

# 银杏蜜环口服溶液对多发性脑梗死大鼠模型的影响

徐立<sup>1</sup> 宋文婷<sup>1</sup> 姚明江<sup>1</sup> 王益民<sup>2</sup> 王勇<sup>2</sup> 王光蕊<sup>1</sup> 刘建勋<sup>1</sup>

(1 中国中医科学院西苑医院基础医学研究所,中药药理北京市重点实验室,北京,100091; 2 西安步长中医心脑血管病医院,西安,710082)

**摘要** 目的:银杏蜜环口服溶液是由银杏叶和蜜环菌组合而成的上市药物,临床用于缺血性心脑血管疾病,本研究探讨该药对大鼠多发性脑梗死(Multiple Cerebral Infarction, MCI)模型的影响。方法:将大鼠随机分为假手术组,模型组,金纳多组(18 mg/kg),银杏叶提取物组(9 mg/kg),天麻蜜环菌素片组(600 mg/kg),天麻蜜环菌粉组(300 mg/kg),银杏蜜环口服溶液组(618 mg/kg),银杏蜜环口服溶液组(309 mg/kg)。从大鼠颈总动脉向大脑中动脉方向注射荧光微球混悬血清,致使大脑动脉多发性阻塞,造成大鼠多发性脑梗死模型。灌胃给药 28 d,末次给药后观察药物对大鼠神经功能评分、抓力、血清 TNF- $\alpha$ 、脑内氨基酸类神经递质及脑组织形态学的影响。结果:MCI 模型大鼠神经功能有显著障碍,抓力显著降低,脑组织内谷氨酸(Glu)和  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)水平显著升高,血清 TNF- $\alpha$  水平升高,与假手术组大鼠比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。组织学检查显示,脑组织受损,有明显的梗死灶,神经细胞排列紊乱,炎性细胞浸润等病理改变,免疫组化显示 CD34、GFAP 有自修复的表达,NeuN 低表达。给药 28 d 后,银杏蜜环口服溶液神经功能明显改善,抓力增加,脑内 Glu 和 GABA 显著降低,血清 TNF- $\alpha$  水平显著下降,与模型组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05 \sim 0.01$ );病理结果显示,银杏蜜环口服溶液可保护脑缺血,改善由此导致的神经缺损程度;免疫组化结果显示,银杏蜜环口服溶液可明显促进血管内皮细胞、胶质细胞及神经元修复。银杏蜜环口服溶液对神经功能的改善和脑内 Glu、GABA 水平的降低作用显著优于银杏叶提取物;增加抓力作用显著优于天麻蜜环菌;降低血清 TNF- $\alpha$  水平程度则同时优于两者。结论:银杏蜜环口服溶液有保护脑缺血,改善神经功能的作用,复方优于单一组份,且有一定的协同增效的作用。

**关键词** 银杏蜜环口服溶液;多发性脑梗死;氨基酸;肿瘤坏死因子;神经功能

## Effects of Yinxing Mihuan Oral Solution for Rat Models with Multiple Cerebral Infarction

Xu Li<sup>1</sup>, Song Wenting<sup>1</sup>, Yao Mingjiang<sup>1</sup>, Wang Yimin<sup>2</sup>, Wang Yong<sup>2</sup>, Wang Guangrui<sup>1</sup>, Liu Jianxun<sup>1</sup>

(1 Institute of Basic Medical Sciences of Xiuyan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, Beijing 100091, China; 2 Xi'an Buchang Traditional Chinese Cardio-Cerebrovascular Disease Hospital, Xi'an 710082, China)

**Abstract Objective:** To investigate the effects of Yinxing Mihuan Oral Solution combined with Ginkgo Leaf Extracts and Armillaria Mellea Powders (GLE/AMP Oral Solution), a marketed drug for ischemic cardio-cerebrovascular diseases in rat models of multiple cerebral infarction (MCI). **Methods:** SD rats were randomly divided into sham group, model group, gintonin group (18 mg/kg), Extract of Ginkgo Biloba (EGB) group (9 mg/kg), armillaria mellea Tablets group (600 mg/kg), armillaria mellea Powder group (300 mg/kg), and Yinxing Mihuan Oral Solution groups (618 mg/kg and 309 mg/kg). The multiple cerebral infarction rat models were established by injection of fluorescent microsphere suspension serous into the direction of middle cerebral artery through arteria carotis communis. After intragastric administration for 28 days, the effects of each group were tested, including neurological function score, grasping force, concentration of serum TNF- $\alpha$ , level of amino acid neurotransmitters and pathomorphology in brain tissue were investigated. **Results:** Compared with the sham group, significant neurological function impairment was observed in the MCI model, with reduced grasping force, as well as higher level of Glutamate (Glu) and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in the brain and TNF- $\alpha$  in the serum. Pathological observation showed brain damage with significant infarcts, disorganized neurons arrangement and inflammatory cell infiltration. The immunohistochemistry analysis indicated self-repair expression of CD34 and GFAP, and low expression of NeuN. After administration of Yinxing Mihuan Oral Solution for 28 days, the neurological function was improved, and the grasping force was increased. The level of Glu and GABA in the brain and TNF- $\alpha$  in the serum were decreased compared with those in the model group ( $P < 0.05 \sim 0.01$ ). Pathological observation showed that the Yinxing Mihuan Oral Solution could improve the degree of neurological function impairment, and the immunohistochemistry analysis indicated the Yinxing Mihuan Oral Solution could significantly promote the repair of cerebrovascular endothelial cell, glia and neuron. Besides, the effects of Yinxing Mihuan Oral Solution on improvement of neurological function and reducing the level of Glu and GABA

