

银杏叶提取物对小鼠脑缺血再灌注损伤的拮抗作用

廖红^{1*}, 高静¹, 张祖暄¹, 徐强²

(南京大学 1. 医学院, 2. 医药生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210093)

摘要: 目的 研究银杏叶提取物(EGb761)对小鼠脑缺血再灌注损伤的拮抗作用及其作用机理。方法 双侧颈总动脉加速走神经结扎法(左侧不完全结扎)造成小鼠局部脑缺血 5 min, 再灌注 30 min。DTNB法测定谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)活性; 荧光分光光度法测定脑组织线粒体膜蛋白结合钙; 被动性回避行为学模型检测小鼠记忆能力; 海马形态学观察。结果 小鼠局部脑缺血再灌注后, 海马 GSH-px 活性降低, 海马, 下丘脑和皮质线粒体膜蛋白结合钙降低, 说明结合钙升高, 海马 CA1 区神经元损伤, 小鼠的记忆能力下降。EGb761(25, 50, 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹, ig, 连续 7 d)能逆转上述变化。结论 EGb761 拮抗小鼠脑缺血再灌注损伤的作用与抗氧化及阻止线粒体膜蛋白结合钙增加有关。

关键词: 银杏; 脑缺血; 再灌注损伤; 谷胱甘肽过氧化物酶; 线粒体膜蛋白结合钙; 记忆

中图分类号: R971

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2002)04-0273-04

EGb761 是标准化的银杏叶提取物, 其主要有效成分为黄酮(24%)和萜烯类物质(6%), 作为自由基清除剂, 可抗脂质过氧化及升高抗氧化酶的活性, 如谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-px)的活性等^[1], 因此, 具有广泛的生物学效应, 尤其对中枢神经系统的损伤具有保护作用, 如可改善老年小鼠的学习记忆功能障碍^[2], 对抗脑缺血再灌注损伤, 其机理可能与抗自由基和改善脑的能量代谢等有关^[3,4]。钙离子超载在脑缺血再灌注损伤中

也起着很重要的作用, 离体研究表明: 银杏叶提取物及内酯 B 可通过降低单个神经元内游离 Ca²⁺ 浓度以对抗谷氨酸的神经毒性^[5]。但在在体情况下 EGb761 是否可通过减轻钙离子超载来抵抗脑缺血再灌注损伤仍不明了。本文采用颈总动脉加速走神经结扎法^[6], 造成小鼠不完全脑缺血, 从自由基的产生以及钙离子超载方面, 探讨 EGb761 对抗小鼠的脑缺血再灌注损伤的机理。

1 材料和方法

1.1 药品

EGb761(24%黄酮和6%萜烯类物质)购于美国 Jarrow Formulas 公司, 焦油紫为 Chroma-Gesellschaft 公司产品, Tb₄O₇ 购自英国 Johnson Matthey 公司, 其余试剂均为分析纯。

1.2 缺血-再灌模型的制备

雄性昆明小鼠(2级, 合格证号: 97002)购于东南大学实验动物中心, 饲养 2 周。实验体重为 18~22 g, 随机分为假手术组, 缺血-再灌组, EGb761 治疗组(25, 50, 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 7 d, ig, 手术前给药)。按冯亦璞等^[6]的方法制备大鼠灶性缺血模型, 造成右侧颈总动脉, 迷走神经完全结扎, 左侧颈总动脉, 迷走神经不完全结扎, 导致脑缺血, 结扎 5 min 后将丝线放松恢复颈总动脉血流造成再灌。再灌 30 min 后将小鼠处死, 迅速取出海马, 皮层及下丘脑, 用冰盐水洗涤, 冷冻于液氮中备测生化指标。在整个手术过程中小鼠体温保持在 36.5~37℃, 假手术组同样手术, 但不结扎颈总动脉及迷走神经。

1.3 谷胱甘肽过氧化物酶活性测定

海马脑区中的 GSH-px 活性采用 DTNB 法^[7]测定。

1.4 线粒体膜蛋白结合钙(Tb³⁺)测定

按密度梯度离心法^[8]制备线粒体膜, 荧光分光光度法^[9]测定线粒体膜结合 Tb³⁺ 的荧光强度。Tb³⁺ 为镧系元素, 可竞争性抑制 Ca²⁺ 与线粒体膜的

收稿日期: 2001-11-26 接受日期: 2002-05-15

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目(BK9303011)

