

银杏二萜内酯对急性 tMCAO 大鼠及慢性 tMCAO 大鼠的改善作用

王 玲, 徐少锋, 冯 楠, 王伟平, 蔡 杰, 王晓良*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 作用机制研究与药效评价北京市重点实验室 (BZ0150), 北京 100050)

摘要: 本文研究银杏二萜内酯 (diterpene ginkgolides, DG) 对短暂性大脑中动脉阻塞 (transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO) 术后 SD 大鼠学习记忆的影响。利用线栓法造成大鼠 tMCAO, 主要分为假手术组、溶剂对照组、丁苯酞 (NBP) 组、DG 组。本研究中的动物实验按照北京协和医学院福利伦理审查委员会的伦理指导方针进行 (00000646、00000635)。利用神经行为学评分、脑梗塞体积测定、跳台和 Morris 水迷宫实验评价 DG 对 tMCAO 大鼠的改善作用。在急性 tMCAO 大鼠模型中: 100 mg·kg⁻¹ DG 能显著改善急性 tMCAO 模型的神经评分和梗死面积。在慢性 tMCAO 大鼠模型中, 100 mg·kg⁻¹ DG 组在生存率上比模型组有所提高, 水迷宫学习期结果提示, 与模型组比, 100 mg·kg⁻¹ DG 组具有改善的趋势, 但弱于 100 mg·kg⁻¹ NBP 组; 30 mg·kg⁻¹ DG 给药组与模型组相比, 无明显改善作用。综上所述, DG 对急性 tMCAO 和慢性 tMCAO 均具有一定的治疗作用。

关键词: 短暂性大脑中动脉阻塞; 银杏二萜内酯; 学习记忆; 血管性痴呆; 脑保护

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)12-3669-05

Improvement effect of diterpene ginkgolides on acute tMCAO rats and chronic tMCAO rats

WANG Ling, XU Shao-feng, FENG Nan, WANG Wei-ping, CAI Jie, WANG Xiao-liang*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing Key Laboratory of New Drug Mechanisms and Pharmacological Evaluation Study (BZ0150), Beijing 100050, China)

Abstract: To study the cognitive effects of diterpene ginkgolides (DG), transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO)-induced rats were established. tMCAO-rats induced by suture method were divided into sham operation group, solvent control group, NBP group, DG group. The animal experiments in the present study were performed in accordance with the Ethical Guidelines of the Laboratory Animal Welfare Ethical Committee of Peking Union Medical College (00000646, 00000635). The effects of DG on tMCAO rats were evaluated by neurological severity score, cerebral infarction volume measurement, step-down and Morris water maze test. In the acute tMCAO rat model, 100 mg·kg⁻¹ DG improved the neural score and infarction volume. In the chronic tMCAO rat model, DG 100 mg·kg⁻¹ significantly improved the survival rate of tMCAO-induced rats. The Morris water maze results showed 100 mg·kg⁻¹ DG decreased the latency of tMCAO-induced rats to find the platform, while the effect was weaker than the NBP. However, DG 30 mg·kg⁻¹ did not show a significant effect. In conclusion, DG exerted a therapeutic effect on transient middle cerebral artery occlusion.

Key words: transient middle cerebral artery occlusion; diterpene ginkgolides; learning and memory; vascular dementia; cerebral protection

收稿日期: 2023-07-25; 修回日期: 2023-09-22.

基金项目: 新药作用机制研究与药效评价北京市重点实验室 (BZ0150).

*通讯作者 Tel: 86-10-63165330, E-mail: wangxl@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0905

脑卒中是我国成人致死、致残的首要原因, 年龄是脑卒中发生的重要因素, 好发于65岁以上的老年人^[1]。随着人口老龄化的日益加剧, 我国脑卒中患病率逐年增加, 随之而来的恢复期治疗意义重大。脑卒中主要分为缺血性和出血性脑卒中, 其中缺血性脑卒中占68%。缺血性脑卒中主要是由脑实质血流不足引起的, 主要致病因素是颅内动脉血栓形成、栓塞及脑内血管的低灌注等^[2,3]。缺血性脑卒中的治疗手段主要有改善脑血流、他汀类药物和神经保护药物等。神经保护剂在治疗缺血性脑卒中有很好的前景, 研究发现其能阻断缺血造成的脑组织损伤一系列的细胞生化和代谢^[4,5]。

