

银杏内酯K对脑缺血的保护作用

马舒伟¹, 陈旅翼², 何盛江³, 梁军¹, 刘红霞¹, 张现涛^{3*} (1.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; 2.中国药科大学中药学院, 南京 210009; 3.广东省中药所, 广州 510009)

摘要: 目的 研究银杏内酯K对脑缺血的保护作用。方法 采用小鼠常压耐缺氧实验, 测定小鼠存活时间; 小鼠双侧颈总动脉结扎引起急性不完全脑缺血模型, 测定小鼠喘气时间、脑乳酸含量和碱性磷酸酶活性, 观察组织形态学、脑指数和脑含水量的变化。结果 银杏内酯K能剂量依赖性地延长小鼠缺氧缺血的存活时间; 延长喘气时间, 减少乳酸含量, 降低碱性磷酸酶活性, 减小脑指数和脑含水量。病理学组织检查显示, 银杏内酯K能改善脑缺血再灌注造成的小鼠神经细胞的损伤, 减少组织坏死。结论 银杏内酯K对脑缺血有保护作用。

关键词: 银杏内酯K; 脑缺血; 缺氧; 乳酸; 碱性磷酸酶; 脑含水量

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)10-0877-04

Protective Effect of Ginkgolide K on Cerebral Ischemia

MA Shuwei¹, CHEN Lüyi², HE Shengjiang³, LIANG Jun¹, LIU Hongxia¹, ZHANG Xiantao^{3*} (1.Department of Pharmacy Engineering, Institute of Chemistry and Chemical Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China; 2.Institute of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 3.Traditional Chinese Medicine Institute of Guangdong Province, Guangzhou 510009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the protective effect of ginkgolide K on cerebral ischemia. **METHODS** Anoxia was produced by close normobaric hypoxia; the survival time of mice was determined; acute incomplete cerebral ischemia was induced by ligaturing bilateral carotid arterise; breath time, brain lactic acid content and alkaline phosphatase activities, brain index and brain water content were detected, morphologic change was observed. **RESULTS** Ginkgolide K prolonged the survival time of hypoxic-ischemic mice in dose-dependent manner. In acute incomplete cerebral ischemia mice, ginkgolide K extended breathing time, reduced lactic acid content, decreased alkaline phosphatase activity, lessened brain index and brain water content. Moreover, pathological examination showed that ginkgolide K ameliorated the cerebral ischemia-reperfusion injury in mice nerve cells and reduced tissue necrosis. **CONCLUSION** Ginkgolide K has a protective effect on ischemia brain damage.

KEY WORDS: ginkgolide K; cerebral anoxia; cerebral ischemia; lactic acid; alkaline phosphatase; brain water content

目前研究表明, 无论动物研究还是临床试验均支持血小板激活因子(PAF)参与缺血性脑损伤过程^[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。作为天然PAF受体特异拮抗剂银杏叶内酯(ginkgolide)可通过减少神经元的迟发性损伤, 对脑缺血再灌注损伤起到一定的保护作用^[3-5]。银杏内酯K(ginkgolide K)为一种天然血小板活化因子拮抗剂^[6], 推测应具有脑缺血损伤的保护作用。因此, 本试验应用小鼠的缺氧实验模型, 观察小鼠

缺氧存活时间, 采用小鼠不完全脑缺血再灌注模型, 观察喘气时间及脑组织内乳酸和碱性磷酸酶、脑组织切片染色病变情况、脑指数及脑含水量, 以探讨银杏内酯K对小鼠脑缺血缺氧的保护机制。

1 材料与方法

1.1 动物

昆明种小鼠, ♀♂各半, 体重18~22 g, 由广东中医药大学实验动物中心提供, 实验动物合格证号: SCXK(粤)20080020。

1.2 药品

银杏内酯K(本实验室自制, 纯度大于98%,

基金项目: 国家自然科学基金(81001384); 广州市科技计划项目(2010GK-C041)

