

【银杏内酯注射液专栏】

银杏内酯注射液对脑缺血再灌注损伤治疗时间窗及凋亡信号通路的影响

刘科¹, 鄢云彪^{1*}, 丁建花², 兰新新², 胡刚²

1. 成都百裕制药股份有限公司, 四川 成都 641000

2. 南京医科大学, 江苏 南京 211166

摘要: **目的** 研究银杏内酯注射液(Ginkgolide Injection, GI)作用于大鼠脑缺血再灌注损伤的治疗时间窗及对凋亡信号通路的影响。**方法** 采用Longa法制备大鼠大脑中动脉短暂阻塞再灌注(tMCAO)模型,(1)分别于再灌后1、3、6、9 h ip首次给予GI(2.5 mg/kg),每天给药2次,连续给药3 d,通过神经功能评分、脑梗死体积及脑组织含水量评价动物缺血损伤程度。(2)于再灌注后1 h ip给予GI(2.5 mg/kg),每天给药2次,连续给药3 d,分别于再灌注后24、72 h取脑检测缺血半影区p53、Bax、Bcl-2、Caspase 3蛋白表达水平。**结果** 与模型组比较,(1)再灌注后1、3 h给予GI能显著降低神经功能评分、减少脑梗死体积与脑组织含水量($P < 0.05$ 、 0.01),6、9 h给药大鼠脑损伤未见明显改善。(2)于再灌注后1 h给予GI显著抑制p53、Bax、Caspase 3蛋白表达,上调Bcl-2蛋白表达($P < 0.05$)。**结论** GI对tMCAO模型大鼠的有效治疗时间在缺血再灌注后3 h内;其可能的作用机制涉及抑制凋亡信号通路的激活。

关键词: 银杏内酯注射液; 脑卒中; 治疗时间窗; 凋亡信号通路**中图分类号:** R962.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2018)07-1169-05**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.07.001

Effects of Ginkgolide Injection on therapeutic time window of cerebral ischemia-reperfusion injury and apoptosis signaling pathway in rats

LIU Ke¹, YAN Yunbiao¹, DING Jianhua², LAN Xinxin², HU Gan²

1. Chengdu Baiyu Pharmaceutical Co. Ltd., Chengdu 641000, China

2. Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of Ginkgolide Injection (GI) on the therapeutic time window of cerebral ischemia-reperfusion and its apoptosis signaling pathway in rats. **Methods** A transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) model was established using Longa's method. In the first section of the study, GI (2.5 mg/kg) was ip administrated respectively at 1, 3, 6, and 9 h post reperfusion, two times a day for three days continuously. The degree of cerebral ischemia injury in model rats was assessed according to the extent of neurologic status, infarction volume, and water content in brain. The second section of the study was started with the dose of GI (2.5 mg/kg) to the tMCAO rats at 1 h post reperfusion, two times a day for three days continuously. Then p53, Bax, Bcl-2, and Caspase 3 in penumbra were measured with Western blotting at 24 h and 72 h post reperfusion, respectively. **Results** Compared with model group, the neurological deficit, infarction volume as well as edema were significantly improved in the 1 and 3 h GI treated group ($P < 0.05$ and 0.01), and the brain damage of rats in the 6 and 9 h GI treated group were not significantly improved. The p53, Bax, and Caspase 3 were significantly down-regulated and the expression of Bcl-2 was significantly increased by GI administration both at 24 h and 72 h after reperfusion ($P < 0.05$). **Conclusion** The therapeutic window of GI for transient focal cerebral ischemic injury lasts for at least 3 h, and inhibition of the apoptosis activation was involved in GI protective mechanisms.

Key words: Ginkgolide Injection; ischemic stroke; therapeutic window; apoptosis signaling pathway

收稿日期: 2018-01-22

第一作者: 刘科(1987-), 男, 硕士, 主要从事心脑血管药理研究工作。Tel: (028)61688025 E-mail: 370062999@qq.com

*通信作者: 鄢云彪, 男, 硕士, 主要从事心脑血管药理研究工作。Tel: (028)61688025 E-mail: yanyunbiao@baiyu.cn

治疗时间窗是指脑缺血后药物治疗能减轻损伤程度、促进机能恢复以及改善长期预后的一段时间范围^[1]。脑卒中以其发病突然、治疗时间窗窄向临床治疗提出重大挑战,前期研究发现,银杏内酯注射液(Ginkgolide Injection, GI)具有治疗缺血性脑卒中的作用^[2],作用机制与减轻神经血管单元的损伤有关,最佳剂量为2.5 mg/kg^[3],本研究旨在探讨GI对大鼠脑中动脉短暂阻塞再灌注(tMCAO)模型大鼠的有效治疗时间窗以及其对凋亡信号通路的影响。

