

• 基础研究 •

银杏叶提取液抗肢体缺血再灌注损伤

蓝旭¹ 刘雪梅¹ 葛宝丰¹ 许建中²

(1. 兰州军医总医院骨科研究所, 甘肃 兰州 730050; 2. 重庆第三军医大学西南医院, 重庆)

【摘要】 目的 观察银杏叶提取液对肢体缺血再灌注损伤的影响。方法 制作兔肢体缺血再灌注损伤动物模型, 并分为对照组、再灌注组和治疗组。检测不同时相点血小板计数、血栓素 B₂(TXB₂) 和 6-酮前列腺素 F_{1α}(6-Ketσ PGF_{1α}) 含量, 测定骨骼肌丙二醛(MDA)、线粒体钙(Mitochondrial Ca) 含量和组织湿/干重量比值(Wet/Dry)。结果 再灌注组与对照组比较, 以上各项指标变化明显。银杏叶提取液可抑制血小板活化、降低血浆 TXB₂ 和 6-Ketσ PGF_{1α} 水平, 减少骨骼肌 MDA、线粒体 Ca 含量和组织湿/干重量比值。治疗组各项测定指标较再灌注组有比较明显改善。结论 银杏叶提取液对肢体缺血再灌注损伤骨骼肌有保护作用。

【关键词】 再灌注损伤; 中医现代化; 骨骼肌

The effect of Ginkgo Biloba Succi in combating platelet mediated injury of limb during ischemia and reperfusion LAN Xu, LIU Xuemei, GE Baofeng, et al. The General Hospital of PLA of Lanzhou (Gansu Lanzhou, 730050)

【Abstract】 Objective To observe the effect of Ginkgo Biloba Succi on ischemia and reperfusion injury of the limbs. **Methods** The experimental models of ischemia and reperfusion injury of limb was produced in the rabbits which were divided into control group, reperfusion group and treatment group. The platelet count, TXB₂ and 6-Ketσ PGF_{1α} in plasma were assayed at different phase. The MDA, Mitochondrial Ca content and Wet/Dry ratio of skeletal muscle were measured respectively. **Results** The index of reperfusion group changed significantly as compared with those of control group. Ginkgo Biloba Succi inhibited the platelet activation, reduced the level of TXB₂ and 6-Ketσ PGF_{1α} in plasma and decreased the MDA, Mitochondrial Ca content and Wet/Dry ratio of skeletal muscle. The index of treatment group improved significantly as compared with those of reperfusion group. **Conclusion** Ginkgo Biloba Succi might have the protective effect on muscle cells during ischemia and reperfusion injury of limb.

【Key Words】 Reperfusion injury; Modernization of TCM; Skeletal muscles

目前认为肢体缺血再灌注损伤与血小板的功能状态有重要关系^[1]。为了有效改善缺血再灌注损伤, 我们观察了银杏叶提取液对骨骼肌缺血再灌注损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 动物模型制作 健康成年家兔 36 只, 体重 2.5~3.5 kg, 3% 戊巴比妥钠 (25 mg/kg) 静脉注射麻醉。无菌手术显露左大腿股血管鞘并游离股动静脉, 于腹股沟韧带处用微血管夹阻断股动静脉, 在阻断处以下用橡皮带弹性环扎以阻断侧支循环。6h 后取下橡皮带及血管夹, 恢复肢体血供。动物随机分 3 组, 每组 12 只。①对照组: 解剖出股动静脉, 不做其它处理。②再灌注组: 缺血 6h, 恢复血流再灌注 30min、1h、2h、3h。③治疗组: 缺血 6h, 恢复血流灌注前 10min, 按 10mg/kg 静脉注射银杏叶提取液(徐州制药厂产品, 高效液相色谱分析银杏总黄酮甙 27.5%), 再灌注 30min、1h、2h、3h。

1.2 检测指标 ①血小板计数: 采用常规光镜直接计数不同

时相点外周血循环血小板数。②血浆 TXB₂ 和 6-Ketσ PGF_{1α} 含量检测: 采用放射免疫测定法, 试剂盒为苏州医学院血栓研究所产品。③骨骼肌生化指标检测: 缺血再灌注 3h 后, 取右小腿部分腓肠肌制备组织匀浆。MDA 测定采用硫代巴比妥酸法, 试剂盒为南京建成生物医学公司产品。用差速离心法提取骨骼肌线粒体并用双缩脲法进行蛋白定量, 采用原子吸收分光光度计火焰法测定总 Ca 含量。实验结束时取部分腓肠肌测定组织湿/干重量比值。

