

# 银杏叶提取物 (GBE) 对大鼠局灶性脑缺血后细胞间黏附分子-1 及其 mRNA 表达的影响

王雪松<sup>1</sup>, 阮旭中<sup>2</sup>, 刘买利<sup>1</sup> (1. 中国科学院武汉物理与数学研究所, 波谱与原子分子物理国家重点实验室, 湖北 武汉 430071; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院神经科, 湖北 武汉 430030)

**摘要:**目的 探讨银杏叶提取物对鼠脑缺血后细胞间黏附分子-1(ICAM-1)及其 mRNA 表达的影响。方法 建立大鼠大脑中动脉闭塞/再灌注模型,应用 RT-PCR 及免疫组织化学的方法,观察各实验组鼠脑缺血后细胞间黏附分子-1 及其 mRNA 的表达。结果 ICAM-1 及其 mRNA 在假手术组鼠脑组织呈低表达;缺血 90 min 再灌 24h 脑组织 ICAM-1 及其 mRNA 表达较前显著增高( $P < 0.01$ );银杏叶提取物治疗组于相同时限 ICAM-1 及其 mRNA 的表达与缺血再灌注组相比较显著下调( $P < 0.01$ )。结论 银杏叶提取物能显著下调 ICAM-1 及其 mRNA 的表达,减轻脑缺血后炎性病理损害,具有明显的缺血脑保护作用。

**关键词:**银杏叶提取物;细胞间黏附分子-1;脑缺血

中图分类号:R282.71;R285.5 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2003)06-0441-04

## Effect of *Ginkgo biloba* extract on intercellular adhesion molecule 1 and mRNA expression during cerebral is-

**作者简介:**王雪松,女,30岁,2001年6月毕业于华中科技大学同济医学院附属同济医院神经病学专业,获博士学位,现中国科学院武汉物理与数学研究所,波谱与原子分子物理国家重点实验室博士后流动站工作,助理研究员;专业:磁共振,方向为中草药脑保护核磁共振及脑功能磁共振成像研究。E-mail:xuesong@wipm.ac.cn

WANG Xue-song<sup>1</sup>, RUAN Xu-zhong<sup>2</sup>, LIU Ma-li<sup>1</sup> (1. State Key Laboratory of Magnetic Resonance and Atomic and Molecular Physics, Wuhan Institute of Physics and Mathematics, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 2. Department of Neurology, Tongji Hospital, Wuhan 430030, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the effect of *Ginkgo biloba* Extract (GBE) on intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and mRNA expression following cerebral ischemia/reperfusion in rats. **METHOD** The middle cerebral artery (MCA) focal cerebral ischemia/reperfusion rat models were used. The ICAM-1 and mRNA expression were measured in groups by RT-PCR and immunohistochemistry techniques, respectively. **RESULTS** Lower of ICAM-1 and ICAM-1 mRNA expression was observed in pseudo surgery group, and the expression of ICAM-1 and ICAM-1 mRNA distinctly up regulated in the ischemia/reperfusion group. A significant reduction in the expression of ICAM-1 and ICAM-1 mRNA was found in the GBE treated group compared with the ischemia/reperfusion group following focal cerebral ischemia and reperfusion in rats. **CONCLUSION** GBE may alleviate inflammation in cerebral ischemic region and exert a potent effect on cerebral ischemia/reperfusion by down regulating the expression of ICAM-1 and ICAM-1 mRNA.

