

性下降。因内也有报道说,肝癌治疗前后血清 ALD 活性差异有显著性 ($P < 0.05$),因此 ALD 适用于评价肝癌组织损毁程度。

在本实验中,与对照组相比,不同剂量的甜菜碱均可降低 S_{180} 荷瘤小鼠血清中 LDH 和 ALD 的活力,并呈现出了明显的量效关系,说明甜菜碱可能降低了肿瘤组织的坏死程度,限制了瘤细胞经由丙酮酸还原为乳酸的能力,限制了瘤细胞经由糖酵解获得能量的能力,有可能迫使肿瘤细胞转由经三羧酸循环有氧氧化供能,或因能量供应不足而使瘤细胞生长受阻、死亡。LDH、ALD 活性受抑制,糖酵解作用减弱,对于控制肿瘤发展,防止恶液质形成,延长宿主生存期具有重要意义。抑制肿瘤细胞内的无氧糖酵解作用有可能是甜菜碱抗肿瘤作用的机制之一。

本实验只是初步研究了甜菜碱对荷瘤机体的作用,因为给药方式的改变和药物剂量的改变都会对药效学结果有很大的影响。同时,甜菜碱作为一种营养物质,其在肿瘤预防方面的作用也有必要进一步研究,即从肿瘤营养学的角度。甜菜碱作为高效的甲基供体,可促进细胞的 DNA 甲基化,改变肿瘤细胞的甲基化模式,也就是说其更深一步的机制可能要

从表观遗传学的角度进行探讨。同时其对免疫系统的影响也需进一步研究。

References:

- [1] Moriyama T, Carcia Perez A, Olson A D, et al. Intracellular betaine substitutes for sorbitol in Protecting renal medullary from hypertonicity [J]. *Am J Physiol*, 1991, 260: 494-497.
- [2] Petronini P G, De Angelis E M, Borghetti P, et al. Modulation by betaine of cellular responses to osmotic stress [J]. *Biochem J*, 1992, 282(Pt1): 69-73.
- [3] Petronini P G, De Angelis E M, Borghetti P, et al. Effect of betaine on HSP70 expression and cell survival during adaptation to osmotic stress [J]. *Biochem J*, 1993, 293: 553-558.
- [4] Freidel J F, Fardon J C, Tsuchiya Y, et al. In vitro effect of D-isoascorbic acid and betaine hydrate alone and in combination on normal and malignant cells [J]. *Exp Cell Biol*, 1979, 47: 463-469.
- [5] Jeong D W, Cho I T, Kim T S, et al. Effects of lactate dehydrogenase suppression and glycerol-3-phosphate dehydrogenase overexpression on cellular metabolism [J]. *Mol Cell Biochem*, 2006, 2(14): 1-8.
- [6] Jeong D W, Cho I T, Kim T S, et al. Effects of lactate dehydrogenase suppression and glycerol-3-phosphate dehydrogenase overexpression on cellular metabolism [J]. *Mol Cell Biochem*, 2006, 2(14): 1-8.
- [7] Miyagi S, Zhao Y P, Saitoh Y, et al. Replication of the rat aldolase B locus differs between aldolase B-expressing and non-expressing cells [J]. *FEBS Lett*, 2001, 505(2): 332-336.

银杏叶提取物对缺血再灌注大鼠脑线粒体的保护作用

杲海霞,李军霞,王永利*

(河北医科大学 药理学教研室,河北 石家庄 050017)

线粒体是一种结构和功能复杂而敏感的重要细胞器,是细胞能量产生的主要部位,是细胞的活力及生存和死亡的调节中心。缺血再灌注细胞凋亡过程中许多重要事件的发生都与线粒体密切相关,包括 caspases 激活因子的释放、细胞内氧化还原状态的改变、线粒体膜电位的丧失、Bcl-2 家族促进和抑制凋亡蛋白的参与等。其作为凋亡的中心环节已在许多凋亡系统被证实^[1,2]。

银杏 *Ginkgo biloba* L. 为中国特有的古老植物,用作药物在我国已有 5 000 年的历史。现代药理学研究证实,其提取物 (extract of *Ginkgo biloba*,

EGB) 具有清除自由基、降低血液黏度、延长血液凝固时间等功效。自 20 世纪 80 年代以来,国内外学者对 EGB 进行了大量研究工作,并在多种缺血模型上观察了其对于缺血再灌注脑损伤的保护作用及其机制。但关于 EGB 在脑线粒体保护方面,尤其对线粒体钙超载影响方面的研究很少。本实验主要观察银杏叶提取物注射液对局灶性脑缺血大鼠脑线粒体的保护作用,以进一步探讨其抗缺血性脑血管疾病的机制。