作者简介: 廖红(1965-), 女, 副教授, 理学硕士, 主要研究方向神经生理学及药理学。

*联系作者 Tel: (025) 3593374,

E-mail: liao.hong@sohu.com

结合并具有产生荧光的特征,因此测定 Tb^{3+} 的荧光强度以反映线粒体膜蛋白结合钙的情况。Lowry 等法测定组织蛋白含量。

1.5 一次性被动回避实验测定小鼠行为活动

实验装置包括 1 个暗箱及 1 个明箱,实验前 1 d,将小鼠置于明箱中,当其步入暗箱时给予电击(AC, 36 V)直到其回到明箱,记录小鼠由明箱步入暗箱的时间(步入潜伏期,STL)。手术 24 h 后再测定 1 次,记录 STL,做为小鼠记忆能力指标,STL 超过 300 s 记为 300 s。

1.6 形态学观察

行为实验后 d 4,小鼠麻醉状态下以 10% 甲醛溶液行心脏灌流,取脑,在 10% 甲醛溶液中固定 5 d,石蜡包埋,冠状切片(6 μ m),焦油紫染色,光镜下观察海马神经元的损伤情况。

1.7 数据统计与处理

数据表示为 $\bar{x} \pm s$,组间数据差异的显著性检验采用单侧方差分析(ANOVA),STL 的组间差异采用 Mann-Whitney 检验。

2 结果

2.1 EGb761 对海马脑区 GSH-px 活性的影响

缺血-再灌显著降低海马脑区 GSH-px 的活性,预先给予 EGb761(25, 50, 100 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$, 7 d) 显著抑制缺血-再灌引起的海马脑区 GSH-px 活性降低(表 1),表明 EGb761 可显著抑制海马脑区自由基的产生。

2.2 EGb761 对线粒体膜蛋白结合 Ca^{2+} 的影响

如表 2 所示,缺血-再灌组脑组织线粒体膜蛋白

Tab 1. Effect of EGb761 on glutathione peroxidase (GSH-px) activity of hippocampus subjected to focal cerebral ischemia-reperfusion

Group	Dose of EGb761 / $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$	GSH-px activity / $mmol \cdot min^{-1} \cdot g^{-1}$ protein
Sham-operation	—	21.9 \pm 1.8 ^{**}
I-R	—	18.1 \pm 1.1
EGb+I-R	25	19.8 \pm 1.7 [*]
EGb+I-R	50	20.3 \pm 1.4 ^{**}
EGb+I-R	100	22.2 \pm 2.1 ^{**}

EGb761 was given ig for 7 d before 5 min ischemia and 30 min reperfusion (I-R), then GSH-px activity was measured immediately. $\bar{x} \pm s$, $n=8$. ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, compared with I-R group using one-way analysis of variance(ANOVA).

结合 Tb^{3+} 荧光强度明显低于假手术组,表示线粒体膜蛋白结合 Ca^{2+} 明显高于假手术组。而 EGb761 显著抑制缺血-再灌引起的海马,皮层及下丘脑等各脑区组织线粒体膜蛋白结合 Ca^{2+} 的升高。

2.3 被动回避实验

脑缺血-再灌组小鼠的平均 STL 为 119.3 s,显著短于假手术组(219.5 s),EGb761 (50, 100 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$, 7 d) 组平均 STL 显著长于缺血-再灌组(表 3)。表明高剂量 EGb761 可减轻脑缺血-再灌引起的记忆损害。

2.4 海马形态学观察

缺血-再灌组小鼠 CA1 区神经元明显受损(图 1B),假手术组神经元无损伤(图 1A),预先给予 EGb761(50 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$, 7 d) 可防止缺血-再灌引起的 CA1 区神经元的损伤(图 1C)。

Tab 2. Effect of EGb761 on the relative fluorescent intensity of mitochondrial membrane protein-bound Tb^{3+} in discrete brain regions of mice

Group	Dose of EGb761 / $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$	Tb^{3+} relative fluorescent intensity		
		Hippocampus	Hypothalamus	Cortex
Sham-operation		54.4 \pm 6.2 ^{**}	52.8 \pm 5.0 ^{**}	58.6 \pm 4.4 ^{**}
I-R		38.2 \pm 2.1	39.6 \pm 1.4	40.1 \pm 3.6
EGb+I-R	25	40.3 \pm 3.4	41.4 \pm 3.6	44.3 \pm 3.1
EGb+I-R	50	46.4 \pm 3.8 ^{**}	48.2 \pm 5.6 ^{**}	50.2 \pm 4.6 ^{**}
EGb+I-R	100	49.2 \pm 4.2 ^{**}	50.1 \pm 4.8 ^{**}	54.4 \pm 4.1 ^{**}

EGb761 was given ig for 7 d before I-R, mitochondrial membranes were prepared and the protein-bound Tb^{3+} relative fluorescent intensities were determined. $\bar{x} \pm s$, $n=8$. ^{**} $P < 0.01$, compared with I-R group using one-way analysis of variance(ANOVA).

