

银杏内酯注射液及其组分对大鼠缺血性脑卒中模型作用比较及对突触后致密物95表达的影响

邬春久¹, 兰新新^{2,3}, 刘科¹, 丁建花², 李慧琴^{1*}, 胡刚²

1. 成都百裕制药股份有限公司, 四川 成都 641000

2. 南京医科大学, 江苏 南京 211166

3. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: 目的 研究银杏内酯注射液(GIs)及其主要组分银杏内酯B(GB)和白果内酯(BB)对急性缺血性脑损伤的改善作用,以及GIs对突触后致密物95(PSD95)蛋白表达的影响。方法 ①采用Longa法制备大鼠大脑中动脉阻塞(tMCAO)模型,于缺血再灌注1 h后给予GIs(2.5、5.0 mg/kg)、GB(1.25、2.50 mg/kg)、BB(1.25、2.50 mg/kg),每天给药2次,连续给药3 d。于术后24、48、72 h各进行神经功能评分1次;TTC染色法测定脑梗死体积;称大鼠干湿质量,测定脑组织含水量。②大鼠随机分为假手术组、GIs单给药(2.5 mg/kg)组、模型组和GIs治疗(tMCAO+GIs 2.5 mg/kg)组,制备tMCAO模型,再灌1 h后开始ip给药,3 d内每天给药2次。分别于再灌注后24、72 h取脑,Western blotting法检测缺血半影区PSD 95蛋白表达水平。结果 ①与模型组比较,GIs及其主要组分GB、BB均显著改善tMCAO模型大鼠神经运动功能障碍,减少脑梗死体积,降低脑水肿($P < 0.05, 0.01$);同等剂量下(2.5 mg/kg),GIs治疗效应优于单组分GB、BB。②GIs组给药后胞浆PSD95蛋白水平较模型组显著升高($P < 0.05, 0.01$)。结论 GIs及其有效组分GB、BB均具有改善tMCAO大鼠急性缺血性损伤的作用,GIs的作用优于GB、BB单独用药,作用机制可能与上调PSD95蛋白表达相关。

关键词: 银杏内酯注射液;银杏内酯B;白果内酯;脑缺血再灌注;神经保护;PSD95

中图分类号: R962.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2019)06-1110-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.06.010

Effect of Ginkgolides Injection and its active constituents on postsynaptic density 95 in acute cerebral ischemic stroke

HU Chunjiu¹, LAN Xinxin^{2,3}, LIU Ke¹, DING Jianhua², LI Huiqin¹, HU Gang²

1. Chengdu baiyu pharmaceutical Co., Ltd., Chengdu 641000, China

2. Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

3. Tianjin Pharmaceutical Research Institute, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To study the effects of Ginkgolides Injection (GIs) and its main components Ginkgolides B (GB) and Baiguolide (BB) on acute ischemic brain injury, and the effects of GIs on the expression of postsynaptic dense substance 95 (PSD95). **Methods** ① A 90 min transient middle cerebral artery occlusion model (tMCAO) was established using Longa method. Rats were randomly divided into seven groups: tMCAO group, GIs (2.5, 5.0 mg/kg) groups, GB (1.25, 2.5 mg/kg) groups and BB (1.25, 2.5 mg/kg) groups. Rats were ip administered after 1 h of reperfusion, and continuously for three days. Neurological deficit score, infarct size (TTC staining) and brain water content were measured at 72 h after reperfusion. ② Rats were randomly divided into four groups: sham group, sham + GIs groups (2.5 mg/kg), tMCAO groups, and tMCAO + GIs groups (2.5 mg/kg). Rats were ip administered after 1 h of reperfusion, and continuously for three days, twice a day. The PSD 95 protein level in cerebral ischemic penumbra was measured by Western blotting at 24 and 72 h after reperfusion. **Results** ① Compared with model group, GIs and its main components GB and BB significantly improved neuromotor dysfunction, reduced cerebral infarction volume and brain edema in tMCAO model rats ($P < 0.05, 0.01$); At the same dose (2.5 mg/kg), the effect of GIs treatment was better than that of single component GB and BB. ② The level of PSD95 protein in GIs group was significantly higher than that in model group ($P < 0.05$,

收稿日期: 2019-01-22

第一作者: 邬春久, 研究方向为心脑血管药理学。

*通信作者: 李慧琴, Tel: 18981993272 E-mail: huiqin.li@baiyu.cn

0.01)。 **Conclusion** GIs and its active constituents, GB and BB have therapeutical effect in acute ischemic brain injury induced by tMCAO in rats, and GIs was better than single treatment of GB and BB. The mechanism may be related to the up-regulation of PSD95 protein expression.