1 材料

雄性健康 SD 大鼠 96 只 (体重 250~300 g),

收稿日期:2006-02-17

作者简介:杲海霞(1972-),女,河北省泊头市人,硕士,讲师,研究方向为心脑血管药理学。

Tel: 13103212796 E-mail: gaoyuanzhaozhao@sohu.com.cn

* 通讯作者 王永利 Tel: (0311) 6266824 Fax: (0311) 6057291 E-mail: wangy152@heinfo.net

由河北医科大学动物养殖中心提供。EGB 注射液由河北医科大学药理教研室研制提供(注射液含 EGB 3.5 mg/mL, 其中银杏黄酮苷 8.7 mg, 银杏总萜烯内酯 0.77 mg)。金纳多注射液为德国威马舒培博士药厂生产(注射液含 EGB 3.5 mg/mL, 其中银杏黄酮苷 4.2 mg)。

2 方法

2.1 大鼠局灶性大脑中动脉栓塞(MCAO)模型制备:采用 Zea-Longa 等^[3]线栓法,建立 MCAO 动物模型。10%水合氯醛 350 mg/kg ip 麻醉,术中和术后保持室温 25~28℃。取仰卧位,做颈部前正中切口,分离暴露左侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉、甲状腺上动脉、枕动脉,结扎颈外动脉远心端。用微动脉夹暂时夹闭颈总动脉及颈内动脉远心端,用电烧灼器烧断甲状腺动脉、枕动脉及颈外动脉。在颈外动脉近颈内动脉交叉处剪一小口备插线用,从小口处注射肝素稀释液每只 125 U,然后将一长 5 cm 的渔线(直径 0.18 mm,尖端烧成直径 0.2 mm 光滑的小球)经小口插入颈外动脉,经颈内、颈外动脉交叉处插入颈内动脉并继续深入大脑前动脉的近端,(此时可遇轻微阻力,插入尼龙线 1.8~2.0 cm)以阻断该侧大脑中动脉供血区的供血(此时即为脑缺血开始时间)。脑缺血 2 h 后,抽回尼龙线至颈外动脉切口处,此时血流再通,实现再灌注。假手术组不插尼龙线,颈部手术及血管处理同上。各组均于再灌注 4 h 后进行各项指标测定。

2.2 动物分组及给药:大鼠随机分为 12 组,每组 8 只,行 MCAO 2 h,再灌 4 h 动物模型,6 组用于神经功能评分及梗死范围测定,6 组用于线粒体各项指标的测定。均分为假手术组,缺血模型组,阳性对照金纳多注射液 10 mg/kg 组,EGB 注射液 5、10、20 mg/kg 组。各组于缺血当时舌下 iv 给药。

2.3 神经功能评分:参照 Bederson^[4]和 Lin^[5]的方法进行评分(总分 10 分):①提起鼠尾,观察前肢有无异常表现。凡有右前肢内收、内旋者,视其轻重评为 0~3 分。如果大鼠表现为躯体向右旋转,评为 4 分。②将大鼠置于一金属网上,向后轻扯鼠尾,观察大鼠两前肢肌张力。根据右前肢肌力下降程度评为 0~3 分。③将大鼠置于光滑平面上,观察侧向推挡阻力,根据右前肢阻力下降程度评为 0~3 分。

2.4 脑梗死范围的测定^[6]:于再灌注后 4 h 断头取脑,去除嗅球、小脑和脑干,置于-80℃速冻 5 min,由前向后做 6~7 个大脑连续冠状粗切片,置于质量分数为 2%的 TTC 磷酸盐缓冲液中,37℃避光

恒温水浴孵育染色 20 min,正常脑组织被染成红色,梗死区为苍白色,染色的脑片以体积分数为 4%福尔马林溶液固定 24 h,分离红色和白色区域,称质量并计算梗死区域占全脑质量的百分数进行统计分析。

