

生姜水提物对全脑缺血再灌注大鼠脑组织氨基酸递质的影响

王军^{1*}, 黄启福², 刘惠霞¹, 张薇¹

(1. 河南省中医药研究院, 郑州 450004; 2. 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029)

[摘要] 目的: 研究生姜水提物对全脑缺血再灌注大鼠脑组织氨基酸递质的影响。方法: SD 雄性大鼠随机分为假手术组、模型对照组、尼莫地平组(30 mg·kg⁻¹)、生姜高、中、低剂量组(200, 100, 50 mg·kg⁻¹)。Pulsinelli's 四动脉阻断法造成全脑缺血再灌注损伤模型(CIR), 分别于手术前 1 d, 术前 1 h 和再灌注前 30 min ig 给药, 共 3 次。高效液相色谱法测定脑组织谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)和甘氨酸(Gly)含量, 原子吸收分光光度计测定脑组织 Ca²⁺ 含量, 干湿重法测定脑组织含水量, 化学比色法测定脑组织超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量。结果: 与假手术组比较, CIR 模型组大鼠脑组织 Glu, Ca²⁺, MDA 含量和含水量明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), SOD 活性明显降低($P < 0.05$); 生姜水提物能显著降低脑组织 Glu, Ca²⁺ 含量和含水量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 显著升高 SOD 活性和 SOD/MDA 比值($P < 0.05$)。结论: 生姜水提物防治脑缺血再灌注损伤的机制与降低兴奋性氨基酸(EAA)兴奋性毒性、阻滞 Ca²⁺ 超载和提高抗氧化活性有关。

[关键词] 生姜水提物; 脑缺血再灌注; 兴奋性氨基酸

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0184-04

Effect of Aqueous Extract from Zingiberis Rhizoma Recens on Excitatory Amino Acid in Brain Tissue of Cerebral Ischemia Reperfusion in Rats *in vivo*

WANG Jun^{1*}, HUANG Qi-fu², LIU Hui-xia¹, ZHANG Wei¹

(1. Laboratory of Pharmacology, Henan Academy of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450004, China;
2. School of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of aqueous extract from Zingiberis Rhizoma Recens on excitatory amino acid(EAA) in brain tissue after cerebral ischemia reperfusion(CIR) in rats. **Method:** Male SD rats were randomly assigned to 6 groups as following: sham-operation group, model control group, nimodipine group and high, middle and low dosage groups of aqueous extract from Zingiberis Rhizoma Recens. CIR model in rats was reproduced by Pulsinelli's "Four Vessel Occlusion" method. The contents of glutamate(Glu), aspartate(Asp), and glycine(Gly) in brain tissue were analyzed by high performance liquid chromatography with fluorescent detection. Atomic spectrophotometry was used to measure Ca²⁺ content in brain tissue. The changes of brain water content were measured by the wet and dry weight methods. Spectrophotometric assay was used to measure the activity of superoxide dismutase(SOD) and the contents of malondialdehyde(MDA) in brain tissue. **Result:** The contents of Glu, Ca²⁺, water, and MDA in brain tissue were increased, the activity of SOD was declined significantly in CIR model group, compared with the sham operation group. Aqueous extract from Zingiberis Rhizoma Recens could decrease the contents of Glu, Ca²⁺ and water in brain tissue, increase the activities of SOD, but there was no significant difference in the content of Gly, compared with model control group. **Conclusion:** The action of aqueous extract from Zingiberis Rhizoma Recens on CIR may be involve in declining EAA neurotoxicity, decreasing intracellular Ca²⁺ overload and increasing antioxidant activity.

