

银杏叶提取物对反复脑缺血再灌注损伤的保护作用*

周兰兰 明 亮 江 勤 马传庚

内容提要 目的:研究银杏叶提取物(FGE)对反复脑缺血再灌注损伤的保护作用。方法:采用清醒小鼠造成反复脑缺血再灌注模型,应用避暗法、跳台法、比色法观察了 FGE 对小鼠行为、氧自由基代谢及前列腺素 E_2 (PGE_2) 含量的影响。结果:FGE 可以明显改善反复脑缺血再灌注小鼠的学习、记忆功能,同时可不同程度地抑制其脑组织中异常升高的丙二醛、一氧化氮和 PGE_2 含量,并可明显增强脑组织中降低的超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性。结论:FGE 对反复脑缺血再灌注损伤有显著的保护作用,其机制可能与抗脂质过氧化、增强抗氧化酶活性及抑制 PGE_2 生成有关。

关键词 银杏叶提取物 反复脑缺血再灌注 跳台法 避暗法 氧自由基 前列腺素

Protective Effect of Extract of Folium Ginkgo on Repeated Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury ZHOU Lan-lan, MING Liang, JIANG Qin, et al *Department of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei (230032)*

Objective: To study the protective effect of extract of Folium Ginkgo (FGE) on repeated cerebral ischemia-reperfusion injury. **Methods:** The model in waking mice induced by repeated cerebral ischemia-reperfusion were used in the experiment to observe the effect of FGE on behavior, oxygen free radical metabolism and prostaglandin E_2 (PGE_2) content by step-through experiment, diving stand and colorimetric method. **Results:** FGE could obviously improve the learning ability and memory of model animals, and could lower obviously the content of malonyldialdehyde, nitric oxide and PGE_2 , restore the lowered activity of superoxide dismutase and catalase in cerebral tissue. **Conclusion:** FGE has highly protective effect against repeated ischemia-reperfusion injury, the mechanism might be related with its action on anti-lipid oxidatin, improve the activity of antioxidase and inhibit the producing of PGE_2 .

Key words Folium Ginkgo extract, repeated cerebral ischemia-reperfusion, diving stand method, step-through method, oxygen free radical, prostaglandin

反复脑缺血再灌注损伤严重损害大脑功能,其机制可能与基过度激活脑内脂质过氧化过程,增强磷脂代谢等有关^[1]。银杏叶提取物(Folium Ginkgo extract FGE)的主要有效成分为黄酮类和内酯类,具有多种生物学活性。以往研究表明 FGE 具有扩张脑血管,改善脑功能的作用^[2],但 FGE 对反复脑缺血再灌注损伤的影响报道不多。本研究就 FGE 对反复脑缺血再灌注损伤的保护作用及其可能的作用机制进行了研究。

材料与方法

1 药物与试剂 FGE 经高效液相法检测含总黄酮 33.84%、总萜内酯 11.18%,由安徽省金寨神栗

食品有限公司提供,批号 9805011。尼莫地平为山东新华制药股份有限公司产品。硫代巴比妥酸为上海生化试剂二厂产品。N-1 萘乙二胺盐酸盐为上海化学试剂分装厂产品。总蛋白测定试剂盒、SOD、过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

2 动物 昆明种小鼠,体重 (30.0 ± 3.0) g,雌、雄各半,由安徽医科大学实验动物中心提供。

3 小鼠反复脑缺血再灌注模型的制备 按文献^[3]方法略加改进。取清醒小鼠仰位固定,行颈部正中切口,分离双侧颈总动脉,穿线备用。用橡皮泥固定,拉紧丝线,阻断血流,10min 后松线使血液复灌 20min,如此反复 3 次;假手术组只分离双侧颈总动脉,不阻断血流。

4 分组与给药方法 小鼠随机分为 6 组,即假手术组、模型组、尼莫地平组及 FGE 小、中、大剂量组,各

*安徽省自然科学基金资助课题(No.95-医-20);部分内容获安徽医科大学 98 年度青年教师基金资助

安徽医科大学药理教研室(合肥 230032)