基金项目:国家科技重大专项“重大新药创制”(2017ZX09301018);国家自然科学基金项目(81603617)

作者简介:徐立(1960.08—),女,大学本科,研究员,研究方向:脑血管药理学研究,E-mail:xuli1230@sina.com

通信作者:刘建勋(1955.03—),男,博士,研究员,研究方向:药理学研究,E-mail:liujx0324@sina.com

in the brain were superior than that in the EGB group; the effect of Yinxing Mihuan Oral Solution in grasping force was superior than that in the Armillaria Mellea Powder group; and the effect of GLE/AMP Oral Solution in reducing the level of TNF- $\alpha$  in the serum was superior to that in the EGB group and Armillaria Mellea Powder group. **Conclusion:** The Yinxing Mihuan Oral Solution could protect cerebral ischemia and improve neurological function impairment, and combination use of Ginkgo Leaf Extracts and Armillariella Mellea Powders was superior in single component, represented certain synergistic interaction effect.

**Key Words** Yinxing Mihuan Oral Solution; Multiple cerebral infarction (MCI); Amino acid neurotransmitters; Tumor necrosis factor; Neurological function

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.01.006

银杏叶提取物具有清除自由基,调整循环系统,抑制血小板活化因子,抑制血小板聚集,改善血液粘度和血流动力学等作用,临床用于脑部及周围血液循环障碍。天麻蜜环菌是与天麻伴生的真菌,有类似于天麻的药理作用,具有定惊熄风,镇静安神、抗眩晕和镇痛的作用,临床用于治疗眩晕头痛,惊风癫痫,肢体麻木,腰膝酸痛等症。

银杏蜜环口服溶液系由银杏叶提取物和天麻蜜环菌粉组成,临床上用于治疗缺血性心脑血管疾病。有研究表明该药可明显改善脑血流动力学和血液流变学指标<sup>[1]</sup>,减少NIHSS评分<sup>[2]</sup>,但两者配伍使用的药理学优势鲜见报道。本研究建立多发性脑梗死大鼠模型,观察银杏叶提取物和天麻蜜环菌及两者配伍的药理学作用及机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 SD大鼠,雄性,180~220 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2012-0001,合格证号:11400700163978。

1.1.2 药物 银杏蜜环口服溶液(邛崃天银制药有限公司生产,批号:160312),银杏叶提取物(邛崃天银制药有限公司生产,批号:160402),天麻蜜环菌粉(邛崃天银制药有限公司生产,批号:20151027);金纳多(银杏叶提取物片,德国威玛舒培博士药厂生产,批号:5260613);天麻蜜环菌片(江苏神华药业有限公司生产,批号:20160602)。

1.1.3 试剂与仪器 谷氨酸(Glu,  $\geq 99\%$ ), $\gamma$ -氨基丁酸(GABA,  $\geq 99.5\%$ ),50%氢氧化钠溶液(NaOH),85%磷酸( $H_3PO_4$ ),邻苯二甲醛(OPA),均为HPLC级;硼酸( $H_3BO_3$ ),ACS级,均为Fluka公司产品; $\beta$ -巯基乙醇( $\beta ME$ ,  $\geq 99.5\%$ ),BR级,磷酸氢二钠( $Na_2HPO_4$ ),ACS级,均为美国Sigma Aldrich公司产品;甲醇(MeOH),乙腈(Acn),HPLC级,美国Fisher Scientific公司产品;高氯酸85%( $HClO_4$ ),AR级,北京化工试剂二厂产品;水合氯醛,上海国药集团化学试剂有限公司产品;注射用青霉素钠粉针,华