作者简介: 马舒伟, 男, 博士, 讲师 Tel: 15845686560 E-mail: mashuwe2004@yahoo.com.cn *通信作者: 张现涛, 男, 博士, 副教授 Tel: (8620)28854894 E-mail: zxtcpu@yahoo.com.cn

使用前溶解在聚山梨酯中,水稀释后,其浓度不高于20%);银杏叶提取物注射液(ginaton,台湾济生化学制药厂股份有限公司,批号:BC017,规格:5 mL:17.5 mg);0.9%氯化钠注射液(山东华鲁制药有限公司,批号:C0803130)。乳酸测定试剂盒、碱性磷酸酶测定试剂盒、考马斯亮兰蛋白测定试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供,批号均为20101012;水合氯醛、苏木精为市售分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠耐缺氧试验^[7] 健康昆明种小鼠70只,18~22 g,按体重、性别随机将小鼠分为7组:空白对照组生理盐水、银杏内酯K注射液5个剂量组(分别为0.3,1,3,10,30 mg·kg⁻¹)和银杏叶提取物注射液阳性对照组(13 mg·kg⁻¹),每组10只。各组分别尾静脉注射相应的药物溶液,30 mg·kg⁻¹组给药体积为0.042 mL·g⁻¹,其余各组均为0.02 mL·g⁻¹。每天给药1次,连续21 d。末次给药后1 h,将小鼠分别放入盛有15 g钠石灰的密封的250 mL广口瓶中,每瓶1只小鼠,盖严,使之不漏气,立即计时,以呼吸停止为指标观察小鼠存活时间。

1.3.2 小鼠急性脑缺血性缺氧试验 将180只小鼠按体重、性别随机分为6大组:银杏内酯K注射液高、中、低剂量组(8,4,2 mg·kg⁻¹),银杏叶提取物注射液组13 mg·kg⁻¹及模型组和空白对照组均为生理盐水给药。采用尾静脉注射的方法给药,各组给药体积均为0.20 mL·g⁻¹,每天给药一次,连续7 d。每个大组又分为3个小组:第1小组小鼠于末次给药10 min后乙醚麻醉,颈部正中切口,小心分离迷走神经后,在两侧颈总动脉下分别穿线备用,待动物清醒后,拉线结扎双侧颈总动脉,20 min后松开拉线,恢复脑供血,24 h后,自颈部逐只断头,立即按秒表记录小鼠断头后至张口喘气停止时间^[8]。迅速取脑,制备脑组织匀浆,用分光光度法测定脑组织中乳酸、碱性磷酸酶的含量。第2小组方法同第一小组,实验后断头取脑,于视交叉处行冠状切面取左侧缺血区脑一小片放入2%甲醛溶液中固定48 h。乙醇梯度脱水,石蜡包埋,切片,进行苏木精伊红染色,光镜下观察脑组织疏松、水肿程度及神经元变性坏死情况。第3小组,方法同第1小组,实验后断头取脑,称重,然后烘干,测定脑干重,计算

脑指数及脑含水量,计算公式分别如下:脑指数=脑湿重/体重;脑含水量=(脑湿重-脑干重)/脑湿重×100%。空白对照组小鼠于末次注射生理盐水10 min后,乙醚麻醉,颈部正中切口,小心分离迷走神经后,20 min后缝合,按照上述方法分3个小组进行断头取脑后续实验。

1.4 统计数据

小鼠存活时间、喘气时间以及乳酸含量、碱性磷酸酶活性及脑指数、脑含水量以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS13.0软件进行统计学分析,对各给药组与模型组进行差异比较。

2 结果

2.1 银杏内酯K对小鼠常压耐缺氧能力的影响

银杏内酯K连续给药21 d后,小鼠的耐缺氧作用与空白对照组相比,3,10,30 mg·kg⁻¹均能明显延长密闭小鼠存活时间,0.3,1 mg·kg⁻¹组虽可延长耐缺氧时间,但与空白对照组比较,未见明显差异,见表1。

