

相对于模型组, 100 mg/kg 和 50 mg/kg 的 Sal 能缩短槟榔碱致小鼠震颤的持续时间, 且 100 mg/kg 的 Sal 效果与 75 mg/kg 的 L-dopa 的效果相当。

综上所述, Sal 对槟榔碱致小鼠震颤具有一定的治疗作用。本实验在前期工作的基础上进一步验证了 Sal 对 PD 模型小鼠的保护作用, 但其作用机制尚有待进一步研究。

#### 参 考 文 献

- [1] Yuan H, Zhang ZW, Liang LW, et al. Treatment strategies for Parkinson's disease [J]. Neurosci Bull, 2010, 26(1): 66-76.
- [2] 孟凛冽, 李峰, 伞智勇, 等. 帕金森病氧化应激机制及抗氧化药物

治疗进展 [J]. 现代生物医学进展, 2015, 46(2): 380-383.

- [3] 李莉, 刘耕陶. 五味子酚对氧自由基引起大鼠脑突触体和线粒体损伤的保护作用 [J]. 药理学, 1998, 33(2): 81-86.
- [4] Li L, Wu RS. Protective effect of schisanhenol (SAL) on oxygen free radicals induced injury of spleen lymphocytes in mice [J]. Yao Xue Xue Bao, 1997, 32(3): 178.
- [5] 林童俊. 五味子酚和丹酚酸 A 抗氧化作用机理及对阿霉素心肌毒性的保护作用 [J]. 生理科学进展, 1991, 22(4): 342-345.
- [6] 许幸, 魏秀兰. 序贯试验法测定异丙酚诱导时的 BIS<sub>50</sub> 和 ED<sub>50</sub> [J]. 中华麻醉学杂志, 2001, 21(1): 7-9.
- [7] 张元鹏, 李新钢. 实验用帕金森病动物模型的研究进展 [J]. 中国临床神经外科杂志, 2005, 10(2): 157-160.

(收稿日期: 2017-07-10)

(本文编辑: 郭俊杰)

## 银杏内酯 A、B 联合改善缺血/再灌注损伤老年大鼠心功能

郝艳玲 董薇

**【摘要】目的** 探讨银杏内酯 A (GA) 与银杏内酯 B (GB) 联合用药后处理对缺血/再灌注 (I/R) 损伤的老年大鼠心功能的影响。**方法** 将老年 SD 大鼠随机分为正常对照组 (Control 组)、缺血/再灌注损伤组 (I/R 组)、GA 后处理组 (GA 组)、GB 后处理组 (GB 组) 及 GA、GB 联合用药组 (GA+GB 组) 各 10 只。通过对离体心脏进行停灌 30 min 再灌注 60 min 制备离体心脏 I/R 损伤模型, 并记录左心室收缩压 (LVSP), 左心室舒张末压 (LVEDP), 左心室内压上升和下降的最大变化速度 ( $\pm dp/dt_{\max}$ ), 收集冠脉流出液检测其中的乳酸脱氢酶 (LDH) 含量。**结果** GB 与 GA+GB 无论在复灌 30 min 还是在复灌 60 min 都能明显地抑制缺血后心室内压差  $\Delta LVP$ 、 $+dp/dt_{\max}$  和  $-dp/dt_{\max}$  各指标的降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与 I/R 组比较, GB 与 GA+GB 处理均能够明显降低冠脉流出液中 LDH 的含量, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。**结论** GA 与 GB 联合用药后处理能够改善缺血/再灌注损伤的离体老年大鼠的心功能。

**【关键词】** 心脏; 大鼠; 缺血/再灌注; 银杏内酯 A; 银杏内酯 B

**Combination of ginkgolide A and B in improving the cardiac function in aged rats with ischemia/reperfusion injury** Hao Yanling, et al. Laboratory of Functional Science, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China

