

## 银杏叶提取物对脑梗死后神经元轴突损伤的保护作用

李欣<sup>1</sup>, 荆小莉<sup>1</sup>, 简际美, 崔喜梅, 魏红艳, 胡春林, 廖晓星

(中山大学附属第一医院急诊科, 广东 广州 510080)

**【摘要】** 目的 探讨脑梗死慢性期神经元轴突的损伤情况及银杏叶提取物(EGB761)的干预作用机制。方法 用光化学法制备大脑皮质局灶缺血梗死(PCI)模型。将 15 只大鼠随机分为 EGB761 组、磷酸盐缓冲液(PBS)组、假手术组, 每组 5 只。EGB761 组腹腔注射 25 mg/kg 的 EGB761, 假手术组、PBS 组腹腔注射等量 PBS, 每日 1 次, 共 7 d。PCI 后 1 d 用磁共振成像(MRI)技术观察梗死灶的情况并计算其体积。PCI 后 7 d 处死大鼠后取脑, 电镜下观察梗死灶附近皮质神经元轴突的损伤情况。结果 光化学法可以成功复制 PCI 模型。PBS 组和 EGB761 组梗死灶体积分别为  $(265.1 \pm 24.2) \text{mm}^3$  和  $(262.9 \pm 26.3) \text{mm}^3$ , 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。PCI 后 7 d, 与假手术组比较, PBS 组可见到严重的病变, 无鞘纤维中可见广泛的轴浆水肿或溶解、基质变淡; 有鞘纤维中可见广泛的髓鞘增厚或皱缩、板层紊乱。EGB761 组则较 PBS 组的病变显著减轻。结论 脑梗死发生后在较长的一段时间内都存在着显著的轴突损伤, 而 EGB761 则对这种轴突损伤有显著的保护作用。

**【关键词】** 脑梗死; 银杏叶提取物; 轴突

中图分类号: R285.5; R743.3 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.03.007

## Protective effect of ginkgo biloba extract (银杏叶提取物) on neuronal axon injury after cerebral infarction

LI Xin, JING Xiao-li, LIN Ji-yan, CUI Xi-mei, WEI Hong-yan, HU Chun-lin, LIAO Xiao-xing. Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

Corresponding author: LIAO Xiao-xing, Email: liaowens@hotmail.com

**【Abstract】** Objective To approach the neuronal axon injury situation during chronic stage of cerebral infarction and the interference mechanism of ginkgo biloba extract (EGB761, 银杏叶提取物). Methods The rat model of cerebral cortical focal ischemic infarction named as photo-thrombotic cortical injury (PCI) was induced by photochemistry. Fifteen Sprague-Dawley (SD) rats were divided into three groups (each  $n=5$ ): EGB761 group, phosphate buffer solution (PBS) group and sham operation group. EGB761 group was treated by intra-peritoneal injection of EGB761 (25 mg/kg); equal amount of PBS was injected into the peritoneal cavity of sham operation and PBS groups, once everyday for 7 days. One day after the establishment of PCI, magnetic resonance imaging (MRI) was applied to investigate the infarction focus and calculate its volume. Seven days after PCI formation, the rats were sacrificed and their brains were taken. Under the electron transmission microscope, the situation of cortical neuronal axon injury in and close to the focus of infarction was studied. Results The cortical infarction in rat was successfully induced by photochemistry. The volumes of infarction area in EGB761 and PBS groups were similar [ $(265.1 \pm 24.2) \text{mm}^3$  vs.  $(262.9 \pm 26.3) \text{mm}^3$ ,  $P > 0.05$ ]. Seven days after PCI formation, compared with sham operation group, the pathological changes in PBS groups were more serious, in the fiber without neurilemma, extensive edema or dissolution in axoplasm and paler matrix could be seen, and in the fiber with neurilemma, extensive sheath thickening or folding and shrinking with lamella arrangement disturbance could be found. The pathological changes of axons in EGB761 group were obviously lighter than those in PBS group. Conclusion In a relatively long time after the onset of cerebral infarction, significant axon injury exists; EGB761 has an obvious protective effect on this kind of axon injury.

