

银杏内酯 B 对于实验性脑出血后神经保护作用研究

郑家地¹ 郑红花² 聂立铭³

作者单位: 1. 厦门市中医院 神经外科 361000 2. 厦门大学 神经科学研究所 361000

3. 厦门大学 分子影像暨转化医学研究中心 361000

基金项目: 厦门市科技局科技惠民计划(项目编号: 3502Z20164036)

【摘要】 目的 探讨银杏内酯 B 对于脑出血后脑水肿、脑细胞凋亡及脑代谢的影响, 从多角度进一步探讨银杏内酯 B 的神经保护机制。方法 将 50 只 Sprague-Dawley (SD) 大鼠随机分为干预组 ($n=21$)、对照组 ($n=21$)、假手术组 ($n=8$), 采用 VII 型细菌胶原酶构建大鼠实验性脑出血模型, 在脑出血造模后第 3 天行脑含水量检测; 在第 3 天采用 TUNEL 法行细胞凋亡检测; 在造模成功后, 分别在第 1 天、第 3 天、第 7 天, 对 3 组大鼠行氢质子磁共振波谱成像 ($^1\text{H-MRS}$), 并对图像进行处理及定量分析。结果 脑组织含水量对照组 [82.52 ± 0.86] % 与干预组 [81.45 ± 0.54] % 比较, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。脑细胞凋亡检测, 干预组 (52.47 ± 2.66) 与对照组 (44.22 ± 3.11) 比较, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。 $^1\text{H-MRS}$ 检测结果表明, 银杏内酯 B 3 天亚组和 7 天亚组的 N-乙酰天门冬氨酸 (NAA) 较对照组明显升高 (34.56 ± 2.76 比 26.78 ± 3.26 , 62.66 ± 2.79 比 56.34 ± 1.32 ; $P < 0.05$)。乳酸 (Lac) 明显降低 (56.78 ± 3.22 比 66.47 ± 3.56 , 50.33 ± 4.05 比 55.78 ± 4.07 , 均 $P < 0.05$), 而胆碱复合物 (Cho)、肌酸 (Cr) 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 银杏内酯 B 可以通过降低脑组织含水量、减少细胞凋亡、改善脑代谢等多途径发挥神经保护作用。

【关键词】 磁共振波谱成像 脑出血 银杏内酯 B 脑代谢 细胞凋亡

doi: 10.3969/j.issn.1672-2671.2018.02.008

脑出血后, 炎症反应和自由基损伤等可以导致细胞钙超载, 最终造成神经损伤, 银杏内酯 B 具有抗炎、抗氧化、抗凋亡等作用, 本研究观察银杏内酯 B 对实验性脑出血大鼠神经细

胞水肿、细胞凋亡、脑代谢的影响, 探讨银杏内酯 B 对于脑出血后神经保护作用的可能机制。

作者简介: 郑家地, 副主任医师, 硕士研究生, 主要研究方向: 脑血管疾病。

龄增加, 很多老人的伴侣、亲属、同龄朋友等去世的概率增加, 使得老人社会支持得分降低。

收入水平和老年人的社会支持呈正相关。生理需求是人类最基本的需求, 该需要的满足是以物质条件为基础的, 当生活需求有了保障之后, 老年人才会将更多的精力投入到社会交往活动中, 从而获得更多的社会支持^[8]。

城市老年人的社会支持得分高于农村老年人, 城乡老年人的社会支持差异有统计学意义, 该结果刘新研等^[7] 研究结果不一致, 分析原因可能一方面与城市老年人具有较高的文化程度、收入水平、兴趣爱好有关; 另一方面我国农村, 青年任外出打工的人数越来越多, 导致老年人单独生活的现在比城市更加严重。