[Key words] Zingiberis Rhizoma Recens; cerebral ischemia reperfusion; excitatory amino acid

[收稿日期] 20110324(007)

[基金项目] 河南省属科研单位社会公益项目预研专项资金(0641130503)

[通讯作者] * 王军, 博士, 研究员, 研究方向: 心脑血管中药药理研究, Tel: 0371-66336964, E-mail: wj617222000@yahoo.com.cn

生姜是姜科植物姜 *Zingiber officinales* Rosc 的新鲜根茎,是临床广泛应用的传统中药,对心脑血管系统、消化系统、免疫系统及神经系统等有广泛的药理活性^[1]。研究表明:生姜水提物能显著升高全脑缺血再灌注小鼠脑组织 Na^+ , K^+ -ATP 酶, Ca^{2+} -ATP 酶和 SOD 活性,显著降低 MDA 含量^[2];降低全脑缺血再灌注大鼠血液纤维蛋白原含量,显著延长凝血酶时间,改善血液凝血功能^[3],抑制神经细胞凋亡及调节相关蛋白表达^[4]。本实验采用大鼠四动脉阻断全脑缺血再灌注损伤模型,进一步观察生姜水提物对模型大鼠脑组织兴奋性氨基酸递质的影响。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只,体重 250 ~ 300 g,由中国医学科学院动物研究所维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证编号 SCXK(京)2002-2003。

1.2 药品与试剂 生姜水提物干粉(河南省中医药研究院中药分析实验室提供),每克干粉含生药量 65 g,批号 060912);尼莫地平片(山东新华制药股份有限公司,批号 0512079);谷氨酸(Glu),天冬氨酸(Asp)和甘氨酸(Gly)对照品(纯度 99.99%,Sigma 公司产品)。超氧化物歧化酶(SOD,批号 20061013)、丙二醛(MDA,批号 20061013)和考马斯亮蓝(批号 20061010)试剂盒(南京建成生物工程研究所提供)。

1.3 仪器 LC-10AVP 高效液相色谱仪(日本津岛);ODSC18 色谱柱(美国 WATERS 公司);RF-530 荧光检测器(日本津岛);AA-800 原子吸收分光光度计(美国 Perkin Elmer 公司);UV-265 紫外分光光度计(日本岛津)。

2 方法

2.1 大鼠全脑缺血再灌注模型的制备^[5] 将大鼠用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉($0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),颈腹部正中纵行切口,分离双侧颈总动脉,置线备用。在枕骨后第一、二颈椎处切口,手术显微镜下分离暴露第一颈椎的横突翼并找到左、右横突孔,用一直径为 0.5 mm 的电凝针插入横突孔电凝两侧椎动脉。24 h 后,动物清醒,拆除颈部缝合线,用带硅胶管的动脉夹夹闭两侧颈总动脉,10 min 后打开动脉夹形成再灌注。再灌注 3 h 后,取血、取脑进行生化测定。假手术组仅分离颈总动脉,不做结扎和电凝。

2.2 分组与给药 实验将动物随机分为假手术对

照组、模型对照组、尼莫地平组、生姜高剂量组、中剂量组和低剂量组,每组 10 只,分别于手术前 1 d,术前 1 h,再灌注前 30 min ig 给药,共 3 次。

2.3 观察指标与方法

2.3.1 脑组织氨基酸递质含量

样品处理 取左侧大脑半球,在冰台上迅速分离前脑皮质,以冰生理盐水冲洗后除去残血,吸干后立即精确称重,按质量比 1:9 加入 5% 三氯乙酸,高速匀浆机在冰浴下制成 10% 脑匀浆液,4 °C 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液 -30 °C 保存待测。测试前标本复溶,4 °C 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液测定。

衍生化试剂的配制 75 mg 邻苯二甲醛(OPA)、120 μL β -巯基乙醇(β -MCE)溶于 1.5 mL 甲醇中,加入硼酸缓冲液(pH 10)15 mL,摇匀,避光保存。

对照品溶液的配制 取 Glu, Asp, Gly 对照品精密称量,置于 100 mL 量瓶中,加双蒸水溶解制成浓度分别为 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。

衍生化反应 取上述对照品溶液 20 μL 或样品 100 μL ,加入 2 倍量的衍生化试剂,用震荡仪震荡 1.5 min,移入 10 mL 的量瓶中,加双蒸水稀释到刻度,摇匀,用 0.45 μm 的滤膜滤过。

色谱条件 流动相:乙腈-四氢呋喃-醋酸盐缓冲液(34.2:0.8:65) pH 3.7。流速 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; EX = 330 nm, Em = 456 nm;进样量 5 μL 。