**【Key words】** cerebral infarction; ginkgo biloba extract; axon

脑卒中依然是目前迫切需要解决的医疗难题之  
基金项目: 广东省科技计划项目(2006B36004010, 2007B031402005)

通信作者: 廖晓星, Email: liaowens@hotmail.com

作者简介: 李欣(1972-), 男(汉族), 山东省人, 医学博士, 主治医师。

一, 除了急性缺血、缺氧导致的脑细胞坏死外, 慢性的细胞损伤和凋亡也是导致脑功能受损的重要原因<sup>[1-2]</sup>, 缺血/再灌注损伤、过度的炎症反应、兴奋性氨基酸毒性等因素都可以引发并加重这一病理生理

过程。银杏叶提取物(EGB761)的主要成分为黄酮和萜内酯。近年来研究发现,EGB761 有清除自由基和过氧化脂质、扩张血管、改善循环、拮抗血小板活化因子等多种药理活性<sup>[3]</sup>。目前已广泛用于脑血管性疾病的治疗,无论是对急性期的脑缺血、缺氧和脑水肿,还是慢性期的脑功能不全和退化性痴呆等,都有较好的治疗作用<sup>[4]</sup>,但其具体机制并不清楚。本研究拟复制大脑梗死模型,观察脑梗死慢性期的病理变化及 EGB761 的治疗作用,并初步探讨其机制。

**1 材料与与方法**

**1.1 光化学法大脑皮质局灶缺血梗死(PCI)模型制备:**根据 Watson 等<sup>[5]</sup>的方法稍有改动制备 PCI 模型。选择体重约 250 g 的雄性 SD 大鼠,腹腔注射氯胺酮(80 mg/kg)和甲苯噻嗪(8 mg/kg)进行麻醉。生理盐水稀释的玫瑰红(40 mg/kg)通过股静脉注入体内。在脑立体定位仪上固定动物,切开头皮暴露颅骨表面。把一根直径 10 mm 的光导纤维棒定位连接在颅骨前凶点后 3 mm 和中线向右旁开 3 mm 的交界点。光导纤维棒的另一端连接冷光源,用最大输出功率照射 8 min。实验过程中监测并控制肛温在 37 ℃。大鼠清醒后送入动物中心饲养,自由饮食。假手术组大鼠除不注射玫瑰红外,其余操作相同。此实验获得中山大学动物伦理委员会的批准。

**1.2 动物分组及给药:**按照随机双盲原则将 15 只大鼠分为假手术组、EGB761 组和磷酸盐缓冲液(PBS)组,每组 5 只。EGB761 组从术后 1 h 起腹腔注射 EGB761 (金纳多注射液,德国威玛舒培博士药厂产品)25 mg/kg;假手术组、PBS 组腹腔注射等量 PBS;均每日 1 次,共 7 d。

**1.3 磁共振成像(MRI)检查:**PCI 后 1 d 经 MRI 检查并计算大鼠梗死灶体积,测量过程参照文献<sup>[6]</sup>方法。动物麻醉后,把头放置在一个 35 mm 的谐振器中。按照 RARE 顺序(重复时间 3 000 ms,有效回

波时间 87 ms,层面内空间分辨率 156 μm<sup>2</sup>,监测时间 5 min)采集厚度为 1.2 mm 的 13 个相邻的 T2 加权冠状薄层断面。设定一个信号强度阈值,利用半自动影像分析软件在计算机上将损伤的脑组织分段,并做出形态学评估。根据每个断层的面积和每两个相邻断层之间的距离计算出梗死灶的体积。

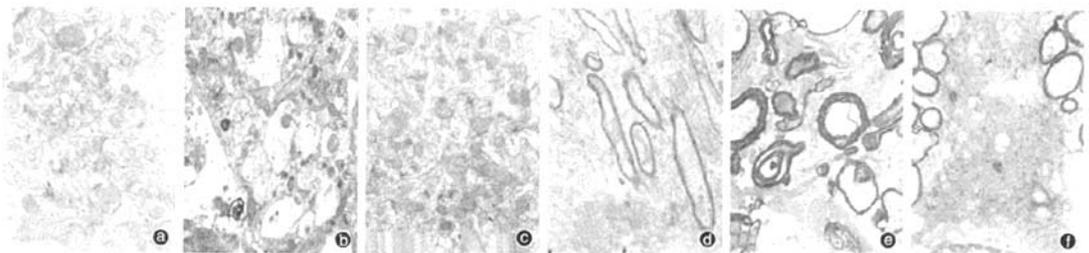
**1.4 电镜检查:**PCI 后 7 d 麻醉后断头取脑,0 ℃下迅速剥取梗死灶后 0.5 mm 处 0.5 cm<sup>3</sup> 的大脑皮质组织块,用体积分数为 4% 多聚甲醛水溶液固定 4 h (4 ℃)。用 0.1 mol/L PBS 进行漂洗,锇酸后固定,乙醇丙酮梯度脱水,包埋,超薄切片,常规铀-铅双染,透射电镜下观察其形态学变化。

