



图 4 大鼠 ig 虎杖有效部位 (50 mg/kg) 后的组织分布 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 4 Tissue distribution of extract after ig administration to rats (50 mg/kg) ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

容积,表明虎杖苷可能与组织大量结合,而与血浆蛋白结合较少。组织分布研究结果也证实了这一推测。

4.2 组织分布:药物在体内的分布与药理作用有密切关系,组织分布决定了药效的强弱和作用的持续时间。大鼠 ig 虎杖有效部位后,经血液循环流经组织而分布于各组织中。组织分布实验研究发现,随着时间的变化,各组织中的药量呈动态分布,给药后 10 或 30 min 时各组织中的药量即达到最高,然后逐渐下降。大鼠 ig 虎杖苷后,以脾脏、心脏、肺中虎杖苷的量最高,这可能与心脏、脾脏中血管丰富,血流量大有关。在给药后 30 min 虎杖苷在脑组织中分布也较丰富,可见虎杖苷经一定时间可透过血脑屏障,

验证了虎杖苷可对一些因素引起的脑损伤起到保护作用^[2]。虎杖苷在睾丸中也有分布,10 min 即达峰浓度,这显示虎杖苷也可通过血睾屏障,因此虎杖苷对生殖器官的作用在今后的临床研究中需要引起高度的重视,监测其不良反应。另外,在研究药物体内分布的同时,还应探索其药理作用的本质,尤其是对某些在体内发生转化的药物,应将其分布与结构转化及作用机制研究结合进行,从而扩大药物的用途,提高药物作用的选择性,并可以加强对药物不良反应的防范。

4.3 在组织检测当中未检测到虎杖苷的代谢物,在各组织中的代谢产物还有待采用灵敏度更高的检测仪器进行研究。

4.4 本实验首次研究了虎杖苷在大鼠体内的组织分布,色谱分离良好,无其他色谱峰的干扰。采用 RP-HPLC 法测定组织匀浆中虎杖苷的质量浓度,样品预处理方法简便快速,方法专属性强,结果准确。

References:

- [1] Lin J H, Li X H, Tang Y N, *et al.* HPLC Determination and pharmacokinetic study of polydatin in pig [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2001, 21(5): 325-328.
- [2] Tian J W, Yang J X, Fu F H, *et al.* Protective effect of polydatin against rat cortex mitochondria injury induced by $\cdot OH$ [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2003, 19(11): 1287-1289.

黄芩苷对神经细胞缺氧缺糖-再灌注损伤的保护作用

朱陵群¹, 李伟华², 王硕仁¹, 牛福玲¹, 崔巍¹, 李澎涛³

(1. 北京中医药大学东直门医院 中医内科学教育部重点实验室, 北京 100700; 2. 北京佑安医院, 北京 100054; 3. 北京中医药大学 基础医学院, 北京 100029)

摘要:目的 观察黄芩苷对神经细胞缺氧缺糖-再灌注损伤的保护作用,在细胞水平阐明黄芩苷治疗脑缺血-再灌注损伤的作用机制。方法 选用 SH-SY5Y 神经细胞,采用缺氧-复氧结合缺糖-复糖的方法,对其进行攻击,模拟人体神经细胞的缺血-再灌注损伤,观察黄芩苷对此损伤的治疗作用。结果 缺氧、缺糖 8 h 结合复氧、复糖 12 h 对神经细胞可造成明显损伤,导致 SH-SY5Y 细胞线粒体的活性下降,凋亡率明显上升;而黄芩苷可以显著减轻上述损伤。结论 黄芩苷对缺氧、缺糖-再灌注损伤的神经细胞有保护作用。

关键词:黄芩苷; SH-SY5Y; 缺氧缺糖-再灌注损伤

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)02-0238-04

Protection of baicalin on oxygen-glucose deprivation and reperfusion injury in neurons

ZHU Ling-qun¹, LI Wei-hua², WANG Shuo-ren¹, NIU Fu-ling¹, CUI Wei¹, LI Peng-tao³

(1. The Key Laboratory of Chinese Internal Medicine, Ministry of Education, Dongzhimen Hospital, Beijing University

收稿日期:2006-04-28

基金项目:国家重点基金研究发展规划(973)项目(G1999054404)