组分别灌胃给予生理盐水、尼莫地平 100mg/kg, FGE25、50、100mg/kg, 假手术组不给药, 均每天 1 次, 连续 21 天。末次给药后 40min 均行反复脑缺血术, 术后 24、48h 进行行为学检测。

5 避暗试验 按文献^[3]方法。记录小鼠从放入明室到进入暗室遭受电击的步入潜伏期(step through latency, STL)、小鼠首次遭电击后从暗室逃入明室的逃避潜伏期(escape latency, EL)、5min 内进入暗室遭电击次数(错误次数)及遭受电击的累积刺激时间(cumulated stimulation time, CST)作为学习成绩, 24h 后重复测试, 作为记忆成绩。刺激电压为 40V。

6 跳台试验 按文献^[3]方法, 记录小鼠跳上平台的潜伏期(EL)和 5min 内小鼠从台上跳下遭受的电击数(错误次数)作为学习成绩; 24h 后将动物轻放于平台上, 底部栅板通电, 记录小鼠跳下平台的潜伏期(step down latency, SDL)和跳上平台的 EL 及 5min 内的错误次数, 作为记忆成绩。刺激电压为 40V。

7 脑组织生化指标检测 各组于术后 72h 行断头取脑, 0℃ 条件下取前脑, 制成匀浆后置 -20℃ 冰箱保存, 待测各项生化指标。采用硫代巴比妥酸法^[4]测定丙二醛(MDA)含量; Green 法^[5]测定一氧化氮(NO)含量; 比色法^[6]测定前列腺素 E₂(PGE₂)含量; 总蛋白含量测定、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性测定均按试剂盒说明书, 分别采用双缩脲法、黄嘌呤氧化酶法及比色法测定。

8 统计学处理 采用组间 *t* 检验。

结 果

1 FGE 对反复脑缺血再灌注小鼠避暗试验的影响 见表 1。与假手术组比较, 模型组小鼠学习训练中错误次数明显增多, CST 明显延长; 记忆测试中 STL 明显缩短, 错误次数明显增多, CST 明显延长; 表明反复脑缺血再灌注造成了小鼠明显的学习、记忆功能障碍。与模型组比较, FGE 中、大剂量组学习训练中 EL 明显缩短, FGE 小、中、大剂量组、尼莫地平组错误次数明显减少; 记忆测试中 FGE 小、中、大剂量组、尼莫地平组 STL 明显延长, CST 明显缩短, 错误次数明显减少, FGE 小、中、大剂量组 EL 亦明显缩短; 表明 FGE 可以明显改善反复脑缺血再灌注小鼠的学习、记忆功能。

2 FGE 对反复脑缺血再灌注小鼠跳台试验的影响 见表 2。与假手术组比较, 模型组小鼠学习训练中 EL 明显延长, 错误次数明显增多; 记忆测试中 EL 明显延长, 错误次数明显增多。与模型组比较, 学习训练中 FGE 小、中、大剂量组、尼莫地平组错误次数明显减少; 记忆测试中 FGE 小、中剂量组错误次数明显减少, SDL 明显延长, FGE 中剂量组 EL 明显缩短; 表明 FGE 对反复脑缺血再灌注小鼠的学习、记忆功能具有明显的增强作用。