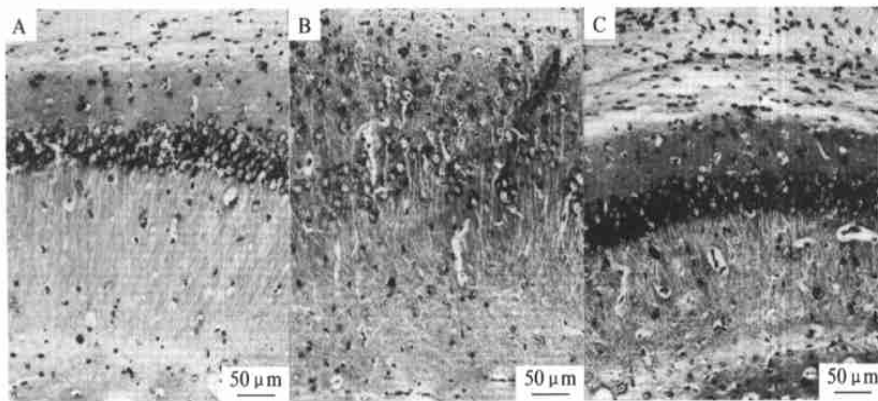


Fig 1. Photomicrographs of hippocampus mounted in paraffin and stained with cresyl violet. A: Sham-operation, neurons in CA1 region remained intact. B: Ischemia-reperfusion, majority of the neuron in CA1 region were damaged. C: EGb761 (50 mg^o kg⁻¹·d⁻¹, for 7 d) treated group, damaged neurons were decreased and CA1 pyramidal cells were preserved.

Tab 3. Alteration in step-through latency (STL) induced by ischemia-reperfusion and influence of EGb761 pretreatment in mice in one-trial passive avoidance behavior

Group	Dose of EGb761 / mg ^o kg ⁻¹ ·d ⁻¹	n	STL/ s
Sham-operation	—	8	220±54 * *
I-R	—	7	119±26
EGb+ I-R	25	7	109±31
EGb+ I-R	50	8	155±22 *
EGb+ I-R	100	8	200±60 *

EGb761 was given ig for 7 d before I-R, step-through test was carried out 24 h after I-R. $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with I-R group using the Mann-Whitney test.

3 讨论

本文采用颈总动脉加迷走神经结扎法,造成小鼠不完全脑缺血,此方法较简便而且小鼠的存活率较高。大量研究表明脑缺血-再灌可导致大量的自由基产生,而自由基产生过多主要是由于体内的抗氧化防御系统失调,如抗氧化酶活性降低以及抗氧化剂的耗竭^[10]。文献报道,EGb761作为自由基清除剂,可抗脂质过氧化及升高GSH-px的水平^[11],本文结果显示脑缺血-再灌可导致皮层,海马及下丘脑等组织GSH-px活性显著降低,而EGb761可显著抑制GSH-px活性的降低,表明EGb761具有明显的抗自由基作用,与以往的研究结果一致^[1,4]。

细胞内Ca²⁺超载在缺血-再灌引起的组织损伤

中可能担任关键角色,本研究结果发现,缺血-再灌组脑组织线粒体膜蛋白结合Tb³⁺荧光强度明显低于假手术组,表示线粒体膜蛋白结合Ca²⁺明显高于假手术组。而EGb761显著抑制缺血-再灌引起的海马,皮层及下丘脑等各脑区组织线粒体膜蛋白结合Ca²⁺的升高。线粒体膜蛋白结合Ca²⁺增加以及自由基产生过多,会导致线粒体功能障碍,引起海马神经元损伤,而海马是一个与学习记忆功能关系非常密切的脑区^[11],因此,海马神经元的损伤可能导致小鼠的记忆功能障碍。本文形态学观察可见EGb761 (50 mg^o kg⁻¹·d⁻¹,连续7 d)减轻缺血-再灌小鼠海马CA1区神经元的损伤,行为学测试也见EGb761改善缺血-再灌小鼠的记忆功能。以上结果提示:EGb761拮抗小鼠脑缺血-再灌注损伤可能与抗自由基以及降低细胞内钙水平有关。

4 参考文献:

- [1] Bilgihan A, Anicioglu A, Bliighan K, Onol M, Hasanreisoglu B, Turkozkan N. The effect of EGb761 on retinal lipid peroxidation and glutathione peroxidase level in experimental lens induced uveitis[J]. *Int Ophthalmol*, 1994, **18** (1): 21-24.
- [2] Stoll S, Scheuer K, Pohl O, Muller WE. *Ginkgo biloba* extract (EGb761) independently improves changes in passive avoidance learning and brain membrane fluidity in the aging mouse[J]. *Pharmacopsychiatry*, 1996, **29**(4): 144-149.
- [3] Loffler T, Lee SK, Noldner M, Chatterjee SS, Hoyer S, Schliebs R. Effect of *Ginkgo biloba* extract (EGb761) on glucose metabolism-related markers in streptozotocin-dam-

- aged rat brain[J] . *J Neural Transm*, 2001, **108**(12): 1457—1474.
- [4] Wang HY, Wang Y, Zhao XN, Zhang ZX, Miao YQ. Protective effects of folium Ginkgo extract on experimental cerebral ischemia of mice[J] . *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 1998, **23**(3): 169—171, inside backcover.
- [5] Zhu L, Wu J, Liao H, Gao J, Zhao XN, Zhang ZX. Antagonistic effects of extract from leaves of *Ginkgo biloba* on glutamate neurotoxicity[J] . *Acta Pharmacol Sin*(中国药理学报), 1997, **18**(4): 344—347.
- [6] Feng YP, Sun YD, Chen BT, Ye G, Zeng GY. Brain energy metabolism of cerebral ischemic mice and the effects of some drugs[J] . *Acta Pham Sin*(药理学报), 1989, **24**(2): 89—94.
- [7] Xia YM, Zhu LZ. A method for determination of glutathione peroxidase in blood and tissue[J] . *J Hyg Res*(卫生研究), 1987, **16**(4): 29—33.
- [8] Greenawalt JW. The isolation of outer and inner mitochondrial membrane[A] . In: Fleischer S, Packer L, ed. *Methods in Enzymology*(酶学方法) [M] . New York: Academic Press, 1974. 310—323.
- [9] Huang MJ, Bao J, Chen RS, Xie XY, Li XX, Liao H, *et al*. Effects of anisomycin on analgesic tolerance to electroacupuncture and drugs and on mitochondrial Ca²⁺ levels in discrete brain regions[J] . *J Nanjing Univ*(南京大学学报), 1988, **24**(3): 486—494.
- [10] Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage[J] . *Stroke*, 1996, **27**(6): 1124—1129.
- [11] Volpe BF, Davis HP, Towle A, Dunlap WP. Loss of hippocampal CA1 pyramidal neurons correlates with memory impairment in rats with ischemic or neurotoxin lesions[J] . *Behav Neurosci*, 1992, **106**(3): 457—464.

Protective effects of extract from leaves of *Ginkgo biloba* on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in mice

LIAO Hong¹, GAO Jing¹, ZHANG Zu-Xuan¹, XU Qiang²

(1. School of Medicine, 2. State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: **AIM** To investigate whether the extract from leaves of *Ginkgo biloba* (EGb761) can protect neurons from focal cerebral ischemia-reperfusion injury in mice. **METHODS** Focal cerebral ischemia(5 min)-reperfusion(30 min) injury was induced by occlusion of common carotid artery and vagus nerve(the left was occluded incompletely). The activity of glutathione peroxidase(GSH-px) of hippocampus was determined by the method of DTNB. The mitochondrial membrane protein-bound Tb³⁺ fluorescent intensity was measured by fluorospectrophotometry. One-trial passive avoidance model was carried out for determining memory retention in mice. Morphological observation of hippocampus was made with a light microscopy. **RESULTS** After cerebral ischemia-reperfusion, GSH-px activity in hippocampus was decreased and mitochondrial mem-

brane protein-bound Tb³⁺ fluorescent intensity in hippocampus, hypothalamus and cortex decreased, which indicated the increase in protein-bound Ca²⁺. Hippocampus CA1 neurons were damaged and memory retention was alleviated. However, the pretreatment with EGb761(25, 50, 100 mg ° kg⁻¹ ° d⁻¹, ig for 7 d) reduced the above changes. **CONCLUSION** EGb761 Protects neurons from focal cerebral ischemia-reperfusion injury in mice by virtue of anti-oxidation and inhibition of Ca²⁺ overloading.

Key words: *Ginkgo biloba*; cerebral ischemia; reperfusion injury; glutathione peroxidase; mitochondrial membrane protein-bound Tb³⁺, memory

Foundation item: The project supported by Natural Science Foundation of Jiangsu Province(BK9303011)

(本文编辑 董立春)