1 材料

1.1 动物

SD大鼠,雄性,180~220 g,清洁级,购自南京医科大学实验动物中心(生产许可证号SCXK(苏)2013-0005)与浙江省实验动物中心(生产许可证号SCXK(浙)2008-0033)。领回后常规饲养,室温22~24℃,12 h照明,适应饲养至少1周,待体质量达到250~300 g用于实验。

1.2 药物与主要试剂

GI,无色澄明液体,每支2 mL,含萜内酯10 mg,成都百裕制药股份有限公司提供,产品批号20121201,阴凉避光保存,使用前用无菌生理盐水稀释至相应浓度。

2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC),Sigma公司;戊巴比妥钠,中国医药(集团)上海化学试剂公司产品;多聚甲醛,上海凌峰化学试剂有限公司;小鼠抗P53抗体(CST,2524,USA)、兔抗Bax抗体(CST,2772,USA)、兔抗Bcl-2抗体(CST,2876,USA)、兔抗Caspase 3抗体(CST,9662,USA)、小鼠抗 β -actin抗体(武汉博士德,BM0627);蛋白提取试剂盒,南京凯基生物科技有限公司。

1.3 主要仪器

尼龙栓线,美国Docol Corporation公司产品;XZ-150WA冷光源,深圳市瑞沃德生命科技有限公司;HH-2型数显恒温水浴锅,国华电器有限公司;TE124S型电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;数码相机,Canon NO. 7068001809 JAPAN;ALC-HTP104小动物恒温系统,上海奥尔科特生物科技有限公司;调温型电热台板,南昌太阳岛实业有限公司;电泳与电转系统,miniprotein-III wet transfer unit, Bio-Rad, Hercules, California, USA;全自动化学发光成像系统, ImageQuant

LAS4000mini, GE Healthcare, USA; 全波长扫描多功能读数仪, Varioskan Flash, Thermo scientific, USA; 微量电动匀浆器, PELLET PESTLE MOTOR KONTES。

2 方法

2.1 大鼠 tMCAO 模型的制备

参考Longa法制备tMCAO模型^[4],术前禁食6~8 h,异氟烷麻醉,碘伏消毒后作颈正中切口2 cm,从颈外动脉插入栓线,通过大脑中动脉起始处至大脑前动脉,丝线固定插入的栓线,将动物置于加热板上确保肛温达37℃。缺血1.5 h后,轻轻拔出栓线恢复血流,缝合切口后置于笼中饲养。

2.2 神经功能评分

参照Bederson评分法^[5]:正常为0分;提起鼠尾,手术对侧前肢屈曲为1分,躯体向手术对侧扭转为2分;行走时向手术对侧转圈为3分,向手术对侧倾倒或无法自主行走为4分;死亡为5分。去除24 h神经功能评分为0的动物,剩余大鼠即为模型成功大鼠,按评分结果均等分入实验组。

2.3 治疗时间窗研究

实验共设5组:模型组、GI共4组(分别于缺血再灌注后1、3、6、9 h时首次给药2.5 mg/kg, ip给药,每天给药2次,连续给药3 d),观察GI治疗时间窗,造模后动物损伤严重,部分组别动物出现死亡情况,各组最终动物数均大于6。动物于缺血再灌注后72 h断头取脑,记录湿质量, -20℃冰冻10 min,冠状位以2 mm/片厚度将脑切成6片,置于1% TTC染液中,37℃染色,用10%多聚甲醛溶液固定,微距拍照,用Image-Pro Plus 5.0图像分析软件测量脑片梗死面积,以每片脑片正反面梗死面积均数 $\times$ 片厚得出每片脑片梗死体积,再以6片脑片梗死体积之和求出整个脑梗死体积。将脑片置于110℃烘箱烘烤24 h,称量脑干质量。

脑组织含水量=1-脑组织干质量/脑组织湿质量

2.4 凋亡信号通路研究

实验共设4组:对照组、GI组、模型组、模型+GI组,再灌注后1 h给予生理盐水或GI(2.5 mg/kg, ip,每天给药2次,给药1 d或连续给药3 d),分别于脑缺血再灌注24和72 h后,断头取脑,分离损伤侧缺血半影区和对照组相应区域的脑组织,称质量并匀浆,试剂盒法提取胞浆蛋白,BCA法测定总蛋白含量,SDS-PAGE胶进行电泳分离蛋白,利用电转系统转膜,10%脱脂奶粉-TBST(pH 7.5, 10 mmol/L

Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20) 室温封闭 1 h, 分别使用一抗 (p53、Bax、Bcl-2、Caspase 3、pro-caspase3) 4 °C 孵育过夜, 二抗孵育, ECL 发光底物染色, 全自动化学发光成像系统显影分析。

2.5 数据处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析: 神经功能评分采用秩和检验, 其余数据的组间差异采用 t 检验。

3 结果

3.1 GI 对治疗时间窗的影响

tMCAO 模型是模拟脑缺血再灌注损伤的经典动物模型, 缺血致使动物体质量减轻, 活动减少, 缺血对侧肢体偏瘫等症状; 如图 1 所示, 模型大鼠神经功能受损, 脑组织水肿, TTC 染色结果显示脑组织大面积梗死; GI 给药在一定时间窗内能显著改善脑缺血大鼠损伤, 与模型组比较, 再灌后 1、3 h

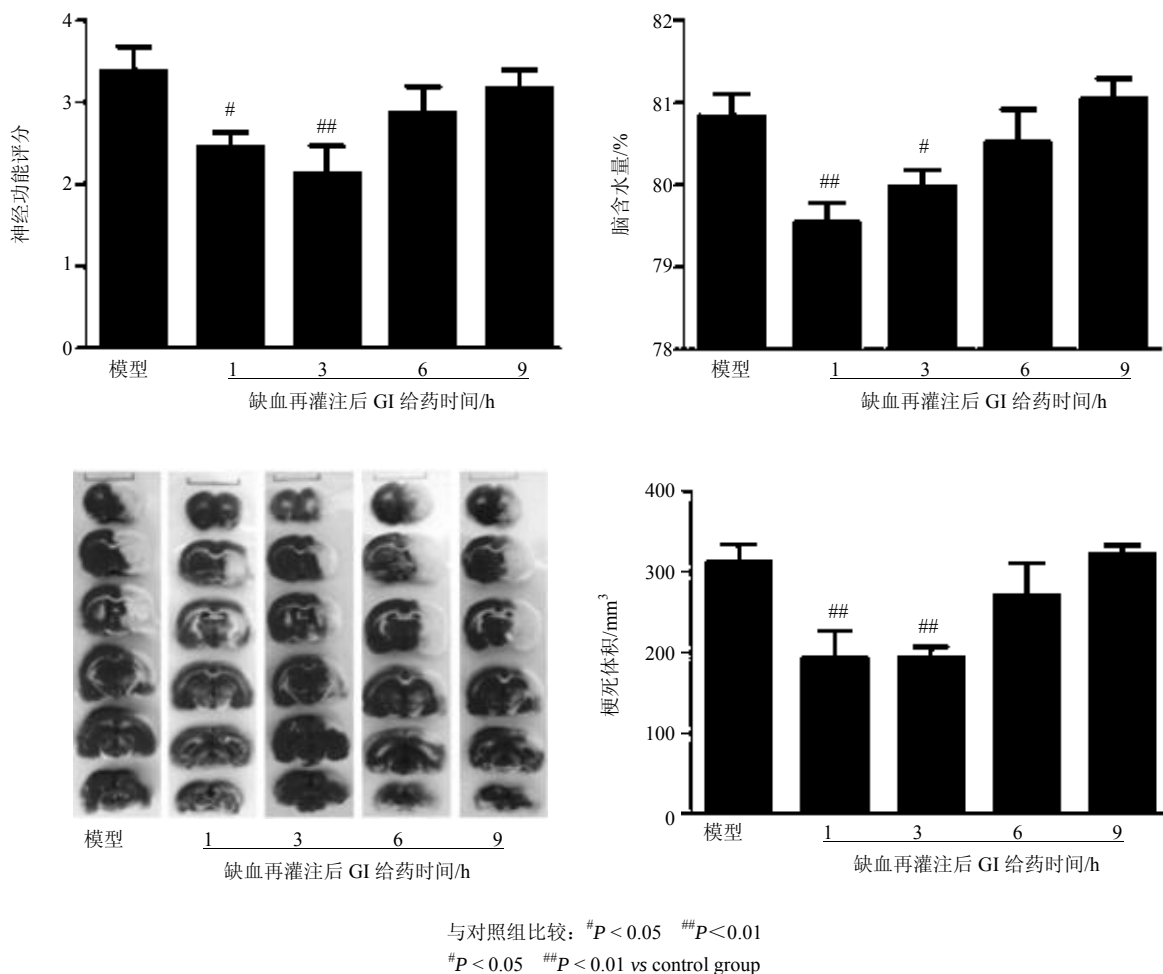


图 1 GI 对 tMCAO 模型大鼠的治疗时间窗的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Fig. 1 Effects of GI on therapeutic time window of tMCAO model rats ($\bar{x} \pm s$)