2.5 大鼠脑线粒体的制备:采用改良的 Clark 技术^[7],整个过程均在 0~4℃中进行。动物断头处死,于 30 s 内迅速取出缺血侧大脑半球,(去除小脑和脑干)去软脑膜,于带冰渣的分离介质液(0.025 mmol/L 蔗糖、0.075 mol/L 甘露醇、1 mmol/L EGTA)中剪碎,洗涤 3 次,按 1:9 加入分离介质于玻璃匀浆器中手动匀浆(八上八下),制成 10%匀浆液。2 000×g,4℃离心 3 min,取上清液,12 500×g,4℃离心 8 min,沉淀为粗制线粒体。将沉淀加入到 3% Ficoll 液 5 mL (3% Ficoll、0.12 mol/L 蔗糖、0.03 mol/L 甘露醇、25 μmol/L EDTA-K, pH 7.4, Tris 调)中悬浮粗制线粒体,仔细分层入 6% Ficoll 液 10 mL (6% Ficoll、0.12 mol/L 蔗糖、0.03 mol/L 甘露醇、25 μmol/L EDTA-K, pH 7.4, Tris 调),10 400×g 离心 30 min,沉淀用分离介质悬浮,12 100×g 离心 10 min,沉淀即为提纯线粒体。整个过程控制在 1 h,温度控制在 0~4℃,分离介质必须保持有冰渣状态。线粒体用呼吸介质(300 mmol/L 甘露醇、10 mmol/L KH₂PO₄, 10 mmol/L KCl, 5 mmol/L MgCl₂, pH 7.2)稀释。线粒体蛋白定量以考马斯亮蓝试剂盒测定。除用于线粒体游离钙测定的线粒体外,其余于-20℃分装保存。

2.6 线粒体基质游离钙浓度测定^[8]

2.6.1 荧光染色剂的负载:取部分新鲜配制的线粒体蛋白为 2 mg/mL 线粒体悬液。取 10 μL 1 mmol/L Fura-2/AM 加入线粒体悬液,混匀,将线粒体悬液在 37℃水浴中孵育 30 min,进行负载。30 min 后用大量线粒体呼吸介质冲洗 2 次,并分别以 10 000×g 离心 3 min,获得已负载的线粒体,重新悬浮于呼吸介质中,进行蛋白的量测定,定蛋白为 1 mg/mL。

2.6.2 测定:线粒体游离钙浓度测定按 Gunter 方法稍加改进。在测试介质液(120 mmol/L KCl, 10 mmol/L MOPS, 5 mmol/L Glamate, 5 mmol/L malate, pH 7.0)中分别加入 50 μL 线粒体悬液,30℃水浴温育 5 min,反应体系为 200 μL。在多功能微量分析仪上分别测定正常线粒体、负载后线粒体、破膜后饱和钙及无钙(EGTA 络合)4 种情况下

荧光强度。激发波长 340 nm 和 380 nm, 发射波长 500 nm。试验过程注意避光。

2.7 脂质过氧化产物丙二醛 (MDA) 测定: 用硫代巴比妥酸法检测, MDA 可与硫代巴比妥酸络合形成红色产物, 在 632 nm 处有最大吸收峰。根据试剂盒说明严格操作。

2.8 线粒体超氧化物歧化酶 (SOD) 活性测定: 具体操作按试剂盒说明进行。酶的活性单位: 每毫升反应液中抑制率达 50% 时所对应的 SOD 的量为一个亚硝酸盐单位 (U/mL)。

2.9 线粒体 ATP 酶活性测定: ATP 酶可分解 ATP 生成 ADP 及无机磷。测定无机磷的量可判断酶活力的强弱。ATP 酶活力单位以每小时分解每毫克组织蛋白产生的无机磷的量来表示, 即 $\mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{mg})$ 。具体方法严格按试剂盒说明书进行。

2.10 统计学分析: 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 t 检验比较组间差异。

3 结果

3.1 神经功能评分: 假手术组为 0 分; 缺血模型组为 8.0 ± 0.0 , EGB 注射液 5.0 mg/kg 组为 7.2 ± 0.8 , 神经症状无明显改善; EGB 注射液 10.0 mg/kg 和 20.0 mg/kg 组可明显改善大鼠神经症状, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.01$)。见表 1。

3.2 脑梗死范围: 缺血 2 h 再灌注 4 h 后, 梗死范围占全脑的 (15.6 ± 0.8)%, 给予 EGB 注射液各组梗死范围均有明显缩小。见表 1。

