

银杏叶提取物联合依达拉奉对气虚血瘀型脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织 NO 及 NOS 表达的影响

侯 晞¹ 梁 枫¹ 李爱剑¹ 王 灿¹ 戴体俊² 桂常青³

[摘要]目的:观察银杏叶提取物(ginkgo biloba extraction, EGb)与依达拉奉(edaravone, ED)联合应用对气虚血瘀型脑缺血再灌注损伤大鼠模型脑组织一氧化氮(NO)及一氧化氮合酶(NOS)表达的影响。方法:采用饥饿、疲劳、高脂饮食等复制大鼠气虚血瘀模型,再用线栓法阻断大脑中动脉 2 h,再灌注治疗 72 h 后,观察 EGb、ED 及 EGb + ED 组对气虚血瘀型脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织 NO 及 NOS 表达的影响。结果:与模型组比较,EGb 和 ED 均能降低气虚血瘀型脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织 NO/诱导型 NOS(iNOS)、总 NOS(TNOS)含量,减轻神经细胞损伤($P < 0.01$),尤以两药联用效果更为显著($P < 0.01$)。结论:EGb 联合 ED 能更好地降低气虚血瘀型脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织 NO 含量,其机制可能是通过降低脑组织 iNOS、TNOS 蛋白的表达而实现清除自由基、抗氧化、减轻神经细胞损伤,共同发挥脑保护作用。

[关键词] 脑缺血;银杏叶提取物;依达拉奉;脑缺血再灌注;一氧化氮;一氧化氮合酶;大鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 743.31

[文献标识码] A

Effects of ginkgo biloba extraction combined with edaravone on expression of NO and NOS in Qi deficient and blood stasis type of rat brain tissue with cerebral ischemia reperfusion injury

HOU Xi¹, LIANG Feng¹, LI Ai-jian¹, WANG Can¹, DAI Ti-jun², GUI Chang-qing³

(1. Medical Function Department, Anhui College of Chinese Traditional Medicine, Wuhu Anhui 241000;

2. Department of Anesthesia, Xuzhou Medical College, Xuzhou Jiangsu 221002;

3. Functional Laboratory, Wannan Medical College, Wuhu Anhui 241000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of ginkgo blades extraction (EGb) combined with edaravone (ED) on expressions of NO and NOS in Qi deficient and blood stasis type of rat brain tissue with cerebral ischemia reperfusion injury. **Methods:** Rats model with Qi deficient and blood stasis were reproduced by hunger, fatigue and high-fat diet. Then the suture method was used to block up the middle cerebral artery for 2 hours, followed by 72 hours' reperfusion therapy. The expressions of NO and NOS in brain tissue were evaluated on the rats model treated with EGb, ED and EGb combined with ED respectively. **Results:** Compared with model group, EGb and ED all decreased the levels of NO/iNOS and TNOS in Qi deficient and blood stasis type of rat brain tissues with cerebral ischemia reperfusion injury, and the injuries to neurons ($P < 0.01$). The effect was significant especially in group of EGb combined with ED ($P < 0.01$). **Conclusions:** EGb associated ED can obviously inhibit the levels of NO in Qi deficient and blood stasis type of rat brain tissues with cerebral ischemia reperfusion injury, and the mechanism of it may be through reducing the expression of iNOS and TNOS proteins in brain tissue to remove the free radicals, reduce nerve cell damages and protect brain tissue.

[Key words] cerebral ischemia; ginkgo blades extraction; edaravone; cerebral ischemia reperfusion; nitrogen monoxidum; nitric oxide synthase; rats

缺血性脑血管疾病是一种常见病、多发病,严重危害人类健康和生命。目前,中医治疗缺血性脑血管病的常用药物有银杏叶、丹参、红花、葛根、川芎等。中药的优点是急性期和恢复期均可应用,不会引起“盗血”现象,不会使脑血肿进一步加重,不会

使血压进一步降低而影响脑灌注;缺点是药物有效成分的纯度不如西药高,效果不如西药理想,起效不如西药快。西医治疗常用的药物有阿司匹林、尼莫地平,主要缺点是在脑梗死的急性期,特别是 72 h 内,有引起“盗血”的可能性,会导致症状加重,长时间应用可引起毒副反应^[1]。因而,临床常采用中西医结合治疗。依达拉奉(edaravone, ED)为强效自由基清除剂,能阻断氧自由基介导的脑损伤,抑制脑缺血/再灌注时的脑水肿,对脑组织损伤有保护作用^[2]。用于治疗急性脑梗死疗效显著,但依达拉奉治疗时间窗较短,近年来临床多采用依达拉奉联合