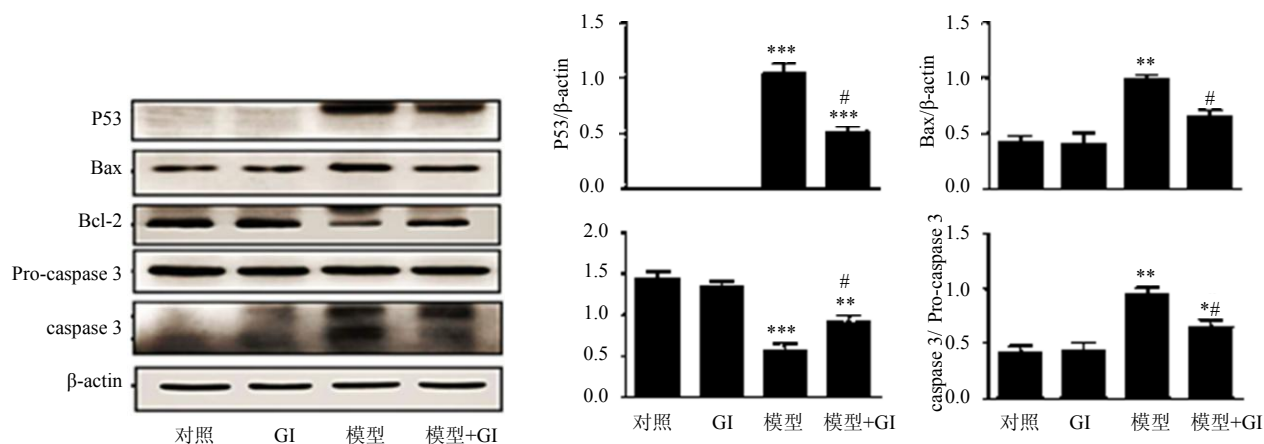
给药组神经功能评分显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 梗死体积显著缩小 ($P < 0.01$), 脑组织含水量显著减少 ($P < 0.05$ 、 0.01), 6、9 h 给药组症状略有改善, 但无统计学意义。

3.2 GI 对凋亡信号通路的影响

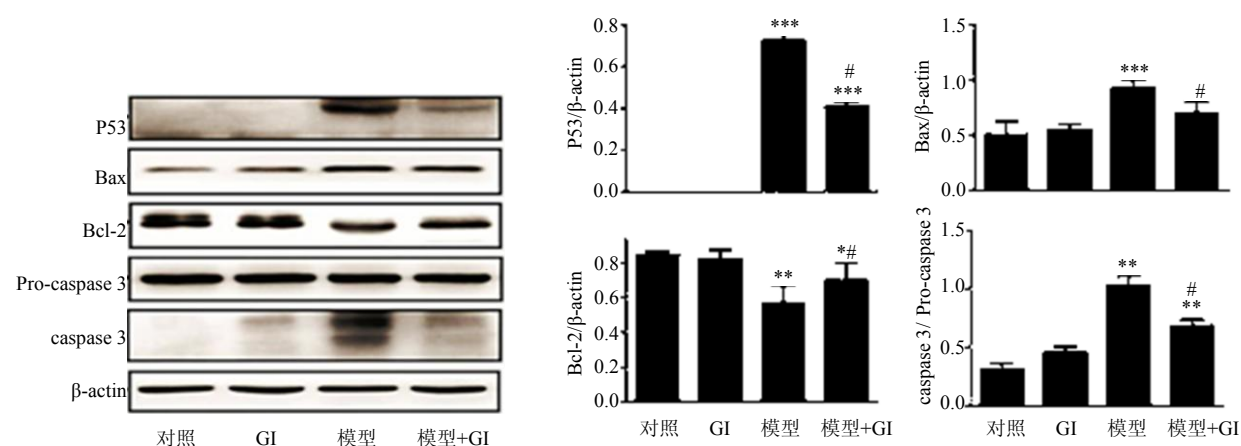
再灌注 24、72 h 后, 各处理组缺血半影区凋亡相关蛋白表达如图 2 所示, 基础状态下, GI 对大鼠脑组织胞浆内 p53、Bax、Bcl-2、Caspase 3 蛋白表达