2.3.2 脑组织 SOD 活性和 MDA 含量测定 取左侧大脑半球后半部,冰盘中取脑皮层组织称重。在冰浴上按 1:9 加入 4 °C 匀浆介质(生理盐水),高速细胞粉碎机匀浆(14 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 30 s), 3 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。取上清液以考马斯亮蓝法测定蛋白含量,分装于 -70 °C 冰箱保存备用。按试剂盒操作说明于紫外分光光度计 550 nm 波长处测定 SOD 活性,532 nm 波长处测定 MDA 含量。

2.3.3 脑组织含水量和 Ca^{2+} 含量测定 取右侧大脑半球,称湿重后置于 80 °C 烤箱中烤至恒重,称干重,计算脑组织含水量。将烤干脑组织碾碎,精确称重,加入高氯酸(优级纯)6 mL 和硝酸(优级纯)1 mL,12 min 后,加热消化,蒸干呈盐状,去离子水定容,火焰原子吸收法进行脑组织 Ca^{2+} 含量测定。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 15.0 统计软件。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,选用 Student Newman-Keuls(S-N-K)检验进行组间比较, $P < 0.05$

有统计学意义。

3 结果

3.1 生姜水提取物对脑组织氨基酸递质含量的影响

脑缺血再灌注 180 min 后,模型组大鼠脑组织 Glu 含量与假手术组比较明显升高,Asp 和 Gly 含量分别有升高和降低的趋势,但无统计学差异。与模型组比较,生姜高剂量能显著降低脑组织 Glu 和 Glu + Asp 含量,对 Asp, Gly 含量未见明显影响;生姜大、中剂量可明显降低 Glu + Asp 含量,对 Glu, Asp 含量有降低的趋势,但无统计学差异;生姜低剂量对 Glu, Asp 和 Glu + Asp 含量均有降低的趋势,但无统

计学差异。见表 1。

3.2 生姜水提取物对 CIR 大鼠脑组织 SOD 活性与 MDA 含量的影响

与假手术组比较, CIR 模型组大鼠脑组织 SOD 活性明显降低,MDA 含量明显升高;生姜水提取物高剂量和尼莫地平能显著升高脑组织 SOD 活性和 SOD/MDA 比值,与模型组比较有显著性差异;对 MDA 含量有降低的趋势,但无统计学意义;生姜水提取物中、低剂量与模型组比较,对 SOD 和 MDA 分别有升高和降低的趋势,但无统计学意义。见表 2。

表 1 生姜水提取物对 CIR 大鼠脑组织 Glu, Asp, Gly 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Glu/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	Asp/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	Gly/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	Glu + Asp/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$
假手术	-	13.56 ± 1.82 ¹⁾	10.20 ± 3.56	12.32 ± 2.98	23.71 ± 4049 ¹⁾
模型	-	17.05 ± 3.78	9.69 ± 1.71	11.18 ± 1.96	28.33 ± 2.44
尼莫地平	30	16.01 ± 3.31	7.95 ± 4.57	12.22 ± 3.49	23.96 ± 6.16
生姜水提取物	200	12.91 ± 4.32 ¹⁾	9.23 ± 3.80	10.95 ± 2.72	22.14 ± 6.34 ¹⁾
	100	13.87 ± 5.35	8.83 ± 3.19	12.13 ± 3.76	22.70 ± 6.23 ¹⁾
	50	15.05 ± 5.29	8.95 ± 4.55	11.40 ± 3.08	24.00 ± 9.13

注:与模型组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01(表 2~3 同)。

表 2 生姜水提取物对 CIR 大鼠脑组织 SOD, MDA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	MDA/nmol·mg ⁻¹	SOD/MDA
假手术	-	92.47 ± 20.48 ¹⁾	17.88 ± 2.87 ¹⁾	5.38 ± 1.76 ¹⁾
模型	-	73.70 ± 13.98	24.23 ± 7.18	3.34 ± 1.23
尼莫地平	30	99.67 ± 31.33 ¹⁾	21.93 ± 6.18	4.67 ± 1.33 ¹⁾
生姜水提取物	200	98.60 ± 29.32 ¹⁾	21.54 ± 4.29	4.58 ± 1.05 ¹⁾
	100	81.33 ± 17.16	23.10 ± 2.18	3.53 ± 0.74
	50	75.78 ± 25.44	19.00 ± 2.99	4.08 ± 1.52