Key words: Ginkgolides Injection; ginkgolide B; bilobalide; cerebral ischemia reperfusion; neuroprotection; PSD95

银杏内酯 B (Ginkgolide B, GB) 和白果内酯(bilobalide, BB)均为从银杏中提取的主要活性成分,两者对脑缺血急性期具有神经保护作用,但作用途径略有不同;GB 主要通过抗血小板聚集、抗炎、抗氧化、改善血脑屏障等多种途径共同起作用^[1-3],而 BB 主要通过保护线粒体、抗氧化应激、抑制谷氨酸兴奋毒性、抑制神经元细胞凋亡、促进内源性神经再生等途径起作用^[4-6]。银杏内酯注射液(Ginkgolides Injection, GIs),由成都百裕制药股份有限公司生产,主要有效成分为 BB(48%)和银杏内酯(GB 34%、银杏内酯 A 12%、银杏内酯 C 5%),已被证实脑缺血急性期具有神经保护作用^[7],但其确切机制目前尚不清楚,目前对于银杏内酯组分间的对比研究亦报道少见。

突触后致密蛋白 95(PSD95)是突触后致密区支架蛋白,作为锚定蛋白介导中枢神经系统中各种蛋白的互相作用。脑缺血再灌注后引起谷氨酸释放增加和摄取减少,突触后神经元谷氨酸受体过度激活,在谷氨酸的刺激下,NMDA 受体通过 PSD95 激活一系列信号分子实现其毒性作用^[8]。PSD95 目前为减少兴奋性毒性、治疗脑缺血又一受关注的治疗靶点,可以避免 NMDA 受体抑制和 NO 合成抑制等作用靶点引起的副作用^[9-11]。本实验制备大鼠大脑中动脉阻塞(tMCAO)模型,研究 GIs 对脑缺血半影区 PSD95 蛋白表达的影响,探讨 GIs 的可能作用机制,并对 GIs 及 2 种主要有效成分 GB、BB 进行治疗作用比较研究。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

GIs,成都百裕制药股份有限公司提供,每支 2 mL,含萜类内酯 10 mg,批号 20121201,使用前用无菌生理盐水稀释至相应浓度。银杏内酯 B、白果内酯均为白色粉末,成都百裕制药股份有限公司提供,使用前用 0.5% 葡甲胺 80℃水浴溶解,10%的柠檬酸水溶液调节 pH 至 8.0,用 0.5% 葡甲胺与 0.15%柠檬酸溶媒定容,无菌生理盐水稀释至所需浓度。

2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC),购于 Sigma 公司;异氟烷,山东科源制药有限公司;多聚甲醛,上海凌峰化学试剂有限公司。鼠抗 PSD

95(Abcam, AB2723, USA);鼠抗 β -actin(武汉博士德, BM0627)。

1.2 实验动物

清洁级 SD 大鼠,雄性,2 月龄,180~220 g,购自南京医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证号 SCXK(苏)2013-0005。常规饲养,室温 22~24℃,日夜照明各 12 h,适应饲养至少 1 周,待体质量达到 250~300 g 用于实验。

1.3 主要仪器

Canon 数码相机(Japan);Matrx 气体麻醉机(USA);大鼠脑缺血尼龙栓线,4037(适用于 250~280 g 大鼠),4039(适用于 280~330 g 大鼠),美国 Doccoll Corporation 公司产品。