无显著影响; tMCAO 模型缺血再灌注后 24、72 h 半影区组织细胞胞浆内 p53、Bax、Caspase 3 成熟体蛋白表达上调, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下降 ($P < 0.01$ 、 0.001), 表明凋亡信号通路激活; 给予 GI 显著抑制 P53、Bax、Caspase 3 蛋白表达的上调, 同时抑制 Bcl-2 蛋白水平的下降 ($P < 0.05$)。结果提示, GI 参与抑制 tMCAO 所致凋亡信号通路的激活, 发挥神经保护作用。

再灌注 24 h



再灌注 72 h

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group图2 GI对tMCAO大鼠凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)Fig. 2 Effects of GI on apoptotic associated proteins of tMCAO rat model ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

4 讨论

GI由成都百裕制药股份有限公司研发,广泛用于治疗脑卒中,本实验结果显示,再灌注后1、3 h给予GI可显著改善模型大鼠缺血损伤,表现为改善神经功能、减少脑梗死体积及降低脑含水量等作用,再灌注后6、9 h给予GI对脑缺血损伤修复作用不明显,表明GI对tMCAO模型大鼠的有效治疗时间为再灌注后3 h内,提示临床上在卒中发病早期或溶栓再通早期用药疗效更佳。

凋亡是细胞的程序性死亡,是生物体维持正常生长发育的重要机制;按照激活形式的差异,凋亡分为外源性死亡受体信号通路和内源性信号通路,涉及多种基因的激活与蛋白的表达,在内源性通路

中,Bcl-2家族促凋亡成员Bax在线粒体膜上形成寡聚体通道,导致细胞色素C外流参与凋亡复合体的形成,并最终激活caspase 3,caspase 3作为凋亡的执行者之一,参与细胞骨架蛋白的撤除与DNA的剪切;Bcl-2家族抗凋亡蛋白Bcl-2通过与BH3结构域蛋白结合抑制内源性凋亡信号的启动^[6-7];p53作为重要的肿瘤抑制蛋白和转录因子,可在缺血缺氧刺激下直接诱导凋亡蛋白基因的表达(转录依赖机制),亦可作为蛋白分子独立的与抗凋亡蛋白Bcl-2或Bcl-XL结合,促进线粒体细胞色素C的形成^[8]。缺血造成的神经元死亡是细胞坏死和凋亡的共同结果,缺血使各种钙通道开放,大量 Ca^{2+} 内流可通过激活钙蛋白酶Calpains调节凋亡通路中Bid

蛋白表达最终促进凋亡通路的激活^[9]。

本研究结果显示,模型组促凋亡蛋白 p53、Bax 与 caspase3 表达大量增加,抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达量降低,表明缺血半影区凋亡信号通路的激活是导致神经损伤的潜在因素之一;GI 治疗 24 与 72 h 后,凋亡蛋白 p53、Bax 与 caspase 3 表达均显著下调,抑凋亡蛋白 Bcl-2 显著上升;表明 GI 可通过抑制凋亡信号通路的激活发挥神经保护作用。

GI 具有改善脑缺血损伤作用,在脑卒中溶栓再通后尽早使用可提高疗效,其作用机制与抑制凋亡信号通路的激活有关。

参考文献

- [1] 潘红,孙芳玲,王文.缺血性脑卒中的治疗药物及其有效治疗时间窗的研究进展[J].中国康复理论与实践,2013,19(3):201-203.
- [2] 张学非,曹泽彧,许治良,等.银杏内酯治疗脑缺血作用机制的研究进展[J].中草药,2016,47(16):2943-2948
- [3] 曹磊,兰新新,王林晓.银杏内酯注射液对大鼠急性

期脑缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国临床药理学与治疗学,2015,20(7):721-726.

- [4] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [5] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. Stroke, 1986; 17(3): 472-476
- [6] Taylor R C, Cullen S P, Martin S J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(3): 231-241.
- [7] Gross A, McDonnell J M, Korsmeyer S J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis [J]. Genes Dev, 1999, 13(15): 1899-1911.
- [8] Haupt S, Berger M, Goldberg Z, et al. Apoptosis - the p53 network [J]. J Cell Sci, 2003, 116(20): 4077-4085.
- [9] Broughton B R, Reuŕens D C, Sobey C G. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia [J]. Stroke, 2009, 40(5): 331-339.