**【Abstract】Objective** To explore the effects of ginkgolide A, ginkgolide B combined post-treatment therapy on the cardiac function of aged rats hearts with ischemia/reperfusion injury. **Methods** Sprague-Dawley aged rats were randomly divided into five groups: a normal control group (Control group), an ischemia/reperfusion injury group (I/R group), a ginkgolide A post-treatment group (GA group), a ginkgolide B post-treatment group (GB group) and a combined post-treatment group (GA+GB group). An in vitro isolated aged rat heart model of I/R injury was established by the whole heart stopped perfusion 30min followed 60min reperfusion. Then, the left ventricular systolic pressure (LVSP), left ventricular end diastolic pressure (LVEDP), the maximal rate in rise and fall of ventricular pressure ( $+dp/dt_{\max}$ ,  $-dp/dt_{\max}$ ) were recorded and the activity of LDH in the fluid of coronary artery were tested. **Results** Both GB and GA+GB could significantly inhibit the decrease of LVP,  $+dp/dt_{\max}$  and  $-dp/dt_{\max}$  indexes after ischemia, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ) between 30 min and 60 min after reperfusion. Compared with the I/R group, GB and GA+GB treatment can significantly reduce the content of LDH in the coronary outflow fluid, the difference was statistically significant ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Combined administration of GA and GB can improve the cardiac function in the aged rats with ischemia / reperfusion injury.

**【Key words】** ginkgolide A; ginkgolide B; ischemia/reperfusion; heart; aged rat

随人民生活水平的提高, 中老年缺血性心脏病发病率呈上升趋势。银杏内酯 B (Ginkgolide B, GB) 是中药银杏叶提取物的主要活性成分之一, 被公认

为血小板活化因子 (Platelet Activating Factor, PAF) 特异性拮抗剂<sup>[1]</sup>, 具有抗炎、抗氧化等广泛生物学作用, 而银杏内酯 A (Ginkgolide A, GA) 的活性和作用仅次之。GB 具有保护缺血性心肌病的心脏和心肌细胞的作用<sup>[2]</sup>, 可缓解心脏毒性<sup>[3]</sup>。目前, 多数研究均是针对成年大鼠用银杏内酯预处理的方法进行研

作者单位: 221004 江苏省徐州医科大学机能学实验中心

通信作者: 董薇, Email: 532343477@qq.com

究,而现在缺血性心肌病多是老年人的常发病,成年大鼠和老年大鼠的心脏结构和功能会略微有差别的,而银杏内酯及联合用药后处理对老年大鼠缺血心功能的研究报道甚少。因此,本研究采用 GA+GB 联合用药及后处理来研究对老年大鼠离体 I/R (Ischemia/Reperfusion, I/R) 损伤的心功能的影响,为今后临床治疗老年人心肌病提供实验依据和新的治疗方法,现报道如下。

### 一、材料与方法

1. 试剂与仪器: 银杏内酯 A, 银杏内酯 B (德国 Fluka 公司, 规格: 20mg), 溶于二甲基亚砜 (DMSO) 中, 终浓度为 0.01%, 对心脏没有影响<sup>[4]</sup>。银杏内酯 A 和 B 先溶解在 DMSO 中, 然后按照比例与灌注液 KH 液 [Krebs-Henseleit buffer, 成分为 (mM): 120 NaCl、4.7 KCl、1.2  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、1.2  $\text{MgSO}_4$ 、25  $\text{NaHCO}_3$ 、11 glucose 和 1.25  $\text{CaCl}_2$ ], 通入 95%  $\text{O}_2$  ~ 5%  $\text{CO}_2$  混合气体中, 调节 pH 为 7.4 混合, 使其终浓度均为 10  $\mu\text{mol/L}$ 。采用 PowerLab 道生物信号采集系统, Langendorff 灌注装置, (Lactate dehydrogenase, LDH) 测定试剂盒由北京中生物技术有限公司提供。