银杏二萜内酯葡胺注射液是临床上常用于治疗脑卒中的神经保护剂^[6], 主要通过抑制血小板的活化因子发挥作用^[7]。由于银杏二萜内酯 (diterpene ginkgolides, DG) 的使用时间较短, 相关的报道数量有限, 特别是对急性脑缺血后的恢复期的作用, 对脑功能的影响需要提供更多的数据支持临床应用。本研究考察 DG 对急性短暂性大脑中动脉阻塞 (transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO) 大鼠及慢性 tMCAO 大鼠恢复期的改善作用, 为其临床应用提供数据支持。

材料与方 法

试剂和药品 银杏二萜内酯原料药 (DG), 批号: 200302, 白色粉末, 难溶于水, 纯度为99%, 由江苏康缘药业股份有限公司提供, 吐温80研磨成混悬液。丁苯酞 (NBP), 中国食品药品检定研究院标准品 (每支200 mg), 将其用橄榄油溶解配置成20 mg·mL⁻¹浓度。

实验动物及手术^[8,9]

急性 tMCAO 模型的建立 SD 大鼠, 雄性, 220~240 g。大鼠用气体麻醉机麻醉 (1.5%~2.5% 异氟烷), 体温维持在 (37 ± 0.5) °C, 仰卧位固定于手术台上, 进行线栓法大脑中动脉阻断缺血手术。动物随机分为4组, 溶剂对照组、NBP 200 mg·kg⁻¹组、DG 30 mg·kg⁻¹组和 DG 100 mg·kg⁻¹组, 每组动物17~19只。缺血手术后5 min内完成给药, 大鼠缺血2 h, 再灌24 h后取材。

慢性 tMCAO 模型的建立 SD 大鼠, 雄性, 220~240 g。大鼠适应性饲养3天, 于术前8~12 h禁食, 不禁水。动物异氟烷气体麻醉后行线栓法大脑中动脉阻断缺血手术, 缺血后20~30 min (动物清醒状态) 口服灌胃相应药物, 缺血手术后120 min进行大脑中动脉再灌注手术, 动物术后24 h分笼标记。动物随机分为5组: 假手术组、溶剂对照组、NBP口服100 mg·kg⁻¹组、

DG 30 mg·kg⁻¹和 100 mg·kg⁻¹组, 每组动物15~20只。口服给药, 每天给药1次, 连续给药28天, 动物于术后1、7、14、21、28天记录体重及行为学变化, 动物于术后18天进行跳台实验, 术后21~25天进行水迷宫学习期测试, 术后26天后进行水迷宫探索测试, 术后28天处死。

脑梗塞体积测定和神经行为学评分^[10,11]

脑梗塞体积的测定 大鼠缺血2 h, 再灌24 h后, 即刻断头取脑, 去除嗅球、小脑和低位脑干, 将其冠状切成6片 (每片2 mm), 迅速置于5 mL含有1.5 mL 4% TTC及0.1 mL K₂HPO₄的溶液中染色 (37 °C, 避光) 20~30 min, 其间每隔5 min翻动一次。经TTC染色后, 正常组织深染呈红色, 梗塞组织呈白色。将每组脑片排列整齐, 拍照保存。应用图像分析系统软件 (Photoshop 软件) 处理并统计, 求算每片的梗塞面积, 并最终叠加换算成梗塞体积。为消除脑水肿的影响, 梗塞体积百分率以下列公式计算:

半脑梗塞体积 (%) = 手术侧半球梗塞部分的体积 ÷ 手术侧半球的体积 × 100%

全脑梗塞体积 (%) = 手术侧半球梗塞部分的体积 ÷ 全脑的体积 × 100%

神经行为学评分 于缺血后2 h, 再灌24 h后, 进行动物的行为学评分, 提鼠尾离开地面约1尺, 观察两前肢状况; 将大鼠置于水平地面, 推动其双肩, 观察两侧抵抗力有无差异; 大鼠置于地面, 观察其行走情况。采用四级评分法 (0~4分), 分数越高, 说明其神经行为损伤越严重。①行为完全正常为0分; ②提起鼠尾离开地面, 手术对侧前肢内旋、内收者, 为1分; ③大鼠至地面, 用手挤压两侧检查其抗力, 手术对侧抗力下降者, 为2分; ④大鼠至地面, 观察其行走, 围绕手术对侧转圈者, 为3分; ⑤损伤极其严重, 已无法自主活动者, 为4分。

学习记忆行为学评价^[12,13]

跳台实验 跳台实验装置为一个长方形反射箱, 用黑色塑料板分隔成5间。第一天将大鼠放入跳台内自由活动2 min, 然后接通36 V交流电, 适应性训练3 min; 第二天记录大鼠第一次跳下平台的时间, 即潜伏期以及在5 min内跳下的错误次数。