作者简介:朱陵群(1962—),男,湖南长沙人,主任医师,研究员,硕士生导师,主要从事中西医结合防治脑血管疾病的临床与应用基础研究及进行中药新药开发、设计、药理(药效)的研究。

Tel: (010) 84013196 13661276736 E-mail: lingqunzh@vip.sina.com

of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 2. Beijing You-an Hospital, Beijing 100054, China;
3. College of Basic Medicine, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Key words: baicalin; SH-SY5Y; oxygen-glucose deprivation and reperfusion injury

目前研究认为^[1,2],细胞凋亡除了存在细胞核的变化外,细胞质中的变化也是细胞凋亡病理改变的重要组成部分,其中以线粒体的表现特别明显,在细胞凋亡时,线粒体发生一系列与细胞凋亡密切相关的变化,包括形态和功能的转变,线粒体在细胞凋亡中起着中心调控作用。黄芩苷(baicalin)是从唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 中提取的有效成分,也是清开灵注射液的主要有效组分,具有抗缺血缺氧、抗自由基、抑制细胞凋亡等多方面的作用^[3-5]。其中最为突出的是其对组织缺血-再灌注损伤的保护作用,但对神经细胞缺血-再灌注损伤是否具有保护作用,尚未见报道。为进一步评价黄芩苷对神经细胞缺血-再灌注损伤的保护作用,本实验对体外培养的神经细胞进行了缺血-再灌注损伤,观察黄芩苷对此损伤的保护作用。

1 材料

1.1 细胞、药物及试剂:SH-SY5Y (human neuroblastoma cells) 神经细胞由首都医科大学宣武医院药理研究室惠赠;黄芩苷由中国药品生物制品检定所提供(批号 110715-200212,质量分数 $\geq 98\%$);MEM 培养基为 Gibco 产品;新生小牛血清为 Hyclone 产品;二甲基亚砜(DMSO)、连二亚硫酸钠为国产分析纯;四甲基偶氮唑盐(MTT)、胰酶为美国 Sigma 公司产品;Apo-BRDU 试剂盒为 Pharmingen 公司产品。

1.2 仪器:HERAEUS-BB₁₆型 5% CO₂培养箱,美国;JJT₁₃₀₀型超净工作台,北京半导体设备仪器厂;IMT-2 型倒置相差显微镜:日本 OLYMPUS 产品;FACS Calibur 型流式细胞仪,美国 B.D 公司产品;V1.24 354-00627 T 型酶标仪,瑞士 Multiskan Ascent。

2 方法

2.1 神经细胞培养:SH-SY5Y 细胞用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基,同时加入 2 mmol/L 谷氨酰胺、 1×10^5 U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素,在 37 ℃、5% CO₂饱和湿度的培养箱中培养,每隔 4 d 传代 1 次,用处于对数生长期的细胞进行实验。

2.2 神经细胞缺氧缺糖-再灌注损伤模型的建立:根据文献报道的方法^[6]稍加改进,用无糖 Earle's 液 (mmol/L) (NaCl 143、KCl 5.4、CaCl₂ 21.8、

MgSO₄ 10、NaH₂PO₄ 1.0、HEPES 2.4, pH 7.4) 洗细胞 2 次,依次加入含各组药物和加连二亚硫酸钠的无糖 Earle's 液,将培养瓶用胶塞封闭培养 8 h,此后,模型组换无血清培养基,治疗组换含药无血清培养基继续培养 12 h。收集细胞进行相关实验。

2.3 实验分组和给药方法:随机将细胞分为 6 组:正常组,弃去原培养液换成无血清培养基;模型组,先用终浓度为 1 mmol/L 连二亚硫酸钠的无糖 Earle's 液培养 8 h,再换成无血清培养基培养 12 h;黄芩苷组,先用终浓度 5.6、28、140 nmol/L 黄芩苷和 1 mmol/L 连二亚硫酸钠的无糖 Earle's 液培养 8 h,再换成含终浓度 5.6、28、140 nmol/L 黄芩苷的无血清培养基培养 12 h;清开灵注射液组加入 0.5 mL/L 清开灵注射液和 1 mmol/L 连二亚硫酸钠的无糖 Earle's 液培养 8 h,再换成含 0.5 mL/L 清开灵注射液的无血清培养基培养 12 h。