表1 银杏内酯K对常压密闭环境中小鼠存活时间的影响(n=10)

Tab 1 Effect of ginkgolide K on survival time of hypoxic ischemic mice(n=10)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	存活时间/min
空白对照组	-	25.61±4.60
银杏内酯K组	0.3	31.52±7.24
	1.0	32.53±8.89
	3	35.81±7.40 ¹⁾
	10	36.62±6.46 ¹⁾
	30	37.31±4.36 ¹⁾
银杏叶提取物注射液组	13	37.72±6.48 ¹⁾

注:与空白对照组比较,¹⁾P<0.01

Note: Compared with control group, ¹⁾P<0.01

2.2 银杏内酯K对急性脑缺血再灌注小鼠断头后喘气时间、脑组织乳酸含量及碱性磷酸酶活性的影响

与空白对照组比较,急性脑缺血再灌注模型小鼠断头喘气时间明显缩短,脑组织乳酸含量及碱性磷酸酶活性显著提高;银杏内酯K(4,8 mg·kg⁻¹)剂量组与模型组相比,能明显延长喘气时间,减少乳酸含量,降低碱性磷酸酶的活性(P<0.05)。银杏内酯K(2 mg·kg⁻¹)组虽能延长喘气时间,减少乳酸含量,减低碱性磷酸酶的活性,但与模型组比较无明显差异(P>0.05)。结果见表2。

表 2 银杏内酯 K 对小鼠不完全脑缺血的影响(n=10)

Tab 2 Effect of ginkgolide K on the incomplete cerebral ischemia in mice(n=10)

组 别	剂量/mg·kg ⁻¹	喘气时间/s	乳酸/mmol·gprot ⁻¹	碱性磷酸酶/U·gprot ⁻¹
空白对照组	—	29.45±4.76	0.44±0.04	254.28±42.64
模型组	—	16.47±5.51 ¹⁾	0.58±0.05 ¹⁾	361.90±24.89 ¹⁾
银杏内酯 K 组	2	23.32±3.62	0.57±0.02	319.30±32.64
	4	25.24±4.15 ²⁾	0.52±0.06 ²⁾	297.07±46.29 ²⁾
	8	28.33±3.45 ³⁾	0.48±0.04 ²⁾	285.14±35.45 ²⁾
银杏叶提取物注射液组	13	27.46±3.93 ³⁾	0.49±0.07 ²⁾	281.34±71.53 ²⁾

注：与空白对照组比较，¹⁾P<0.01；与模型组比较，²⁾P<0.05，³⁾P<0.01

Note: Compared with control group, ¹⁾P<0.01; compared with model group, ²⁾P<0.05, ³⁾P<0.01

2.3 银杏内酯 K 对脑组织形态学的影响

与空白对照组相比，模型组中脑组织疏松、水肿明显，神经元变性坏死；银杏内酯 K(4, 8 mg·kg⁻¹)

组能够使脑组织疏松、水肿明显改善，神经元变性坏死的动物数目明显减少，而银杏内酯 K(2 mg·kg⁻¹)对脑缺血损伤未见保护作用，结果见图 1。

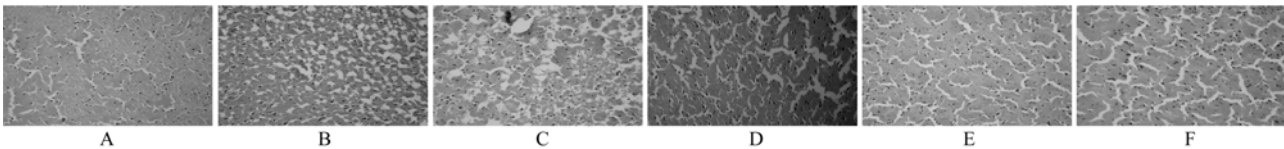


图 1 小鼠脑组织形态学的苏木精染色图片(200×)

