

丹皮酚银杏叶提取物组合物对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用研究

常秀娟^{1,2}, 张 帅^{1,2}, 孙晓萍^{1,2}, 周 军^{1,2}, 王振中^{1,2}, 萧 伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要: **目的** 评价丹皮酚与银杏叶提取物 1:1 组合物对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用。**方法** 尼莫地平 (10.8 mg/kg) 组、丹皮酚 (37.5 mg/kg) 组、银杏叶提取物 (37.5 mg/kg) 组以及丹皮酚银杏叶提取物 1:1 组合物 (75.0 mg/kg) 组大鼠灌胃给予相应药物, 给药容积 10 mL/kg, ig 给药 6 d 后大脑中动脉栓塞造模, 脑缺血再灌注后 4、24 h 进行观察, 计算行为学评分; 动物取脑, 测定脑梗死面积, 计算脑梗死率; 大鼠脑缺血再灌注后 24 h 后, 测定血清中自由基超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、 γ -氨基丁酸 (GABA)、谷氨酸 (Glu) 水平和脑组织中基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)、GABA、Glu 含量。**结果** 与模型组比较, 脑缺血再灌注 22 h 后, 各组大鼠行为学评分均有降低趋势, 其中组合物组的降低作用的差异具有显著性 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 脑缺血再灌注 24 h 后, 银杏叶提取物、丹皮酚、组合物组大鼠脑梗死率均明显降低, 差异具有显著性 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 组合物组大鼠血清中 SOD 水平、丹皮酚和组合物组血清中 GABA 水平显著升高 ($P < 0.05$), 银杏叶提取物、丹皮酚、组合物组大鼠血清中 MDA 水平、组合物组血清中 Glu 水平显著降低 ($P < 0.01$ 、0.05); 丹皮酚和组合物组大鼠脑组织中 MMP-9、Glu 含量显著降低 ($P < 0.01$ 、0.05), 组合物组脑组织中 GABA 含量显著升高 ($P < 0.01$)。**结论** 丹皮酚银杏叶提取物组合物对大鼠脑缺血再灌注损伤具有保护作用, 其作用机制可能是通过抗氧化损伤、平衡兴奋性氨基酸与抑制性氨基酸浓度、调节 MMP-9 表达量有关。

关键词: 丹皮酚; 银杏叶提取物; 组合物; 脑缺血再灌注损伤; 保护作用

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2015)09-1063-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.09.003

Protection of combination of paeonol and *Ginkgo biloba* extracts on cerebral ischemia reperfusion injury in rats

CHANG Xiu-juan^{1,2}, ZHANG Shuai^{1,2}, SUN Xiao-ping^{1,2}, ZHOU Jun^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Kanion Pharmaceutical Co., Ltd, Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To evaluate the protective effects of combination of paeonol and *Ginkgo biloba* extracts (1:1) on cerebral ischemia reperfusion injury in rats. **Methods** Rats in nimodipine (10.8 mg/kg) group, *Ginkgo biloba* extracts (37.5 mg/kg) group, paeonol (37.5 mg/kg) group, and combination of paeonol and *Ginkgo biloba* extracts (1:1) (75.0 mg/kg) group were ig administered with according drugs for 6 d, drug volumes were 10 mL/kg, and then were established middle cerebral artery occlusion models. Rats with cerebral ischemia reperfusion after 4 and 24 h were observed, and behavior scores were calculated. Animal brains were obtained, cerebral infarction areas were determined, and cerebral infarction rates were calculated. Cerebral ischemia reperfusion after 24 h, levels of free radicals, such as SOD, MDA, GABA, and Glu levels in serum, and contents of MMP-9, GABA, and Glu in brain tissues were determined. **Results** Compared with model group 22 h after cerebral ischemia reperfusion, behavior scores of rats in all experiment groups decreased, and there was significant difference on behavior score in combination group ($P < 0.05$). Compared with model group 24 h after cerebral ischemia reperfusion, cerebral infarction rates of *Ginkgo biloba* extracts group, paeonol group, and combination group were obviously decreased, with significant differences between two groups ($P < 0.01$). Compared with model group, SOD level in serum of combination group, and GABA levels in serum of paeonol group and combination group were significantly

