作用, 可能与其减少大鼠脑缺血再灌注后脑组织 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度、抗自由基损伤有关。

[关键词] 脑缺血再灌注; 银杏叶内酯 N; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 游离钙

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0141-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20111107.1627.009 **[网络出版时间]** 2011-11-07 16:27

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20111107.1627.009.html>

Protective Effects of Ginkgolide N on Focal Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Rats

ZHANG Xian-tao¹, LIANG Jun², LIU Hong-xia², HAN Guang-cheng³, MA Shu-wei^{2*}

(1. Traditional Chinese Medicine Institute of Guangdong Province, Guangzhou 510009, China;

2. Department of Pharmacy Engineering, Institute of Chemistry and Chemical Engineering,

Qiqihar University, Qiqihar 161006, China; 3. Heilongjiang Tianhong pharmaceutical Industry Limited Company, Harbin 150025, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect and the mechanism of ginkgolide N (GN) model of focal cerebral ischemia reperfusion injury in rat. **Method:** The model of ischemia (2 hours) and reperfusion (22 hours) induced by thread approach was reproduced for evaluating the effect of GN on the neurological symptoms, infarction area percentage, rate of brain water, content of malondialdehyde (MDA), activity of SOD in the brain tissues and the intracellular $[Ca^{2+}]_i$ in the cerebral cortex. **Result:** Compared with I/R group, GN high dosage group, middle dosage group and nimodipine group relieved significantly the neurological symptoms and reduced the cerebral infarction area percentage and content of brain water in rats, meanwhile all GN and nimodipine groups ameliorated the activity of SOD and decreased MDA content and $[Ca^{2+}]_i$ level after ischemia and reperfusion injury. **Conclusion:** GN has the protective effect on rats with cerebral focal ischemia and reperfusion injury, which may be related to that GN can reduce the content of brain water, infarction area percentage, content of MDA and

[收稿日期] 20100324(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81001384); 广东省科技计划(2010B030700020); 广东省中医药管理局重点项目(2010465)

[第一作者] 张现涛, 博士, 副教授, 从事天然产物技术研究和新药研究与开发

[通讯作者] * 马舒伟, 博士, 讲师, 从事治疗心脑血管新药研究与开发, Tel: 0452-2738301, E-mail: mashuwe2004@yahoo.com.cn.

[Ca²⁺]_i level and increase the activity of SOD.

[**Key words**] cerebral ischemia-reperfusion; ginkgolide N; malondialdehyde; superoxide dismutase; [Ca²⁺]_i;

目前研究表明血小板激活因子(PAF)参与缺血性脑损伤^[1-2],认为 PAF 作为一种内源性介质在脑缺血再灌注中进一步加重脑损伤;PAF 受体特异性拮抗剂可防止或逆转脑缺血后遗症所引起的脑损伤,银杏内酯为天然 PAF 受体特异拮抗剂之一,目前研究表明:银杏内酯(ginkgolide)可明显提高脑缺血损伤大鼠神经元中 BDNF 神经营养因子表达水平^[3],抑制缺血脑组织 iNOS 的表达减轻缺血后脑损害的作用^[4]。作者首次分离出新化合物银杏叶内酯 N(GN,结构见图 1),为内酯 B 衍生物,水溶性较好。本实验通过观察银杏叶内酯 N 对大鼠脑缺血再灌注损伤后大脑皮层神经元细胞内钙离子浓度([Ca²⁺]_i)及脑梗死百分比、脑组织含水量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量的影响,以探讨其对脑缺血再灌注损伤的保护作用。

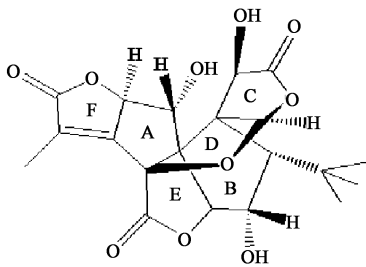


图 1 银杏叶内酯 N 的化学结构

1 材料

1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠 180 只,体重(220 ± 30) g,由中国药科大学实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(苏) 200220011。

1.2 药品及仪器 银杏叶内酯 N(高效液相色谱法测定,纯度大于 95%,广东中药所提供,使用前用少量乙醇溶解,再用双蒸水定溶);尼莫地平注射液(nimodipine) 山东潍坊制药有限公司,批号 0904025。SOD,MDA 试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品;DMEM 培养基 Fura-2/AM 和 TritonX-100 均为 Sigma 公司产品;其余试剂为市售分析纯。MPF-4 荧光分光光度计,日本日立公司产品;318c 多功能酶标仪,上海沛欧分析仪器有限公司。