表 2 EGB 注射液对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑线粒体 Ca^{2+} 浓度、MDA 水平、SOD 及 ATP 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effects of EGB Injection on content of free calcium and MDA, and activities of SOD and ATPase of mitochondrial in rats after focal cerebral ischemia-reperfusion ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Ca^{2+} 浓度/ ($\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$)	MDA/ ($\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$)	SOD/ ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Na^+, K^+ -ATP 酶活性/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	$\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)
假手术	—	296 ± 13	3.02 ± 0.21	39.1 ± 1.9	6.65 ± 0.31	16.3 ± 1.2
模型	—	$564 \pm 23^{\Delta\Delta}$	$3.88 \pm 0.10^{\Delta\Delta}$	$28.0 \pm 1.6^{\Delta\Delta}$	$4.41 \pm 0.23^{\Delta\Delta}$	$7.3 \pm 0.8^{\Delta\Delta}$
EGB 注射液	5	537 ± 18	$3.59 \pm 0.15^*$	$30.5 \pm 1.2^*$	$5.12 \pm 0.28^{**}$	7.8 ± 0.5
	10	$477 \pm 28^*$	$3.43 \pm 0.11^{**}$	$34.7 \pm 3.3^{**}$	$5.33 \pm 0.36^{**}$	$10.5 \pm 0.7^{**}$
	20	$400 \pm 29^{**}$	$3.15 \pm 0.14^{**}$	$36.9 \pm 1.7^{**}$	$5.59 \pm 0.35^{**}$	$12.3 \pm 1.1^{**}$
金纳多注射液	10	$505 \pm 25^{**}$	$3.49 \pm 0.13^{**}$	$32.5 \pm 1.5^{**}$	$5.38 \pm 0.27^{**}$	$10.21 \pm 0.8^{**}$

与假手术组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组比较: $* P < 0.05$ $** P < 0.01$

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs Sham group; $* P < 0.05$ $** P < 0.01$ vs model group

4 讨论

钙离子广泛存在于人体的各种组织, 并参与许多重要的生理活动。实验研究表明无论在局灶性脑缺血还是全脑缺血性脑损伤中, 细胞内钙离子浓度的变化对神经细胞的损害都具有特别重要的意义, 钙超载已被认为是导致神经细胞死亡的最后共同通路^[9]。线粒体是细胞内最大的钙池之一, 具有完善的

3.3 对脑线粒体基质游离钙浓度的影响: 假手术组线粒体游离钙为 (296 ± 13) nmol/mg, 模型组为 (564 ± 23) nmol/mg, 明显高于假手术组 ($P < 0.01$)。EGB 10、20 mg/kg 组线粒体游离钙与模型组比较显著下降。见表 2。

3.4 对线粒体 MDA 水平及 SOD 活力的影响: EGB 各组均降低线粒体 MDA 水平, 提高 SOD 活力。见表 2。

3.5 对线粒体 ATP 酶活性的影响: 与模型组比较, EGB 各组均可升高 Na^+, K^+ -ATP 酶活性。同时 EGB 10、20 mg/kg 组 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性显著高于模型组。见表 2。

表 1 EGB 注射液对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑梗死范围及神经功能缺损评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effects of EGB Injection on cerebral infarct volume and score of neurological deficits after focal cerebral ischemia-reperfusion in rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	梗死范围/%	神经功能评分
假手术	—	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
模型	—	$15.6 \pm 0.8^{\Delta\Delta}$	$8.0 \pm 0.0^{\Delta\Delta}$
EGB 注射液	5	$14.6 \pm 0.6^*$	7.2 ± 0.8
	10	$12.9 \pm 0.7^{**}$	$6.0 \pm 0.6^{**}$
	20	$10.1 \pm 1.0^{**}$	$4.5 \pm 0.5^{**}$
金纳多注射液	10	$13.3 \pm 0.6^{**}$	$5.8 \pm 0.6^{**}$

与假手术组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

与模型组比较: $* P < 0.05$ $** P < 0.01$

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs Sham group

$* P < 0.05$ $** P < 0.01$ vs model group

钙离子摄取、释放系统, 生理状态下可以有效地缓冲细胞内钙离子浓度变化。脑缺血后期损伤的发生、发展与线粒体内钙离子稳态失调密切相关。目前研究证实^[10,11]任何原因导致的细胞内钙离子浓度升高都可能触发因线粒体摄取钙离子, 导致线粒体内钙离子的过度聚集, 引起线粒体通透性转运孔 (MPTP) 开放, 线粒体膜电位耗竭, 肿胀破坏, 同时

触发线粒体大量释放 Ca^{2+} , 并启动与细胞死亡事件相关蛋白的释放以及启动神经元细胞的死亡和凋亡。本研究显示线粒体基质游离钙浓度显著增加, 提示缺血再灌注后出现了线粒体钙超载。