收稿日期: 2015-05-25

基金项目: 国家重大新药创制科技重大专项 (2013ZX09402203)

作者简介: 常秀娟 (1981—), 女, 硕士, 工程师, 研究方向为药理毒理学。Tel: (0518)81152299 E-mail: cxj045@163.com

*通信作者 萧 伟, 男, 博士, 研究员级高级工程师, 研究方向为中药新药的研究与开发。Tel: (0518) 81152337 E-mail: wzzh-nj@163.net

increased ($P < 0.05$); MDA levels in serum of *Ginkgo biloba* extracts group, paeonol group, and combination group, and Glu level in serum of combination group were obviously decreased ($P < 0.01, 0.05$); MMP-9 and Glu contents in brain tissues of paeonol group and combination group were significantly decreased ($P < 0.01, 0.05$); GABA content in brain tissue of combination group was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Combination of paeonol and *Ginkgo biloba* extracts has a good effect in the cerebral ischemia reperfusion injury, which is related to anti-oxidant damage, concentration balance of excitatory amino acids and inhibitory amino acids, and regulation of MMP-9 expression.

Key words: paeonol; *Ginkgo biloba* extracts; combination; cerebral ischemia reperfusion injury; protective effects

脑缺血再灌注损伤是指因脑缺血致脑组织坏死前、闭塞的脑血管再通后发生复杂的脑循环机能和代谢的变化,加重了脑组织的功能障碍和结构损伤^[1-2]。研究发现,丹皮酚、银杏叶提取物对脑缺血再灌注损伤动物模型可增加脑缺血部位的血供,改善脑循环,清除自由基,保护缺血脑组织^[3-4]。经前期体外实验的筛选,本课题组发现丹皮酚与银杏叶提取物按照 1:1 的组合物具有良好的治疗脑血管疾病的作用。大脑中动脉闭塞模型是目前较成熟的局灶性脑缺血模型,广泛用于评价抗脑缺血药物的作用,更加接近于临床的脑缺血再灌注损伤的病理过程,是一种较理想的脑缺血再灌注的动物模型。故本实验选择大鼠脑缺血再灌注模型对丹皮酚与银杏叶提取物 1:1 的组合物对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用进行了研究。

1 材料

1.1 药物与试剂

丹皮酚(质量分数 94.6%,批号 Z131223)、银杏叶提取物(含黄酮 46%、萜内酯 7.6%,批号 Z111221)均由康缘现代中药研究院中药、天然药物新药研究所提供;尼莫地平片,规格 20 mg/片,山东新华制药股份有限公司,批号 1204215;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、 γ -氨基丁酸(GABA)、谷氨酸(Glu)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)放免检测试剂盒均由北京华英生物技术研究所提供;氯化三苯基四氮唑(TTC),Sigma公司,批号 122015;水合氯醛,国药集团化学试剂有限公司,批号 20120409;羧甲基纤维素钠(CMC-Na),300~800 mPa·s,化学纯,国药集团化学试剂有限公司,批号 F20081023;其他试剂均为市售分析纯。

1.2 动物

SD 大鼠,雄性,SPF 级,6 月龄,体质量 280~320 g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,许可证号 SCXK(沪)2008-0016。动物饲养于

屏障环境中,12 h/12 h 明暗交替,温度 22~25 °C,相对湿度 50%~60%,动物自由进食饮水,适应 7 d 后开始实验。

1.3 仪器

r-911 全自动放免计数器,中国科技大学实业总公司;TSQ-280 型恒温培养振荡器(上海精宏实验设备有限公司),5804R 型冷冻离心机(Eppendorf 公司),BS224S 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 分组及给药

72 只大鼠随机分为 6 组,每组 12 只,分别为假手术组、模型组、尼莫地平(10.8 mg/kg)组、丹皮酚(37.5 mg/kg)组、银杏叶提取物(37.5 mg/kg)组以及丹皮酚银杏叶提取物 1:1 组合物(75.0 mg/kg)组。各组动物 ig 给予相应药物,给药容积 10 mL/kg,给药 6 d 后造模,脑缺血再灌注后 4、24 h 进行观察。假手术组和模型组给予等容积的 CMC-Na 溶液。