2 方法

2.1 分组及给药 大鼠随机分成 6 组,每组 30 只:假手术组,缺血再灌注(I/R)组,尼莫地平组(8 mg·

kg⁻¹),GN 高、中、低剂量组(8,4,2 mg·kg⁻¹)。尾静脉给药,每日 1 次,连续 3 d。I/R 组和假手术组注射等体积生理盐水。

2.2 造模方法 于末次给药后 1 h,参考 Longa^[5]的方法,采用颈内动脉线栓法制备大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型:大鼠用 3% 水合三氯乙醛(300 mg·kg⁻¹)ip 麻醉,仰卧手术台上,颈部正中切口,暴露右侧颈总动脉,向外牵引二腹肌及胸锁乳突肌,由颈总动脉分叉处向头端依次游离,结扎并剪断颈外动脉的分支:枕骨下动脉和甲状腺上动脉。在颈外动脉远端结扎,切断颈外动脉使其主干游离备用。然后分离颈内动脉,用丝线在颈外动脉根部打一松扣,夹闭颈总动脉和颈内动脉。将鱼线(长 40 mm,直径 0.26 mm)经颈外动脉主干切口,缓慢向颈内动脉入颅方向推进,当鱼线进入颈内动脉后松开颈内动脉上的动脉夹。以颈总动脉分叉处为标记,推进 18 mm 左右时感到阻力,即达到了较细的大脑前动脉内,阻断了 MCA 的所有血供来源,扎紧颈外动脉根部松扣。2 h 后,拔出鱼线,扎紧动脉残端。缝合皮肤,完成 MCAO 导致局灶性脑缺血-再灌模型。假手术组大鼠麻醉后,仅暴露颈内外动脉分叉,不闭塞 MCA。

2.3 神经症状评分 神经行为学检查评分参照文献[5]的 5 分制评分标准,于造模 24 h 后进行评分。对动物的行为缺陷进行分级评分,0 分:未观察到神经症状;1 分:提尾悬空时,动物的手术侧前肢表现为腕肘屈曲,肩内旋,肘外展,紧贴胸壁;2 分:将动物置于光滑平面上,推手术侧肩向对侧移动时,阻力降低;3 分:动物自由行走时向手术侧循环转或转圈;4 分:软瘫,肢体无自发活动。

2.4 脑组织含水量及梗死率测定 每组另取 10 只大鼠,于脑缺血 2 h 再灌注 22 h 后,断头处死大鼠,取出全脑,称重。在视交叉及其前后各 2 mm 处,做冠状切四刀,切成 5 片后迅速将脑片置 5 mL 含有 1% TTC 的磷酸缓冲溶液中,避光温孵 30 min,在温孵过程中每隔 7~8 min 翻动 1 次,温孵 30 min 后取出脑片,用数码相机拍照,之后用眼科镊分离苍白区(梗死区)和非苍白区(正常区),计算梗死率。

梗死率 = 苍白区质量 / (苍白区质量 + 非苍白区质量) × 100%

将染色后的脑组织置于 110 °C 烘箱烘干,对照大脑湿质量求出脑含水量。

$$\text{脑组织含水量} = (1 - \text{脑组织干质量} / \text{脑组织湿质量}) \times 100\%$$

2.5 脑组织 SOD 活性和 MDA 含量的测定 每组另取 10 只大鼠,于脑缺血 2 h 再灌注 22 h 后,快速断头取脑。将缺血脑组织匀浆后按试剂盒说明书分别测定脑组织 SOD 活性、MDA 含量。脑组织 SOD 活力检测系采用黄嘌呤氧化法,脑组织 MDA 含量测定用硫代巴比妥酸显色法,组织蛋白含量测定用考马斯亮蓝法,按试剂盒操作程序进行测定。

2.6 大脑皮层神经细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的测定^[6] 每组取剩余 10 只大鼠,于脑缺血 2 h 再灌注 22 h 后,快速断头取脑。将大脑置于冰冷 D-Hanks 液中,取出大脑皮层,用 D-Hanks 液冲洗干净,剪碎后加入 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶,于 37 °C 水浴中 30 min,以含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基终止消化,过滤,滤液离心,再以 D-Hanks 液洗 2 遍,沉淀以含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基悬浮计数后制成细胞密度为 $1 \times 10^9 / \text{L}$ 的细胞悬液,台盼蓝排斥试验查细胞成活率达 95% 以上^[7]。将悬液于 37 °C 预热 5 min,加入 Fura-2/AM (终浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),震荡 45 min,再以含 0.2% 牛血清白蛋白的 D-Hanks 液洗 2 遍,然后再调整细胞密度为 $1 \times 10^9 / \text{L}$ 。用荧光分光光度计测定并根据以下公式计算 $[Ca^{2+}]_i$ 。