2. 动物: 正常健康 Sprague-Dawley (SD) 清洁级雄性老年大鼠 50 只, 月龄 20 ~ 24 个月, 体质量 350 ~ 500 g, 由徐州医学院实验动物中心提供。随机分为 5 组各 10 只: (1) 对照组 (Control 组): 心脏稳定后, 持续灌注 KH 液 90 min; (2) I/R 组: 心脏稳定后, 停灌 30 min 后 KH 液复灌 60 min; (3) GA 组: 心脏稳定后, 停灌 30 min 后在复灌最初的 10 min 内灌注含有浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  GA 的 KH 液, 做缺血后处理, 再复灌不加药的 KH 液 50 min; (4) GB 组: 含 GB 的 KH 液, 浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ , 其余与 GA 组相同; (5) GA+GB (1:1) 组: 含 GA 与 GB 的 KH 液, 浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ , 其余与 GA 组相同。

3. 心脏 I/R 损伤模型制备: 本方法为实验室的常用方法<sup>[5]</sup>, 具体如下: 将 SD 老年大鼠腹腔注射肝素, 10 min 后颈椎脱臼处死, 并迅速取其心脏放入预先用 100%  $\text{O}_2$  饱和的冰浴台氏液中, 修剪后挂于 Langendorff 灌注装置上结扎固定。37  $^{\circ}\text{C}$  恒温恒流 (流速为 6 ~ 10 ml/min) 灌注 95%  $\text{O}_2$  ~ 5%  $\text{CO}_2$  混合气饱和过的 KH 液。剪去左心耳, 将球囊导管经房室瓣口插入左心室, 球囊导管的另一侧连接压力传感器并将其信号传到 PowerLab 生物信号采集系统, 通过 Chart 7.0 软件记录心功能。心脏稳定 30 min 后, 采用停灌复灌的方法制备心脏 I/R 损伤模型。

4. 观察指标: (1) 心功能测定: 用 PowerLab 生物信号采集系统及 Chart 7.0 软件记录每个心脏的心功能各指标, 并计算  $\Delta\text{LVP}$  ( $\Delta\text{LVP} = \text{LVSP} - \text{LVEDP}$ )。 (2) LDH 的测定: 在复灌 15 min 时收集冠脉流出液 5 ml, 按试剂盒说明书测定 LDH 的含量, 用酶标仪严

格按照操作规程进行测定。

5. 统计学方法: 使用 GraphPad Prism 4.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较采用方差分析, 计数资料采用例数表示, 比较采用  $\chi^2$  检验; 以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 二、结果

1. GA 与 GB 联合用药后处理对 I/R 损伤老年大鼠心功能的影响: 在整个灌注过程中对照组大鼠的心功能各指标并没有明显变化; 在缺血前的稳定期 (基础值) 比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。在缺血后 30 min 和 60 min 时, 与对照组大鼠比较, I/R 组大鼠的心功能各指标均明显下降, 而用银杏内酯 A 后处理对 I/R 损伤的大鼠心功能也有一定改善。与 I/R 组相比较, GB 与 GA+GB 无论在复灌 30 min 还是在复灌 60 min 都能明显地抑制缺血后各指标的降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与 GA+GB 组大鼠比较, 银杏内酯 A 的改善心功能在  $-\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$  方面明显较差, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

2. GA 与 GB 联合用药后处理对冠状动脉流出液中 LDH 含量的影响: I/R 损伤能够使冠脉流出液中 LDH 的含量显著增加。与 I/R 组比较, GB 与 GA+GB 处理均能够明显降低冠脉流出液中 LDH 的含量, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见图 1。

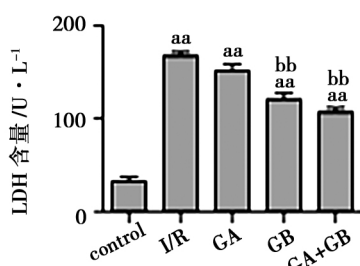
讨论 相对于机械性缺血后处理, 药物缺血后处理是缺血以后进行药物口服或静脉给药, 不用进行手术, 更加优于手术治疗, 降低风险, 因而具有更大的临床意义。本课题团队在之前的研究中发现, 银杏内酯 B 预处理对成年大鼠 I/R 损伤的心脏有改善作用, 能够增强离体心脏的心功能, 提高单个心肌细胞的收缩幅度<sup>[6]</sup>, 并能通过降低 Bax/Bcl<sub>2</sub> 而减轻心肌细胞的凋亡。同时也发现银杏内酯 A 预处理能够通过降低心肌梗死面积, 减少凋亡从而发挥对成年大鼠的 I/R 损伤的心功能的改善作用<sup>[7]</sup>。因而本课题进行联合用药并针对老年大鼠的缺血后处理进行研究。