Morris 水迷宫实验 Morris 水迷宫实验装置直径120 cm, 水深40 cm, 实验时平台位置固定不变, 低于水面2~3 cm。1~5天为定位航行实验, 记录大鼠90 s内找到平台的潜伏期, 并让其在平台上停留30 s。若大鼠90 s内未找到平台, 则将其放到安全平台上停留30 s, 潜伏期记为90 s。

统计学方法 实验结果以 mean ± SEM 表示。水

迷宫实验的潜伏期采用 two-way ANOVA with post hoc LSD 进行比较, 其余通过 one-way ANOVA with post hoc LSD 进行比较。 $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

结果

1 DG 对急性 tMCAO 大鼠的改善作用

在急性 tMCAO 大鼠模型中, 本研究首先利用神经评分对 DG 的作用进行评价, DG 在一定程度上能改善 tMCAO 神经评分, 与阳性药 NBP 相当, 表明 DG 对急性 tMCAO 大鼠有一定的改善作用 (图 1A)。进一步对急性 tMCAO 大鼠的脑梗塞体积进行测定, 与神经评分结果一致, DG $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 能显著改善急性 tMCAO 大鼠的脑梗死体积 (图 1B、C)。以上研究表明, DG 对急性 tMCAO 大鼠有一定的治疗作用。

2 DG 对慢性 tMCAO 大鼠的改善作用

2.1 DG 对慢性 tMCAO 大鼠生存期的改善作用 本研究又建立了慢性 tMCAO 大鼠模型, 评价 DG 的保护作用。生存实验结果显示, 模型组在平均生存天数 ($P < 0.01$)、体重变化 ($P < 0.05$, $P < 0.001$) 与假手术组

具有显著性差异; $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DG 组对平均生存天数有一定的改善趋势, 但弱于 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ NBP 组, 对体重无基本影响 (图 2)。以上结果表明, $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DG 对 tMCAO 大鼠的生存期具有一定的改善作用。

2.2 DG 对慢性 tMCAO 大鼠学习记忆的改善作用 (跳台实验) 跳台实验于 tMCAO 术后 18 天进行, 结果显示在潜伏期方面各给药组与模型组比较均无明显差异; 在错误次数方面, 与假手术组相比, 模型组大鼠有升高的趋势, 而 NBP 组和 DG 小剂量组有一定的改善作用 (图 3)。

2.3 DG 对慢性 tMCAO 大鼠学习记忆的改善作用 (Morris 水迷宫实验) 水迷宫实验于 tMCAO 术后 21 天进行, 结果显示, 模型组大鼠与假手术组在水迷宫学习训练期有明显的统计学差异, 表明 tMCAO 能明显引起大鼠学习记忆障碍; NBP 和 DG ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 能明显地改善 tMCAO 大鼠的学习记忆障碍, 有统计学差异 (图 4)。以上数据表明提示, $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DG 具有一定的改善作用。

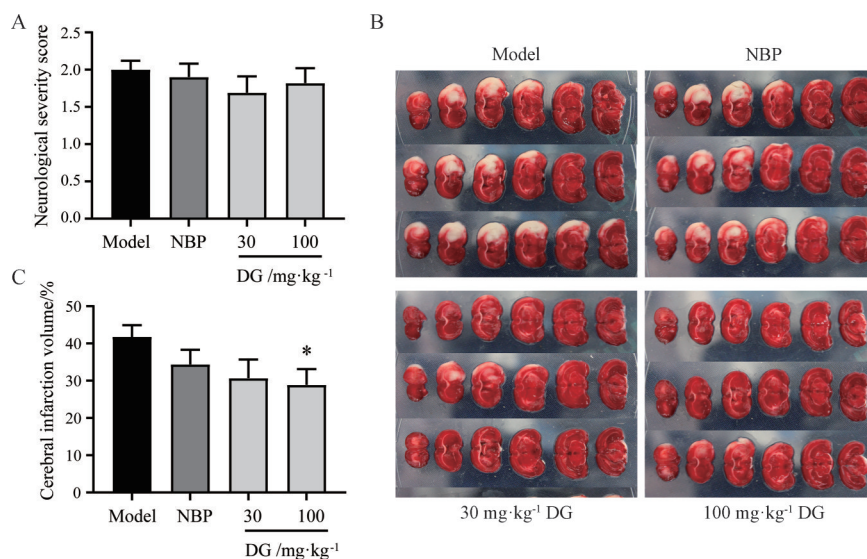


Figure 1 Protective effect of diterpene ginkgolides (DG) on acute transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) rats. A: Neurological score; B: TTC staining; C: Cerebral infarct volume. NBP: *n*-Butylphthalide. $n = 17-19$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs model group