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)$$

其中 K_d 为 Fura-2 与 Ca^{2+} 反应的解离常数,为 $224 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; F 为不同实验条件下的荧光强度,由加入终浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 后测得; F_{\max} 为最大荧光值,由加入 Triton X-100 后测得, F_{\min} 为最小荧光值,由加入 3 倍于 Ca^{2+} 的 EGTA 后测得。

2.7 统计方法 数值采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 SPSS 13.1 软件作单因素方差分析和独立样本 t 检验统计分析。 $P < 0.05$ 有统计意义。

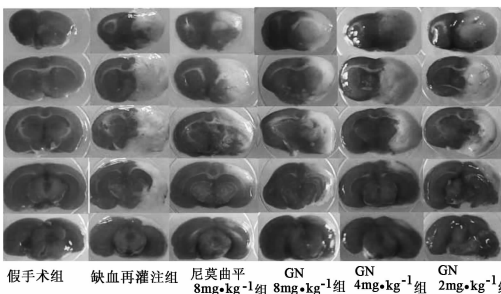
3 结果

3.1 对大鼠神经功能缺损、脑组织含水率及梗死率的影响 假手术组大鼠麻醉清醒后未见明显神经功能缺损症状,模型组大鼠在缺血后 2 h 再灌注 22 h 均出现明显的神经行为缺陷症状,而尼莫地平组、GN 高剂量组和中剂量组可明显改善大鼠神经症状 ($P < 0.01$),GN 低剂量组与模型组比较无统计学意义;与假手术组相比,缺血再灌注组脑组织含水率及梗死百分比显著升高;与缺血再灌注组相比,尼莫地平组、GN 高剂量组及中剂量组脑组织含水率及梗死面积显著降低 ($P < 0.01$),GN 低剂量组脑组织含水率及梗死百分比也降低但无显著意义;GN 各组间神经功能缺损、脑组织含水率及梗死百分比降低亦有显著差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果表 1 和图 2。

表 1 GN 对大鼠神经功能缺损,脑组织含水率及梗死率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	神经功能缺损/分	脑组织含水率/%	梗死率/%
假手术	-	-	74.8 ± 3.3	-
缺血再灌	-	$3.12 \pm 0.34^{1)}$	$86.7 \pm 4.8^{1)}$	$13.2 \pm 3.3^{1)}$
尼莫地平	8	$1.87 \pm 0.35^{3)}$	$78.6 \pm 1.6^{3)}$	$7.2 \pm 1.8^{3)}$
GN	8	$1.87 \pm 0.34^{3)}$	$75.3 \pm 2.9^{3)}$	$4.7 \pm 1.4^{3)}$
	4	$2.23 \pm 0.54^{3)}$	$78.7 \pm 2.7^{3)}$	$5.4 \pm 1.1^{3)}$
	2	$2.76 \pm 0.65^{2)}$	$81.6 \pm 0.6^{2)}$	$12.5 \pm 1.9^{2)}$

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与缺血再灌注组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。



白色表示梗死区,鲜红色表示正常区

图 2 脑切片 TTC 染色图片

3.2 对大鼠脑缺血再灌注后脑组织中 MDA 含量及 SOD 活性及大脑皮层神经细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

与假手术组相比,缺血再灌注组 MDA 含量增加, SOD 活性降低;与缺血再灌注组相比,GN 各组及尼莫地平组 MDA 含量减少, SOD 活性升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且 GN 各组随着剂量增加,MDA 含量减少, SOD 活性升高亦有显著差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与假手术组比较,缺血再灌注组皮层神经元 $[Ca^{2+}]_i$ 显著升高;与缺血再灌注组比较,GN 各剂量组及尼莫地平组皮层神经元 $[Ca^{2+}]_i$ 明显下降 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),且 GN 各剂量组间 $[Ca^{2+}]_i$ 含量下降也有显著意义 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),见表 2。

表 2 GN 对大鼠急性脑缺血再灌注损伤后脑组织中丙二醛,超氧化物歧化酶及 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	丙二醛 /μmol·g ⁻¹	超氧化物歧化酶 /kU·g ⁻¹	$[Ca^{2+}]_i$ /nmol·L ⁻¹
假手术	-	51.3 ± 4.4	156.5 ± 8.1	193.7 ± 25.6
模型	-	137.6 ± 7.8 ¹⁾	64.5 ± 7.3 ¹⁾	572.1 ± 26.7 ¹⁾
尼莫地平	8	70.5 ± 6.6 ³⁾	103.8 ± 10.2 ³⁾	397.1 ± 20.8 ³⁾
GN	8	80.6 ± 5.7 ³⁾	101.5 ± 11.8 ³⁾	461.3 ± 37.5 ³⁾
	4	98.7 ± 6.2 ³⁾	82.1 ± 8.5 ³⁾	481.8 ± 45.0 ³⁾
	2	128.6 ± 11.9 ²⁾	72.1 ± 6.7 ²⁾	550.1 ± 30.4 ²⁾

