

银杏内酯对大鼠局灶性脑缺血的保护作用

吴雪丰, 王秋娟*, 楼凤昌¹

(中国药科大学生理学教研室; 植物化学教研室, 南京 210009)

摘要 目的 研究银杏内酯对大鼠局灶性脑缺血的作用。方法 选用中动脉阻塞-再灌模型观测对比脑缺血大鼠给药组和模型组的各项指标。结果 银杏内酯口服能使脑缺血大鼠的神经行为明显改善, 脑梗塞面积和脑含水量显著降低; 高、中、低三个剂量组与缺血模型组相比均有显著性差异。该药还能降低缺血后脑组织匀浆中的MDA、LD含量, 提高SOD和GSH活性。脑组织病理切片也证实了该药对神经细胞的保护作用。结论 银杏内酯对大鼠局灶性脑缺血有保护作用。

关键词 银杏内酯; 中动脉阻塞-再灌模型; 大鼠; 局灶性脑缺血; 保护

中图分类号: R965.1; R972 文献标识码: A 文章编号: 1000-5048(2001)02-0141-17

银杏内酯(Ginkgolides, Gin)是由银杏植物中提取的天然产物。它是一类强特异性的血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)拮抗剂, 可用于血淤气滞引起的缺血性脑血管疾病, 治疗中风病患者。PAF及其受体大量存在于脑组织中, 脑缺血时局部PAF浓度增高^[1], 它激活血小板, 多形核白细胞(PMN)及内皮细胞, 引起内皮细胞结构破坏, 血小板、PMN聚集、粘附, 释放5-羟色胺、自由基、白三烯类、前列腺素类等血管活性介质及细胞因子。最终导致细胞内钙离子增加, 膜结构破坏, 脑组织微循环及代谢障碍, 使得细胞产生不可逆性损害, 乃至死亡^[2]。银杏内酯对抗脑缺血的作用已有报道, 在数种动物模型上得到了验证。研究表明, 银杏内酯B能显著降低小鼠电惊厥休克和脑缺血后脑组织中游离脂肪酸(FFA)含量^[3]及对小鼠脑缺血再灌期脑组织谷胱甘肽过氧化物酶和Na-K-ATP酶活性的抑制^[4], 同时还能降低沙土鼠脑缺血再灌注90 min时前脑和中脑FFA含量^[5]。然而, 在模拟临床中风的中动脉缺血模型上尚未见到关于银杏内酯药效学的报道, 所以我们采用中动脉阻塞-再灌模型研究了银杏内酯对大鼠局灶性脑缺血的保护作用, 以期进一步验证银杏内酯的作用极其机理。

1 实验材料

1.1 动物

SD大鼠, (350±50)g, 中国药科大学实验动物中心。合格证号: 苏动质 97004。

1.2 药物

银杏内酯原料药(含银杏内酯B 56%, 银杏内酯A 30%, 银杏内酯C 2%~3%, 银杏内酯G、K 5%, 银杏内酯J等 0.5%~1%, 总内酯含量95.35%), 批号950105, 中国药科大学植物化学教研室提供。

杏灵颗粒(Xingling granule, Xing), 批号990305, 每克颗粒含总黄酮17.6 mg, 总内酯2.4 mg, 上海杏灵科技药业有限公司。

尼膜同(尼莫地平片, Nimotop, Nim), 每片含药30 mg, 批号CAGFT3, 德国拜尔公司。

1.3 试剂

乳酸测定试剂盒(LA), 批号20000705; 丙二醛测定试剂盒(MDA), 批号20000715; 超氧化物歧化酶测定试剂盒(SOD), 批号20000705; 谷胱甘肽测定试剂盒(GSH), 批号20000721; 考马斯亮兰试剂盒, 批号20000825, 均为南京建成生物工程研究所产品。

* 收稿日期 2000-10-09 * 通讯作者 Tel: 025-3271324 E-mail: njqlt039@jlonline.com

基金项目 国家新药基金资助项目部分内容(93-67-N-45) 江苏省“三药”重点攻关项目部分内容(苏科技(2000)357号)