北制药股份有限公司产品。TNF- $\alpha$ 试剂盒,批号:GR2995505-1,由abcam公司提供。抗体CD34, GFP, NeuN,均由abcam公司提供,批号分别为GR305367-3, GR129953-4和GR249899-29。CoulArray-5600型高效液相-电化学工作站,5600A电化学检测器,582液相泵,542自动进样器,6210碳石墨电极,CTO-324可控温元件箱,美国ESA公司产品。AG2245电子天平,瑞士梅特勒托利多公司产品。UVPMS-BY2  $\varnothing 180 \sim 212 \mu m$ 荧光微球,美国Cospheric公司产品,批号:100309-7。YLS-13A大小鼠抓力测定仪,北京众实迪科技发展有限公司。台式MIKRO 22R离心机,德国Hettich公司产品。超声破碎仪,VCX150PB型,美国SONICS公司。针筒式微孔滤膜过滤器:水系( $0.22 \mu m$ ),天津腾达过滤器厂产品。TELTA 320 pH计,上海Mettler Toledo仪器公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 参考文献<sup>[3-4]</sup>进行改良,建立多发性脑梗死大鼠模型。动物4.0%水合氯醛腹腔注射麻醉(400 mg/kg),保温毯上仰卧位固定,分离右侧颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)及颈外动脉(ECA),结扎ECA并剪断,CCA用丝线打活结暂时阻断,用动脉夹夹闭ICA后,于ECA剪开切口,注射荧光微球混悬血清,致使大脑动脉多发性阻塞。假手术组只分离CCA结扎ECA,不注射微球。实验过程中保温毯设定温度 $37 \sim 37.5 \text{ }^\circ C$ ,保持大鼠体温。术后24 h动物进行神经学评分,剔除0分及4分大鼠,其余随机分组:假手术组,模型组,金纳多组(18 mg/kg),银杏叶提取物组(9 mg/kg),天麻蜜环菌素片组(600 mg/kg),天麻蜜环菌粉组(300 mg/kg),银杏蜜环口服溶液组(618 mg/kg),银杏蜜环口服溶液组(309 mg/kg)。

1.2.2 给药方法 术后2 d开始灌胃给药,给药体积为5 mL/kg(银杏蜜环口服溶液高剂量组给药体积为6 mL/kg),连续给药28 d。末次给药后动物进行神经功能评分,并测定左前爪抓力。麻醉取血,分

离血清冷冻保存,并迅速取出大脑,离后缘4 mm处冠状切一刀,分离纹状体,液氮固化,-80℃保存,高效液相-电化学法测定中枢氨基酸类神经递质,后脑区福尔马林固定,经脱水、包埋、切片、HE染色,分析脑组织的病理变化,免疫组化观察微血管、胶质细胞和神经元的修复情况。

1.2.3 行为学检测 术后24 h采用单盲法观察神经行为学。以Longa 5分制评分,其标准为:无神经损伤症状,0分;不能完全伸展左侧前爪,1分;向非缺血侧转圈,2分;行走时向非缺血侧倾倒,3分;不能自行行走,意识昏迷,4分。给药28 d后再次评分

1.2.4 抓力检测 右手抓持大鼠后按放在抓力测定仪的抓力板上,左手向前推住抓力板,然后右手向后滑至鼠尾部,左手轻轻松开抓力板,待大鼠用左侧前爪用力抓住抓力板时及时加力后拉,测定大鼠的最大抓力。每个动物测定3次,取平均值作为该大鼠的抓力值。

1.2.5 Glu/GABA测定

1.2.5.1 色谱条件 Waters XTerra MS C18 色谱柱(3.0 mm×50 mm,2.5 μm),流动相:100 mM磷酸氢二钠,20%甲醇,3.5%乙腈,pH值(6.70±0.02)。ESA 582液相泵流速为0.4 mL/min;电势+150,+650 mV;柱温30℃。氨基酸衍生程序4℃,吸取50 μL衍生工作液,加入25 μL脑匀浆样品中,混合3次,30 μL/次,静置1 min,进样20 μL分析。

1.2.5.2 氨基酸衍生试剂储备液的配制 27 mg OPA,溶于1 mL甲醇,加入5 μL βME,加入9 mL,0.1 mol/L硼酸溶液(NaOH调至pH 9.3),4℃保存,5 d内使用。