2.2 大脑中动脉栓塞模型的制备

采用 Longa 等报道的方法^[5-7]。将长 60 mm、直径 0.24 mm 的尼龙线一端用硅橡胶涂圆,自然干燥,显微镜下观测,取栓头直径约 0.31 mm 的线栓用于试验,并在距球端 18.0 mm 处标记,75%乙醇消毒后备用。除假手术组外,其他各组大鼠禁食 12 h 后以 10%水合氯醛(350 mg/kg)麻醉,仰位固定于手术台,颈部正中切口,分离出右侧颈总动脉行大脑中动脉阻断,尼龙线插入深度约为 18 mm,2 h 后,将线栓栓头拔出至颈内动脉和颈外动脉分叉处,造成血流再灌注(再灌 24 h)。假手术组手术方法同模型组,但不阻断大脑中动脉。

2.3 行为学评分^[5]

大鼠于缺血 2 h 再灌注后 4、22 h,提尾悬空地地面约 35 cm,观察两前肢状况。将大鼠置于水平地面,推动其双肩,观察两侧抵抗力的差异。将大

鼠置于地面,观察其行走情况,计算行为学评分。

行为完全正常,0分;提尾悬空时,大鼠手术对侧前肢表现腕肘屈曲、肩内旋、肘外展、紧贴胸壁,1分;大鼠置于地面,推手术侧肩向对侧移动时阻力降低,2分;大鼠置于地面,其围绕手术对侧转圈者,3分;损伤极其严重,已无法自助活动者,4分。分数越高,说明其神经行为损伤越严重。

2.4 血清自由基水平的测定

各组大鼠再灌注24 h后,以10%水合氯醛(350 mg/kg)麻醉,腹主动脉取血分离血清,按试剂盒说明书操作测定血清中自由基SOD、MDA、GABA、Glu水平。

2.5 脑组织MMP-9、GABA、Glu含量的测定

各组大鼠再灌注24 h后,麻醉,断头取脑,-70℃冰箱保存,按试剂盒说明测定脑组织中MMP-9、GABA、谷氨酸含量。

2.6 脑梗死面积的测定

动物腹主动脉取血后,立即取脑,去除嗅球、小脑和低位脑干后称定湿质量,置-20℃冰箱20 min,沿冠状切成5片,片厚约2 mm。迅速将脑片置5 mL、含有2% TTC的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中避光温孵30 min,每隔7~8 min翻动1次。染色后,正常组织呈枚红色,缺血组织呈白色。温孵后拍照,用Image-Pro Plus软件对梗死区面积及梗死区、正常区面积进行统计,计算脑梗死率。

脑梗死率=梗死区总面积/全脑总面积

2.7 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS 17.0统计软件进行分析,多组间均数比较采用单因素方差分析,两组间样本均数比较采用q检验。

3 结果

3.1 组合物对大鼠的行为学评分的影响

与模型组比较,脑缺血再灌注4 h后,各组大鼠行为学评分均有降低趋势,但差异无显著性;脑缺血再灌注22 h后,各组大鼠行为学评分均有降低趋势,其中组合物组的降低作用的差异具有显著性($P < 0.05$),结果见表1。

3.2 组合物对大鼠血清自由基的影响

与假手术组比较,模型组大鼠血清中SOD、GABA水平显著降低($P < 0.01$ 、 0.05),MDA、Glu水平显著升高($P < 0.01$ 、 0.05)。与模型组比较,组合物组大鼠血清中SOD水平、丹皮酚和组合物组血清中GABA水平显著升高($P < 0.05$),银杏叶提取物、丹皮酚、组合物组大鼠血清中MDA水平、组合物组血清中Glu水平显著降低($P < 0.01$ 、 0.05),结果见表2。

3.3 组合物对大鼠脑组织中MMP-9、GABA、Glu含量的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中MMP-9、Glu含量显著升高($P < 0.05$),GABA含量显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,丹皮酚和组合物组大鼠脑组织中MMP-9、Glu含量显著降低($P < 0.01$ 、 0.05),组合物组脑组织中GABA含量显著升高($P < 0.01$),结果见表3。

