

银杏内酯 B 的神经保护作用及机制研究进展

黄建 综述 刘之荣 审校

第四军医大学西京医院神经内科 陕西省西安市 710032

摘要: 银杏内酯 B (GB) 在脑缺血、脑出血、缺血缺氧、帕金森病模型及体外培养的神经元发挥神经保护效应,主要通过抗炎、抗凋亡、能量代谢、星形胶质细胞保护、抗兴奋性毒性及免疫调节等机制,产生神经保护作用。本文综述了 GB 的生物学特性、神经保护效应及机制研究进展。

关键词: 银杏内酯 B; 神经保护; 脑缺血; 机制

银杏在我国的种植面积、地域分布较广,素有“活化石”之称。银杏叶的药用价值甚高,自上世纪以来,银杏叶提取物 (extract of ginkgo biloba, EGb) 广泛应用于心脑血管保护,银杏叶提取物中以银杏内酯和白果内酯为多,其中银杏内酯又分为 A、B、C、K、J。银杏内酯 B (ginkgolide B, GB) 作为一种强力的血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF) 受体拮抗剂,得到了国内外的公认,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,作为一种神经保护剂应用于临床。

1 GB 的生物学特性

GB 能抑制血小板聚集^[1]。有研究发现 GB 能激活基质金属酶-9 (matrix metalloproteinase, MMP-9) 下调环氧酶-1 (COX-2) 和血栓素 A2 (TXA2) 的合成,增加环磷酸腺苷 (cAMP) 和环磷酸鸟苷 (cGMP) 的形成,产生抗血小板聚集效应^[2]。

2 GB 的神经保护作用

2.1 GB 对脑缺血模型的保护作用

通过对短暂性大脑中动脉缺血模型 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 的研究,GB 对再灌注 21 h 大鼠神经症状有明显的改善作用,GB 10 mg/kg、5 mg/kg 能明显降低脑梗死范围^[3]。

有学者观察了 MCAO 中皮质及基底节区的病理变化,发现缺血后给予 GB 处理,在 3 h 内对基底节区以及 5 h 内对皮质的神经功能有改善作用并降低可梗死灶范围^[4]。有学者构建了高血糖大鼠 MCAO,发现 GB 能明显降低正常血糖大鼠的梗死

范围和神经缺损分数,降低高血糖大鼠 ROS 和丙二醛的含量^[5]。采用永久大脑中动脉局灶性缺血模型 (pMCAO) 研究 GB 的神经保护效应,EGb 及 GB 能降低脑梗死范围和降低神经缺损分数^[6]。胡清文等通过双重结扎 Wistar 大鼠双侧颈总动脉构建急性不完全性脑缺血模型,用 80 mg/kg GB 灌胃后发现皮质及海马区坏死神经元减少,海马区病变部位减少,胶质细胞空化程度减轻,脑白质水肿范围略减少。且明显降低全血粘度、血浆粘度及红细胞聚集指数^[7]。

2.2 GB 对缺血缺氧模型的保护作用

新生儿缺血缺氧是导致脑损伤和后遗症的常见原因,王军等^[8]利用新生 7 d 的 SD 大鼠缺血缺氧模型,观察到 GB 能下调脑组织 caspase3 表达及上调血管内皮生长因子 mRNA 的表达,减轻并修复脑损伤。孙明霞等^[9]采用相同模型,观察到 GB 抑制 MMP-2 及 MMP-9,起到脑保护的作用。

2.3 GB 对脑出血模型的神经保护作用

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 EGb 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^[10]。

2.4 GB 对帕金森病模型的神经保护作用

帕金森病是中老年人中常见的神经退行性疾病,在发病机制中其右旋谷氨酸是否参与发病是研究热点,有研究发现 GB 干预帕金森病小鼠模型,拮抗右旋谷氨酸的兴奋毒性,对谷氨酸能神经元具有保护作用^[11]。