[收稿日期] 2011-02-18

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(KJ2009B208Z)

[作者单位] 1. 安徽中医药高等专科学校基础教学部 机能学教研室,安徽 芜湖 241000; 2. 徐州医学院 麻醉学系,江苏 徐州 221002; 3. 皖南医学院 机能实验室,安徽 芜湖 241000

[作者简介] 侯 晞(1960-),女,副教授。

银杏叶注射液治疗急性脑梗死,其疗效比单用银杏叶注射液更确切^[3-6]。本实验选用大鼠气虚血瘀型脑缺血再灌注损伤模型,观察银杏叶提取物(ginkgo biloba extraction, EGb)与ED联合应用对气虚血瘀型脑缺血再灌注损伤大鼠模型脑组织一氧化氮(NO)及一氧化氮合酶(NOS)表达的影响。

1 材料与方 法

1.1 动物和分组 健康SD大鼠,体重180~220g,月龄8个月,雌雄各半,由河南省实验动物中心提供,合格证号:scxk(豫)2005~0001。实验前先行饲养观察3d,随机分成假手术组、模型组、EGb组、ED组、EGb+ED组,每组14只,共70只。

1.2 主要药剂和仪器 EGb注射液:台湾济生化学制药厂股份有限公司,批号:080825;ED注射液:南京先声东元制药有限公司,批号:080511;胆固醇由合肥博美生物科技有限责任公司提供;1,2-丙二醇由国药集团化学试剂有限公司提供,批号:T20080825;猪胆盐由国药集团化学试剂有限公司提供,批号:F20070517;吐温-80由天津市百世化工有限公司提供。脂肪乳剂配制:每100ml中加入胆盐2g,吐温-80 20ml,丙二醇20ml,胆固醇10g,猪油20g,蒸馏水适量加热搅拌溶解。NO试剂盒、NOS试剂盒、考马斯亮蓝蛋白均由南京建成生物工程研究所,南京建成科技有限公司提供,批号:20090715;HJ-5型多功能搅拌器:江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司;YP1201N型电子天平:上海精密科学仪器有限公司;722s型分光光度计:上海棱光技术有限公司。

1.3 气虚血瘀模型制作 根据王键等^[7]提出的气虚血瘀证模型制作方法,采用饥饿、疲劳、惊恐、高脂饮食,持续10d,制作气虚血瘀大鼠模型。

1.4 局灶性脑缺血再灌注模型制作 根据改良Longa法^[8],于气虚血瘀模型制作第11天时制作大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型^[6]。假手术组只分离不插栓塞线。

1.5 给药剂量和方法 制作大脑中动脉阻断前30min尾静脉给药1次,造模后3h尾静脉给药1次,以后每天尾静脉给药1次,连续3d。对照组给生理盐水。各组给药剂量,EGb组:EGb注射液按20mg/kg静脉注射;ED组:ED注射液按3mg/kg静脉注射;EGb+ED组:上述2组剂量分次静脉注射;假手术组和模型组分别静脉注射等量生理盐水。于治疗后第4天用8%水合氯醛按3.5ml/kg,静脉

麻醉,处死大鼠,并迅速开颅取脑。脑组织匀浆制作:每组随机选取6只大鼠,取双侧大脑半球,称重后用生理盐水混合,质量体积比为1:10,低温下制作脑组织匀浆悬液,冷冻离心4000r/10min,取上清液,-20℃保存。

1.6 脑组织NO含量的测定 将离心后的脑组织匀浆液置于室温下溶化,取上清液0.5ml,采用硝酸还原酶法,严格按照NO试剂盒说明书测定脑组织匀浆中NO含量,计算方式:NO($\mu\text{mol/gprot}$) = [(测定管吸光度 - 空白管吸光度) / (标准管吸光度 - 空白管吸光度)] × 标准品浓度 / 样本蛋白含量。