4. 结论

对高龄、低收入、文化程度较低、兴趣爱好和亲密朋友少、独居的老年人应给予更多的包括物质上的援助、生活上的照料、情感上的关爱和社会网络的支持。政府机构应重视完善社会福利和医疗保障体制, 使老年人老有所养、老有所医; 鼓励配偶、子女给予老年人经济、心理各方面的支持, 促进家人间的相互支持与照顾, 发挥家庭支持系统的重要作用; 同时支持老年人培养广泛兴趣爱好, 提高老年人的社会支持, 对提高

老年人的生活质量有重要意义。

参 考 文 献

- 1 卫焕焕, 李婷, 姜月, 等. 我国老年人社会支持的研究进展 [J]. 护理研究, 2016, 30(10): 1161-1162.
- 2 张磊, 李良寿, 范凤美, 等. 老年人社会支持情况与生命质量关系的研究 [J]. 中国行为医学科学, 2002(1): 86-88.
- 3 肖水源, 杨德森. 社会支持对身心健康的影响 [J]. 中国心理卫生杂志, 1987, 1(4): 183-187.
- 4 王瑞梅, 郭继志, 张涵, 等. 山东省老年人社会支持状况对心理健康的影响 [J]. 中国卫生事业管理, 2016(3): 217-220.
- 5 余永春, 贺加. 社会支持对成渝地区军队老年人生命质量的影响 [J]. 重庆医学, 2009, 38(20): 2599-2600.
- 6 宁艳花, 张琳, 姚丽, 等. 银川市老年人社会支持状况的调查 [J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(3): 487-490.
- 7 刘新研, 王春颖, 王靖宇, 等. 黑龙江省 617 例城乡老年人社会支持状况调查 [J]. 医学与社会, 2011, 24(9): 13-14+21.
- 8 李磊, 施帆帆, 张强, 等. 城市社区老年人社会支持现状及影响因素分析 [J]. 中国卫生事业管理, 2014(6): 412-415+428.

收稿日期: 2018-2-28

1. 资料与方法

1.1 主要试剂及设备 VII型细菌胶原酶(SIGMA USA), 银杏内酯 B(ABSIN), 细胞凋亡试剂盒由 PROMEGA 生物工程有限公司提供(Cat#7360), 9.4T 磁共振(BRUKER, 瑞士), KOPF 型大鼠脑立体定位仪(美国 KOPF 公司), 微量注射器(上海飞鸽医疗器械有限公司), 牙科钻, 手术器械等。

1.2 研究方法

1.2.1 脑出血模型的建立: 健康雄性 SD 大鼠, 由厦门大学实验动物中心提供, 体重 250 ~ 300g, 4% 水合氯醛(400mg/kg) 溶液腹腔注射麻醉, 将大鼠俯卧位固定在立体定向仪上(KOPF USA) 根据大鼠大脑立体定位图谱调整立体定向仪使门齿沟平面比耳间线平面低 3.3mm, 前囟和后囟基本上在同一平面上, 将头部背侧的鼠毛剪去, 皮肤消毒后纵行切开头皮 1cm, 暴露颅骨, 用 30% 双氧水腐蚀颅骨上腱膜及颅骨外膜, 暴露前囟; 于前囟后 0.2mm, 中线右旁 3mm, 用牙科钻钻一直径约 1mm 的圆孔; 钻孔后将 0.4units 的 VII 型细菌胶原酶(SIGMA USA) 溶于 1 μ l 生理盐水中, 采用微量加样器沿钻孔方向垂直进针 5.0mm, 使用缓慢推进器匀速将其推注入脑, 术毕用石蜡封闭骨口, 严密缝合皮肤切口, 待动物苏醒后送回动物房饲养。

1.2.2 脑含水量检测: 麻醉后断头取脑, 将其从大脑纵裂切开, 然后平均分成前中后三块并称重, 置于 95 $^{\circ}$ C 烘箱中烘烤至恒重后称取干重, 根据下式计算脑组织含水量: (湿重 - 干重) / 湿重 \times 100%; 取平均值做统计学分析。