线粒体还是体内氧自由基 (ROS) 产生的主要来源^[12], 生理条件下线粒体内存在着有效的抗氧化机制 (如 SOD, GSH-Px 等), 可将代谢中产生的 ROS 及时清除, 使脂质过氧化产物 MDA 生成减少, 线粒体和神经元不致遭受过氧化损害。脑缺血再灌注条件下伴随大量氧的供应, 线粒体在呼吸链电子传递过程中产生大量 ROS, 使富含不饱和脂肪酸且最靠近线粒体产生 ROS 部位的线粒体内膜成为 ROS 攻击的主要靶部位, 影响线粒体结构和功能的完整性, 并进一步影响整个细胞的正常生理功能。本研究结果表明线粒体脂质过氧化产物 MDA 水平显著增加, SOD 活性降低。说明缺血再灌注后线粒体 ROS 大量产生且其抗氧化能力下降, 使 ROS 不能及时得到清除, 攻击线粒体内膜, 从而导致线粒体结构和功能异常。同时由于线粒体功能异常, ATP 产生减少, 使细胞内及线粒体内膜上依靠 ATP 的离子泵活性受到抑制。本实验观察到对维持线粒体膜内外 H_2O , Na^+ 平衡起重要作用的 Na^+ , K^+ -ATP 酶以及与线粒体钙离子转运有关的 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性降低, 提示有可能是缺血再灌注后线粒体发生肿胀以及钙超载的原因。

综上所述, 缺血再灌注后线粒体钙超载、ROS 的产生、抗氧化能力下降、线粒体结构和功能损伤, 脑梗死范围及神经功能评分增加, 产生了缺血再灌注脑损伤。给与 EGB 后, 各给药组与模型组相比, 线粒体损伤的各项指标及大鼠脑梗死范围及神经症状均有明显改善。提示 iv EGB 具有缺血再灌注脑损伤保护作用, 其可能机制为清除线粒体 ROS, 提高抗氧能力, 抑制线粒体钙超载, 维持线粒体结构及功能的完整, 从而在亚细胞水平上发挥其缺血再灌注脑损伤的保护作用。

本实验采用的阳性对照药德国产金纳多注射液的主要成分为目前国际常用的银杏叶提取物 EGB761, 内含 24% 的黄酮苷和 6% 的萜烯。本室研制的 EGB 注射液含黄酮苷 49.79%、萜烯 4.4%, 两者所含银杏黄酮苷的量不同。结果显示, 二者对缺血再灌注脑线粒体损伤均有显著保护作用, 二者比较差异无统计学意义, 表明银杏黄酮苷量的高低与缺血脑损伤的保护作用无相关关系。

References:

- [1] Adrain C, Martin S J. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas [J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(6): 290-297.
- [2] Vande V C, Cizeau J, Dubi K D. BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(15): 5454-5468.
- [3] Zea Longa E L, Weinstein P R, Canson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [4] Bederson J B, Petts L H, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurological examination [J]. *Stroke*, 1986, 17(3): 472-476.
- [5] Lin Y, Philis J W. Deoxycoformycin and oxypurinol: Protection against focal ischemia injury in the rats [J]. *Brain Res*, 1992, 571(2): 272-280.
- [6] Bederson J B, Pitts L H, Germano S M, et al. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats [J]. *Stroke*, 1986, 17(6): 1304-1308.
- [7] Clark J B, Nicklas W J. The metabolism of rat brain mitochondria [J]. *J Biochem*, 1970, 245(18): 4724-4731.
- [8] Gunter T E, Restrepo D, Gunter K K. Conversion of esterified fura-1 to Ca-sensitive forms by mitochondria [J]. *Am Physiol*, 1988, 255: 304-310.
- [9] Kristian T, Siesjo B K. Calcium in ischemia cell death [J]. *Stroke*, 1989, 29: 705-718.
- [10] Budd S L, Nicholls D G. Mitochondria calcium regulation and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells [J]. *Neurochem Int*, 1996, 67: 2282-2291.
- [11] White R J, Reynolds U. Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure [J]. *Neuroscience*, 1996, 16: 5688-5697.
- [12] Piantadosi C A, Zhang J. Mitochondrial generation of reactive oxygen species after brain ischemia in the rat [J]. *Stroke*, 1996, 27: 327.

八 荣 八 耻

树立社会主义荣辱观: 以热爱祖国为荣、以危害祖国为耻, 以服务人民为荣、以背离人民为耻, 以崇尚科学为荣、以愚昧无知为耻, 以辛勤劳动为荣、以好逸恶劳为耻, 以团结互助为荣、以损人利己为耻, 以诚实守信为荣、以见利忘义为耻, 以遵纪守法为荣、以违法乱纪为耻, 以艰苦奋斗为荣、以骄奢淫逸为耻。