**1.5 统计学处理:**应用 SPSS 12.0 软件,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用配对 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 透射电镜下观察脑梗死后神经轴突的损伤(图 1):**PCI 后 7 d,梗死灶同侧大脑皮质的形态学变化。与假手术组比较,PBS 组可见到更严重的病变:无鞘纤维中可见广泛的轴浆水肿或溶解、基质变淡、纤维融合,个别可见少突胶质细胞吞噬纤维现象;有鞘纤维中髓鞘增厚或皱缩、板层紊乱,个别可见髓鞘淀粉样变性,轴索水肿,部分基质溶解,轴索膜与髓鞘板层的最内层分离。与 PBS 组比较,EGB761 组可见无鞘轴突轻度的轴浆水肿、轴突畸形、基质变淡、未见轴突融合与少突胶质细胞吞噬轴突现象;有鞘轴突的脱髓鞘和髓鞘板层化现象明显较轻,形态大致正常,未见髓鞘淀粉样变性现象。

**2.2 梗死灶的 MRI 检查和体积测定:**PCI 后 1 d, T2 信号图像显示右侧大脑半球有明显细胞性水肿高强度信号。梗死灶从前凶点延续到向后 6 mm。脑梗死动物受影响的皮质区域包括额叶皮质、顶叶皮质、皮质的前肢和后肢支配区域、部分枕叶皮质。先



①~③依次为假手术组、PBS 组、EGB761 组无鞘轴突,×11 500;④~⑥依次为假手术组、PBS 组、EGB761 组有鞘轴突,依次为×11 500、×6 610、×11 500

图 1 透射电镜下观察各组大鼠脑梗死后神经轴突损伤情况(轴-铅双染)

前的研究已经表明,这类梗死灶会导致机体对侧前爪持续性的抓取功能丧失。PBS 组和 EGB761 组的梗死灶体积分别为  $(265.1 \pm 24.2) \text{mm}^3$  和  $(262.9 \pm 26.3) \text{mm}^3$  ( $P > 0.05$ );假手术组未见梗死灶。

### 3 讨论

光化学法制备脑梗死模型由 Watson 等于 1985 年首次报道<sup>[5]</sup>,近年来被广泛应用于脑梗死的研究。光化学法的原理是由注入动物体内特定的光敏物质在特定波长的光源照射下,诱发光化学反应,产生并释放活性氧自由基,导致血管内皮细胞损害,引发血小板聚集、黏附并进一步形成血管内血栓,使血管闭塞,局部组织缺血、缺氧,最终发生不可逆的缺血性脑损伤。其优点是:可预知梗死的部位、深度和范围,死亡率低,重复性好。本实验中,已成功制成 PCI 模型,并伴有血脑屏障破坏。血脑屏障的破坏保证了干预药物注射到侧脑室后可弥散到梗死灶及其周围而发挥作用,每个梗死灶的大小基本一致,这为随后对药物治疗效果的比较提供了前提。

既往的病理研究结果表明,脑组织缺血 24 h 时缺血侧大脑皮质的细胞轴突存在不同程度的损伤,再灌注 24 h 后缺血部分区域的轴突破坏最为明显,轴突排列紊乱、不规则,纤维数目较假手术组显著减少,且染色明显变浅,纤维变短、变细。本研究中,PCI 后 7 d 透射电镜下依然可以看到明显的轴突病变。与假手术组比较,PBS 组可见无鞘轴突广泛的轴浆水肿、轴突畸形、基质变淡、轴突融合,个别可见少突胶质细胞吞噬轴突;有鞘轴突广泛的脱髓鞘和髓鞘板层化现象,轴突水肿、基质变淡,个别可见髓鞘淀粉样变性。作为神经元细胞的一部分,轴突的病变和细胞体本身的病变是一致的,细胞器的病变更是共同的。细胞体的坏死、凋亡必然带来轴突的损伤,而轴突的损伤又进一步加重胞体的病变<sup>[7]</sup>。在我们既往关于视神经的研究中已经证实,在持续性高血压大鼠模型中存在神经节细胞的损伤和凋亡,而拮抗髓鞘抑制蛋白(包括 Nogo-66、MAG 和 OMgp)的共同受体 NgR1 后可逆转这一过程。因此,有理由相信,除了缺血、缺氧和过度的炎症反应等导致轴突损伤的原因之外,Nogo-66、MAG 和 OMgp 在脑损伤局部的过多表达也加重了这一损伤过程<sup>[8]</sup>。