1.2.5.3 衍生工作液的配制 取2.5 mL氨基酸衍生试剂储备液,加入7.5 mL,0.1 mol/L硼酸溶液(NaOH调至pH 9.3),每日现用现配。

1.2.6 病理学检查 HE染色,光镜下观察脑组织梗死灶、神经元数目、病变程度、小胶质细胞增生程度等形态学指标。

1.2.7 免疫组化 脱水10%中性福尔马林固定,再行梯度脱水(70%酒精60 min×1、80%酒精60 min×1、90%酒精60 min×1、95%酒精60 min×1、100%酒精30-50 min×1、100%酒精60 min×1),透明(二甲苯60 min×2),浸蜡(蜡I 60 min×1、蜡II 60 min×1、蜡III 30 min×1)。包埋:用干净的石蜡融化后浇注组织。切片:切片厚度5 μm。指标检测及检测方法采用PV-6000 二步法免疫组化法。采集图像及图像分析:CREB抗体着色表达细胞核,其余抗

体着色表达细胞胞质,高倍镜下拍摄3个视野,将采集的图像应用Image-pro Plus 5.1 图像分析系统进行分析,所得数据作免疫组织化学染色阳性信号累积光密度(IOD),以IOD值作为组织表达的定量标准。累积光密度(IOD)=平均光密度(AOD)×阳性面积(A)。

1.3 统计学方法 剔除死亡动物后,各组数据以均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。数据用SPSS 16.0 统计软件对数据进行统计学分析,以One-way ANOVA进行统计学处理,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 对MCI大鼠神经功能评分和抓力的影响 术后24 h进行行为学评分,假手术组动物神经行为未发现异常;手术造成大鼠肢体行为学异常,可见明显的神经功能损伤,主要表现为左肩内收、屈曲,前肢无力,向非缺血侧转圈,行走时向非缺血侧倾倒等。按评分标准进行评分,去掉4分和0分大鼠并随机分组,使组间差异没有统计学意义,但与假手术组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。给药28 d后,模型组行为学功能变化不大,与模型组比较,对照药金纳多18 mg/kg剂量组和银杏蜜环口服溶液618 mg/kg和309 mg/kg均有改善神经症状的作用,其中银杏蜜环口服溶液618 mg/kg作用最强,309 mg/kg次之,但与金纳多组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。给药28 d后,与假手术组大鼠比较,MCI模型组大鼠抓力显著减小,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组大鼠比较,对照药金纳多组、银杏叶提取物组以及银杏蜜环口服溶液618 mg/kg和309 mg/kg组大鼠抓力均明显增加,差异有统计学意义( $P < 0.05 \sim 0.01$ ),与蜜环菌片及蜜环菌粉比较,差异有统计学意义( $P < 0.05 \sim 0.01$ )。见表1。

2.2 对MCI大鼠脑组织谷氨酸(Glu)、γ-氨基丁酸(GABA)的影响 模型组大鼠脑组织内脑内谷氨酸(Glu)、γ-氨基丁酸(GABA)水平有所增加,与假手术组大鼠比较,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组大鼠比较,银杏蜜环口服溶液618 mg/kg组大鼠脑组织中Glu水平显著降低;蜜环菌片600 mg/kg组、银杏蜜环口服溶液618 mg/kg组及309 mg/kg组的GABA水平显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05 \sim 0.01$ ),金纳多、银杏叶提取物和天麻蜜环菌粉因大鼠个体差异较大,数据无统计学意义( $P > 0.05$ )。银杏蜜环口服溶液618 mg/kg组与

表1 对 MCI 大鼠神经功能评分和抓力的影响( $\bar{x} \pm s$ )

分组	剂量 (mg/kg)	神经功能评分		抓力 (g)
		24 h	28 d	
假手术组 (n=10)	—	0	0	840.6 ± 42.4
模型组 (n=10)	—	2.33 ± 0.20 <sup>**</sup>	2.33 ± 0.19 <sup>**</sup>	408.7 ± 28.3 <sup>**</sup>
金纳多组 (n=10)	18	2.30 ± 0.14 <sup>**</sup>	1.80 ± 0.14 <sup>△</sup>	668.2 ± 59.4 <sup>△△</sup>
银提组 (n=10)	9	2.30 ± 0.14 <sup>**</sup>	1.90 ± 0.17	552.9 ± 59.0 <sup>△</sup>
蜜环菌片组 (n=10)	600	2.30 ± 0.14 <sup>**</sup>	2.00 ± 0.20	436.5 ± 39.3
密环菌粉组 (n=10)	300	2.30 ± 0.14 <sup>**</sup>	2.10 ± 0.17	479.2 ± 47.2
银蜜高剂量组 (n=10)	618	2.30 ± 0.14 <sup>**</sup>	1.50 ± 0.16 <sup>△△▲</sup>	620.0 ± 34.2 <sup>△△□□■</sup>
银蜜低剂量组 (n=10)	309	2.30 ± 0.20 <sup>**</sup>	1.70 ± 0.14 <sup>△△</sup>	579.8 ± 37.7 <sup>△△□</sup>