收稿日期: 2014-07-02; 修回日期: 2014-09-17

作者简介: 黄建 (1980-), 男, 在读硕士, 主要从事脑血管病和痴呆的研究。

通讯作者: 刘之荣 (1966-), 男, 博士, 副教授、副主任医师, 硕士生导师, 主要从事脑血管病和痴呆的研究。E-mail: liuzhir@fmmu.edu.cn。

2.5 GB 对体外培养神经元的保护作用

有研究发现 120 $\mu\text{mol/l}$ 的 GB 预处理体外培养的神经元,能提高细胞的存活率^[12]。徐静等^[13]采用体外培养神经元比较了 GB 和银杏叶提取物的保护作用,发现在不同剂量下均能不同程度的提高细胞存活率。有学者研究发现 GB 能抑制大鼠脑组织的炎症反应,并能够利用脂多糖对星形胶质细胞进行修复,并且 GB 通过拮抗 β -淀粉样蛋白 25-35 的表达和缺血引起的细胞凋亡对神经元细胞具有保护作用^[14]。但也有学者发现 GB 预处理拮抗 β -淀粉样蛋白 1-42 产生的突触损伤和认知功能降低,保护体外培养的神经元^[15]。

3 GB 的神经保护作用机制

国内外的学者将 GB 的神经保护作用机制作为更深入的探索方向,但其机制并不是非常明确,分别在抗炎、抗凋亡、能量代谢、星形胶质细胞保护、抗兴奋性毒性及免疫调节等方面作了研究,以期更好的开发利用 GB。

3.1 抗炎

刘永刚等^[16]用 GB 预处理大鼠 MCAO,结果证实 GB 能降低脑内肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、血清白介素 6 (IL-6)、血清白介素 1 β (IL-1 β) 的含量和 E 选择素、细胞间黏附分子 1 (ICAM1) 的表达。刘晖等^[17]用 Longa 法制作老龄大鼠脑中动脉栓塞模型,经 GB 预处理后,得出与刘永刚等的相似结论。GB 能够抑制氧化型低密度脂蛋白刺激的炎症蛋白^[18]。有学者采用小鼠 MCAO,发现缺血后静脉给予 GB 能抑制 NF- κ B 激活,降低 TNF- α 、IL-1 β 、iNOS 水平^[19]。GB 能够使损伤后的脊髓白质显著增多,同时减低促炎性因子 mRNA 的水平^[20]。

3.2 抗凋亡

王军等^[8]发现 GB 下调缺血缺氧性新生大鼠脑组织 caspase3 的表达。孙明霞等^[9]也采用缺血缺氧模型观察到 GB 能抑制基质金属蛋白酶 MMP-2 及 MMP-9 的高表达。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^[21]。脑缺血发生早期的神经元凋亡与 PI3K/Akt 信号通路密切相关^[22]。有学者发现 GB 预处理体外培养的神经元通过 PI3K 信号通路抗凋亡,发挥神经保护效应^[12]。也有研究表明 GB 通过 Toll 样受体 4 和 NF- κ B 降低创伤性脑损伤引起的神经细胞凋亡^[23]。

3.3 对星形胶质细胞的保护

星形胶质细胞在脑缺血时发挥着神经毒性及

神经修复的双重作用,有研究表明脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激体外培养的星形胶质细胞其炎症因子明显增加,GB 能显著降低星形胶质细胞释放的 NO、IL-6 及趋化因子 RANTES 的表达,对星形胶质细胞起到保护作用^[24]。有学者证实 GB 预处理星形胶质细胞能产生保护效应,并且可以通过上调红细胞生成素的分泌对神经元产生间接的保护作用^[25]。

3.4 抑制兴奋性诱导的神经元损伤

兴奋性氨基酸如谷氨酸在脑缺血、出血等病理条件下产生神经细胞毒性作用,加重损伤程度。研究发现 GB 能降低谷氨酸诱导的神经元变性坏死。有学者建立了大鼠原代培养的海马神经元谷氨酸毒性模型,发现用 GB 预处理后对谷氨酸所诱导的海马神经元损伤有保护作用^[13,26]。有研究比较了 MCAO 纹状体中的细胞外氨基酸变化水平,发现 GB 预处理后降低了谷氨酸、天门冬氨酸以及甘氨酸,增加了细胞外 γ -氨基丁酸水平,减低了兴奋性毒性,减少梗死范围^[27]。