本研究结果显示,使用 EGB761 后可显著减轻轴突的损伤:无鞘轴突仅见轻度的轴浆水肿、轴突畸形、基质变淡,未见轴突融合与少突胶质细胞吞噬轴突现象;有鞘轴突的脱髓鞘和髓鞘板层化现象轻微,形态大致正常,未见髓鞘淀粉样变性现象。这说明

EGB761 对脑梗死后慢性期的轴突损害有很好的保护作用。EGB761 含银杏黄酮苷、银杏内酯和白果内酯等多种活性物质,作为一种中药制剂,其具有清除氧自由基、防止细胞老化和脂质过氧化对细胞膜损伤、对抗血小板活化因子、改善微循环等多种药理作用,所以 EGB761 防治轴突损伤的机制也应该是多方面的和复杂的<sup>[9]</sup>。但具体作用机制尚不明确,可能是通过营养神经细胞促其合成神经营养因子,从而起到对细胞及其轴突的营养作用;也可能是通过降低自由基产生的异常信号通路而减少细胞损伤所致;也可能与逆转了髓鞘抑制蛋白的损伤和抑制再生的作用有关<sup>[10]</sup>。

总之,本研究发现 EGB761 在防治脑梗死后慢性期轴突损伤方面有一定的作用,为下一步将其用于脑梗死的慢性期治疗提供了实验依据,但作用机制尚待进一步深入研究。

### 参考文献

- [1] 张继龙,翁方中,陈国华,等.银杏叶对缺血性脑损伤后 Bcl-2 和 Bax 基因表达的作用[J].中国中西医结合急救杂志,2007,14(1):56-59.
- [2] 蒋祝昌,毕桂南,石胜良.黄皮酰胺对高血压局灶性脑缺血/再灌注大鼠 Bcl-2 蛋白表达和细胞凋亡的影响[J].中国危重病急救医学,2005,17(5):289-292.
- [3] 奚淑芳,陈建宗,杨浩,等.银杏叶提取物对大鼠中脑原代细胞的作用[J].第四军医大学学报,2005,26(9):948-950.
- [4] 廖玉群,李文宏,刘永忠.银杏叶提取物对中枢神经系统保护作用研究进展[J].实用中西医结合临床,2007,7(5):91-92.
- [5] Watson BD, Dietrich WD, Busto R, et al. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis[J]. Ann Neurol, 1985, 17(5):497-504.
- [6] Wiessner C, Bareyre FM, Allegrini PR, et al. Anti-Nogo-A antibody infusion 24 hours after experimental stroke improved behavioral outcome and corticospinal plasticity in normotensive and spontaneously hypertensive rats[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2003, 23(2):154-165.
- [7] Culmsee C, Plesnila N. Targeting Bid to prevent programmed cell death in neurons[J]. Biochem Soc Trans, 2006, 34(Pt 6):1334-1340.
- [8] Wang F, Liang Z, Hou Q, et al. Nogo-A is involved in secondary axonal degeneration of thalamus in hypertensive rats with focal cortical infarction[J]. Neurosci Lett, 2007, 417(3):255-260.
- [9] 荆小莉,王东平,李欣,等.银杏叶提取物对糖尿病肾病的防治作用与机制研究[J].中国中西医结合急救杂志,2005,12(5):282-285.
- [10] 徐颖,张志雄.银杏叶提取物对中枢神经系统作用机制研究的进展[J].中国老年学杂志,2008,28(13):1342-1344.

(收稿日期:2009-02-27 修回日期:2009-04-18)

(本文编辑:李银平)

### • 广告目次 •

- ① 珠海丽珠:丽珠血液灌流器 ..... (封2)  
 ② 天津红日药业:血必净注射液 ..... (封底)