1.7 脑组织NOS含量的测定 严格按照NOS试剂盒说明书操作。总NOS(TNOS)、诱导型NOS(iNOS)活力计算根据说明书公式求得。

1.8 统计学方法 采用方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 EGb和ED对气虚血瘀型脑缺血再灌注损伤大鼠NO表达的影响 脑缺血再灌注后,模型组脑组织NO的表达较假手术组明显升高($P < 0.01$);EGb组、ED组、EGb+ED组治疗72h与模型组比较脑组织NO的表达明显下降($P < 0.01$);其中,EGb+ED组比单独应用EGb组、ED组降低更为显著($P < 0.01$)。

表1 EGb和ED对气虚血瘀型脑缺血再灌注损伤大鼠NO表达的影响($n_i = 6; \bar{x} \pm s$)

分组	剂量 (mg/kg)	NO ($\mu\text{mol/gprot}$)	F	P	MS _{组内}
假手术组	—	15.36 ± 1.50 **			
模型组	—	29.18 ± 1.85			
EGb组	20	20.45 ± 1.96 **	71.64	<0.01	2.640
ED组	3	19.67 ± 1.81 **			
EGb+ED组	20+3	15.53 ± 0.64 ^{***}			

q 检验:与模型组比较** $P < 0.01$;与EGb组比较## $P < 0.01$;与ED组比较 $\Delta\Delta P < 0.01$

2.2 EGb和ED对气虚血瘀型脑缺血再灌注损伤大鼠NOS表达的影响 假手术组仅有少量的iNOS表达,脑缺血再灌注后,模型组脑组织iNOS及TNOS的表达较假手术组明显升高($P < 0.01$),EGb组、ED组、EGb+ED组治疗72h与模型组比较脑组织iNOS、TNOS的表达均有不同程度的下降($P < 0.01$),其中EGb+ED组降低iNOS、TNOS的表达较单独应用EGb组、ED组更为显著($P < 0.01$)。

表 2 EGb 和 ED 对气虚血瘀型脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织 NOS 表达的影响 ($n_i = 6; \bar{x} \pm s$)

分组	剂量 (mg/kg)	TNOS (u/mgprot)	iNOS (u/mgprot)
假手术组	—	4.11 ± 0.77**	1.68 ± 0.16**
模型组	—	18.95 ± 1.45	7.36 ± 0.68
EGb 组	20	11.10 ± 1.43**	3.30 ± 0.44**
ED 组	3	12.16 ± 1.63**	3.75 ± 0.45**
EGb + ED 组	20 + 3	9.45 ± 1.13 ^{△△#}	2.33 ± 0.41 ^{△△###}
<i>F</i>	—	98.84	139.10
<i>P</i>	—	<0.01	<0.01
<i>MS</i> 组内	—	1.735	0.210

q 检验: 与模型组比较 * $P < 0.01$; 与 EGb 组比较 # $P < 0.05$ # $P < 0.01$ 与 ED 组比较 $\Delta \Delta P < 0.01$

3 讨论

研究^[9]表明, 缺血再灌注损伤是一种常见的临床病理生理过程, NO/NOS 等细胞因子在脑缺血再灌注损伤中起着重要作用。NO 是一种新的自由基、神经递质, 在体内以左旋精氨酸为底物, 经 NOS 催化而合成。颅脑损伤时, NO/NOS 具有典型的“双重作用”, 其有利的是扩张血管、调节脑血流、改善微循环及抗血小板聚集和黏附, 有利于疾病的恢复。但过量的 NO 则以自由基的形式对神经细胞产生毒性。一般认为, 颅脑损伤时神经毒性作用占主导地位^[10]。过量的自由基使神经细胞膜磷脂中的不饱和脂肪酸过氧化, 破坏细胞膜结构, 加重脑组织损伤及脑水肿, 加速神经细胞凋亡和进行性的缺血损害。因此, 清除自由基是减轻脑缺血损伤及脑水肿的重要措施^[11]。

NOS 分为结构型 NOS (cNOS) 和 iNOS, cNOS 主要存在于神经元和内皮细胞内, 生物活性依赖钙调蛋白, 又分为神经原型 NOS (nNOS) 和内皮型 NOS (eNOS); 而 iNOS 主要存在于巨噬细胞内, 常由细胞因子诱导, 生物活性不依赖钙调蛋白, 为非钙离子依赖型。研究^[12]表明, iNOS 能介导缺血晚期神经元损伤。李净等^[13]研究表明, 再灌注时诱导 eNOS、iNOS 蛋白同时大量表达, 并随再灌注时间延长均有所逐渐减弱趋势。由于脑缺血再灌注损伤后, 损伤区能量代谢障碍, ATP 缺乏, 引起 NOS 脱磷酸化, 从而激活 NOS, 产生大量的 NO, 这可能是颅脑损伤后 NO 升高的主要原因^[10]。过量的 NO 通过与含铁血红素形成复合物、亚硝化 DNA 及过氧化亚硝酸阴离子等而导致神经毒性作用^[14]。