A-空白对照组；B-模型组；C-银杏内酯 K 2 mg·kg⁻¹ 组；D-银杏内酯 K 4 mg·kg⁻¹ 组；E-银杏内酯 K 8 mg·kg⁻¹ 组；F-银杏叶提取物注射液组

Fig 1 Representative photomicrographs (hematoxylin-eosin stain) of coronal sections of brain after cerebral ischemia reperfusion in mice(200×)

A-control group; B-model group; C-ginkgolide K 2 mg·kg⁻¹ group; D-ginkgolide K 4 mg·kg⁻¹ group; E-ginkgolide K 8 mg·kg⁻¹ group; F-ginkgolide K extract injection group

2.4 银杏内酯 K 对脑指数和脑含水量的影响

与空白对照组比较，模型组中脑指数和脑含水量明显升高(P<0.05)。银杏内酯 K(4, 8 mg·kg⁻¹)组与模型组相比，能明显降低脑指数和脑含水量(P<0.05 或 P<0.01)。银杏内酯 K(2 mg·kg⁻¹)组与空白对照组相比无明显差异(P>0.05)。结果见表 3。

临床上应用的各类治疗药物效果仍不甚理想。目前，银杏叶类药物为国内主要预防和治疗脑缺血的药物，但其临床效果并不理想，因而亟待深层次开发银杏内酯类药物，本试验首次对银杏内酯 K 对实验动物的脑缺血损伤的保护作用进一步研究。

表 3 银杏内酯 K 对脑指数和脑含水量的影响(n=10)

Tab 3 Effect of ginkgolide K on brain index and brain water content in acute incomplete cerebral ischemia-reperfusion mice(n=10)

组 别	剂量/mg·kg ⁻¹	脑指数/ × 10 ⁻²	脑含水量/%
空白对照组	—	0.64±0.03	76.28±0.77
模型组	—	0.78±0.03 ²⁾	78.63±0.45 ¹⁾
银杏内酯 K 组	2	0.75±0.04	78.34±0.78
	4	0.70±0.05 ⁴⁾	77.56±0.97 ³⁾
	8	0.67±0.06 ⁴⁾	76.59±0.37 ³⁾
银杏叶提取物注射液组	13	0.70±0.06 ⁴⁾	77.07±0.74 ³⁾

注：与空白对照组比较，¹⁾P<0.05，²⁾P<0.01；与模型组比较，³⁾P<0.05，⁴⁾P<0.01

Note: Compared with control group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01; compared with model group, ³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01

3 讨论

缺血性脑血管疾病是临床上常见且致死率极高的一种疾病，严重影响着人类的健康及生活质量。由于其发病机制十分复杂，迄今为止，

小鼠急性缺氧实验表明，银杏内酯 K 可明显延长常压密闭小鼠存活时间，表明连续用药具有明显耐缺氧作用。在小鼠不完全脑缺血模型中，Nilsson 等^[9]发现乳酸水平增加与脑缺血的症状密切相关，高浓度乳酸与严重缺血有很好的相关性，认为乳酸是检测脑缺血程度有价值的特异性指标。从本研究可以看出，由于脑内糖原储备极少，缺血期脑乳酸不会明显增加，再灌注开始后，随反应性高血流的大量血糖供应，使乳酸浓度明显增加，接着发生的低灌注使脑组织再次缺氧无氧酵解加强，乳酸浓度进一步升高。目前，动物实验表明脑缺血后 Ca²⁺内流是主要的神经细胞死亡的原因^[10]，其作用机理可能是 Ca²⁺可激活磷脂 A2，破坏降解细胞膜，促使细胞损伤。碱性磷酸酶是一个脑缺血损伤的重要指标^[11]。本实验研究表明，提前给予银杏内酯 K 能够显著降低乳酸的含量和碱性磷酸酯酶的活性，表明银杏内酯 K 具有一定的神经保护作用。