2.4 线粒体损伤和细胞活力的测定^[1]:取对数生长期细胞,以 1×10^5 /L 接种于 96 孔培养板,每孔 100 μ L。在 37 ℃、5% CO₂饱和湿度的培养箱中培养过夜后,按分组要求给予不同处理因素,每组设 8 个平行孔。缺氧、缺糖 8 h,再灌注 12 h 后每孔加入 20 μ L MTT (终质量浓度 5 g/L,以 Hank's 液溶解,过 0.22 μ m 滤膜),37 ℃、5% CO₂饱和湿度的培养箱中温育 4 h,吸弃 MTT,每孔加入 100 μ L DMSO,震荡 10 min,充分溶解有活性的细胞中生成的蓝色颗粒。用酶标仪在 570 nm 波长处测定 A 值,进行细胞线粒体活力和细胞存活率的测定。神经细胞存活率计算方法如下:细胞存活率 = 实验组 A 值/对照组 A 值 $\times 100\%$

2.5 流式细胞仪分析 DNA 断裂片段及细胞凋亡信息:DNA 片断 3'-OH 标记,按 Apo-BRDU 试剂盒说明书介绍的原位末端标记法进行。具体操作步骤:将 SH-SY5Y 细胞制成 PBS 细胞悬液, 2×10^6 /L,每管取 0.5 mL 细胞悬液加入 5 mL 固定液(含 1% 多聚甲醛的 PBS 缓冲液),冰浴 15 min。PBS 缓冲液冲洗 2 次,加入 5 mL 70% 乙醇在 4 ℃ 下固定 30 min,1 mL wash 缓冲液洗 2 次,加入 DNA 标记液 50 μ L,混匀,37 ℃ 温浴 60 min,1 mL Rinse 缓冲液 2 次,加入抗体应用液 0.1 mL,室温闭光反应 30 min,加入 0.5 mL PI/RnaseA Solution,室温闭

光反应 30 min,200 目筛网过滤,上机检测。结果分析:分析单个细胞 (DNA-W/DNA-A 设门) 的 Fluorescein-BrdU 直方图,获得细胞凋亡信息。

2.6 统计学处理:采用 SPSS 10.0 统计软件中 One-Way ANOVA 对所得数据进行方差齐性检验及组间方差分析。

3 结果

3.1 对线粒体损伤和细胞存活率的影响:模型组线粒体活性和细胞存活率较正常组明显降低 ($P<0.001$),说明缺氧缺糖-再灌注可导致神经细胞及其线粒体损伤;大剂量黄芩苷组因药物浓度过大,致使药物对细胞有直接毒性作用,所以细胞存活率与模型组无显著差异 ($P>0.05$)。清开灵组及中、小剂量黄芩苷组的线粒体活性和细胞存活率与模型组比较显著升高,其中尤以小剂量黄芩苷组最为明显 ($P<0.001$)。说明黄芩苷可显著拮抗缺氧缺糖-再灌注导致的神经细胞及其线粒体损伤。见表 1。

3.2 对细胞凋亡率的影响:缺氧缺糖培养 8 h、再灌注 12 h,模型组细胞凋亡率较正常组显著增高 ($P<0.001$),清开灵组及中、小剂量黄芩苷组细胞凋亡率均较模型组显著降低,其中尤以小剂量黄芩苷组作用最为显著 ($P<0.001$),大剂量黄芩苷组细胞凋亡率与模型组相比无明显差异。见表 2。

表 1 黄芩苷对神经细胞线粒体损伤的保护作用
($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Protection of baicalin on mitochondrial injury of neurons ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组 别	剂 量	A 值 (570 nm)	细胞存活率/%
正常	—	0.59±0.25***	100***
模型	—	0.34±0.11	48.16±13.19
黄芩苷	5.6 nmol·L ⁻¹	0.52±0.06***	84.27±11.12***
	28 nmol·L ⁻¹	0.48±0.15***	76.40±10.12***
	140 nmol·L ⁻¹	0.40±0.18	54.89±16.13
清开灵注射液	0.5 mL·L ⁻¹	0.56±0.01***	92.12±15.43***

与模型组比较:*** $P<0.001$

*** $P<0.001$ vs model group

表 2 黄芩苷对神经细胞凋亡率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=7$)