EGb 是从银杏科植物种子中分离、纯化的一种

混合物, 主要有效成分为类黄酮和萜内酯, 具有清除自由基, 扩张血管, 增加脑血流量, 改善脑缺血、缺氧, 减轻脑水肿, 拮抗血小板活化因子、影响神经介质和改善学习记忆等作用^[15]。ED 是一种新型的自由基清除剂, 能捕获羟自由基形成更稳定而毒性作用低的产物, 因其强大的神经保护效能, 使其在多种脑损伤模型治疗实验中得到广泛应用^[16]。

通过前期血液学、病理学等研究显示, EGb 联合 ED 组能改善脑缺血再灌注损伤大鼠气虚血瘀症状和神经功能障碍; 改善脑组织病理形态; 通过降低血液中白细胞数和中性粒细胞数, 阻止白细胞浸润; 降低红细胞数和加快血沉, 而降低血液黏稠度, 减少红细胞聚集或改善红细胞变形; 降低血小板数和血小板压积, 抑制血小板聚集, 防止脑缺血/再灌注后血栓形成^[6]。本文结果显示, 气虚血瘀型脑缺血再灌注损伤大鼠 72 h 模型组脑组织 NO/iNOS 蛋白的表达明显增加, 采用 EGb 和 ED 治疗, 能降低脑组织 NO/iNOS、TNOS 蛋白的表达, 尤以两药联用最为显著, 提示 EGb 和 ED 均能降低脑缺血再灌注损伤模型鼠脑组织 NO 含量。

[参 考 文 献]

- [1] 周庆萍, 陆建锋, 王会平, 等. 银杏叶提取物对脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 浙江大学学报: 医学版, 2010, 39(4): 445.
- [2] Edaravone acute infarction study group. Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction, randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenter[J]. Cerebrovasc Dis, 2003, 15(3): 222-229.
- [3] 马玉龙. 依达拉奉联合银杏叶注射液治疗脑梗死的疗效观察[J]. 临床合理用药, 2009, 2(15): 61.
- [4] 李云, 李宏, 杜伟. 依达拉奉联合银杏叶注射液治疗急性脑梗死疗效观察[J]. 延安大学学报: 医学科学版, 2009, 7(4): 21-24.
- [5] 王斌, 赵军波, 王小明. 依达拉奉联合银杏叶注射液治疗急性脑梗死疗效观察[J]. 实用心脑血管病杂志, 2010, 18(8): 1113-1114.
- [6] 侯晞, 梁枫, 李爱剑, 等. 银杏叶提取物联合依达拉奉对气虚血瘀型脑缺血/再灌注大鼠血液学的影响[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(8): 1049-1052.
- [7] 王键, 赵辉, 李净, 等. 多因素复合制作气虚血瘀证脑缺血动物模型的实验研究[J]. 中国实验动物学报, 2001, 9(4): 216-220.
- [8] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [9] Zhao LR, Spellman S, Kim J, et al. Synthetic fibronectin peptide exerts neuroprotective effects on transient focal brain ischemia in rats[J]. Brain Res, 2005, 1054(1): 1-8.
- [10] 秦信贵, 肖顺武. 脑缺血再灌注损伤大鼠血清及脑组织 NO/iNOS 变化研究[J]. 中国现代医生, 2009, 47(6): 34-35.