2 方法

2.1 大鼠 tMCAO 模型的建立

参考 Longa 法^[12]制备大鼠 tMCAO 模型,大鼠禁食 6~8 h,气体麻醉机-异氟烷麻醉,剪去颈前鼠毛,碘伏消毒后作颈正中切口 2 cm,分离右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA)。结扎 ECA 远心端和 CCA 处丝线,并用电凝笔将 ECA 远心端凝断。将栓线从剪口处缓慢插入 ICA,直至有阻力出现后停止。结扎 ECA 近心端丝线固定插入的栓线,将其置于加热板上(温度控制在 27~30℃)确保其肛温达 37℃。缺血 1.5 h 后,拔出栓线,松开 CCA 处丝线恢复血流,缝合切口,常规饲养。手术中应用激光多普勒血流仪监测损伤侧脑皮质血流变化,确保模型缺血期血流量稳定维持在 10%左右,再灌注后血流量恢复至 70%以上。假手术组大鼠不插入栓线,其余操作同模型组大鼠。

2.2 分组及给药

2.2.1 GIs 及其主要组分对 tMCAO 大鼠急性期作用比较 SD 大鼠随机分为 7 组,即模型组、GIs 2.5 和 5.0 mg/kg 组、GB 1.25 和 2.5 mg/kg 组、BB 1.25 和 2.5 mg/kg 组。各组均于缺血 1.5 h 复灌 1 h 后开始 ip 不同药物,给药体积 10 mL/kg,其后 3 d 内每天给药 2 次,模型组同法给予生理盐水。

2.2.2 GIs 对 PSD95 蛋白表达的影响 大鼠随机分为假手术组、GIs 单给药组(2.5 mg/kg)、模型组和 GIs 治疗组(tMCAO+GIs 2.5 mg/kg),再灌 1 h 后开

始ip给药,其后3 d内每天给药2次。

2.3 神经功能评分

参照Bederson评分法^[13],神经功能完全正常为0分;提起鼠尾,手术对侧前肢屈曲,无法完全伸直为1分,躯体向手术对侧扭转为2分;将鼠置于地面,行走时向手术对侧转圈为3分,向手术对侧倾倒或无法自主行走,意识障碍为4分;死亡为5分。于术后24、48、72 h各评分1次,计算平均分。

2.4 脑梗死体积测定

大鼠于缺血再灌注后72 h断头取脑,去掉嗅球、小脑和低位脑干,−20℃冰冻10 min,冠状位将大脑切成6片,片厚2 mm。脑片置于1% TTC染液中,37℃染色,每隔2~3 min翻转1次,使其均匀接触到染液,待正常组织呈红色、梗死组织为白色时取出脑片,用10%多聚甲醛溶液固定1 h以上,微距拍照,用Image-Pro Plus 5.0图像分析软件测量脑片梗死面积,以每片脑片正反面梗死面积均数×片厚得出每片脑片梗死体积,再以6片脑片梗死体积之和求出整个脑梗死体积。

2.5 脑组织含水量测定

大鼠于缺血再灌注后72 h断头取脑,去掉嗅球、小脑和低位脑干,称量脑湿质量,于TTC染色及微距拍照后,将脑片置于110℃烘箱烘烤24 h,称量脑干质量,计算脑组织含水量。

脑组织含水量=(1-脑组织干质量/脑组织湿质量)

2.6 Western blotting法检测缺血半影区PSD95蛋白表达

分别于脑缺血再灌注24 h和72 h后,断头取脑,分离损伤侧缺血半影区和对照组相应区域的脑组织,称质量并匀浆,提取胞浆蛋白,BCA法测定总蛋白含量。SDS-PAGE胶进行电泳分离蛋白,利用电转系统转膜,10%脱脂奶粉-TBST(pH 7.5,含10 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、0.1% Tween-20)室温封闭1 h,分别使用一抗:鼠抗PSD95(1:1 000稀释)、鼠抗β-actin(1:1 000稀释)4℃孵育过夜,加二抗孵育,ECL发光底物染色,全自动化学发光成像系统显影分析。Image J软件分析条带灰度值。

2.7 数据统计

采用SPSS 11.0软件进行统计学分析,数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用One-way ANOVA分析各组间差异。