注:与假手术组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ,<sup>△△</sup> $P < 0.01$ ;与银杏叶提取物比较,<sup>▲</sup> $P < 0.05$ ,<sup>▲▲</sup> $P < 0.01$ ;与天麻蜜环菌片比较,<sup>□</sup> $P < 0.05$ ,<sup>□□</sup> $P < 0.01$ ;与天麻蜜环菌粉比较,<sup>■</sup> $P < 0.05$ ,<sup>■■</sup> $P < 0.01$

金纳多组比较,Glu 水平比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),银杏蜜环口服溶液 618 mg/kg 组与金纳多、银杏叶提取物组比较,GABA 水平下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表2 对 MCI 大鼠脑组织 Glu、GABA 的影响( $\bar{x} \pm s$ )

分组	剂量 (mg/kg)	Glu ( $\mu\text{g/g}$ )	GABA ( $\mu\text{g/g}$ )
假手术组 (n=10)	—	823.2 ± 111.2	249.8 ± 18.4
模型组 (n=10)	—	2246.0 ± 332.3 <sup>**</sup>	546.3 ± 71.8 <sup>**</sup>
金纳多组 (n=10)	18	2062.5 ± 245.6	464.2 ± 58.8
银提组 (n=10)	9	1352.3 ± 213.9	384.6 ± 32.2
蜜环菌片组 (n=10)	600	1638.4 ± 173.8	356.0 ± 31.9 <sup>△</sup>
密环菌粉组 (n=10)	300	1568.6 ± 298.7	315.6 ± 66.2
银蜜高剂量组 (n=10)	618	1154.9 ± 199.7 <sup>△▲</sup>	259.7 ± 35.0 <sup>△△▲□</sup>
银蜜低剂量组 (n=10)	309	1441.4 ± 222.0	324.4 ± 44.2 <sup>△</sup>

注:与假手术组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ,<sup>△△</sup> $P < 0.01$ ;与金纳多组比较,<sup>▲</sup> $P < 0.05$ ,<sup>▲▲</sup> $P < 0.01$ ;与银杏叶提取物比较,<sup>□</sup> $P < 0.05$ ,<sup>□□</sup> $P < 0.01$

表3 对 MCI 大鼠血清 TNF- $\alpha$  的影响( $\bar{x} \pm s$ )

分组	剂量 (mg/kg)	TNF- $\alpha$ (ng/L)
假手术组 (n=10)	—	0.332 ± 0.036
模型组 (n=10)	—	0.426 ± 0.099 <sup>*</sup>
金纳多组 (n=10)	18	0.333 ± 0.033 <sup>△</sup>
银提组 (n=10)	9	0.341 ± 0.058
蜜环菌片组 (n=10)	600	0.242 ± 0.013 <sup>△△▲▲□□#</sup>
密环菌粉组 (n=10)	300	0.330 ± 0.085
银蜜高剂量组 (n=10)	618	0.204 ± 0.023 <sup>△△▲▲□□■</sup>
银蜜低剂量组 (n=10)	309	0.191 ± 0.018 <sup>△△▲▲□□■</sup>

注:与假手术组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ,<sup>△△</sup> $P < 0.01$ ;与金纳多组比较,<sup>▲</sup> $P < 0.05$ ,<sup>▲▲</sup> $P < 0.01$ ;与银杏叶提取物比较,<sup>□</sup> $P < 0.05$ ,<sup>□□</sup> $P < 0.01$ ;与天麻蜜环菌片比较,<sup>■</sup> $P < 0.05$ ,<sup>■■</sup> $P < 0.01$ ;与天麻蜜环菌粉比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$

2.3 对 MCI 大鼠血清 TNF- $\alpha$  的影响 模型组大鼠血清 TNF- $\alpha$  水平升高,与假手术组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较,金纳多 18 mg/kg 组,天麻蜜环菌片 600 mg/kg 组,银杏蜜环口服溶液 618 mg/kg 和 309 mg/kg 组大鼠血清

TNF- $\alpha$  水平均显著降低 ( $P < 0.05 \sim 0.01$ ),以天麻蜜环菌片 600 mg/kg 组,银杏蜜环口服溶液 618 mg/kg 和 309 mg/kg 组最优,天麻蜜环菌片 600 mg/kg 组与金纳多组、银杏叶提取物组以及天麻蜜环菌粉组比较,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05 \sim 0.01$ );银杏蜜环口服溶液 618 mg/kg 和 309 mg/kg 组与金纳多组、银杏叶提取物组、天麻蜜环菌片组以及天麻蜜环菌粉组比较,差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