[文章编号] 1000-2200(2011)07-0676-04

· 基础医学 ·

抑制磷脂酰肌醇-3 激酶通路减弱乙醇后处理的心肌保护作用

胡俊锋¹, 王晓梅², 叶红伟², 姜翠荣², 姜丽娜³, 高 琴², 李正红²

[摘要]目的:探讨抑制磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase ,PI3K) 途径是否减弱乙醇后处理的心肌保护作用。方法:采用离体大鼠心脏 Langendorff 灌注方法,局部结扎冠状动脉左前降支 30 min,再灌注 120 min 复制心肌缺血/再灌注模型。测定心室动力学指标和再灌注期间冠状动脉流出液中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase ,LDH) 含量。结果:与单纯缺血/再灌注相比,乙醇后处理明显促进了左心室发展压、左心室内压最大上升和下降速率、左心室做功量的恢复,降低再灌注期冠状动脉流出液中 LDH 的释放($P < 0.01$);PI3K 抑制剂渥曼青霉素减弱了乙醇后处理的作用,抑制了心室动力学指标的恢复($P < 0.05 \sim P < 0.01$),LDH 释放增多($P < 0.01$)。结论:抑制 PI3K 通路减弱了乙醇后处理的心肌保护作用。

[关键词] 心肌再灌注损伤;乙醇后处理;磷脂酰肌醇-3 激酶;渥曼青霉素;心肌缺血

[中国图书资料分类号] R 542.2; R 331.33 [文献标识码] A

Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase pathway attenuated the cardioprotection of ethanol postconditioning in isolated rat hearts

HU Jun-feng¹, WANG Xiao-mei², YE Hong-wei², JIANG Cui-rong², JIANG Li-na³, GAO Qin², LI Zheng-hong²

(1. Department of Respiratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004;

2. Department of Physiology, 3. Department of Pathophysiology Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether the cardioprotection of ethanol postconditioning can be attenuated by inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase(PI3K) pathway in isolated rat hearts subjected to ischemia and reperfusion. **Methods:** Hearts isolated from male Sprague-Dawley rats were perfused on a langendorff apparatus and subjected to 30 minutes of regional ischemia(occlusion of left anterior descending artery) followed by 120 minutes of reperfusion. The ventricular hemodynamic parameters and lactate dehydrogenase(LDH) release during reperfusion were measured. **Results:** In contrast to ischemia and reperfusion, ethanol postconditioning improved the recovery of left ventricular developed pressure, maximal rise/fall rate of left ventricular pressure, rate pressure product and reduced LDH release during reperfusion($P < 0.01$). Administration of PI3K inhibitor wortmannin attenuated the effect of ethanol postconditioning, the recovery of hemodynamic parameters were inhibited($P < 0.05 - P < 0.01$), LDH release was increased($P < 0.01$). **Conclusions:** These findings indicate that inhibition of PI3K pathway can attenuate the cardioprotection of ethanol postconditioning.

[Key words] myocardial reperfusion injury; ethanol postconditioning; phosphatidylinositol-3 kinase; wortmannin; myocardial ischemia

[收稿日期] 2011-03-07

[基金项目] 安徽省自然科学基金资助项目(090413097)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院第一附属医院 呼吸病科,安徽 蚌埠 233004;蚌埠医学院 2. 生理学教研室 3. 病理生理学教研室,安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 胡俊锋(1973-) 男,硕士,讲师,副主任医师。

[通讯作者] 李正红,博士,硕士研究生导师,副教授。E-mail: lizhbbmc@yahoo.com.cn

心肌缺血/再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, I/R) 是心血管病理生理学中一个重要的病理过程,它涉及许多临床常见疾病,包括冠状动脉痉挛、心肌梗死后溶栓或介入治疗、冠状动脉旁路移植术、体外循环下心脏手术以及心脏骤停后心肺复苏等。介导心肌 I/R 的信号转导途径十分复杂,是目前研究的热点问题之一。磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B(phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase

[11] 马福元,张林亭. 依达拉奉对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 济宁医学院学报, 2007, 30(3): 215-216.

[12] Samdani AF, Danson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in model of focal ischemia[J]. Stroke, 1997, 28(6): 1283-1288.

[13] 李净,李小亮,胡建鹏,等. 脑络欣通对气虚血瘀证脑缺血再灌注损伤大鼠一氧化氮和神经细胞凋亡的影响[J]. 中国中医药科技, 2007, 14(4): 248.

[14] Solomon HS. Nitric oxide: first in new class of neurotransmitters

[J]. Science, 1992, 257(5069): 494-496.

[15] 朱卫,张晓彪. 银杏叶制剂对脑血管疾病治疗的概况[J]. 国外医学:脑血管疾病分册, 1998, 6(4): 235-238.

[16] Margail I, Plokine M, Lerouet D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke [J]. Free Radic Biol Med, 2005, 39(4): 429-443.

(本文编辑 姚仁斌)