2 方法及结果

2.1 对局灶性脑缺血大鼠脑功能、梗塞和脑含水量的影响

取雄性 SD 大鼠 70 只, 体重 300 ~ 400 g, 按体重随机分为 7 组, 分别为银杏内酯高剂量组 (40 mg/kg), 中剂量组 (20 mg/kg), 低剂量组 (10 mg/kg), 阳性对照尼膜同组 (1.2 mg/kg), 阳性对照杏灵颗粒组 (24 mg/kg), 假手术组及缺血模型对照组 (均给以等量 0.5% CMC-Na)。于实验前 7 d, 每天 ig 1 次, 第 7 天最后一次于缺血前 60 min 给药。参考 Longa 等人的方法, 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 10% 水合三氯乙醛 (300 mg/kg) ip 麻醉, 仰卧恒温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。将尼龙线 (长 4 cm, 直径 0.28 mm) 经颈外动脉主干切口, 缓慢向颈内动脉入颅方向推进, 以颈总动脉分叉处为标记, 推进 20 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。1 h 后, 拔出尼龙线, 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, 不闭塞大脑中动脉。

术后 24 h 按 Bederson 的方法对动物的行为缺陷进行分级评分, 标准如下:^[9]

- 0 级: 未观察到神经症状;
- 1 级: 提尾悬空时, 动物的手术对侧前肢表现为腕肘屈曲, 肩内旋, 肘外展, 紧贴胸壁;
- 2 级: 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 级: 动物自由行走时向手术对侧环转或转圈;
- 4 级: 软瘫, 肢体无自发活动。

MCAO 24 h 后, 断头处死大鼠, 取出全脑, 左右脑分别切开, 称重。在右脑视交叉及其前后各 2 mm 处, 做冠状切片, 脑切片于 1% TTC 溶液中避光 37℃ 孵育 25 min, 用眼科镊分离苍白区 (梗塞区) 和非苍白区 (正常区), 计算梗塞百分比如下:

梗塞百分比 (%) = 苍白区重量 / (苍白区重量 + 非苍白区重量) × 100%

将染色后的脑组织烘干, 对照大脑湿重求出脑含水量如下:

脑组织含水量 (%) = (1 - 脑组织干重 / 脑组织湿重) × 100%

Tab 1 Effect of ginkgolide (Gin) on brain functions, infarction percentage and middle cerebral artery occlusion (MCAO) rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Groups	Dose(mg/ kg)	Score of behavior	Infarction(%)	Water content in brain(%)
Sham-operate		0.2 ± 0.42		77.66 ± 0.61
MCAO model		3.5 ± 0.53	21.21 ± 1.92	81.04 ± 0.70
MCAO+Gin	40	1.9 ± 0.74 *** ◇◇◇	15.59 ± 2.26 ***	78.73 ± 0.66 *** ◇◇◇
	20	2.4 ± 0.97 *** ◇◇◇	17.47 ± 2.64 ***	79.44 ± 0.89 *** ◇◇◇
	10	2.5 ± 0.85 *** ◇◇◇	18.86 ± 2.17 *	80.30 ± 0.80 *** ◇◇◇
MCAO+ Nim	1.2	1.8 ± 0.77 *** ◇◇◇	15.28 ± 2.70 ***	78.02 ± 0.87 ***
MCAO+ Xing	24	2.4 ± 0.97 *** ◇◇◇	17.81 ± 2.64 ***	79.45 ± 1.08 *** ◇◇◇

$P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$ vs MCAO model; ◇ $P < 0.05$ ◇◇ $P < 0.01$, ◇◇◇ $P < 0.001$ vs sham-operate; Nim(Nimotop); Xing(Xingling granule, Contant 17.6 mg ginkgo flavonoids and 2.4 mg Ginper gram)

由表 1 可知, ig 银杏内酯 10, 20, 40 mg/kg 能使 MCAO 大鼠的脑卒中评分降低, MCAO 梗塞范围缩小, 脑组织含水量减少, 其作用强度与杏灵颗粒比较无明显差异^[7-8]。

2.2 对局灶性脑缺血大鼠生化指标的影响

取雄性大鼠 70 只 (300~400 g), 分组给药, 手术

方法如前。MCAO 24 h 后, 大鼠断头处死, 取脑, 去除小脑。将大脑用生理盐水制成 10% 匀浆, 按南京建成生物工程研究所提供的试剂盒说明书, 测定大脑组织中的超氧化物歧化酶 (SOD), 谷胱甘肽 (GSH), 丙二醛 (MDA) 和乳酸 (LA) 等的含量。