3.5 改善能量代谢

能量代谢是维持细胞结构和功能所必需的,当能量代谢障碍时引起细胞功能及信号传递发生障碍,研究发现 GB 能提高 ATP 活性,改善病理状态的能量代谢。降低乳酸脱氢酶 (LDH) 的活性^[3]。

3.6 免疫调节

PAF 受体信号通路与炎症、感染等疾病的关系及其在固有免疫应答中发挥重要作用,而作为 PAF 受体强效拮抗剂的 GB 对巨噬细胞具有免疫调节作用。GB 能有效抑制 LPS 诱导的细胞增殖吞噬作用产生 NO 和 ROS 的水平,产生免疫抑制剂的作用^[28]。

4 结语

GB 在多种疾病的模型中发挥神经保护作用。在脑缺血模型中减轻梗死灶,改善神经症状,减轻脑水肿;减少坏死神经元,降低血粘度。降低高血压性脑出血血肿周围脑水肿,改善神经功能障碍;对抗帕金森病模型中谷氨酸的毒性损伤。并可以通过体外培养的神经元的存活率。

GB 作为一种 PAF 的强力拮抗剂,可通过抗炎、抗凋亡及改善能量代谢、抑制兴奋性氨基酸的毒性作用对神经元起保护作用,亦能通过星形胶质细胞的桥梁作用对神经元产生保护效应。GB 也有免疫调节作用,并发挥免疫抑制剂的效应。但其产生神