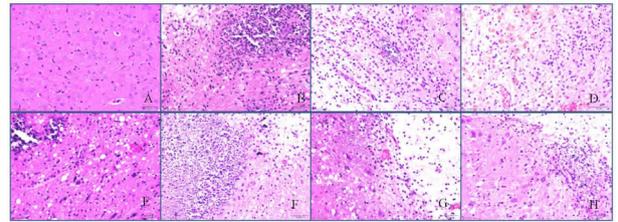


图1 各组脑组织病理形态比较

注:A 假手术组,B 模型组,C 金纳多组,D 银杏叶提取物组,E 天麻蜜环菌片组,F 天麻蜜环菌粉组,G 银杏蜜环口服溶液高剂量组,H 银杏蜜环口服溶液低剂量组。HE 染色,×40

2.4 对 MCI 大鼠脑组织病理形态的影响 假手术组:脑组织均未见明显异常,未见组织坏死灶及神经元变性/坏死。模型组脑组织标本均可见脑组织坏死灶,发生区域以单侧丘脑区坏死灶最为常见,其次为大脑皮质和海马区;主要表现为丘脑组织局灶性、多灶性或片状坏死,坏死区可见组织细颗粒样崩解或中央液化性坏死,神经元变性/坏死(皱缩浓染)或消失,可伴炎细胞浸润,以及坏死区和周围组织胶质细胞增生、组织空泡形成等坏死后修复反应;大脑皮质可见明显组织坏死所致组织溶解缺失。与模型组比较,金纳多组、银杏蜜环口服溶液 309 mg/kg 组和 618 mg/kg 组脑组织坏死发生率均明显降低,程度亦有明显减轻,这 3 组脑组织均以坏死后组织修复反应为主要表现,坏死急性期的反应如组织崩解和液化性坏死发生率较低或程度较轻,大脑皮质均

表4 对MCI大鼠脑CD34、GFAP和NeuN表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

分组	剂量 (mg/kg)	灰度值(IOD)		
		CD34	GFAP	NeuN
假手术组 (n=10)		309 950 ± 123 768	153 936 ± 167 822	824 303 ± 88 587
模型组 (n=10)	—	381 158 ± 84 500	229 264 ± 88 993	427 197 ± 217 453 **
金纳多组 (n=10)	18	345 646 ± 101 589	267 991 ± 162 767	410 473 ± 193 897
银提组 (n=10)	600	386 270 ± 170 871	189 845 ± 121 305	779 382 ± 267 191 $\Delta\Delta$
蜜环菌片组 (n=10)	9	364 779 ± 193 277	242 537 ± 125 415	675 404 ± 233 383 $\Delta$
蜜环菌粉组 (n=10)	300	386 753 ± 164 822	471 694 ± 302 329 **	658 169 ± 233 062 $\Delta$
银蜜高剂量组 (n=10)	618	451 664 ± 207 672 *	362 131 ± 136 432 **	650 885 ± 204 851 $\Delta$
银蜜低剂量组 (n=10)	309	416 047 ± 106 479 *	349 994 ± 238 799 *	630 751 ± 261 349

注:与假手术组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$

未见明显组织坏死,可明显缓解和改善动物脑梗死状态;天麻蜜环菌片组脑组织坏死发生率和病变程度亦有降低,但不如上述3组明显;天麻蜜环菌粉组脑组织坏死发生率略有降低,但病变程度无明显降低;银杏叶提取物9 mg/kg组脑组织坏死发生率和病变程度均无明显降低,对缓解和改善动物脑梗死状态效果不显著。见图1。

2.5 对MCI大鼠脑CD34、GFAP和NeuN表达的影响 免疫组化结果显示,模型组CD34、GFAP阳性细胞数增多,表明坏死组织在修复;银杏蜜环口服溶液309 mg/kg组和618 mg/kg组脑组织的CD34和蜜环菌粉组、银杏蜜环口服溶液309 mg/kg组和618 mg/kg组脑组织的GFAP着色更重,与假手术组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明修复作用强于模型组。模型组NeuN正常着色减少,坏死程度较重,与假手术组比较,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );天麻蜜环菌片600 mg/kg组,天麻蜜环菌粉300 mg/kg组,银杏叶提取物9 mg/kg组及银杏蜜环口服溶液618 mg/kg组的NeuN着色加强,与模型组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。提示银杏蜜环口服溶液对缓解和改善动物脑梗死状态有促进作用,对血管内皮、胶质细胞以及神经元均有修复作用。见表4,图2~4。