Table 2 Effect of baicalin on apoptosis rate of nerve-cell ($\bar{x}\pm s, n=7$)

组 别	剂 量	细胞凋亡率/%
正常	—	0.17±0.09***
模型	—	64.70±10.32
黄芩苷	5.6 nmol·L ⁻¹	1.82±0.42***
	28 nmol·L ⁻¹	13.25±3.12**
	140 nmol·L ⁻¹	53.97±9.50
清开灵注射液	0.5 mL·L ⁻¹	0.74±0.62***

与模型组比较:** $P<0.01$ *** $P<0.001$

** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group

4 讨论

文献报道^[2],脑缺血-再灌注损伤后可引起神经细胞的凋亡,而线粒体在细胞凋亡中起着中心调控作用。细胞凋亡过程中的许多关键环节都与线粒体密切相关,包括线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_{mt}$) 的丧失、电子传递链的改变、caspase 激活因子 (如细胞色素 C、凋亡诱导因子) 的释放、细胞内氧化还原状态的改变、Bcl-2 家族促进和抑制凋亡蛋白的参与等不同信号的传导最终都集中到线粒体上来,以启动或抑制这些环节及其效应的产生^[7]。另外,线粒体是真核细胞的一种重要细胞器,能产生和储存 ATP,为细胞及其自身代谢提供能量,线粒体活性的高低可代表细胞的生存状况^[8]。线粒体在细胞存亡机制中的作用越来越引起人们的重视。

本实验利用缺氧-缺糖结合复氧-复糖的方法对神经细胞造成明显损伤,导致 SH-SY5Y 细胞皱缩、变圆,并可见有部分细胞漂起,细胞凋亡率显著增高 (与正常组比较 $P<0.001$);中、小剂量黄芩苷组细胞形态改变均较模型组明显减轻,细胞形态清晰,贴壁良好,细胞凋亡率均较模型组显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001),而大剂量黄芩苷组细胞凋亡率与模型组相比无明显差异。从而说明中、小剂量的黄芩苷对缺氧缺糖-再灌注损伤的神经细胞具有明显的保护作用,而高剂量的黄芩苷对神经细胞具有损伤作用。缺氧缺糖-再灌注损伤导致神经细胞存活率及线粒体的活性显著下降 (与正常组比较 $P<0.001$),而中、小剂量黄芩苷则可显著提高神经细胞及线粒体的活性 (与模型组比较 $P<0.01$ 、 0.001),从而说明抑制缺氧缺糖-再灌注导致的线粒体损伤、保护线粒体的活性可能是黄芩苷拮抗神经细胞缺氧缺糖-再灌注损伤所致的细胞凋亡的内在机制之一。其他具体机制有待本课题组做进一步的探讨。

References:

[1] Zhang W S, Zhu L Q, Deng R C, et al. Effect of salidroside on mitochondrial membrane potential during injury induced by hypoxia/hypoglycemia in cultured SH-SY5Y cells [J]. Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志), 2004, 20(7): 1218-1221.

[2] Chen H, Hu C J, He Y Y, et al. Reduction and restoration of mitochondrial DNA content after focal cerebral ischemia/reperfusion [J]. Stroke, 2001, 32(10): 2382-2387.

[3] Gao Z, Huang K, Xu H. Protective effects of flavonoids in the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in SH-SY5Y cells [J]. Pharmacol Res, 2001, 43(2): 173-178.

[4] Gao Z H, Huang K X, Bian S G, et al. Protective effects of flavonoids extracted from *Scutellaria Baicalensis* Georgi on free radical induced rat cortex mitochondrial injury [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2000, 16(1): 81-83.

- [5] Wan C Y, Jiang W L, Zhi H Y, *et al.* Protective effect of baicalin on brain injury [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(2): 188-190.
- [6] Oddis C V, Finkel M S. Cytokine-stimulated nitric oxide production inhibits mitochondrial activity in cardiac myocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 213(3): 1002-1009.
- [7] Kudla G, Montessuit S, Eskes R, *et al.* The destabilization of lipid membranes induced by the C-terminal fragment of caspase 8-cleaved bid is inhibited by the N-terminal fragment [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(30): 22713-22718.
- [8] Bouaziz N, Redon M, Quere L, *et al.* Mitochondrial respiratory chain as a new target for anti-ischemic molecules [J]. *Eur J Pharmacol*, 2002, 441(1-2): 35-45.