1.2.3 脑组织凋亡细胞的检测: 采用 TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick-end-labeling) 法, 操作按试剂盒说明书进行, 试剂盒由 PROMEGA 生物工程有限公司提供(Cat#7360), 高倍镜下(400 倍) 细胞核呈棕黄色着色为凋亡阳性细胞。高倍镜下在双侧纹状体区各随机取 5 个视野, 计数阳性细胞。阳性对照用 1mg/L DNA 酶 I 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟, 缓冲液中含有 50mmol/L Tris, 10mmol/L MgSO₄, 0.1mmol/L DTT, 蒸馏水冲洗。阴性对照: 以磷酸盐缓冲液(PBS) 代替 DNA 末端标记中的末端脱氧核苷酸转移酶及生物素标记的 dUTP。

1.2.4 MRI 参数及后处理方法: 采用 BRUKER 9.4T 超导 MR 成像系统, 并用 EWS 影像后处理工作站处理图像 A 通道大鼠专用线圈。大鼠麻醉后仰卧位, 头置于线圈中央, 毛巾覆盖体表保温。MRS: 点分辨自旋回波波谱(point-resolved spectroscopy, PRESS) 刺激回波采集样式(stimulated echo acquisition mode, STEAM) 在 T2 横断位像定位, 置于尾壳核层面(包括脑出血区及其周围区), 体素容积为 3 \times 3 \times 3mm, 扫描前自

动匀场, 采集时间为 20 分钟, 在右侧脑出血区周围选取 4 ~ 7mm² 感兴趣区, 统计该区域的各代谢物波峰下面积。

1.2.5 干预组处理方法: 干预组大鼠按 20mg/kg 银杏内酯 B 腹腔每日注射 1 次。对照组大鼠注射同体积的生理盐水。所有大鼠放回笼中常规喂养。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析, 符合正态分布采用两样本 *t* 检验, 非正态分布采用 Wilcoxon 非参数检验; 两组间比较采用单因素方差分析 One-Way ANOVA, 多组间比较采用 LSD 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2. 结果

2.1 脑出血模型的建立及大鼠追尾征 本研究中建立的大鼠脑出血模型, 均有左侧肢体活动障碍, 呈现追尾征。3 天内干预组及对照组各死亡 1 只, 死亡时段数据缺失, 其余大鼠功能障碍随着银杏内酯 B 的应用, 偏瘫症状得到改善。

2.2 脑组织含水量检测 对照组 [(82.52 \pm 0.86) %] 与干预组 [(81.45 \pm 0.54) %] 比较, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.3 细胞凋亡检测 脑细胞凋亡检测, 干预组 (52.47 \pm 2.66) 与对照组 (44.22 \pm 3.11) 比较, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.4 ¹H-MRS 检测结果

2.4.1 假手术组: 假手术组 MRS 波形基本与脑组织磁共振波谱曲线相同, NAA 峰最为明显; Cr 与 Cho 峰曲线下面积相近; Lac 峰大部分未见。

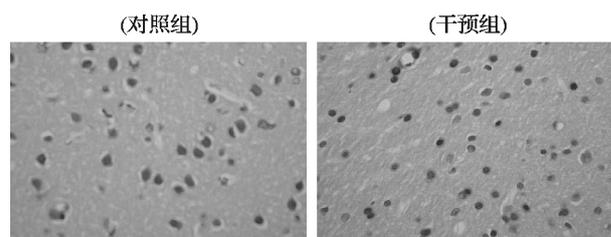


图 1 第 3 天干预组与对照组细胞凋亡情况

2.4.2 干预组与对照组: 干预组与对照组的第 1 天、第 3 天在脑血肿周围均可见到 NAA 下降, 但两组在第 1 天 NAA 的浓度及 Lac 浓度均差异无显著意义 ($P > 0.05$), 在第 3 天、第 7 天, 干预组的 Lac 浓度均较对照组明显降低 (56.78 \pm 3.22 比 66.47 \pm 3.56, 50.33 \pm 4.05 比 55.78 \pm 4.07; 均 $P < 0.05$), 而胆碱复合物(Cho)、肌酸(Cr) 虽然浓度略有变化, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1、表 2。