3 结果

3.1 GIs及其主要组分GB、BB对tMCAO大鼠神经损伤保护作用的比较

3.1.1 GIs、GB、BB对tMCAO模型大鼠神经功能评

分的影响 如表1所示,与模型组比较,GIs(2.5、5.0 mg/kg)、GB(2.5 mg/kg)和BB(2.5 mg/kg)均能显著降低tMCAO大鼠的神经运动功能评分($P<0.05$ 、 0.01),1.25 mg/kg的GB和BB作用不显著。GB、BB、GIs同等剂量下(2.5 mg/kg)神经功能评分较模型组分别降低20.83%、19.04%、35.00%,其中,GIs组大鼠神经功能评分显著低于BB组($P<0.05$);GB、BB 1.25 mg/kg组大鼠神经功能评分显著高于GIs 2.5 mg/kg组($P<0.01$)。结果提示,GB、BB、GIs均显著改善缺血性脑卒中大鼠神经功能障碍,GIs作用强于GB、BB单独用药。

表1 GIs及其主要组分GB、BB对tMCAO模型大鼠神经功能的影响

Table 1 Effects of GIs and its main components GB and BB on neurological function in tMCAO model rats

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只	神经功能评分
模型	—	13	2.92±0.08
GB	1.25	10	2.72±0.07 ^{##}
GB	2.50	9	2.31±0.20 [*]
BB	1.25	10	2.74±0.12 ^{##}
BB	2.50	9	2.37±0.15 ^{**}
GIs	2.5	10	1.90±0.09 ^{**}
GIs	5.0	11	2.27±0.09 ^{**}

与模型组比较:^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$;与GIs 2.5 mg/kg组比较:[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$

^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs GIs 2.5 mg/kg group

3.1.2 GIs、GB、BB对tMCAO模型大鼠脑梗死体积的影响 如图1、表2所示,与模型组比较,GIs(2.5、5.0 mg/kg)、GB(2.5 mg/kg)和BB(2.5 mg/kg)均能显著减少tMCAO大鼠脑梗死体积($P<0.01$),1.25 mg/kg的GB和BB作用不显著。GB、BB、GIs同等剂量下(2.5 mg/kg),脑梗死体积较模型组分别降低27.50%、22.27%、41.36%,GIs组大鼠脑梗死体积明显低于GB、BB组,其中较BB组降低具有显著性差异($P<0.05$);GB、BB 1.25 mg/kg组大鼠脑梗死体积显著高于GIs 2.5 mg/kg组($P<0.01$)。结果提示,GIs及其主要组分GB、BB均具有减少tMCAO模型大鼠脑梗死体积的作用,相同剂量下GIs的保护作用强于单用GB、BB。

3.1.3 GIs、GB、BB对tMCAO模型大鼠脑组织含水量的影响 如表3所示,GIs(2.5、5.0 mg/kg)、GB(2.5 mg/kg)和BB(2.5 mg/kg)均能显著减少tMCAO大鼠脑含水量($P<0.05$ 、 0.01),且GIs(2.5

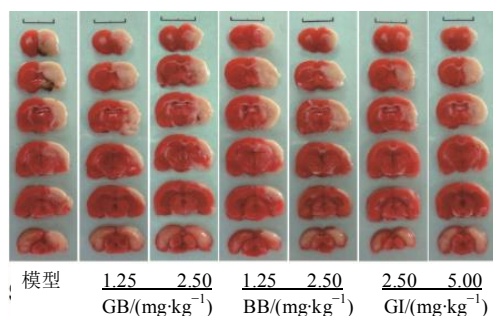


图1 GIs、GB、BB对tMCAO模型大鼠脑梗死体积的影响
Fig. 1 Effects of GIs, GB and BB on cerebral infarction volume in tMCAO model rats

表2 GIs、GB、BB对tMCAO模型大鼠脑梗死体积的影响
Table 2 Effects of GIs and its main components GB and BB on cerebral infarction volume in tMCAO model rats

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只	梗死体积/mm ³
模型	—	10	378.68±16.12
GB	1.25	10	339.41±30.04 ^{##}
GB	2.50	9	274.55±15.47 ^{**}
BB	1.25	8	343.39±20.03 ^{##}
BB	2.50	9	294.35±18.38 ^{##}
GIs	2.50	9	222.04±64.01 ^{**}
GIs	5.00	10	290.30±91.79 ^{**}

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 GIs 2.5 mg/kg 组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs GIs 2.5 mg/kg group

表3 GIs、GB、BB对tMCAO模型大鼠脑组织含水量的影响
Table 3 Effects of GIs and its main components GB and BB on brain water content in tMCAO model rats