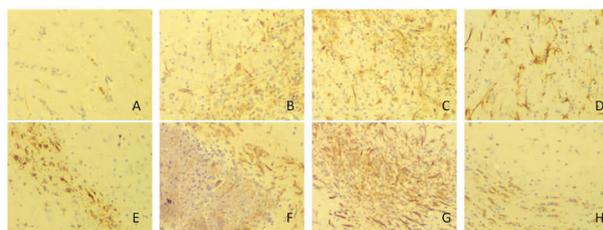


图3 各组脑组织GFAP表达的比较

注:A假手术组,B模型组,C金纳多组,D银杏叶提取物组,E天麻蜜环菌片组,F天麻蜜环菌粉组,G银杏蜜环口服溶液高剂量组,H银杏蜜环口服溶液低剂量组。×400

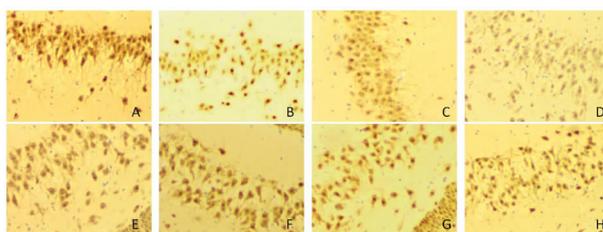


图4 各组脑组织NeuN表达的比较

注:A假手术组,B模型组,C金纳多组,D银杏叶提取物组,E天麻蜜环菌片组,F天麻蜜环菌粉组,G银杏蜜环口服溶液高剂量组,H银杏蜜环口服溶液低剂量组。×400

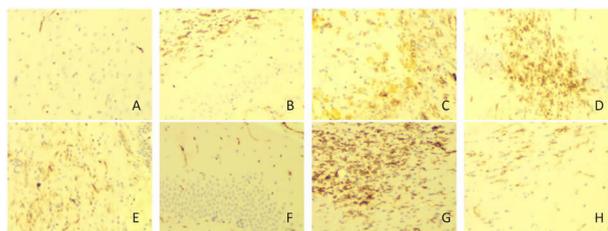


图2 各组脑组织CD34表达的比较

注:A假手术组,B模型组,C金纳多组,D银杏叶提取物组,E天麻蜜环菌片组,F天麻蜜环菌粉组,G银杏蜜环口服溶液高剂量组,H银杏蜜环口服溶液低剂量组。×400

### 3 讨论

Glu是哺乳动物中枢神经系统主要的兴奋性神经递质,研究发现Glu可以有效促使培养的成人脊髓神经元以及成人海马神经元恢复神经电生理活动。不仅如此,生理状态下Glu通过激活兴奋性氨基酸受体对神经元的分化、中枢神经系统的发育、神经元-胶质细胞耦联以及长时程增强效应和记忆的形成都有重要作用。只有在脑缺血缺氧急性损伤等病理情况下,Glu过度释放,在神经元外周间隙大量积聚时,可造成神经元损伤。正常情况下,GABA受体的激活起到抑制兴奋毒性、镇静、催眠、抗惊厥、降血压等生理作用,但在脑缺血时,其过度激活却对神经细胞有毒性作用<sup>[5]</sup>。本研究结果显示,模型大鼠脑组织内谷氨酸(Glu)、 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)水平显

著升高,银杏蜜环口服溶液经口给药 28 d,脑内 Glu 和 GABA 水平显著降低。

脑缺血发生后,会有一系列的细胞因子介导炎症反应,肿瘤坏死因子(TNF-α)就是其中之一。TNF-α 是一种多肽类细胞因子,主要是由激活的单核巨噬细胞分泌产生的细胞因子,T 细胞、B 细胞、血管内皮细胞、星形胶质细胞、小胶质细胞和神经元都是其分泌细胞<sup>[6]</sup>。脑缺血发生时,TNF-α 能介导白介素-1(IL-1)、白介素-6(IL-6)和前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)等多种炎性递质的产生。TNF-α 还可以通过上调血管内皮细胞和白细胞上的黏附因子(ICAM-1)的表达加剧脑内炎症反应,增加血管通透性<sup>[7]</sup>;TNF-α 还可刺激前列环素(PGI<sub>2</sub>)和血栓素 B<sub>2</sub>(TXB<sub>2</sub>)的释放,引起血管收缩和血小板聚集。TNF-α 的水平与脑梗死以及行为障碍程度呈正相关<sup>[8]</sup>。本研究观察到模型组大鼠血清 TNF-α 水平升高,银杏蜜环口服溶液组血清 TNF-α 水平显著下降。