经保护效应的内在完整机制还有待于更多实验探究。

参 考 文 献

- [1] 姜秀新, 管斯斯, 鲍利, 等. 银杏内酯 B 对胶原或二磷酸腺苷刺激血小板活化后一氧化氮含量及血管舒张因子刺激磷酸蛋白磷酸化的影响. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(11): 2066-2070.
- [2] Cho HJ, Nam KS. Inhibitory effect of ginkgolide B on platelet aggregation in a cAMP- and cGMP-dependent manner by activated MMP-9. J Biochem Mol Biol, 2007, 40(5): 678-683.
- [3] 黄贱英, 孙建宁, 梅世昌, 等. 银杏内酯 B 对缺血/再灌注脑损伤大鼠的保护作用. 中国药理学通报, 2008, 24(2): 269-272.
- [4] Lv P, Fang W, Geng X, et al. Therapeutic neuroprotective effects of ginkgolide B on cortex and basal ganglia in a rat model of transient focal ischemia. Eur J Pharm Sci, 2011, 44(3): 235-240.
- [5] Huang M, Qian Y, Guan T, et al. Different neuroprotective responses of Ginkgolide B and bilobalide, the two Ginkgo components, in ischemic rats with hyperglycemia. Eur J Pharmacol, 2012, 677(1-3): 71-76.
- [6] Shah ZA, Nada SE, Dore S. Heme oxygenase 1, beneficial role in permanent ischemic stroke and in Ginkgo biloba (EGb 761) neuroprotection. Neuroscience, 2011, 180: 248-255.
- [7] 胡清文, 任冬梅, 杨爽. 银杏内酯和银杏叶胶囊对大鼠脑缺血治疗的对比研究. 中药材, 2012, 35(3): 449-451.
- [8] 王军, 尚凤伟, 朱登纳, 等. 银杏内酯 B 对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑组织 Caspase-3 及 VEGF mRNA 表达的影响. 郑州大学学报(医学版), 2013, 48(02): 175-178.
- [9] 孙明霞, 殷其改, 张亚楠, 等. 银杏内酯 B 对新生大鼠缺血性损伤海马 MMP-2 及 MMP-9 表达的影响. 神经解剖学杂志, 2013, 29(2): 177-182.
- [10] 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元保护作用的研究. 神经解剖学杂志, 2011, 27(3): 316-320.
- [11] 陈敏, 罗慧琼, 卢昕, 等. 银杏内酯对 PD 小鼠中脑谷氨酸能神经元的保护性作用. 时珍国医国药, 2013, 24(3): 614-616.
- [12] Wu X, Qian Z, Ke Y, et al. Ginkgolide B preconditioning protects neurons against ischaemia-induced apoptosis. J Cell Mol Med, 2009, 13(11-12): 4474-4483.
- [13] 徐静, 孙长凯, 马辉, 等. 银杏叶提取物及银杏内酯 B 对体外培养大鼠神经元损伤的保护作用比较. 中国中药杂志, 2010, 35(1): 114-117.
- [14] Xiao Q, Wang C, Li J, et al. Ginkgolide B protects hippocampal neurons from apoptosis induced by beta-amyloid 25-35 partly via up-regulation of brain-derived neurotrophic factor. Eur J Pharmacol, 2010, 647(1-3): 48-54.
- [15] Bate C, Tayebi M, Williams A. Ginkgolides protect against amyloid-beta1-42-mediated synapse damage in vitro. Mol Neurodegener, 2008, 3: 1.
- [16] 刘永刚, 李芳君, 王婧, 等. 银杏内酯 B 对大鼠脑缺血-再灌注损伤炎症反应的影响. 中药材, 2010, 33(4): 578-580.
- [17] 刘晖, 张嘉伟, 林宇, 等. 银杏内酯 B 对老龄大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤炎症反应的作用. 中国老年学杂志, 2013, 33(13): 3139-3140.
- [18] Li R, Chen B, Wu W, et al. Ginkgolide B suppresses intercellular adhesion molecule-1 expression via blocking nuclear factor-kappaB activation in human vascular endothelial cells stimulated by oxidized low-density lipoprotein. J Pharmacol Sci, 2009, 110(3): 362-369.
- [19] Gu J H, Ge J B, Li M, et al. Inhibition of NF-kappaB activation is associated with anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of Ginkgolide B in a mouse model of cerebral ischemia/reperfusion injury. Eur J Pharm Sci, 2012, 47(4): 652-660.
- [20] Wang JH, Sun GY. Platelet activating factor (PAF) antagonists on cytokine induction of iNOS and sPLA2 in immortalized astrocytes (DITNC). Neurochem Res, 2000, 25(5): 613-619.
- [21] Hsuw YD, Kuo TF, Lee KH, et al. Ginkgolide B induces apoptosis via activation of JNK and p21-activated protein kinase 2 in mouse embryonic stem cells. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1171: 501-508.
- [22] 许艺超, 石松生. PI3K/Akt 信号通路在脑缺血神经元凋亡中作用的研究进展. 国际神经病学神经外科学杂志, 2012, 39(6): 530-533.
- [23] Yu WH, Dong XQ, Hu YY, et al. Ginkgolide B reduces neuronal cell apoptosis in the traumatic rat brain: possible involvement of toll-like receptor 4 and nuclear factor kappa B pathway. Phytother Res, 2012, 26(12): 1838-1844.
- [24] 彭珊瑛, 廖文辉, 聂珍贵, 等. 银杏内酯 B 对星形胶质细胞释放 NO、IL-6 及趋化因子 RANTES 的影响. 药学报, 2010, 45(9): 1103-1108.
- [25] Wu X, Zhou C, Du F, et al. Ginkgolide B preconditioning on astrocytes promotes neuronal survival in ischemic injury via up-regulating erythropoietin secretion. Neurochem Int, 2013, 62(2): 157-164.
- [26] 孙晶, 孙长凯, 范明, 等. 银杏内酯 B 对谷氨酸诱导海马神经元损伤的影响. 中国应用生理学杂志, 2007, 23(2): 155-158.

[27] Yang ZZ, Li J, Li SX, et al. Effect of ginkgolide B on striatal extracellular amino acids in middle cerebral artery occluded rats. *J Ethnopharmacol*, 2011, 136(1): 117-122.

[28] 王晓东, 曾耀英, 宋兵. 银杏内酯 B 对小鼠腹膜巨噬细胞体外增殖、吞噬及产生 NO 和 ROS 的影响. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(1): 4-7.