3 FGE 对反复脑缺血再灌注小鼠脑组织脂质过氧化和抗氧化酶活性及 PGE₂ 的影响 见表 3。与假

表 1 FGE 对反复脑缺血再灌注小鼠避暗试验的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	学习功能				记忆功能			
		STL(s)	EL(s)	错误(次)	CST(s)	STL(s)	EL(s)	错误(次)	CST(s)
假手术	9	30.16±11.26	4.05±2.66	3.67±1.50	9.09±5.04	24.14±11.73	3.04±1.86	3.78±1.30	10.90±5.71
模 型	8	20.14±9.56	5.87±3.57	6.87±2.95 [△]	38.76±47.96 [△]	12.36±5.70 [△]	5.02±3.51	6.62±3.20 [△]	27.19±17.53 [△]
尼莫地平	8	32.86±15.88	3.49±2.23	3.43±1.72 [*]	8.74±6.40	99.31±58.17 ^{**△△}	2.17±1.51	2.96±1.34 [*]	5.00±2.18 ^{*△}
FGE 小	8	24.49±15.78	4.80±2.29	3.62±1.51 [*]	16.93±13.56	115.81±97.98 ^{*△}	1.93±0.94 [*]	2.12±1.64 ^{**}	5.17±6.75 [*]
中	8	30.91±17.30	1.66±0.58 ^{**△}	1.88±1.13 ^{**△△}	4.79±1.69 [△]	201.09±102.07 ^{**△△}	0.98±0.39 ^{**△△}	1.25±0.71 ^{**△△}	1.39±0.85 ^{**△△}
大	8	31.75±11.79	1.65±1.88 [*]	2.00±0.76 ^{**△}	6.79±5.62	196.23±113.19 ^{**△△}	1.36±1.03 ^{*△}	1.12±0.83 ^{**△△}	1.74±0.97 ^{**△△}

注: 与模型组比较, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01; 与假手术组比较, [△] *P* < 0.05, ^{△△} *P* < 0.01

表 2 FGE 对反复脑缺血再灌注小鼠跳台试验的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	学习功能		记忆功能		
		EL(s)	错误(次)	EL(s)	SDL(s)	错误(次)
假手术	8	0.25±0.16	1.88±0.83	0.07±0.14	1.32±0.89	1.25±1.16
模 型	8	1.52±0.55 ^{△△}	8.00±4.24 ^{△△}	1.25±0.35 ^{△△}	0.81±0.64	4.56±1.81 ^{△△}
尼莫地平	9	1.39±0.32 ^{△△}	3.62±2.61 [*]	1.21±0.18 ^{△△}	1.38±0.73	3.50±1.77 [△]
FGE 小	8	1.32±0.23 ^{△△}	3.25±2.37 [*]	0.81±0.52 ^{△△}	1.61±0.51 [*]	2.75±1.39 [*]
中	8	1.42±0.46 ^{△△}	3.00±2.78 [*]	0.65±0.38 ^{**△△}	1.54±0.74 [*]	1.87±1.81 ^{**}
大	8	1.40±0.56 ^{△△}	3.71±2.81 [*]	1.03±0.69 ^{△△}	1.22±0.66	2.87±2.42

注: 与模型组比较, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01; 与假手术组比较, [△] *P* < 0.05, ^{△△} *P* < 0.01

表 3 FGE 对反复脑缺血再灌注小鼠脑组织 MDA、NO、PGE₂ 含量和 SOD、CAT 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MDA (nmol/kg pro)	NO (nmol/mg pro)	PGE ₂ (μ mol/mg pro)	SOD (NU/mg pro)	CAT (u/g pro)
假手术	9	1.30 $\pm$ 0.12	0.52 $\pm$ 1.13	10.24 $\pm$ 1.15	5.64 $\pm$ 0.73	39.76 $\pm$ 22.75
模型	8	1.54 $\pm$ 0.15 ^{△△}	8.22 $\pm$ 1.10 [△]	13.42 $\pm$ 1.12 ^{△△}	1.74 $\pm$ 0.81 ^{△△}	18.91 $\pm$ 15.71 [△]
尼莫地平	8	1.29 $\pm$ 0.20 [*]	6.71 $\pm$ 1.24 [*]	12.48 $\pm$ 2.36 [△]	3.01 $\pm$ 1.34 [*]	29.63 $\pm$ 24.89
FGE 小	8	1.24 $\pm$ 0.16 ^{**}	6.67 $\pm$ 1.39 [*]	12.64 $\pm$ 2.13	3.50 $\pm$ 1.47 [*]	37.84 $\pm$ 17.51 [*]
中	8	1.23 $\pm$ 0.11 ^{**}	5.60 $\pm$ 0.94 ^{**}	10.10 $\pm$ 2.13 [*]	5.81 $\pm$ 0.69 ^{**}	48.82 $\pm$ 25.46 [*]
大	8	1.26 $\pm$ 0.29 [*]	6.84 $\pm$ 1.03 [*]	11.49 $\pm$ 2.00 [*]	2.73 $\pm$ 1.12 [*]	38.70 $\pm$ 22.36

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与假手术组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