**KEY WORDS:** *Ginkgo biloba* extract; cerebral ischemia; ICAM-1

银杏是我国及周边少数几个国家所特有的古老裸子植物之一,其叶入药在我国已有几千年的历史。近年来对其主要成份银杏叶提取物(*Ginkgo biloba* extract, GBE)药理作用的研究已取得了一定的进展。研究证实银杏叶提取物具有增加脑血流量、清除自由基、抗缺血缺氧、抗血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)诱导的血小板聚集等作用,临床上广泛用于缺血性心脑血管疾病的治疗<sup>[1]</sup>。研究表明缺血再灌注性脑损伤病理过程与脑局部的急性炎症反应有密切关系。当脑组织缺血时,活化的白细胞可与血管内皮细胞黏附,白细胞与内皮细胞的相互作用是由表达在这两种细胞上的黏附分子介导的,这有利于白细胞穿出血管的内皮层,游出至缺血脑组织中引起脑缺血区的急性炎症反应。GBE对缺血再灌注性脑损伤时伴发的脑局部的急性炎症反应的影响笔者尚未见报道。因此有必要研究 GBE 对缺血脑组织中细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1 ICAM-1) 及其 mRNA 表达的影响,探讨 GBE 的脑保护作用机制,为 GBE 的临床应用提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 实验动物及分组

Wistar 大鼠 84 只,雌雄各半,体重 220~280g(同济医学院实验动物中心),自然喂养,随机分为(1)假手术组、(2)阴性对照组:缺血再灌注组(缺血 90 min 再灌 24h)、(3)阳性对照组:灯盏花水溶液治疗组(1 mL/kg)、(4) GBE 治疗组(剂量为 10, 20 mg/kg),每组动物 6 只。

治疗组于缺血前 30 min 和缺血后即刻分别经腹腔注射银杏叶提取物水溶液(GBE 剂量分别为 10, 20 mg/kg)、灯盏花水溶液(1 mL/kg),假手术组和缺血/再灌注组均于相同时限腹腔注射等容量的生理盐水。

### 1.2 仪器与试剂

银杏叶提取物(德国舒培大药厂,批号:6660399)每毫升含 3.5 mg 银杏叶提取物,灯盏花水溶液(中美合资黑龙江迪龙制药有限公司,批号:300557),氯化三苯四氮唑(2, 3, 5-

tripheyltetrazolium chloride, TTC, 上海试剂三厂),免疫组织化学试剂盒(北京中山公司),抗 ICAM-1 抗体(北京中山公司)、ICAM-1 mRNA 引物(由上海深工公司合成)、RT-PCR 试剂盒(美国 Promega 公司)、图象分析系统(HPIAS-1000 型高分辨病理图文分析系统,北航医学图象分析管理系统)、显微镜(Olympus U-CMAD-2Japan)。

## 2 方法

### 2.1 建立大鼠大脑中动脉闭塞/再灌注模型

参照 Longa 等报道方法<sup>[2]</sup>略加改进,用 0.4%戊巴比妥钠(1 mL/100g 体重)麻醉大鼠后,仰卧固定取颈前正中切口,分离右侧颈总、颈外及颈内动脉,结扎颈外动脉。在距颈总动脉分叉 2 mm 处剪一小口,尼龙线栓由此进入颈内动脉,造成大脑中动脉缺血。栓子插入深度为 18~22 mm,留 10 mm 栓子于皮外,缝合皮肤。术后肌注青霉素 4 万单位,栓子为直径 0.22 mm 市售尼龙鱼线,长度 40 mm,前端 5 mm 用聚胺脂包被,直径 0.24~0.26 mm。假手术者栓子插入仅 10 mm,不足以闭塞大脑中动脉。动物清醒后具备同侧 Horner 氏征,提尾时左前肢屈曲内收者方为研究对象,排除有蛛网膜下腔出血者。

### 2.2 标本制备

将已麻醉的大鼠用生理盐水 200 mL 快速左心室灌注冲洗,再用 4%多聚甲醛(pH7.4 0.01 mol/L PBS 配制) 400 mL 灌注固定,恒定灌注(输液瓶高出心脏 1 m)时间 30~60 min。灌注完毕立即断头取脑,于中 1/3 处取冠状切片(3~4 mm) 4%多聚甲醛溶液中固定 2~3 h,然后浸泡在 20%蔗糖溶液中过夜,后作冰冻切片备用。余 30 只大鼠断头取脑,右侧顶叶皮层约 100 mg 脑组织作 RT-PCR 的标本时,所用器械和试剂均经 0.1%焦碳酸二乙酯(DEPC)处理以灭活核糖核酸酶(RNAase)。