3.3 生姜水提取物对 CIR 大鼠脑含水量和 Ca²⁺ 含量的影响

与假手术组比较, CIR 模型组大鼠脑组织含水量和 Ca²⁺ 含量明显增加;生姜水提取物中剂量能显著降低 CIR 大鼠脑组织含水量和 Ca²⁺ 含量,与模型组比较有显著性差异;生姜水提取物高、低剂量对含水量有降低的趋势,但无统计学意义。见表 3。

表 3 生姜水提取物对 CIR 大鼠脑含水量和 Ca²⁺ 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	含水量	Ca ²⁺
	/mg·kg ⁻¹	/%	/μg·g ⁻¹
假手术	-	78.03 ± 0.23 ²⁾	176.62 ± 44.59
模型	-	78.37 ± 0.30	196.50 ± 49.05
尼莫地平	30	78.47 ± 0.83	162.62 ± 49.07
生姜水提取物	200	78.35 ± 0.43	180.06 ± 29.02
	100	77.94 ± 0.47 ¹⁾	136.83 ± 38.21 ²⁾
	50	78.33 ± 0.71	196.84 ± 41.11

4 讨论

生姜作为药物首载于《名医别录》,而实出于

《神农本草经》,仅由于当时未将生姜与干姜区别用药。根据张仲景等名医的用药经验,《名医别录》将生姜与干姜分条立名,其生姜“主伤寒头痛鼻塞,咳逆上气”。《本草经集注》增补其“归五脏,驱风邪寒热……止呕吐,去痰下气,除风湿寒热”。该时期的本草主要记述其发散风寒、和中止吐、化痰止咳等主治功能。此后的本草则主要增加其在解毒和急救方面的应用,如《本草拾遗》谓“(生姜)汁,解药毒”;《医学启源》谓“制厚朴、半夏毒”;《日用本草》谓“解菌蕈诸物毒”;《丹溪心法附余》谓“凡中风、中暑、中气、中毒、干霍乱,一切卒暴之病,用姜汁与童便服,立刻解散”;《本草纲目》谓“解食野禽中毒”;《本草从新》谓“救暴卒”^[6]。

缺血性脑损伤是由于缺血后能量耗竭引起级联反应的结果,其激发点是神经元去极化和细胞外 EAA 含量增加(兴奋性毒性);细胞内 Ca²⁺ 超载、Ca²⁺ 依赖性酶的激活和自由基形成等是兴奋性毒性

对神经元损伤的重要因素;花生四烯酸代谢产生多种血管活性物质引起的血管收缩和血栓形成,多种细胞毒性细胞因子释放引起的炎症反应,进一步加重脑缺血和细胞损伤^[7]。

脑缺血缺氧导致能量代谢耗竭,Na⁺,K⁺-ATP酶功能障碍,神经元去极化而触发动作电位,神经末梢释放EAA增加;ATP的减少使突触前膜依赖能量重摄取EAA的功能减弱,使大量的EAA集聚于突触间隙。EAA作用于突触后膜受体,引起配体门控性离子通道开放,Na⁺,Cl⁻和H₂O先后顺浓度差、电位差和渗透压内流,在引起去极化而诱发动作电位同时,导致突触后神经元急性肿胀,形成“早期细胞损伤”。质膜的去极化使电压门控性Ca²⁺通道开放,EAA作用于突触后膜的离子型受体开放配体门控性Ca²⁺通道和胞内升高的Na⁺浓度使Na⁺-Ca²⁺交换增加,Ca²⁺大量内流造成Ca²⁺超载;EAA作用于突触后膜的代谢型受体,通过G蛋白偶联第二信使,激活磷脂酶C,分解磷脂肌醇,产生三磷酸肌醇(IP₃),作用于内质网膜上特异性IP₃受体(IP₃R),使内质网释放Ca²⁺;此外由于ATP依赖性Ca²⁺泵功能减弱,Ca²⁺排除减少,进一步加重Ca²⁺超载。