脑水肿是脑组织缺血损伤的重要表现^[12]。急性不完全性脑缺血脑组织含水量的增加,反映了脑水肿的状况,而银杏内酯 K 能明显降低该缺血模型的脑指数和脑含水量,同时组织形态学变化明显轻于缺血模型组。同时发现脑指数增加 21.9%,而脑含水量只增加 3.08%,其原因可能是在动物实验中,手术组的小鼠体重明显减轻,因为手术会对小鼠饮食和饮水有明显的影响,所以直接大大增加了脑指数的数值,虽然脑含水量也增加,但是手术对小鼠的脑重的影响不那么明显,所以脑含水量增加没有脑指数增加那样显著。

总之,通过小鼠的缺氧缺血的模型发现,提前给予银杏内酯 K 能够显著的减少脑组织损伤程度,但其更深层次的保护机理还应进一步研究。

REFERENCES

- [1] LEE W S, RHIM B Y, HONG K W, et al. A study on cerebral ischemia-reperfusion injury. Involvement of platelet-activating factor [J]. Korean Pharmacol, 2008, 34(1): 1-8.
- [2] SHUAI J, YE J N, GAO G Z. Effect of platelet activating factor receptor antagonist on cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Chin J Clin Rehabil(中国临床与康复杂志), 2004, 8(4): 740-741.
- [3] WANG X, QIN ZH, SHI H, et al. Protective effect of ginkgolids (A+B) is associated with inhibition of NIK/IKK/IkappaB/NF-kappaB signaling pathway in a rat model of permanent focal cerebral ischemia [J]. Brain Res. 2008(1234): 8-15.
- [4] LI S Q, ZHANG Y, YANG L J, et al. Improving effect of ginkgolide B on mitochondrial respiration of ischemic neuron after cerebral thrombosis in tree shrewa [J]. Chin Med J (Engl)(中国医学杂志 英文版), 2007, 120(17): 1529-1533.
- [5] HU H F, LOU J. Observations on clinical efficacy of ginkgo leaf tablets on ischemic stroke with syndrome of blood stasis [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学杂志), 2010, 27(7): 649-651.
- [6] LOU F C, LING Y, TANG Y P, et al. Isolation, purification and identification of ginkgo terpene lactones [J]. Chin J Nat Med(中国天然药物), 2004, 2(1): 11-15.
- [7] XU S Y, BIAN R L, CHEN X. Pharmacological Experimental Methodology(药理实验方法学) [M]. 3rd Ed. People's Medical Publishing House(人民卫生出版社), 2002: 1510-1511.
- [8] XU S Y, BIAN R L, CHEN X. Pharmacological Experimental Methodology(药理实验方法学) [M]. 2nd Ed. People's Medical Publishing House(人民卫生出版社), 1998: 945-948.
- [9] NILSSON O G, BRAND L, UNGERSTED U. Beside detection of brain ischemia using intracerebral microdialysis: subarachnoid hemorrhage and delayed ischemic deterioration [J]. Neurosurgery, 1999, 45(5): 1176-1184.
- [10] HUANG L, CHEN N, GE M, et al. Ca^{2+} and acidosis synergistically lead to the dysfunction of cortical GABAergic neurons during ischemia [J]. Biochem Biophys Res Commun. 2010, 394(3): 709-714.
- [11] ZHANG X, HAN L S, XU J, et al. Study on renal ischemia-reperfusion injury and protective effect of Danshen [J]. Prog Anat Sci(解剖科学进展), 1996, 2(3): 269-272.
- [12] ZHAO L, XU Q P, TANG M K. Experimental study on protective effect of Congsheng capsule in acute cerebral ischemia and improvement of cerebral blood flow and energy metabolism [J]. Chin J Integr Tradit Chin West Med(中国中西医结合杂志), 2001, 21(5): 375-377.

收稿日期: 2010-12-13