银杏内酯 A 和 B 混合物对大鼠永久性局灶性脑缺血的保护作用

王 旋^{1,2}, 顾振纶¹, 秦振红¹, 张慧灵^{1*}

(1. 苏州大学医学院 药理教研室, 江苏 苏州 215007; 2. 上海市普陀区人民医院, 上海 200060)

摘要:目的 研究银杏内酯 A 和 B 混合物 (ginkgolide A and ginkgolide B, GKAB) 对大鼠永久性局灶性脑缺血的保护作用。方法 采用大鼠永久性大脑中动脉阻塞 (permanent middle cerebral artery occlusion, pMCAO) 模型观察 GKAB 12.5、25、50 mg/kg iv 给药对脑梗死体积、脑含水量、行为学症状及组织形态学 (光镜) 的影响。结果 GKAB 12.5、25、50 mg/kg iv 给药呈剂量依赖性减少 pMCAO 大鼠脑梗死体积、降低脑含水量、改善行为学症状及减轻脑组织形态改变。50、25 mg/kg 组与模型组相比均有显著性差异 ($P < 0.01, 0.05$)。结论 GKAB 对大鼠永久性局灶性脑缺血损伤具有保护作用。

关键词:银杏内酯 A; 银杏内酯 B; 脑缺血; 永久性大脑中动脉阻塞

中图分类号:R286.10

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)02-0241-04

Protective effect of mixture of ginkgolide A and ginkgolide B on permanent focal cerebral ischemia in rats

WANG Xuan^{1,2}, GU Zhen-lun¹, QIN Zhen-hong¹, ZHANG Hui-ling¹

(1. Department of Pharmacology, School of Medicine, Soochow University, Suzhou 215007, China;

2. Shanghai Puto District People's Hospital, Shanghai 200060, China)

Key words: ginkgolide A; ginkgolide B; cerebral ischemia; middle cerebral artery occlusion (MCAO)

缺血性脑中风 (包括脑梗死、脑血栓形成) 约占脑血管疾病的 80%, 是人类严重病残和死亡原因之一。脑缺血后病理生理改变有诸多因素参与, 如能量代谢耗竭、兴奋性氨基酸毒性、细胞内钙超载、毒性氧自由基产生、酸中毒、花生四烯酸产生等。这些不利因素是导致神经元损伤的主要原因。目前银杏叶提取物 (*Ginkgo biloba* extract, GBE) 是临床上防治缺血性脑损伤广泛应用的最有效药物之一。银杏中具有生理活性的主要化学成分为黄酮苷、萜内酯和聚萜烯醇等化合物。其中萜内酯类化合物有: 银杏内酯 A、B、C、M、J 及白果内酯。已证明银杏内酯均为强的血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF) 拮抗剂, 且抑制 PAF 是本类药物抗缺血性脑损伤的基本作用机制之一。银杏内酯中抗

PAF 活性最强的是银杏内酯 B, 其次为银杏内酯 A, 且银杏内酯 A 和 B 均为银杏内酯中的主要成分。因此, 本课题组欲开发银杏内酯 A 和 B 的混合物 (GKAB) 的静脉注射剂。本实验观察 GKAB 对大鼠永久性局灶性脑缺血的保护作用, 以期对 GKAB 的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物: SD 大鼠, 雄性, (300±10) g, 清洁级, 由苏州大学医学院实验动物中心提供, 生产许可证 XCYK (苏): No 2002-0008, 使用许可证 SYXK (苏): No 2002-0037。

1.2 药物、试剂与仪器: GKAB [银杏内酯 A-银杏内酯 B (1:1)], 中国科学院上海药物研究所提供, 用生理盐水溶解。红四氮唑 (TTC, 中国医药集团上

收稿日期: 2006-06-04

基金项目: 香港保健协会资助项目 (20030816 HK)

作者简介: 王 旋 (1977—), 女, 苏州人, 硕士研究生, 主要研究方向为神经药理学, 目前就职于上海市普陀区人民医院。

Tel: (0512) 66110866 E-mail: wx741109@sohu.com

* 通讯作者 张慧灵 Tel: (0512) 65190599