Ghayur's等发现^[8-9],生姜水提取物能引起麻醉大鼠血压下降,并具有明显的剂量依赖性,其作用可被阿托品部分阻断;在大鼠内皮细胞完整的主动脉离体实验中,生姜水提取物能明显抑制肾上腺素诱导的血管收缩,其作用可被阿托品部分阻断;抑制K⁺诱导的血管收缩,并使Ca²⁺量反应曲线右移,具有维拉帕米样Ca²⁺拮抗效应;6-,8-,10-姜酚亦具有明显的阿托品耐受和L-NAME(一种NOS抑制剂)敏感的舒血管效应。在豚鼠心脏离体实验中,生姜水提取物能明显抑制心房收缩幅度和频率;如预先用阿托品阻断影响心房的抑制性因素,暴露其兴奋性因素,即对心得安和维拉帕米耐受而对ryanodine(一种细胞内储存Ca²⁺释放拮抗剂)敏感,生姜水提取物能完全抑制心房组织,该效应不受格列本脲、吡拉明(组胺受体阻断剂)、氨茶碱和L-NAME的影响。以上研究提示:激活M胆碱受体和阻断Ca²⁺通道可能是生姜水提取物的降压机制。在对大鼠、小鼠、豚鼠和兔肠道平滑肌在体和离体实验的研究中,进一步证实生姜水提取物Ca²⁺拮抗效应^[10-11]。生姜水提取物对脑血管平滑肌细胞膜Ca²⁺通道、神经细胞膜Ca²⁺通道和脑组织EAA的研究尚未见报道。

本实验结果显示,四动脉阻断造成大鼠全脑缺血再灌注损伤模型,动物出现明显的脑水肿,同时伴有脑组织EAA、Ca²⁺和MDA含量显著升高,SOD活性明显降低。与其他相关的报道基本一致^[12-13]。生姜水提取物能明显减轻脑水肿,显著降低脑组织EAA和Ca²⁺含量,显著升高SOD活性和SOD/MDA比值,而对抑制性氨基酸递质无明显影响。说明生姜水提取物可通过降低EAA神经毒性、减轻Ca²⁺超载及调节氧化应激等多种途径实现对脑缺血再灌注损伤的保护作用。

[参考文献]

- [1] 王本祥. 现代中药药理与临床[M]. 天津:天津科技翻译出版公司,2004:473.
- [2] 王军,张薇,王玉升,等. 生姜水提取物对脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中医药临床杂志,2007,19(1):23.
- [3] 张关亭,王军,张磊,等. 生姜水提取物对全脑缺血再灌注大鼠凝血功能的影响[J]. 中医研究,2007,20(4):9.
- [4] 贾士奇,王军,张红霞,等. 生姜对局灶性脑缺血大鼠海马神经细胞凋亡及相关蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):163.
- [5] 徐叔云,卞如谦,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:1065.
- [6] 王颖,李东伟. 生姜的研究进展[J]. 中国药业,2006,15(9):62.
- [7] 邵福源,王宇卉. 分子神经药理学[M]. 北京:上海科学技术出版社,2005:337.
- [8] Ghayur M N, Gilani A H, Afridi M B, et al. Cardiovascular effects of ginger aqueous extract and its phenolic constituents are mediated through multiple pathways[J]. Vascul Pharmacol, 2005,43(4):234.
- [9] Ghayur M N, Gilani A H. Ginger lowers blood pressure through blockade of voltage-dependent calcium channels[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2005,45(1):74.
- [10] Ghayur M N, Gilani A H. Pharmacological basis for the medicinal use of ginger in gastrointestinal disorders[J]. Dig Dis Sci 2005,50(10):1889.
- [11] Ghayur M N, Gilani A H. Species differences in the prokinetic effects of ginger[J]. Int J Food Sci Nutr, 2006,57(1):65.
- [12] 冯泉,黄帆,马中富,等. 脑缺血后脑组织NO、EAA和MDA含量的变化[J]. 热带医学杂志,2004,4(2):172.
- [13] 崔景斌,王俊萍,鄢文海,等. 大鼠脑缺血再灌注损伤后兴奋性氨基酸、NOS和NO的含量变化[J]. 郑州大学学报:医学版,2002,37(2):169.

[责任编辑 聂淑琴]