RNA 干扰技术原理及其在脑胶质瘤治疗中的应用

汪超甲 综述 王辉 审校

湖北医药学院附属太和医院神外三科 湖北 十堰 442000

摘要: RNA 干扰是 dsRNA 在转录后水平特异性降解目的基因 mRNA, 导致该基因沉默的现象。脑胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤, 传统的手术、放、化疗均不能达到彻底治愈的目的。RNA 干扰在脑胶质瘤治疗中的应用, 可能会取得更好的效果。本文就 RNA 干扰技术原理及其在脑胶质瘤治疗中的研究进展作一综述。

关键词: RNA 干扰; 脑胶质瘤; 原理; 应用

脑胶质瘤是中枢神经系统中最常见的恶性肿瘤, 其发病率高达 50% ~ 60%。由于其恶性程度高, 易复发, 侵袭性强, 因此, 针对胶质瘤的治疗一直是神经外科领域的难题。目前临床上以手术治疗为主, 随着显微技术及定位系统的发展, 手术切除率大大提高, 患者的生存时间得以延长, 生存质量得以大幅提高^[1]。放、化疗或者是术后辅以放、化疗进一步提高的病人的生存时间和生活质量, 但是仍不能达到根治的目的。随着基因治疗, 特别是靶向分子治疗, 如 RNA 干扰技术的出现, 使得我们看到了彻底治愈脑胶质瘤的曙光, 为临床治疗提供了一条崭新的治疗途径^[2]。

1 RNA 干扰技术的发现

1990 年, Fire 试图在矮牵牛花中插入一种能够催生红色素的基因, 使花朵的色彩变得变得更加艳丽, 结果转基因的植株不仅没有新的基因表达, 原有的色素基因反而受到抑制, 花朵变为白色, 当时他把这一现象称为共抑制 (consuppression)^[3]。1994 年 Cogoni 在真菌中发现同种现象, 被其称为基因压制 (quelling)^[4]。1995 年 Guo 和 Kemphues 试图利用反义 RNA 阻止秀丽线虫的一些基因表达, 用正义 RNA 作对照组时发现不但不增加该基

因的表达, 反而产生与实验组相同的结果, 证明该基因被特异性阻断, 从而证实了 RNA 干扰现象的存在^[5]。1998 年 Fire 等在将混合的正、反义链 RNA 同时注入秀丽线虫时, 观察到更强的基因表达的抑制, 并首次提出了 RNA interference 的概念^[6]。2001 年 Elbashir 在《Nature》上首次报道利用 21 个核苷酸的 siRNA 成功的在哺乳动物培养的细胞中诱导特异性基因沉默^[7]。2002 年, Brummelkamp 等利用小鼠 H1 启动子首次成功构建了小发夹 RNA (small hairpin RNA, shRNA) 表达载体, 并发现转染该载体可特异性、有效地降低目的基因的表达, 为 RNAi 技术在基因治疗中的应用研究奠定了基础^[8]。

2 RNA 干扰技术原理及特点

内源性基因或者外源性基因整合到宿主细胞基因组并转录时, 常产生一些 dsRNA。宿主细胞胞质中的核酸内切酶 Dicer 将这些 dsRNA 切割成多个具有特定长度和结构的带有 3' 端单链尾巴及磷酸化 5' 端的短链 dsRNA (大约 21 ~ 23 bp), 即 siRNA。由 siRNA 中的反义链指导形成一种核蛋白体, 即 RNA 诱导的沉默复合体 (RISC), RISC 中的 siRNA 随后变成单链, 并识别同源靶 mRNA, 引导

基金项目: 湖北省教育厅中青年项目 (Q20112103)

收稿日期: 2014-08-19; 修回日期: 2014-11-21

作者简介: 汪超甲 (1981-), 男, 硕士, 主治医师, 主要研究方向: 胶质瘤的临床及基础研究。

通讯作者: 王辉 (1971-), 男, 博士, 主任医师, 主要研究方向: 颅内肿瘤的临床基础研究。