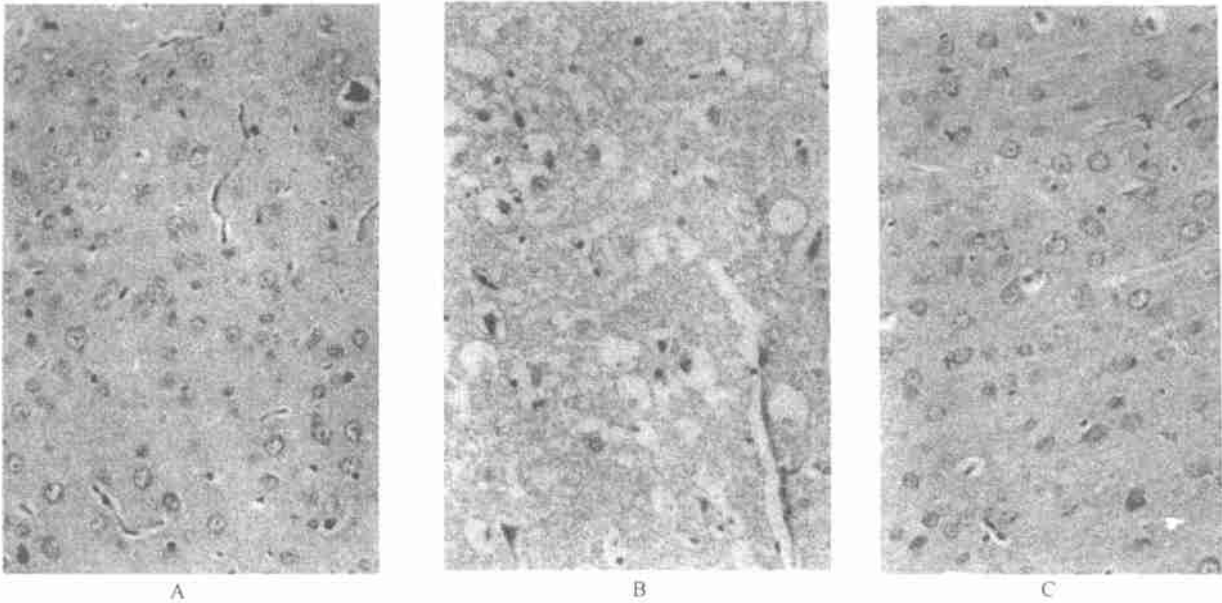
Tab 2 Effects of Gin on the biochemical indices of focal ischemic rats' brain homogenate ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Group	Dose(mg/ kg)	MDA(nmol/ mg)	LA(mmol/ g)	SOD(NU/ mg)	GSH(mg/ mg)
Sham-operate	—	57.33±17.06	1.94±0.56	935.77±52.93	79.76±20.10
MCAO model	—	116.86±24.27	8.82±1.47	363.84±121.06	38.10±15.08
MCAO+Gin	40	61.97±11.86 ^{***△}	3.88±0.34 ^{***◇}	753.35±61.35 ^{***◇}	57.40±19.08 ^{△◇}
	20	77.21±16.03 ^{**◇}	6.09±1.07 ^{***△}	697.35±139.88 ^{***◇}	46.39±19.44 ^{◇◇}
	10	84.94±18.46 ^{***◇}	7.34±2.56 ^{***△}	451.66±117.91 ^{***◇}	43.94±19.47 ^{◇◇}
MCAO+ Nim	1.2	58.90±14.27 ^{***}	3.51±0.40 ^{***◇}	732.98±65.35 ^{***◇}	58.36±21.55 ^{*◇}
MCAO+ Xing	24	78.05±19.45 ^{**◇}	4.15±0.41 ^{***◇}	671.87±125.26 ^{***◇}	56.33±12.40 ^{***◇}

$\hat{P}<0.05$ $\hat{P}<0.01$, $\hat{P}<0.001$ vs MCAO model; $\hat{P}<0.05$ $\hat{P}<0.01$ $\hat{P}<0.001$ vs MCAO+Xing; $\hat{P}<0.05$ $\hat{P}<0.01$, $\hat{P}<0.001$ vs sham-operate

由表 2 可见银杏内酯可使局灶性脑缺血大鼠再灌注损伤的脑组织内的 MDA, LA 等含量降低, 表明组织缺血缺氧和过氧化程度受到明显抑制; 同

时 SOD 和 GSH 含量增加, 反映了药物对机体抗氧化能力和清除自由基的能力有提高。其作用与杏灵颗粒比较无显著性差异。



Sham-Operate (A); MCAO model (B); MCAO+Gin (40 mg/kg) (C)

Fig 1. Protective effects of Gin on focal ischemia of rat (pathological slices×200)

2.3 对局灶性脑缺血大鼠脑组织学的影响

取雄性大鼠 35 只 (300±400 g), 分组给药, 手术方法如前。MCAO 后 24 h 断头处死大鼠, 取出全脑于 10% 甲醛溶液中固定。标本于腊制模具中切片后作 H. E. 染色, 对大脑皮层海马进行病理组织学检查。结果如下所示:

假手术组: 各例脑组织神经元及胶质细胞正常, 核膜清楚, 核仁明显, 未见神经变性、坏死及炎细胞浸润等明显病理改变。

缺血模型组: 各例脑组织均见神经元结构模糊, 胞体肿胀, 尼氏小体减少或消失, 出现不同程度的核深染, 核固缩, 核溶解, 核体不规则, 并见明显

软化灶形成。

银杏内酯口服三个剂量组: 大脑皮质锥体细胞和脑实质神经细胞的核固缩、核溶解程度比缺血对照组明显减轻, 软化灶减少。其中高剂量效果比较显著, 而低剂量组的效果不明显。

杏灵颗粒对照组和尼膜同对照组也对脑缺血造成的脑组织损伤有明显保护作用。

3 讨 论

我们采用 Longa's 颈内线栓法加以改进制备大脑中动脉阻塞-再灌模型, 损伤小, 稳定性高, 方法比较可靠, 是国内外 90 年代以来逐渐广泛使用的

方法。

结果表明,银杏内酯 po 10, 20, 40 mg/kg 连续 7 d 可剂量依赖性地改善中动脉闭塞所致局灶性脑缺血大鼠的神经功能,明显缩小梗塞面积、减轻脑水肿;该药还可剂量依赖性地显著降低中动脉闭塞大鼠大脑组织中的丙二醛(MDA)和乳酸(LA)含量,增加超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽(GSH)含量。病理切片也表明银杏内酯可明显改善局灶性脑缺血下大鼠的脑代谢;维持脑缺血状态下神经细胞的正常形态和功能,延缓、减轻其坏死。

很多资料均表明,脑缺血后病理生理改变有诸多因素参与,如能量代谢耗竭、兴奋性氨基酸毒性、细胞内钙超载、毒性氧自由基产生、酸中毒、花生四烯酸产生等。这些不利因素是导致神经元损伤的主要原因^[9]。银杏内酯具有强大的 PAF 拮抗作用。据报道,外源性 D-Asp 负载后,银杏内酯 B 能抑制其在缺血再灌时大鼠海马区的 Ca^{2+} -依赖性 PAF 释放;抑制沙土鼠脑缺血再灌注后 PKC 的激活,抑制 $2 \sim 10 \mu\text{mol/L}$ PAF 所导致的多种神经瘤细胞内 Ca^{2+} 浓度增加^[11]。尤其重要的是作为特异性 PAF 拮抗剂,银杏内酯 B 从形态学上改善 Glu, 海人藻酸对原代培养的大鼠大脑皮层神经细胞损伤^[12, 13]。而我们的试验采用缺血-再灌模型重点研究氧自由基对脑组织的损伤。脑缺血后,尤其是缺血-再灌期,生成大量氧自由基(OR)和脂质过氧化物(LP),也是造成神经元损伤的重要因素^[9]。我们测定的脑匀浆生化指标表明,银杏内酯给药组可以降低 LA, MDA 含量,即降低脑脂质过氧化速率;同时升高 SOD, GSH 的含量,加快对组织超氧阴离子自由基 $\text{O}^{\cdot-}$ 的清除。银杏内酯对脑缺血的保护作用还与其显著的抗组织氧自由基作用密切相关,这一点在国内外文献中尚未见报道。