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只	脑含水量/%
模型	—	10	80.51±0.06
GB	1.25	10	80.29±0.18 ^{##}
GB	2.5	9	79.50±0.08 [*]
BB	1.25	8	80.18±0.17 ^{##}
BB	2.5	9	79.29±0.17 [*]
GIs	2.5	9	78.85±0.27 ^{**}
GIs	5.0	10	79.21±0.21 [*]

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 GIs 2.5 mg/kg 组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs GIs 2.5 mg/kg group

mg/kg)效果最明显,1.25 mg/kg的GB和BB作用不明显。同等剂量下(2.5 mg/kg),GIs组大鼠脑含水量低于GB、BB组,2.5 mg/kg GIs组脑含水量显著低于1.25 mg/kg GB、BB单独用药组($P < 0.01$)。结果提示,GIs及其主要组分GB、BB均具有降低tMCAO模型所致大鼠脑水肿的作用。

3.2 GIs对tMCAO大鼠PSD95蛋白表达的影响

如图2所示,GIs对正常大鼠脑组织胞浆内PSD95蛋白表达水平无显著影响;tMCAO模型大鼠缺血再灌注后24、72 h,半影区组织胞浆内PSD95

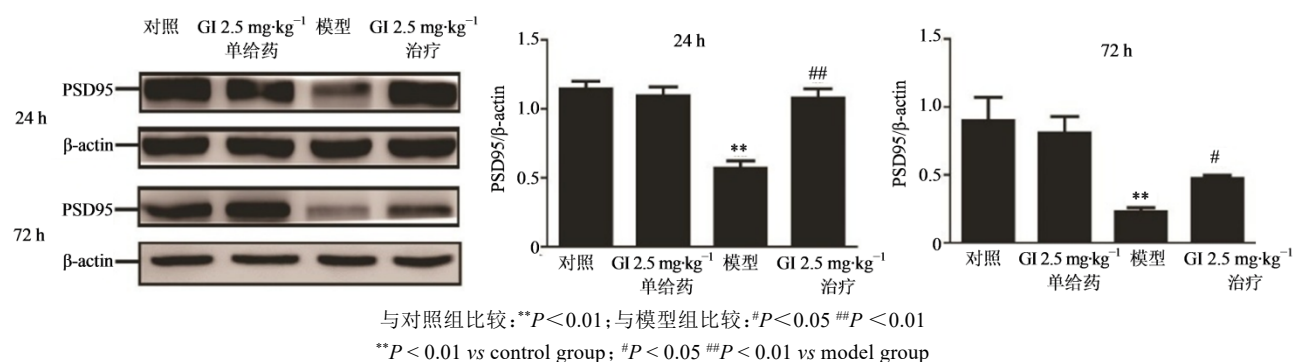


图2 GIs对tMCAO大鼠缺血半影区PSD95蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Fig. 2 Effects of GIs on expression of PSD95 protein in ischemic penumbra of tMCAO rats($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

蛋白水平较对照组显著降低($P < 0.01$);GIs组给药后相同时间点胞浆PSD95蛋白水平较模型组显著升高($P < 0.05, 0.01$)。结果提示,GIs对脑缺血所致突触结构的破坏有改善作用。

4 讨论

本研究结果证实,GIs及有效组分GB和BB均可显著改善tMCAO大鼠神经功能障碍、减少脑梗死体积及脑含水量,对脑缺血急性期均具有神经保

护作用。同时,在研究中发现,GIs的治疗效果优于同等剂量下的单组分GB和BB,提示GB和BB在卒中神经保护中作用特点、作用靶标及其相关机制可能存在不同之处,在GIs中可能发挥了协同增效作用。目前,对于银杏内酯组分间的对比及协同作用研究报道少见,对该类组分及组成的深入研究将有助于银杏内酯类药物的优化与合理应用。