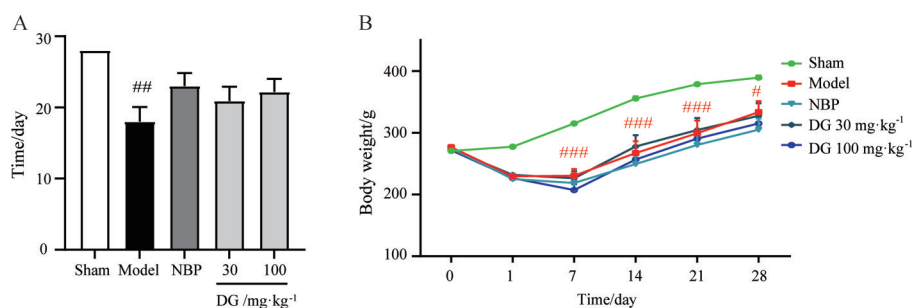


Figure 2 Protective effect of DG on chronic tMCAO rats. A: Survival period of chronic tMCAO rats; B: Weight of chronic tMCAO rats. $n = 15-20$, mean \pm SEM. # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$ vs sham group

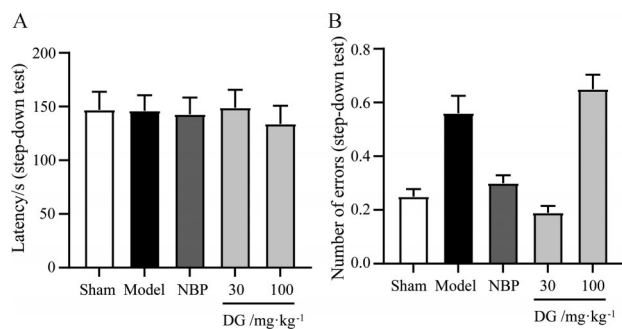


Figure 3 Protective effect of DG on cognition of chronic tMCAO rats (step-down test). A: Latency; B: Number of errors. $n = 15-20$, mean \pm SEM

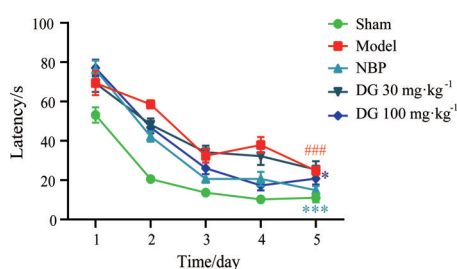


Figure 4 Protective effect of DG on cognition of chronic tMCAO rats (Morris water maze). $n = 15-20$, mean \pm SEM. $^{###}P < 0.001$ vs sham group; $^{\wedge}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$ vs model group

讨论

缺血性脑卒中是由于脑血管阻塞、血流减少导致缺氧及其他营养物质缺乏引起脑组织应激反应和炎性损伤等,长期发展会引起学习记忆的障碍^[13,14]。研究发现神经保护剂在脑缺血后期可改善神经元功能,是治疗缺血性脑卒中的一种有前景的选择。然而,很多神经保护剂在临床阶段的疗效并不显著,临床可选择的药物较少^[15,16]。因此,寻找新的药物或者上市药物的新适应症迫在眉睫。银杏作为传统中药,广泛应用于心脑血管疾病的治疗。研究发现,银杏可通过抗氧化、抗炎和保护神经元等起到增加脑血流量和改善脑缺血作用^[17,18]。

银杏二萜内酯葡胺注射液是治疗缺血性脑疾病的第5类新药,研究表明银杏二萜内酯葡胺注射液可有效改善缺血再灌注大鼠的脑损伤,但长期给药的临床前数据较少。因此,本研究采用tMCAO线栓法制备局灶性脑缺血大鼠模型以评价银杏二萜内酯对脑缺血的改善作用。

在本研究中,急性tMCAO实验结果表明,100 mg·kg⁻¹ DG能显著改善tMCAO大鼠的损伤,主要表现在能一定程度改善神经评分和显著缩小患侧的脑梗塞体积。在慢性tMCAO大鼠实验中,100 mg·kg⁻¹ DG组在生存率上比模型组有所提高;在平均生存天数、跳台实验错