CD34、GFAP、NeuN 这 3 种抗体均可用来评价脑组织坏死后血管内皮、胶质细胞及神经元的修复反应<sup>[9-11]</sup>,CD34 和 GFAP 染色越强,说明组织修复越明显,在组织坏死及修复早期,这 2 种抗体染色较强,在组织修复后期会逐渐减弱。本研究观察到模型组大鼠 CD34、GFAP 染色强于假手术组,表明脑损伤后脑组织有自修复的作用,灌胃给药后,银杏蜜环口服溶液组大鼠脑组织中 CD34、GFAP 染色强于模型组,表明血管内皮、胶质细胞的修复作用进一步增强。NeuN 正常着色减少越明显,说明脑组织坏死越严重,坏死周围组织 NeuN 加深,可能提示坏死组织有修复趋势。本研究观察到模型组 NeuN 着色减轻,银杏蜜环口服溶液组着色加深,表明有明显的组织修复作用。

此外,银杏蜜环口服溶液对神经功能的改善和

抑制脑内 Glu、GABA 过度释放作用显著优于银杏叶提取物;增加抓力作用显著优于天麻蜜环菌;降低血清 TNF-α 水平程度则同时优于两者。结论:银杏蜜环口服溶液有保护脑缺血,改善神经功能的作用,复方优于单一组份,且有一定的协同增效的作用。

参考文献

[1]孔伟.银杏蜜环口服溶液对于脑缺血性疾病治疗的临床探究[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(54):73-74.

[2]周欣满,宋宝林.银杏蜜环口服液治疗缺血性脑血管疾病疗效观察[J].世界最新医学信息文摘,2016,16(23):163.

[3]Takagi K, Miyake K, Taguchi T, et al. Failure in learning task and loss of cortical cholinergic fibers in microsphere embolized rats[J]. Exp Brain Res, 1997, 114(2): 279-287.

[4]Kaneko D, Nakamura N, Ogawa T. Cerebral infarction in rats using homologous blood emboli: Development of a new experimental model[J]. Stroke, 1985, 16(1): 76-84.

[5]徐立,宋文婷,林成仁,等.塞络通胶囊对大鼠多发性脑梗死恢复期 Glu 和 GABA 合成以及 NMDA 受体亚型表达的影响[J].药学报,2012,47(7):870-877.

[6]杨金升.肿瘤坏死因子在脑卒中时的表达及作用[J].国外医学脑血管疾病分册,1996,4(2):77-80.

[7]杨延林,武继彪,隋在云.肿瘤坏死因子与脑缺血[J].浙江中西医结合杂志,2009,19(1):60-61.

[8]张明义,韩俊英,张蕴,等.血清肿瘤坏死因子-α 对急性缺血性脑卒中患者预后的影响[J].中国现代神经疾病杂志,2007,7(3):234-237.

[9]朱惠斌,陈懿,谭璇,等.脑泰方提取物对局灶性脑缺血大鼠 CD34 表达的影响[J].中药新药与临床药理,2011,22(2):141-144.

[10]闫世军,何晓明,李昕华,等.局灶性脑缺血预处理星形胶质细胞 GFAP 表达变化[J].中国实验诊断学,2009,13(10):1345-1346.

[11]耿倩,邹玉,薛茜.康脑液对脑缺血再灌注大鼠 GFAP 和 NeuN 表达的影响[J].中国临床药理学杂志,2012,28(11):843-845.

(2017-12-20 收稿 责任编辑:张文婷)

(上接第 24 页)

[3]李磊,任建勋,林治荣,等.丹酚酸 A 不同给药途径对犬急性心肌梗死影响[J].四川中医,2016,41(5):910-916.

[4]湛月娥,孙莉莎,程玉芳,等.丹酚酸 B 对犬心肌耗氧量的影响[J].实用医学杂志,2006,22(9):1000-1002.

[5]董亚琴,修春英,朱小香,等.急性缺氧对心包经循行线上经皮氧分压及心功能的影响[J].福建中医药大学学报,2014,24(1):6-8.

[6]丁兰婷,李晟,江勤,等.黄蜀葵花总黄酮对麻醉犬血流动力学及心肌耗氧量的影响[J].中药药理与临床,2013,29(3):79-82.

[7]鄢晓平,黄煜,彭亚飞,等.银杏叶提取物对大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用及其机制[J].中国老年学杂志,2017,5(1):35-37.

[8]陈家欢,黄仁彬,何萍,等.银杏叶提取物对心脏血流动力学和冠脉流量的影响[J].广西中医学院学报,2017,37(13):3177-3179.

(2017-12-20 收稿 责任编辑:王明)