PSD95是突触后致密区支架蛋白,在突触重

塑、介导及整合突触信号传递等均有重要作用,其作为锚定蛋白介导蛋白质分子间的相互作用,锚定谷氨酸兴奋性受体(NMDAR)到突触后膜特定部位,利于受体介导的突触间信号传导^[14];此外,PSD95还能招募神经一氧化氮合酶(Neuronal nitric oxide synthase, nNOS),介导兴奋性毒性的产生^[4,15]。研究显示,脑缺血损伤会降低 PSD95 蛋白的表达^[15-16],影响突触结构与功能的完整性,使突触中兴奋性氨基酸释放至突触外,并结合到突触外 NMDA 受体,激活下游细胞死亡通路,引起脑细胞死亡^[16-18],本次研究亦证实脑缺血损伤后 PSD95 蛋白的表达降低。本研究结果显示,缺血再灌注 1 h 后给予 GIs,治疗组 24、72 h 缺血半影区 PSD95 蛋白水平较模型组显著升高,说明 GIs 具有上调缺血区 PSD95 表达的作用,促进突触重塑、减轻缺血所致突触结构损伤作用。

兴奋性氨基酸是中枢神经系统的兴奋性神经递质,正常生理条件下,由细胞膜上 Glu 载体不断将细胞外 Glu 转输至神经元或胶质细胞内,细胞间液中 Glu 维持在 1 $\mu\text{mol/L}$ 左右,因此不会引起毒性作用^[19]。脑缺血后,缺血区域脑细胞由于缺血引起能量缺乏,不能维持细胞的正常功能,导致细胞过度去极化,释放大 EAA 至细胞间液中,EAA 激活 NMDA 受体,使大量钙离子内流,导致胞浆内游离钙浓度异常升高,激活 nNOS,释放 NO,引发下游级联神经毒性反应^[1,20],而 NMDAR 和 PSD95 以及 nNOS 组成 NMDAR/PSD95/nNOS 复合体,进一步激活 nNOS,释放 NO,形成正反馈机制,不断加重神经细胞损伤或死亡^[20]。有研究显示,银杏叶提取物通过上调缺血区 PSD95 的表达,促进突触重塑,使突触功能恢复正常,从而可以减少释放至细胞间液的 EAA 水平,其有效成分也可以透过血脑屏障作用于神经元和胶质细胞,提高摄取 EAA 的能力,两者共同作用使细胞间液的 EAA 含量降低,避免细胞内 Ca^{2+} 超载引起的一系列级联反应^[19]。GIs 可以上调缺血半影区 PSD95 蛋白水平,但 PSD95 会和 NMDAR 以及 nNOS 形成复合体,该复合体会不断加重神经细胞损伤,推测 GIs 可能通过突触重塑,减少 EAA 释放至细胞外的量,并增加突触间隙 EAA 的重摄取,降低细胞间液的 EAA 至正常生理水平,从而降低突触外 NMDAR 激活数量,减少 NMDAR/PSD-95/nNOS 复合体的形成。

本研究结果证实,GIs 及其有效组分 GB、BB 均

具有治疗 tMCAO 所致大鼠急性缺血性损伤的作用,GIs 的作用优于 GB、BB 单独用药。GIs 对脑缺血损伤的改善作用机制与上调缺血半影区 PSD95 蛋白表达有关,可能涉及促进突触重塑,减轻缺血对突触结构和功能的损伤。

参考文献

- [1] 黄贱英,孙建宁,梅世昌,等.银杏内酯 B 对缺血/再灌注损伤大鼠的保护作用[J].中国药理学通报,2008,24(2): 269-272.
- [2] Yang Z Z, Li J, Li S X, et al. Effect of ginkgolide B on striatal extracellular amino acids in middle cerebral artery occluded rats [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 136(1): 117-122.
- [3] 杨鹏飞,陈卫东.银杏内酯 B 药理作用研究进展[J].安徽中医学院学报,2012,31(5): 86-90.
- [4] 华骏.白果内酯对缺血性脑损伤的神经保护作用及其机制研究[D].南京:南京医科大学,2017.
- [5] 邹凯华.白果内酯:银杏叶制剂有效成分研究现状[J].上海医药,2008;29(8): 365-367.
- [6] Janssens D, Michiels C, Delaive E, et al. Protection of hypoxia-induced ATP decrease in endothelial cells by ginkgo biloba extract and bilobalide [J]. Biochem Pharmacol, 1995, 50(7): 991-999.
- [7] 刘科,鄢云彪,丁建花,等.银杏内酯注射液对脑缺血再灌注损伤治疗时间窗及凋亡信号通路的影响[J].药物评价研究,2018,41(7): 1169-1173
- [8] 刘颖异,胡玲芹,张映,等.PSD-95 与脑缺血的关系及其调控机制研究[J].现代生物医学进展,2014,14(9): 1796-1800.
- [9] Zhou L, Li F, Xu H B, et al. Treatment of cerebral ischemia by disrupting ischemia-induced interaction of nNOS with PSD-95 [J]. Nat Med, 2010, 16(12): 1439-1443.
- [10] 俞月萍,徐秋琴,魏尔清,等.急性缺血性卒中的神经保护药物研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2005,10(8): 841-845.
- [11] Mehta S L, Manhas N, Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics [J]. Brain Res Rev, 2007, 54(1): 34-66.
- [12] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [13] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. Stroke, 1986, 17(3): 472-476.