### 2.3 TTC 染色结合球积仪测定各实验组鼠脑梗塞面积

各实验组鼠于缺血 90 min 再灌 24 h 迅速断头取脑,切去额极后,间隔 2 mm 连续作 6 个脑冠状切片,立即置切块于

37℃ 2% TTC 生理盐水中避光恒温孵育 30 min, 在 15 min 时将脑组织块翻面, 染色后用 10% 甲醛固定, 固定 24h, 直接用球积仪测定脑梗塞面积( TTC 被线粒体过氧化氢酶还原, 可使正常组织染色呈红色, 坏死组织呈白色)。

#### 2.4 神经功能缺失征象的评定

采用临床神经功能评分标准观察药物对缺血大鼠神经功能缺失征象的影响。评分标准: 0 级, 无神经功能缺损, 肢体活动正常; 1 级, 轻度神经功能缺损, 不能伸展左前肢; 2 级, 中度神经功能缺损, 向左侧划圈; 3 级, 重度神经功能缺损, 向左侧倾倒; 4 级, 极重度神经功能缺损, 无自主行走及意识障碍。

#### 2.5 免疫组织化学染色

免疫组化采用链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物 (Strept Avidin Biotin enzyme Complex, SABC) 法, 山羊抗大鼠 ICAM-1 多克隆抗体工作液浓度为 1:100, 具体步骤如下: (1) 冰冻切片放置室温下 30 min, 蒸馏水洗 5 min × 3 次; (2) 3% 过氧化氢室温作用 8 min, 以清除内源性过氧化物酶, 0.01 mol/L PBS 液洗 5 min × 3 次; (3) 抗原修复液修复 10 min, 0.01 mol/L PBS 液洗 5 min × 3 次; (4) 血清封闭液 10 min, 不洗; (5) 加 ICAM-1 (1:100) 抗体, 4℃ 于湿盒做过夜; (6) 0.01 mol/L PBS 液洗 5 min × 3 次, 加抗山羊的免疫球蛋白室温下 30 min; (7) 0.01 mol/L PBS 液洗 5 min × 3 次, 加链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物室温下 30 min; (8) 0.01 mol/L PBS 液洗 5 min × 3 次, 加 DAB 显色 5~10 min; (9) 常规镜检封片。

#### 2.6 逆转录多聚酶链反应 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) 测定缺血及再灌注后鼠脑组织中 ICAM-1 mRNA 的表达

采用 100 mg 脑组织 + Trizol 1 mL 彻底匀浆, 随后加入氯仿和冰异丙醇, 将提取出的总 RNA 用紫外分光光度仪进行浓度测定后, 用灭活 RNAase 的 DEPC 水稀释为 1 μg/μL, -70℃ 保存。取样品 RNA 2~4 μg, 5 × 逆转录酶缓冲液 4 μL, 逆转录酶 2 U, 核酸酶抑制剂 (Rnasin) 20 U, dNTPs 2 μL, OligdT181 μL, 加去离子水至 25 μL, 72℃ 水浴 5 min, 37℃ 水浴 1 h, 95℃ 灭活逆转录酶 5~10 min, 立即置冰上冷却 -20℃ 保存。ICAM-1 引物工作液浓度为 10 pmol/L, 引物序列<sup>[3]</sup>: 上游引物 (P1): 5'-ACAGACACTAGAGGAGTGAGCAGG-3', 下游引物 (P2): 5'-GTGAGCGTCCATATTTAGGCATGG-3', 此对引物扩增出一条 327 bp 的 ICAM-1 cDNA 片段。内参三磷酸甘油醛 (GAPDH) 引物序列<sup>[4]</sup>: 上游: 5'-GAAGGGCTCATGACCACAG-3', 下游: 5'-GGATGCAGGGATGTTC-3', 此对引物扩增出一条 166 bp 的 GAPDH cDNA 片段。PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min, 60℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环, 72℃ 后延伸 10 min。

#### 2.7 统计学处理

采用北航医学图像分析管理系统、HPIAS-1000 型高分辨病理图文分析系统进行图像分析处理得出平均面密度、吸光度值 ( $\bar{x} \pm s$ ), 组间差异的显著性用方差分析进行检验, 两两比较用  $q$  检验法。