1.3 统计学方法 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间计量资料比较用 Excel 97 软件行 *t* 检验。

2 结果

2.1 血小板计数的变化 再灌注组与对照组比较, 相同时相点血小板计数明显降低 ($P < 0.05$)。银杏叶提取液可抑制血小板活化, 治疗组与再灌注组比较, 相同时相点血小板计数明显升高 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 各组动物血小板计数的变化($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 术前 | 再灌注 30min | 再灌注 1h | 再灌注 2h | 再灌注 3h |
|------|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 对照组 | 158.9 ± 35.2 | 155.6 ± 33.7 | 150.7 ± 28.9 | 148.9 ± 31.6 | 135.6 ± 35.5 |
| 再灌注组 | 162.6 ± 26.8 | 113.2 ± 27.3 ^a | 102.9 ± 29.3 ^a | 103.6 ± 27.3 ^a | 110.5 ± 29.6 ^a |
| 治疗组 | 159.2 ± 30.9 | 148.9 ± 31.3 ^b | 148.5 ± 32.5 ^b | 141.3 ± 21.6 ^b | 142.9 ± 33.2 ^b |

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与再灌注组比较, ^b $P < 0.05$

2.2 血浆 TXB₂ 和 6 K ϵ t σ PGF_{1 α} 含量的变化 再灌注组与对照组比较, 相同时相点 TXB₂ 和 6 K ϵ t σ PGF_{1 α} 含量显著升

高($P < 0.01$)。治疗组与再灌注组比较, 相同时相点 TXB₂ 和 6 K ϵ t σ PGF_{1 α} 含量明显降低($P < 0.01, P < 0.05$)。结果见表 2。

表 2 各组动物血浆 TXB₂ 和 6 Keto PGF_{1 α} 含量的变化($\bar{x} \pm s$)

| 项目 | 组别 | 术前 | 再灌注 30min | 再灌注 1h | 再灌注 2h | 再灌注 3h |
|--|------|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| TXB ₂ | 对照组 | 132.7 ± 21.3 | 158.7 ± 19.2 | 162.9 ± 22.3 | 166.5 ± 27.3 | 159.3 ± 24.1 |
| | 再灌注组 | 131.5 ± 19.9 | 251.1 ± 17.3 ^a | 303.6 ± 16.8 ^a | 286.3 ± 19.6 ^a | 250.5 ± 21.7 ^a |
| | 治疗组 | 135.3 ± 25.6 | 183.6 ± 21.2 ^b | 218.5 ± 15.9 ^b | 192.7 ± 17.9 ^b | 185.5 ± 20.3 ^b |
| 6 Keto PGF _{1α} | 对照组 | 27.2 ± 3.7 | 29.8 ± 3.9 | 31.5 ± 6.2 | 30.9 ± 5.7 | 29.9 ± 5.2 |
| | 再灌注组 | 26.5 ± 4.9 | 56.5 ± 3.1 ^a | 58.9 ± 4.1 ^a | 52.6 ± 4.9 ^a | 49.3 ± 3.8 ^a |
| | 治疗组 | 27.9 ± 3.9 | 38.6 ± 5.3 ^b | 47.7 ± 3.9 ^c | 42.5 ± 5.1 ^c | 39.8 ± 6.3 ^c |

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与再灌注组比较, ^b $P < 0.01, ^cP < 0.05$

2.3 骨骼肌生化指标的变化 再灌注组与对照组比较, MDA 含量、线粒体 Ca 和组织湿/干重量比值明显升高($P < 0.01, P < 0.05$)。银杏叶提取液可改善骨骼肌生化指标, 治疗组与再灌注组比较, 以上各项指标明显降低($P < 0.01, P < 0.05$)。结果见表 3。

表 3 各组动物骨骼肌 MDA、线粒体 Ca 和 Wet/Dry 重的变化($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | MDA(nmol/g) | 线粒体 Ca(μ mol/mg) | Wet/Dry |
|------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| 对照组 | 82.36 ± 9.33 | 115.36 ± 21.53 | 1.89 ± 0.09 |
| 再灌注组 | 153.92 ± 10.47 ^a | 228.97 ± 26.55 ^a | 2.93 ± 0.12 ^b |
| 治疗组 | 101.53 ± 11.29 ^c | 155.11 ± 18.02 ^c | 1.96 ± 0.15 ^d |