参考文献

[1] 方思伟(Fang SW), 李麟仙(Li LX), 王子灿(Wang ZC)等. 沙土鼠及大鼠局部脑缺血时血小板活化因子的变化[J]. 中国病理

生理杂志(*Chin J Pathophysiol*), 1999, 15(5): 392-394

- [2] 王伟(Wang W), 董为伟(Dong WW). 脑缺血病理损伤过程中的活性介质 PAF[J]. 国外医学 神经病学 神经外科学分册(*Foreign Med Sci. Section on Neurology & Neurosurgery*), 1995, 5: 237-241
- [3] Birckle DL, Kurian P. Platelet-activating factor antagonist BN 52021 decrease accumulation of free polyunsaturated fatty acid in mouse brain during ischemia and electroconvulsive shock[J]. *J Neurochem*, 1988, 51: 1900-1905.
- [4] 汪红仪(Wang HY), 王瑜(Wang Y), 赵晓宁(Zhao XN). 银杏叶提取物对实验小鼠脑缺血的防护作用[J]. 中国中药杂志(*Chin J Chinese Materia Medica*), 1999, 23(3): 169-171.
- [5] Panetta T, Marcheselli VL, Braquet P, et al. Effects of a platelet activating factor antagonist (BN 52021) on free fatty acids, diacylglycerols, polyphosphoinositides and blood flow in the cerebellar brain; inhibition of ischemia-reperfusion induced cerebral injury[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987, 149: 580-593.
- [6] Bederson JB, Pitts IH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: valuation of the model and development of a neurological examination[J]. *Stroke*, 1986, 17(3): 472-476.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(10): 84-89.
- [8] 张均田. 现代药理实验方法(*Modern Experimental Methods in Pharmacology*); 下册[M]. 北京医科大学中国协和医科大学出版社, 1998 1240-1247.
- [9] 陈修, 陈维洲, 曾贵云. 心血管药理学(*Cardiovascular Pharmacology*)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998 141-144.
- [10] Zablocka B, Domanska-Janik K. PAF antagonist, BN52021, inhibits [^3H] D-aspartate release after ischemia *in vitro* [J]. *Neuroreport*, 1994, 6(1): 85-88.
- [11] Zablocka B, Lukasiuk K, Lazarewicz JW, et al. Modulation of ischemia signal by antagonist of N-methyl D-aspartate, nitric oxide synthase and platelet-activating factor in gerbil hippocampus[J]. *J Neurosci Res*, 1995, 40(2): 233-240.
- [12] Prehn JH, Kriegstein J. Platelet-activating factor antagonists reduce excitotoxic damage in cultured neurons from embryonic chick telencephalon and protect the rat hippocampus and neocortex from ischemic injury *in vivo* [J]. *J Neurosci Res*, 1993, 34(2): 179-188.
- [13] 朱俐(Zhu L), 高静(Gao J), 张祖暄(Zhang ZX). EGB761 对抗海人藻酸神经毒性的作用[J]. 南通医学院学报(*Acta Academiae Medicinae Nantong*), 2000, 20(1): 13-15.

Protective Effect of Ginkgolides on Rat Focal Brain Ischemia

WU Xue-Feng, WANG Qiu-Juan, LOU Feng-Chang¹

Division of Physiology; ¹Division of Phytochemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

ABSTRACT **AIM** The aim is to study the possible effects of Ginkgolides on rat focal brain ischemia. **METHODS**

The model of rat focal brain ischemia was made through middle cerebral artery occlusion-reperfusion and several indices was measured. **RESULTS** Ginkgolides (po) could significantly improve the behavior of ischemic rats and markedly decrease their infarction percentage & water content. There was significant difference between the three dosages groups and the control. The drug could also decrease the MDA, LA concentration and increase the SOD, GSH activity in rats' brain homogenate at the same time. The pathological slices also proved its protective effect on neuron cells. **CONCLUSION** Ginkgolides have a marked prospective activity on rat focal brain ischemia.

KEY WORDS Ginkgolides; Middle cerebral artery occlusion-reperfusion model; Rat focal brain ischemia

° 会 讯 °

心血管重构, 离子通道病变, 心律失常及药物治疗(CRIAD)

国际学术研讨会

由中国药科大学主办的“心血管重构, 离子通道病变, 心律失常及药物治疗国际学术研讨会”将于2001年9月25~27日在中国南京举行。

人类心血管系统潜在地遭受着先天性及环境因素的袭击。在心血管疾病的发展进程中, 心脏及血管的重构是多种心血管疾病中最重要的机制, 亦是研制新药中药效的主要靶子。临床上, 药物治疗心脏病及糖尿病亦着重于消退心血管重构。在进入新世纪之际, 对具有潜在危险因子人群应予以很好的医疗和医药监护。

会议主要内容:

1. 心脏重构, 离子通道病变, 缺血性病损, 心律失常及高血压病;
2. 心血管重构: 由高血压病及甲状腺疾病等引起;
3. 药物研究开发, 中药及当代西药;
4. 临床治疗: 对各类心脏病、糖尿病、心脏重构及血管重构的相关临床表现治疗。

会议征集论文, 说明如下:

1. 会议论文用英语撰写, 应符合 Drug Development Research 投稿须知的要求。
2. 研讨会论文将在美国核心期刊 Drug Development Research 特辑上发表。
3. 论文截止时间: 2001年7月25日。

联系地址: (20009) 南京 中国药科大学 076 信箱 CRIAD 国际研讨会

联系人: 戴德哉教授

电话: 86/25/3271270, 3271516, 3271423

传真: 86/25/3313027, 3213611

E-mail: dezai.dai@hotmail.com