表 1 干预组与对照组各时间点 NAA 与 Lac 浓度比较

组别	NAA(μ mol/L)				Lac(mmol/L)			
	对照组	干预组	<i>t</i>	<i>P</i>	对照组	干预组	<i>t</i>	<i>P</i>
第 1 天	43.25 \pm 2.35	44.31 \pm 2.46	-0.735	>0.05	76.14 \pm 2.78	73.85 \pm 4.19	0.566	>0.05
第 3 天	26.89 \pm 3.54	32.54 \pm 2.78	-2.966	<0.05	66.28 \pm 3.69	59.82 \pm 3.87	2.789	<0.05
第 7 天	55.42 \pm 1.51	61.73 \pm 2.67	-5.098	<0.05	55.68 \pm 4.17	51.32 \pm 4.45	2.144	<0.05

表 2 干预组与对照组各时间点 Cho 与 Cr 浓度比较(mmol/L)

组别	Cho				Cr			
	对照组	干预组	<i>t</i>	<i>P</i>	对照组	干预组	<i>t</i>	<i>P</i>
第 1 天	88.06 ± 4.11	87.44 ± 3.65	-0.275	>0.05	75.66 ± 2.99	77.58 ± 4.02	-0.856	>0.04
第 3 天	94.31 ± 2.55	93.66 ± 3.58	0.169	>0.05	82.33 ± 2.58	77.63 ± 3.19	2.469	>0.05
第 7 天	103.99 ± 3.21	100.78 ± 3.96	1.677	>0.05	81.99 ± 3.79	80.11 ± 1.92	0.915	>0.02

3. 讨论

银杏内酯 B (GB) 为一种强力的血小板活化因子受体拮抗剂,其具有抗血小板聚集、抗炎、抗凋亡、免疫调节等作用,并且毒副作用低,作为神经保护剂应用于临床^[1],其保护机制有待进一步阐明,是目前研究热点之一。脑出血后血肿周围存在继发性神经损伤,包括脑水肿、细胞凋亡、自由基损伤等。应用 GB 能明显降低脑出血大鼠的神经功能障碍,减轻脑出血后脑水肿;并且凋亡减轻,超微结构明显好转^[2],GB 也能使脑梗死面积含水量明显降低,对局灶性脑缺血大鼠有直接的神经保护作用,这些研究结论与本研究结果基本一致^[3]。体外实验证实,GB 可以拮抗谷氨酸诱导的培养脑皮质神经细胞凋亡^[4]。有研究发现,GB 可以拮抗谷氨酸诱导的视网膜神经细胞凋亡,其作用机制可能与提高线粒体膜功能有关^[5]。也有研究发现在小鼠胚胎干细胞中,GB 激活 JNK、caspase3 和 PAK2 产生抗凋亡效应。总之,GB 可能通过降低体内自由基和炎症反应影响多条信号通路,从而抑制脑出血后神经细胞凋亡,达到神经保护作用。

磁共振波谱 (MRS) 为一种无创性研究活体组织生化代谢的影像技术,利用 MR 现象和化学移位作用进行特定原子核及化合物的定量分析,已经成为研究蛋白质、核酸、多糖等生物大分子及组织、器官活体状态的有力工具。近年来对 MRS 研究显示^[6],MRS 可检测的脑组织的代谢产物主要有 NAA、Lac、Cho 和 Cr。NAA 可以作为反映神经元功能状况的内标物,被认为是神经病理状态的生化标志。NAA 降低提示神经元和突触的损失及功能异常,但仅有脑功能失调而无神经元死亡也可引起 NAA 的显著丢失^[7]。Lac 可反映无氧酵解的情况,当脑缺血、氧供减少、无氧酵解率增加时,Lac 含量亦增加^[8]。Cho 峰及其含量增加可能是细胞合成或分泌量增加的反映。Cr 峰是能量代谢的一种产物,通常将 Cr 作为参照波峰,进行半定量分析。