手术组比较,模型组小鼠 MDA、NO、PGE₂ 含量明显升高, SOD、CAT 活性明显降低, 表明反复脑缺血再灌注使脑内脂质过氧化明显增强。与模型组比较, FGE 小、中、大剂量组、尼莫地平组可不同程度地降低升高的 MDA、NO 含量, 同时还可使降低的 SOD、CAT 活性升高, 表明 FGE 可以明显增强抗氧化酶活性, 抑制脂质过氧化过程。与模型组比较, FGE 中、大剂量组可明显降低升高的 PGE₂ 含量。

讨 论

脑缺血时体内通过黄嘌呤氧化酶系统及花生四烯酸代谢瀑布等各种途径产生大量自由基⁽⁷⁾, 过量自由基过度攻击细胞膜脂质不饱和脂肪酸, 使脂质过氧化加强, 脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量升高, 从而严重破坏细胞功能。SOD、CAT 是体内重要的抗氧化酶, 可有效清除·OH、O₂⁻、H₂O₂ 等多种自由基, 减轻缺血缺氧时脂质过氧化的损伤。因此 MDA、NO 含量及 SOD、CAT 活性的高低是评价脑组织损伤及药物疗效的重要指标。

本研究结果显示 FGE25~100mg/kg 可明显改善反复脑缺血再灌注小鼠的学习、记忆功能, 明显抑制其脑组织 MDA、NO 含量的升高, 并增强 SOD、CAT 活性。表明 FGE 对小鼠反复脑缺血再灌注损伤有明显的保护作用, 其机制可能与抗脂质过氧化, 增强抗氧化酶活性有关。

有研究表明脑缺血时脑中 NO 含量及游离脂肪酸尤其是花生四烯酸(AA)水平急剧增加^(8,9), NO、AA 在脑缺血时均有极强的细胞毒作用, AA 在脑缺血再灌注时产生大量前列腺素(PGs)和白三烯(LTs)类物质, LTs 可破坏血脑屏障而促进脑水肿的形成, PGE₂ 可加重自由基致水肿的作用。NO 亦可刺激 PGE₂ 合成增

加, 在某种程度上尤其对 PGE₂ 的作用至关重要⁽¹⁰⁾。

本研究结果显示 FGE50~100mg/kg 可明显降低反复脑缺血再灌注脑组织异常升高的 NO、PGE₂ 含量。提示 FGE 对脑缺血损伤的保护作用可能与抑制 NO、PGE₂ 含量升高也有一定关系。

参 考 文 献

- 曹仁存, 郑彩梅. 自由基与兴奋性氨基酸在反复脑缺血神经元损伤中的作用. 成都军区总医院院刊 1997;16(1):1—3.
- 谢人明, 汤臣康, 马树德, 等. 银杏液对动物脑循环作用的研究. 中草药 1986;17(8):23—26.
- 徐叔云主编. 药理实验方法学. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1991:660—665.
- 陈顺志, 金有余, 李常涪, 等. 过氧化脂质 TBA 显色的三种方法学比较. 临床检验杂志 1984;7(4):8—10.
- Green LC, Tannebaum SR, Goldman P. Witrafte synthesis in germfree and conventional rat. Science 1981;20:56—61.
- 吉林医科大学化学教研室新药组. 前列腺素 E₂ 生物合成. 吉林医科大学学报 1976;2:24—28.
- 卞留贯, 张天锡, 崔尧元. 兴奋性氨基酸与自由基在致脑缺血损伤中的相关性. 国外医学脑血管分册 1994;2(3):139—142.
- Nishida A, Emoto K, Shimizu M, et al. Brain ischemia decrease phosphatidylinositol-phospholipase D but not phosphatidylinositol-phospholipase C in rats. Stroke 1994; 25:1247—1253.
- 田恒力. 一氧化氮与脑缺血. 国外医学脑血管分册 1995;3:59—62.
- Kelner MJ, Ugluk SF. Mechanism of prostaglandin E₂ release and increase in PGH₂/PGE₂ isomerase activity by PDGF: Involvement of nitric oxide. Arch Biochem and Biophys 1994; 312:240—243.

(收稿:1999-05-14 修回:2000-01-10)