3.4 组合物对大鼠脑梗死率的影响

与模型组比较,脑缺血再灌注24 h后,银杏叶提取物、丹皮酚、组合物组大鼠脑梗死率均明显降低,差异具有显著性($P < 0.01$),结果见表4。

4 讨论

脑缺血发生后自由基SOD、MDA可损害神经元等富含脂质的脑细胞,使多聚不饱和脂肪酸发生过氧化反应,使多糖分子聚合和解聚,引起生物膜

表1 组合物对脑缺血再灌注损伤大鼠行为学评分的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 1 Effect of combination on behavior scores of cerebral ischemia reperfusion injury in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	行为学评分/分	
		再灌注4 h	再灌注22 h
模型	—	2.78±1.17	2.71±1.02
尼莫地平	10.8	1.44±1.26	1.39±1.12*
银杏叶提取物	37.5	2.36±1.25	2.13±1.14
丹皮酚	37.5	1.57±0.75	1.79±0.80
组合物	75.0	1.4±0.67	1.75±0.87*

与模型组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group

表2 组合物对脑缺血再灌注大鼠血清自由基的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)Table 2 Effect of combination on serum free radicals in cerebral ischemia reperfusion injury rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	GABA/(μmol·L ⁻¹)	Glu/(μmol·L ⁻¹)
假手术	—	80.23 ± 5.20	5.26 ± 0.68	5.38 ± 0.74	59.06 ± 3.19
模型	—	69.58 ± 7.38**	7.42 ± 1.05**	4.50 ± 0.29*	62.14 ± 1.32*
尼莫地平	10.8	78.03 ± 5.93 ^{△△}	5.38 ± 1.36 ^{△△}	5.42 ± 0.92 [△]	59.31 ± 2.70 [△]
银杏叶提取物	37.5	72.28 ± 6.23	5.96 ± 1.12 [△]	5.16 ± 1.00	58.57 ± 2.03
丹皮酚	37.5	73.69 ± 5.99	6.26 ± 1.40 [△]	5.21 ± 0.69 [△]	60.02 ± 2.71
组合物	75.0	75.01 ± 7.84 [△]	5.69 ± 1.02 ^{△△}	5.50 ± 0.86 [△]	59.44 ± 3.00 [△]

与假手术组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs Sham group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs model group表3 组合物对脑缺血再灌注大鼠脑组织中 MMP-9、GABA、Glu 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)Table 3 Effect of combination on brain tissue cytokines in cerebral ischemia reperfusion injury rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	MMP-9/(ng·mg ⁻¹)	GABA/(μmol·g ⁻¹)	Glu/(μmol·g ⁻¹)
假手术	—	3.35 ± 0.61	0.57 ± 0.07	7.42 ± 0.38
模型	—	5.25 ± 71.40*	0.49 ± 0.03*	8.49 ± 0.36*
尼莫地平	10.8	3.37 ± 1.04 [△]	0.57 ± 0.04 [△]	7.36 ± 0.33 [△]
银杏叶提取物	37.5	8.21 ± 1.40	0.51 ± 0.06	10.81 ± 1.35
丹皮酚	37.5	3.81 ± 1.80 [△]	0.51 ± 0.07	7.42 ± 0.65 [△]
组合物	75.0	3.26 ± 2.03 ^{△△}	0.79 ± 0.11 ^{△△}	7.48 ± 0.56 [△]

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ * $P < 0.05$ vs Sham group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs model group表4 组合物对脑缺血再灌注损伤大鼠脑梗死率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)Table 4 Effect of combination on cerebral infarction rates in rats with cerebral ischemia reperfusion injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	脑梗死率/%
模型	—	21.83 ± 6.56
尼莫地平	10.8	8.86 ± 3.26**
银杏叶提取物	37.5	7.91 ± 4.83**
丹皮酚	37.5	8.28 ± 6.47**
组合物	75.0	6.20 ± 1.34**

与模型组比较: ** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs model group

裂解, 蛋白质变性, 酶丧失活性, 神经元死亡或凋亡^[8]。本实验研究表明丹皮酚与银杏叶提取物 1:1 的组合物可升高 SOD、降低 MDA 水平, 具有明显的抗自由基作用。