结果显示, 银杏内酯 A、B 联合用药后处理以后完全能够缓解老年大鼠全心 I/R 损伤, 并通过增大  $\Delta\text{LVP}$ 、抑制再灌注后  $+\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$  的降低和  $-\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$  的抬升来改善缺血后的心功能。但联合用药组和单一的银杏内酯 B 用药组在对心功能的改善作用方面差别不大, 这就说明银杏内酯 B 后处理在削弱缺血造成的心功能障碍方面起到了主导的作用。但银杏内酯联合用药的数值较银杏内酯 B 组更加接近对照组的数值, 说明联合用药还是略微优于单一用药。银杏内酯 A、B 联合用药能够增大  $\Delta\text{LVP}$ , 说明增大了心室内压差, 增加了心脏的每搏输出量, 增强了心功能。但银杏内酯 A、B 的联合用药并不能完全恢复心功能, 也说明此过程是一个比较复杂的病理

表 1 银杏内酯 A、B 对缺血/再灌注损伤的心功能的影响(  $\bar{x} \pm s$  )

| 组别                                     | 例数 | 基础值          | 复灌 30 min                  | 复灌 60 min                   |
|----------------------------------------|----|--------------|----------------------------|-----------------------------|
| $\Delta LVP$ (kPa)                     |    |              |                            |                             |
| 对照组                                    | 10 | 11.03±0.78   | 10.99±0.86                 | 10.55±1.08                  |
| I/R 组                                  | 10 | 10.73±0.83   | 5.26±1.02 <sup>a</sup>     | 5.87±0.94 <sup>a</sup>      |
| GA 组                                   | 10 | 11.22±0.91   | 6.17±1.12 <sup>a</sup>     | 6.53±1.07 <sup>ac</sup>     |
| GB 组                                   | 10 | 11.34±1.03   | 6.54±1.15 <sup>ab</sup>    | 7.07±0.92 <sup>ab</sup>     |
| GA+GB 组                                | 10 | 10.77±0.84   | 6.85±0.97 <sup>ab</sup>    | 7.83±1.11 <sup>ab</sup>     |
| $+dp/dt_{\max}$ (kPa·s <sup>-1</sup> ) |    |              |                            |                             |
| 对照组                                    | 10 | 245.33±18.41 | 541.99±16.28               | 242.55±21.23                |
| I/R 组                                  | 10 | 241.00±16.41 | 158.61±21.54 <sup>a</sup>  | 162.42±17.91 <sup>a</sup>   |
| GA 组                                   | 10 | 246.22±24.24 | 179.34±19.35 <sup>ac</sup> | 185.55±13.02 <sup>abc</sup> |
| GB 组                                   | 10 | 244.97±15.36 | 182.54±20.28 <sup>ab</sup> | 190.33±21.48 <sup>ab</sup>  |
| GA+GB 组                                | 10 | 239.34±21.45 | 200.22±18.79 <sup>ab</sup> | 207.67±19.37 <sup>ab</sup>  |
| $-dp/dt_{\max}$ (kPa·s <sup>-1</sup> ) |    |              |                            |                             |
| 对照组                                    | 10 | 189.51±14.36 | 180.87±15.48               | 181.63±11.23                |
| I/R 组                                  | 10 | 185.44±17.30 | 124.35±13.31 <sup>a</sup>  | 131.79±10.65 <sup>a</sup>   |
| GA 组                                   | 10 | 178.30±14.19 | 134.37±15.28 <sup>ac</sup> | 141.81±17.11 <sup>ac</sup>  |
| GB 组                                   | 10 | 182.35±10.42 | 150.27±12.21 <sup>ab</sup> | 158.94±14.05 <sup>ab</sup>  |
| GA+GB 组                                | 10 | 178.10±11.83 | 160.66±10.32 <sup>ab</sup> | 164.08±16.09 <sup>ab</sup>  |