### 3 结果

#### 3.1 TTC 染色结合球积仪观察鼠脑梗塞面积

24 只大鼠缺血再灌注后经 TTC 染色可见右侧顶叶皮质出现苍白的梗塞灶, 经面积仪可测得额叶至顶叶 6 个连续脑冠状切片的梗塞面积。缺血 90 min 再灌 24 h 大鼠脑梗塞面积为  $(23.52 \pm 4.78) \text{ mm}^2$ 。银杏叶提取物 2 个剂量组及灯盏花治疗组脑梗塞面积于缺血 90 min 再灌 24 h 分别为  $(12.04 \pm 3.12)$ ,  $(11.26 \pm 2.17)$ ,  $(12.11 \pm 3.29) \text{ mm}^2$ , 与阴性对照组相比脑梗塞面积明显减小 ( $P < 0.01$ )。

#### 3.2 神经功能缺失征象的观察

假手术组 6 只大鼠肢体活动自如, 无神经功能缺损。缺血 90 min 再灌 24 h 组有 3 只鼠行走时出现追尾现象, 即向左侧划圈; 2 只行走时向左侧倾倒; 1 只出现意识障碍。而银杏叶提取物 2 个剂量组及灯盏花治疗组于相同时间点只有 3 只鼠不能伸展左前肢, 其余大鼠无明显神经功能缺损。表明银杏叶提取物及灯盏花均能明显减轻脑缺血及再灌注损伤所致神经功能缺损, 具有脑保护作用。

#### 3.3 缺血脑组织中 ICAM-1 表达免疫组化 SABC 检测

ICAM-1 在假手术组鼠脑组织呈低表达 (面密度  $0.020 \pm 0.011$ ); 缺血 90 min 再灌 24 h ICAM-1 表达较前显著增高 (面密度  $0.142 \pm 0.031$ ) ( $P < 0.01$ ); 而银杏叶提取物 2 个剂量组及灯盏花治疗组于缺血 90 min 再灌 24 h ICAM-1 表达 [面密度分别为  $(0.051 \pm 0.023)$ ,  $(0.047 \pm 0.019)$ ,  $(0.057 \pm 0.046)$ ] 较缺血再灌组 ICAM-1 表达显著下调 ( $P < 0.01$ )。

#### 3.4 缺血鼠脑组织 ICAM-1 mRNA 表达 RT-PCR 检测

各实验组间内参照 GAPDH 阳性扩增产物电泳扫描平均吸光度值差异无显著性, 组间 ICAM-1 mRNA 表达的 RT-PCR 扩增产物电泳扫描平均吸光度值的计算采用相对平均吸光度值来比较, 即每组 ICAM-1 mRNA 表达的 RT-PCR 扩增产物平均吸光度值/内参平均吸光度值。ICAM-1 mRNA 在假手术组鼠脑组织呈低表达 (相对平均吸光度  $0.266 \pm 0.041$ ); 缺血 90 min 再灌 24 h ICAM-1 mRNA 表达较前显著增高 (相对平均吸光度  $1.364 \pm 0.028$ ) ( $P < 0.01$ ); 而银杏叶提取物 2 个剂量组及灯盏花治疗组于缺血 90 min 再灌 24 h ICAM-1 mRNA 表达 [相对平均吸光度分别为  $(0.881 \pm 0.017)$ ,  $(0.694 \pm 0.026)$ ,  $(0.824 \pm 0.027)$ ] 较缺血再灌组 ICAM-1 mRNA 表达显著下调 ( $P < 0.01$ ), 表明药物能显著下调 ICAM-1 mRNA 的表达。

### 4 讨论

ICAM-1 是 LFA-1 (lymphocyte function associated antigen-1) 的配体之一; 广泛分布于造血和非造血细胞, 而活化的 T 细胞、单核细胞等都表达高水平的 ICAM-1。在炎症时, 血管内皮细胞的 ICAM-1 表达达到高峰, 某些炎症细胞因子如白介素-1 (IL-1)、干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 等可刺激血管内皮细胞使 ICAM-1 的表达迅速上调。脑缺血时 ICAM-1 及其 mRNA 在脑血管内皮细胞表达上调已在许多缺血再灌注动物模型中证实<sup>[5,6]</sup>, 应用 ICAM-1 单抗亦能明显减轻缺血再灌注鼠脑组织损伤<sup>[7]</sup>。表明 ICAM-1 在脑