(下转第 1145 页)

为 $(4.50 \pm 3.75)\%$ 。

3 讨论

实验采用LC-MS/MS测定血中的精氨酸双糖苷的浓度,以乌苯美司为内标,乌苯美司及精氨酸双糖苷的保留时间分别为2.62 min以及4.45 min。采用该方法分析精氨酸双糖苷简便快速,质谱检测避免了化合物在紫外条件下响应值较低的缺点。通过考察分析该方法的最低下限为20 ng/mL。该方法检测灵敏度较高,线性、回收率和基质效应均符合检测方法要求,精密度和准确度及稳定性,RSD及RE值均小于15%,证实该方法用于检测精氨酸双糖苷合理可靠,并且快速高效。采用Hilic silica类型色谱柱,可以分析氨基酸类化合物及极性较大的化合物,并且可以与基质物质达到良好的分离,同时,LC-MS/MS方法具有普遍适用性。

统计结果发现精氨酸双糖苷的绝对生物利用度较低,但本实验只做了药动学的初步研究,造成

生物利用度低的原因还需进行深入的药动学研究,从而阐明其机制。

参考文献

- [1] Zheng Y N, Han L K, Okuda H, et al. A new amino acid derivative from red ginseng [J]. J Chin Pharm Sci, 1998, 7 (1): 7-10.
- [2] 高铭彤, 王佳奇, 陈 凯, 等. 精氨酸双糖苷对脂多糖诱导的巨噬细胞分泌炎症因子的影响 [J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(11): 65-69.
- [3] 黄宝亮, 丁传波, 王佳奇, 等. 红参中精氨酸双糖苷对小鼠的抗疲劳作用 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2017, 43 (5): 897-902.
- [4] 余欣鑫, 高铭彤, 刘兴龙, 等. 精氨酸双糖苷对糖尿病肾病小鼠的治疗作用及基因转化生长因子- $\beta 1$ 和胶原蛋白IV相关性研究 [J]. 中国药理学杂志, 2018(19): 1645-1651.
- [5] 邵 莹. 人参加工品中精氨酸糖苷新测定方法建立及AFG药理活性研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2015.
- [6] (上接第1114页)
- [14] Sheng M, Kim E. The postsynaptic organization of synapses [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011, 3(12): a005678.
- [15] Yan B C, Park J H, Ahn J H, et al. Postsynaptic density protein (PSD) - 95 expression is markedly decreased in the hippocampal CA1 region after experimental ischemia-reperfusion injury [J]. J Neurol Sci, 2013, 330(1-2): 111-116.
- [16] Gascón S, Sobrado M, Roda J M, et al. Excitotoxicity and focal cerebral ischemia induce truncation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor and cleavage of the scaffolding protein PSD-95 [J]. Mol Psychiatry, 2008, 13 (1): 99-114.
- [17] Hardingham G E, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways [J]. Nat Neurosci, 2002, 5 (5): 405-414.
- [18] Ballarin B, Tymianski M. Discovery and development of NA-1 for the treatment of acute ischemic stroke [J]. Acta Pharmacol Sin, 2018, 39(5): 661-668.
- [19] 于仁雯, 金 英, 郭伟英. 银杏叶提取物对大鼠海马缺血再灌注时兴奋性氨基酸释放的影响 [J]. 解放军药理学学报, 2003, 19(1): 24-26, 62.
- [20] Choi D W, Rothman S M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxicischemic neuronal death [J]. Annu Rev Neurosci. 1990, 13: 171-182.