氨基酸是中枢神经系统中重要的神经递质。脑缺血后兴奋性氨基酸含量过多在神经细胞死亡过程中起着重要作用, 而 Glu 为中枢神经系统最为重要

的兴奋性氨基酸。Glu 对神经元有很强的兴奋毒性, 高浓度的 Glu 可激活谷氨酸受体, 导致 Ca²⁺大量内流, 神经元 Ca²⁺超载, 从而产生不可逆的细胞损伤, 造成神经元变性坏死。而 GABA 是公认的中枢系统内最重要的抑制性神经递质, GABA 可以抵制缺血引起的神经元过度兴奋, 起到保护作用^[9-10]。实验结果表明与模型组比较组合物组可显著降低 Glu 水平, 并显著升高 GABA 水平。由此可推测, 组合物组可通过调节脑内及血清中 Glu、GABA 二者的平衡达到缓解脑缺血再灌注损伤的效果。

MMPs 是一组 Zn²⁺相关的金属蛋白内切酶家族, 其中与缺血再灌注损伤后血脑屏障破坏关系最密切的是 MMP-2 和 MMP-9。MMPs 在正常脑组织中不表达或低表达, 当脑缺血再灌注时, MMPs 激活导致血脑屏障通透性增加, 引起血管源性脑水肿及继发神经炎症反应, 并导致神经细胞损伤。正常情况下 MMP-2 和 MMP-9 以无活性的前体形式存在, 但脑缺血再灌注后, MMP-2 和 MMP-9 被激活, 表达上调^[11]。研究发现, 脑缺血再灌注后血脑屏障的开放呈双阳性: 早期开放主要是激活的 MMP-2 降解紧密连接的 Claudin 蛋白所致, 但这种开放是

可逆的,应用 MMPs 抑制剂可阻止紧密连接蛋白成分降解;而后期的延迟开放则与 MMP-9 密切^[12]。本研究中,实验大鼠再灌注时间为 22 h,因此选择 MMP-9 为主要考察指标。结果表明与模型组比较组合物组可显著降低大鼠脑中 MMP-9 含量。

综上所述,丹皮酚与银杏叶提取物 1:1 的组合物对线栓法所致大鼠急性脑缺血再灌注损伤具有一定保护作用,其作用机制可能是通过抗氧化损伤、平衡兴奋性氨基酸与抑制性氨基酸浓度、调节 MMP-9 表达量有关。

参考文献

- [1] 魏 蕾, 宫 鹏. 中药有效成分抗血小板聚集的研究进展 [J]. 安徽医药, 2012, 16(12): 1879-1881.
- [2] 陈春苗, 周 军, 陈 健, 等. 银杏二萜内酯葡胺注射液对大鼠急性脑缺血再灌注损伤的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(17): 133-136.
- [3] 刘馨雨, 郑咏秋, 刘建勋. 银杏叶有效成分抗脑缺血再灌注损伤作用的机制研究进展 [J]. 世界中医药, 2013, 8(10): 1142-1146.
- [4] 武继彪, 隋在云, 管华诗. 丹皮酚对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(9): 1887-1888.
- [5] 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.
- [6] 曹勇军, 程彦斌. 线栓法建立大鼠局灶性脑缺血/再灌注模型的改进与探讨 [J]. 中国应用生理学杂志, 2001, 17(2): 198-200.
- [7] 马舒伟, 张现涛, 何盛江, 等. 银杏叶内酯 K 对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(13): 993-997.
- [8] 赵安东, 李玉亮, 辛益妹, 等. 银杏叶提取物对大鼠脑缺血再灌注氧化损伤的保护作用 [J]. 空军医学杂志, 2013, 29(2): 93-95.
- [9] 甘 平, 杨 茹, 程介士. GABA 受体在脑缺血中的作用 [J]. 中国神经科学杂志, 2004, 20(1): 78-81.
- [10] 曹江北, 李云峰, 米卫东. γ -氨基丁酸受体系统在脑缺血诱发神经元再生过程中的调节作用[J]. 国外医学: 药学分册, 2006, 2(4): 7-15.
- [11] 阎 伟, 孙 微, 张翠荣, 等. 脑缺血/再灌注损伤时 MMP-9 的表达及银杏叶提取物的干预作用 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2007, 24(1): 83-85.
- [12] 李福顺, 闫 伟, 杜庆娟. 川芎嗪对大鼠前脑缺血再灌注后 MMP-9 的影响 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2007, 24(5): 598-600.