注: 与对照组相比<sup>a</sup>  $P < 0.05$ ; 与 I/R 组相比<sup>b</sup>  $P < 0.05$ ; 与 GA+GB 组相比<sup>c</sup>  $P < 0.05$



与 control 组相比, <sup>a</sup>  $P < 0.01$ ; 与 I/R 组相比, <sup>b</sup>  $P < 0.01$

图 1 GA 与 GB 联合用药后处理对冠状动脉流出液中 LDH 含量的影响(  $n = 10, \bar{x} \pm s$  )

生理过程。本课题组之前也发现银杏内酯 B 后处理可通过 PI3K/Akt 信号通路改善缺血后的心功能<sup>[9]</sup>。此外,银杏内酯 A 预处理对成年大鼠的 I/R 损伤的心功能是有改善作用的,而本次对老年大鼠心功能的改善作用并不十分明显,可能是因为银杏内酯 A 的灌流浓度不够高,也可能是因为银杏内酯 A 复灌的时间不够长,也有可能是老年大鼠心肌细胞上的受体对银杏内酯 A 的敏感性下降了,另外,由于其他研究中的复灌时间段都不近相同,所以很难进行横向比较,而且大部分都是对成年大鼠的研究。具体原因还有待进一步研究。

此外,研究结果还发现银杏内酯 A、B 的联合用药能够抑制缺血造成的 LDH 含量的增高。心肌 I/R 可引起自由基增多,钙超载,白细胞的激活等,这可能与心肌 I/R 期间血管内皮细胞产生的 PAF 有关<sup>[10]</sup>。而银杏内酯 A、B 是 PAF 受体拮抗剂,从而减轻心肌细胞的损伤程度。另外,银杏内酯 B 具有抗

氧化的活性,能够清除过氧基团<sup>[11]</sup>,这可能是银杏内酯保护老年心脏的机制之一。

综上所述,银杏内酯 A、B 的联合用药能够在一定程度上能够改善老年大鼠的心肌缺血 I/R 损伤,但联合用药和单一的银杏内酯 B 用药作用效果差别不大,但其具体的保护机制还有待进一步的研究。

## 参 考 文 献

- [1] Kecslemti V, Balogh I. Cardiac ultrastructural effect of the platelet activating factor and its antagonist BN 52021 [J]. Exp Toxicol Pathol, 1995, 47( 6 ): 463-470.
- [2] Tritto I, Wang P, Kuppusamy P, et al. The anti-anginal drug trimetazidine reduces neutrophil-mediated cardiac reperfusion injury [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2005, 46( 1 ): 89-98.
- [3] 张根葆,陈冬云,桂常青,等. 银杏内酯 B 对缺血再灌注大鼠心脏保护作用的实验研究 [J]. 中国中医药科技, 2005, 12( 2 ): 92-94.
- [4] Hao Y, Sun Y, Xu C, et al. Improvement of contractile function in isolated cardiomyocytes from ischemia - reperfusion rats by ginkgolide B pretreatment [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2009, 54( 1 ): 3-9.
- [5] 郝艳玲,袁凤刚,孙红,等. 银杏内酯 A 对缺血/再灌注损伤的大鼠心功能的影响 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29( 4 ): 577-581.
- [6] 郝艳玲,杨艳,吴金霞,等. 银杏内酯 B 后处理改善缺血/再灌注损伤的老年大鼠心功能 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25( 23 ): 2707-2713.
- [7] Pietri S, Maurelli E, Drieu K, et al. Cardioprotective and anti-oxidant effects of the terpenoid constituents of Ginkgo biloba extract ( EGB 761 ) [J]. J Mol Cell Cardiol, 1997, 29( 2 ): 733-742.
- [8] Maitra I, Marcocci L, Droy-Lefaix MT, et al. Peroxyl radical scavenging activity of Ginkgo biloba extract EGB761 [J]. Biochem Pharmacol, 1995, 49( 11 ): 1649-1655.

( 收稿日期: 2017-06-06 )

( 本文编辑: 郭俊杰 )