缺血后白细胞介导的脑缺血早期炎症损伤机制中发挥重要作用。本实验结果与以往文献资料一致,脑缺血/再灌注损伤时 ICAM-1 及 ICAM-1 mRNA 表达明显上调,提示 ICAM-1 在脑缺血早期介导白细胞与血管内皮细胞的黏附,白细胞游出血管至脑缺血区引起脑组织急性炎症病理损害。

银杏叶提取物来源于天然植物银杏,德国已开发出纯度较高的银杏叶提取物,其化学组成主要有 24% 的黄酮苷和 6% 的银杏苦内酯。临床上应用于脑供血不足、学习记忆障碍、痴呆、血管性疾病引起的眩晕耳鸣听力下降等。其作用机制主要为银杏叶提取物能对抗 PAF,从而改善脑组织血液循环,除此以外还兼有改善脑缺血缺氧和减轻脑水肿,保护脑血管内皮细胞的作用。本实验结果表明银杏叶提取物能明显下调鼠脑缺血后 ICAM-1 及其 mRNA 的表达,且剂量差异不显著。银杏叶提取物下调脑缺血后鼠脑组织 ICAM-1 mRNA 及其蛋白的表达,其机制可能与银杏叶提取物直接拮抗 PAF 的作用有关,通过拮抗 PAF 来抑制 IL-1、TNF 等炎性细胞因子的生成,从而导致 ICAM-1 mRNA 及其蛋白表达的下调。

本研究中灯盏花作为一个阳性对照药物,实验结果显示灯盏花也能显著下调 ICAM-1 及其 mRNA 的表达。灯盏花水溶液的有效成分是灯盏花素,为菊科植物短葶飞蓬的全草,灯盏花素是在黄芩素的 4 位接上一个羟基,从而对蛋白激酶 C (protein kinase C PKC) 有很好的抑制作用<sup>[8]</sup>。现已明确灯盏花素具有降低脑血管阻力、增加脑血流量、改善脑血液循环及抗血小板聚集的作用,临床上广泛用于缺血性脑血管病的治疗。

总之,银杏叶提取物通过下调 ICAM-1 及其 mRNA 的表达,减轻脑缺血后的炎症性病理损害,减轻脑水肿,改善局部

脑血液循环,从而发挥脑保护作用。进一步研究开发这一具有中国特色的中药脑保护剂可为临床脑梗塞治疗提供广阔的发展前景。

## 参考文献

- [1] Smith PF, MacLennan K, Darlington CL. The neuroprotective properties of the Ginkgo biloba leaf: a review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF)[J]. *J Ethnopharmacol*, 1996, 50: 131-139.
- [2] Longa E Z, Weinstein P R, Carlsons, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20: 84.
- [3] Yasuo K, Tohru T, Yutaka I, *et al*. Sequence and expression of rat ICAM-1 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 108: 1131.
- [4] Keda K I, Wakahara T, Wang Y Q, *et al*. *In vitro* Migratooey potential of rat quiescent hepatic stellate cells andlt augmentation by cell activation [J]. *Hepatology*, 1999, 29(6): 1760.
- [5] Wang X, Siren AL, Liu Y, *et al*. Upregulation of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on brain endothelial cells in rat ische mia cortex [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1994, 26: 61.
- [6] Zhang RL, Chopp M, Zaloga C, *et al*. The temporal profiles of ICAM-1 protein and mRNA expression after transient MCA occlusion in the rat [J]. *Brain Res*, 1995 Jun, 682: 182.
- [7] Zhang RL, Chopp M, Li Y, *et al*. Antf-ICAM-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in the rat [J]. *Neurology*, 1994, 44: 1747.
- [8] Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C [J]. *Science*, 1986, 233: 305.

收稿日期: 2002-10-26