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01, ^bP < 0.05$; 与再灌注组比较, ^c $P < 0.01, ^dP < 0.05$

3 讨论

目前认为缺血再灌注损伤主要是再灌注时氧自由基过量生成导致膜结构脂质过氧化和膜通透性增高等原因造成肢体损伤进一步加重^[2]。本实验结果进一步证明, 肢体缺血再灌注早期出现的血小板活化是再灌注损伤的重要机制之一。骨骼肌缺血再灌注后, 外周血循环中血小板计数明显减少。其原因在于缺血再灌注过量生成的氧自由基介导血小板活化, 进而导致血小板聚集和微血栓的形成, 血小板被破坏、裂解和消耗^[3]。血小板同时释放大量血栓素 A₂ (TXA₂)、白三烯和血小板活化因子等炎性介质, 加重骨骼肌缺血再灌注损伤。氧自由基激活的中性粒细胞、血小板和巨噬细胞大量生成 TXA₂, 并且组织缺血缺氧、粒细胞和血小板聚集、微血栓形成等因素引起血管内皮细胞受损, 反应性地促进前列环素 (PGI₂) 生成和释放^[4]。TXB₂ 和 6 K ϵ t σ PGF_{1 α} 分别为 TXA₂ 和 PGI₂ 的主要代谢产物, 检测两者的血浆含量, 可间接反映 TXA₂ 和 PGI₂ 的水平。TXA₂ 具有强烈的缩血管作用, 促进血小板聚集和粒细胞脱颗粒反应, 增加血管阻力和通透性^[5]。TXA₂ 和 PGI₂ 的动态平衡紊乱, 加剧了血小板聚集、微血栓

形成和微循环障碍的恶性循环。

MDA 反映脂质过氧化程度并间接反映组织的损伤情况。过量氧自由基生成导致线粒体膜结构被破坏, Ca 超载可加重骨骼肌缺血再灌注损伤。组织湿/干重量比值可反映骨骼肌组织损伤后水肿程度。本研究结果证实血小板活化和聚集参与了骨骼肌缺血再灌注损伤过程并起重要作用, 血小板活化和聚集性增高可加重 TXA₂ 和 PGI₂ 的平衡紊乱^[6]。治疗组与再灌注组结果的差异提示银杏叶提取液对缺血再灌注损伤的骨骼肌有保护作用, 一方面通过抑制血小板的活化、粘附和聚集, 从而阻断血小板介导的缺血再灌注损伤。此外, 银杏叶提取液是一种有效的氧自由基清除剂, 通过阻断自由基的链锁反应, 降低其毒性并经歧化作用解毒, 从而减轻骨骼肌脂质过氧化和炎性反应的程度。

参考文献

- 1 Loucks Eb, Symersky P, Qayumi AK. Platelet activating factor antagonism: A new concept in the management of regional myocardial ischemic reperfusion injury. J Invest Surg, 1997, 10(6): 321-338.
- 2 Abe K, Hayashi N, Terada H. Effect of endogenous nitric oxide on energy metabolism of rat heart mitochondria during ischemia and reperfusion. Free Radic Biol Med, 1999, 26(3-4): 379-387.
- 3 Birk Sorensen L, Kerrigan CL, Wang C. Platelet activating factor antagonism in pure skin flaps exposed to ischemic reperfusion injury. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg, 1999, 33(2): 155-161.
- 4 Yadav SS, Howell DN, Steeber DA, et al. P-Selectin mediates reperfusion injury through neutrophil and platelet sequestration in the warm ischemic mouse liver. Hepatology, 1999, 29(5): 1494-1502.
- 5 Noel AA, Holson RW, Duran WN. Platelet-activating factor and nitric oxide mediate microvascular permeability in ischemic reperfusion injury. Microvasc Res, 1996, 52(3): 210-220.
- 6 Qayumi AK, English JC, Godin DV, et al. The role of platelet activating factor in regional myocardial ischemic reperfusion injury. Ann Thorac Surg, 1998, 65(6): 1690-1697.

(收稿: 2001-10-26 编辑: 李为农)