本研究表明,GB3 天亚组和 7 天亚组的 N-乙酰天门冬氨酸 (NAA) 较对照组明显升高 (34.56 ± 2.76 比 26.78 ± 3.26, 62.66 ± 2.79 比 56.34 ± 1.32; 均 $P < 0.05$),乳酸明显降低 (56.78 ± 3.22 比 66.47 ± 3.56, 50.33 ± 4.05 比 55.78 ± 4.07; 均 $P < 0.05$),而胆碱复合物、肌酸差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。关于 Cho 和 Cr,不同研究得到的结论也不相同^[9]。Cr 是能量的缓冲剂,一般比较稳定,当患者能量代谢不足时,其含量增加;如石金河^[10]等指出,肌酸激酶与脑血管疾病密切相关,间接反映脑组织能力代谢的变化^[11-12]。

综上所述,GB 可以通过减少脑组织含水量、减少细胞凋亡、改善脑代谢,从而起到神经保护作用,也可以通过抗炎、对

星形胶质细胞的保护、抑制兴奋性诱导的神经元损伤、免疫调节、在多种疾病的模型中发挥神经保护作用,但其神经保护效应的内在完整机制还有待于更多实验来探索。

参 考 文 献

- 1 黄建,刘之荣.银杏内酯 B 的神经保护作用及机制研究进展[J].国际神经病学神经外科学杂志,2014,41(6):559-562.
- 2 王登科,张海宇,刘海洋,等.银杏叶提取物对大鼠脑出血后神经保护作用的研究[J].神经解剖学杂志,2011,27(3):316-320.
- 3 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.
- 4 蔡卫斌,臧颖,余明.银杏内酯 B 对谷氨酸诱导大鼠大脑皮质神经元氧化损伤的影响[J].中山大学学报(医学科学版),2003,24(3):256-260.
- 5 郭梦翔,朱晓波,罗燕,等.银杏内酯 B 对谷氨酸诱导视网膜神经细胞凋亡的影响[J].中山大学学报(医学科学版),2008,29(6):690-694.
- 6 Nelson SJ,Graves E,Pirzkall A,et al. In vivo molecular imaging for planning radiation therapy of gliomas: an application of 1H MRSI[J]. J Magn Reson Imaging,2002,16(4):464-476. DOI: 10.1002/jmri.10183.
- 7 Demougeot C,Bertrand N,Prigent-Tessier A,et al. Reversible loss of N-acetyl-aspartate in rats subjected to long-term focal cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab,2003,23(4):482-489. DOI: 10.1097/01.WCB.0000050066.57184.60.
- 8 Dani K A,An L,Hennig E C,et al. Multivoxel MR spectroscopy in acute ischemic stroke: comparison to the stroke protocol MRI[J]. Stroke,2012,43(11):2962-2967.
- 9 Muñoz Maniega S,Cvoro V,Armitage PA,et al. Choline and creatine are not reliable denominators for calculating metabolite ratios in acute ischemic stroke[J]. Stroke,2008,39(9):2467-2469. DOI: 10.1161/STROKEAHA.107.507020.
- 10 石金河,卢瑞丽,杨亚勤,等.心电图 QT 离散度与急性脑血管病患者血清酶学变化相关性研究[J].重庆医科大学学报,2013,38(11):1341-1344.
- 11 Weidusehat N,Mao X,Beal MF,et al. Sex differences in cerebral energy metabolism in Parkinson's disease: a phosphorus magnetic resonance spectroscopic imaging study[J]. Parkinsonism Relat Disord,2014,20(5):545-548. doi: 10.1016/j.parkreldis.2014.02.003.
- 12 Bakker F C,Klijn C J M,Jennekens-Schinkel A,et al. Cognitive Impairment Is Related to Cerebral Lactate in Patients With Carotid Artery Occlusion and Ipsilateral Transient Ischemic Attacks[J]. Stroke,2003,34(6):1419-1424. DOI: 10.1161/01.str.0000069725.09499.14.

收稿日期:2018-1-20