误次数结果中,与模型组比具有改善的趋势。在水迷宫实验中,DG大剂量给药组(100 mg·kg⁻¹)作用与NBP相近,与模型组比较有显著改善作用。30 mg·kg⁻¹ DG给药组与模型组比较无明显改善作用。DG在急性脑缺血后恢复期具有改善学习记忆能力,恢复脑功能,除了抗血小板和活血化瘀以外,与其扩张血管和抗氧化作用有关。综上所述,DG对急性tMCAO和慢性tMCAO均具有一定的治疗作用。

作者贡献: 王玲负责部分实验设计、数据分析和撰写论文;徐少锋和蔡杰负责动物实验;冯楠和王伟平负责数据分析;王晓良负责指导实验设计和论文的修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Stroke Prevention and Treatment in China Writing Group. Brief report on stroke prevention and treatment in China, 2020 [J]. Chin J Cerebrovasc Dis (中国脑血管病杂志), 2022, 19: 136-144.
- [2] Ma Q, Li R, Wang L, et al. Temporal trend and attributable risk factors of stroke burden in China, 1990-2019: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. Lancet Public Health, 2021, 6: e897-e906.
- [3] Wang W, Jiang B, Sun H, et al. Prevalence, incidence, and mortality of stroke in China: results from a nationwide population-based survey of 480 687 adults [J]. Circulation, 2017, 135: 759-771.
- [4] Rabinstein AA. Update on treatment of acute ischemic stroke [J]. Continuum, 2020, 26: 268-286.
- [5] Chamorro A, Dirnagl U, Urra X, et al. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation [J]. Lancet Neurol, 2016, 15: 869-881.
- [6] Peng Y, Xu SF, Wang L, et al. Effects of chiral NBP on cerebral infarct volume due to transient focal cerebral ischemia [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2005, 14: 420-423.
- [7] Wang H, Song S, Zhao JX. The effects of *Ginkgo biloba* diterpene lactone glumine injection on SIRT1/HIF-1 α /VEGF signal pathway and synaptic plasticity in rats with focal cerebral ischemia [J]. Med J West China (西部医学), 2021, 33: 823-828.
- [8] Hao CH, Zhang R, Sun SY, et al. Protection of batroxobin injection on super acute stage of thromboembolic cerebral stroke in rats [J]. Drug Eval Res (药物评价研究), 2017, 40: 911-916.
- [9] Nie JW, Sun CX, Huang S, et al. The neuroprotective effect of p-benzoyl salidroside, a derivative of salidroside, on MCAO model rats [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2022, 38: 67-72.
- [10] Li WP, He XS, Tao L, et al. Study on improvement effects of fingolimod on MCAO/R injury model rats [J]. China pharm (中国药房), 2019, 30: 752-756.

- [11] Xiong J, Xu PX, Sun LN, et al. The protective effects of butylphthalide on mitochondria against hypoxia/hypoglycaemia in cultured neurons [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床)*, 2007, 23: 73-75.
- [12] Peng X, Wu G, Wu H, et al. Influence of Morris water maze training on Alzheimer's disease rats learning and memory ability and the expressions of TNF- α , SOD and MDA in hippocampal tissue [J]. *Chin J Gerontol (中国老年学杂志)*, 2017, 37: 1833-1835.
- [13] Zhang JN, Jin XF, Gao WJ. The role of p53/CytC/Apaf-1 in mediating mitochondrial apoptosis pathway in ischemic stroke [J]. *Chin J Gerontol (中国老年学杂志)*, 2022, 42: 226-230.
- [14] Zheng XT, Gan HY, Li L, et al. Astragaloside IV inhibits inflammation after cerebral ischemia in rats through promoting microglia/macrophage M2 polarization [J]. *J Zhejiang Univ (浙江大学学报)*, 2020, 49: 679-686.
- [15] Ginsberg MD. Expanding the concept of neuroprotection for acute ischemic stroke: the pivotal roles of reperfusion and the collateral circulation [J]. *Prog Neurobiol*, 2016, 145: 46-47.
- [16] Paul S, Candelario-Jalil E. Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: an overview of clinical and preclinical studies [J]. *Exp Neurol*, 2021, 335: 113518.
- [17] Hu Z, Zhao J, Song W, et al. Protective effect of *Ginkgo biloba* extract on the brain in a cerebral ischemia-reperfusion injury rat model [J]. *Chin J Comp Med (中国比较医学杂志)*, 2022, 32: 55-61.
- [18] Zhao J, Wu Y, Zhang JM, et al. Therapeutic effect of *Ginkgo biloba* extract on oxidative stress and inflammation in rats with cerebral ischemia reperfusion injury [J]. *J Baotou Med Colle (包头医学院学报)*, 2019, 35: 61-63.