4 讨论

自由基的大量产生是造成脑缺血再灌注损伤的重要机制之一^[7]。在缺血再灌注损伤时,脑细胞正常代谢途径和自由基产生、清除状态受到破坏,启动自由基连锁反应,导致氧自由基大量产生并造成损伤。自由基可迅速攻击生物膜的脂类、糖、蛋白质和细胞内的核酸,受损的脂质和糖主要是发生过氧化反应,蛋白质则发生变性,酶失活,DNA 多核苷酸主链断裂,碱基发生修饰,从而导致神经细胞死亡。MDA 作为氧自由基与生物膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的代谢产物,其含量的变化间接地反映了组织中氧自由基含量的变化,因此,通过测定 MDA 含量可以评价脑组织中氧自由基水平和脂质过氧化反应的强弱^[8]。SOD 作为一种自由基清除剂,是一种带负电荷的蛋白质,它通过歧化的方式清除超氧阴离子自由基,在缺血缺氧性脑损伤的病情进展中起着关键作用^[9]。在缺血及再灌注时,血脑屏障开放,SOD 进入到脑组织,发挥清除自由基的作用^[10],从而减轻神经元损伤。

近年来有研究表明,脑缺血发生时,细胞膜去极化引起胞质内钙增高, Ca^{2+} 达到一定浓度后,可启动一系列病理生理机制损伤神经细胞,严重影响神经细胞的结构和功能,并可导致细胞凋亡,甚至坏死。因此细胞内钙超载在缺血后神经元凋亡发生中起着关键作用,抑制钙离子浓度可阻止或减弱细胞凋亡的发生^[11-12]。

本实验结果显示 GN 能显著降低脑缺血再灌注后皮层神经元 $[Ca^{2+}]_i$ 水平、脑梗死百分比、脑组织含水率和脑组织中 MDA 含量,升高 SOD 活性,表明作为天然 PAF 拮抗剂的银杏叶内酯 N 能够抑制大脑皮层中钙离子浓度和减少自由基损伤作用。提示 GN 具有脑缺血损伤的保护作用,其机制还需进一步研究。

[参考文献]

[1] Lee W S, rhim B Y, Hong K W. A study on cerebral ischemia- reperfusion injury. Involvement of platelet-

activating factor [J]. Korean Pharmacol, 2008, 34 (1): 1.

[2] Jie Shuai, Ye Jian-ning, Gao Guang-Zheng. Effect of platelet activating factor receptor antagonist on cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Chin J Clin Reha, 2004, 8(4): 740.

[3] 刘昌云, 车春晖, 黄华品. 银杏内酯对大鼠局灶脑缺血再灌注后皮质源性神经营养因子(BDNF)表达的影响[J]. 海峡药学, 2005, 17(6): 51.

[4] 任俊, 贾正平, 张汝学, 等. 银杏内酯对大脑中动脉阻塞大鼠脑内 iNOS 表达的影响[J]. 中成药, 2004, 26(12): 1037.

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

[6] L I M, Wang J F, Han J S. Measurement of intracellular free Ca^{2+} concentration in dissociated rat brain cells using Fura-2/AM [J]. Acta Pharm Sin, 1991, 26 (12): 890.

[7] 朗志峰, 高维娟, 袁国红, 等. 大鼠脑缺血再灌注海马组织 SOD 活性和 MDA 含量的动态变化[J]. 承德医学院学报, 2001, 18(3): 191.

[8] Shibuta S, Varathan S, Mmshimo T. The neurop roective effect of ONO2 1714 on NMDA2 mediated cytotoxicity *in vitro*[J]. J Neurol Sci, 2003, 215 (1/2): 31.

[9] Lewen A, Matz P, Chan P H. Free radical pathways in CNS injury[J]. J Neurotrauma, 2000, 17 (10): 871.

[10] 夏绪刚, 黄兆民, 欧阳珊, 等. 氯喹、SOD 防治脑缺血再灌注损伤的实验研究 [J]. 中风与神经疾病杂志, 1997, 14 (2): 84.

[11] Sun L, Ai J, Wang N, et al. Cerebral ischemia elicits aberration in myocardium contractile function and intracellular calcium handling [J]. Cell Physiol Biochem, 2010, 26(3): 421.

[12] Bull R, Finkelstein J P, Gálvez J, et al. Ischemia enhances activation by Ca^{2+} and redox modification of ryanodine receptor channels from rat brain cortex[J]. J Neurosci, 2008, 28(38): 9463.

[责任编辑 聂淑琴]