维普资讯 http://www.cqvip.com

256-258

(12)

第24卷 第3期 重庆医科大学学报 Vol.24 No 3
1999 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1999

灵芝保护鼠脑缺血性损害的作用机制

1274331

临床学院神经内科 夏一鲁* 胡常林 董为伟

提 要 为探讨灵芝水溶性提取物(EGL)对鼠脑缺血性损害的预防性保护机制,检测了大鼠脑梗塞区rCBF、SOD、Na^+-K^+-ATP酶活性。结果显示预防性使用EGL组较梗塞后使用组的SOD、Na^+-K^+-ATP酶活性更高,rCBF改善仅出现于梗塞后第五天,且与梗塞体积缩小和组织学恢复无关。提示保护SOD、Na^+-K^+-ATP酶可能是EGL发挥其预防性保护作用的机制之一。

关键词 灵芝; 预防性神经保护; 脑缺血; 超氧化物歧化酶; 钠钾三磷酸腺苷酶
中图分类号 R743.31

EGL

灵芝的作用十分广泛,有人将其试用于脑血管病取得了一定疗效。为了给临床应用提供理论依据,我们曾将赤芝(灵芝的一种)的水溶性提取物(extraction of ganoderma lucidum,EGL)用于光化学诱导的大鼠脑皮质梗塞,结果可缩小梗塞体积,促进脑梗塞区组织学的恢复,对脑缺血性损害确有保护作用[1]。为探讨其作用机制,本文进一步研究了EGL对梗塞区局部相对脑组织灌流量(rCBF)及脑组织超氧化物歧化酶(SOD)及钠钾三磷酸腺苷酶($Na^+-K^+-ATPase$,Na^+-K^--ATP酶)活性的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 **实验动物** Wistar大鼠,雄性,体重200~250g。由本校实验动物中心提供。

1.2 **药物、试剂及仪器** EGL,生药含量1.0g/ml,原料为人工栽培的赤芝,购自四川联合大学生物工程系制药厂。玫瑰红B(四碘四氯荧光素钠),Sigma公司;Na^+-K^+-ATPase测定盒,南京建成生物制品研究所;黄嘌呤氧化酶,Sigma公司;黄嘌呤及其它试剂,均为国产分析纯。以上试剂按要求以双蒸水,去离子水或其它溶剂配制,LDF-3型激光多普勒血流计(天津南开大学电子仪器厂);LHL-1型医用光化冷光仪(锦州光学仪器厂与我所共同研制); GL-20C型高速冷冻离心机(中国科学院武汉科学仪器厂);721A型分光光度计(四川仪表九厂)。

1.3 **方法**

1.3.1 **脑皮质梗塞模型** 采用胡常林等描述的方法[2]稍加改进,造成鼠脑皮质梗塞。

1.3.2 **脑局部血流量测定** 大鼠18只,按体重排序后随机均分为单纯梗塞组(对照组)、EGL治疗组(治疗组)、预防性治疗组(预防组)。对照组及治疗组先造成梗塞,而后分别经口灌服生理盐水或EGL(25ml/kg),每天两次,共五天。预防组灌服EGL(25ml/kg),每天两次,五天后造成梗塞,之后不再给药。梗塞后第一、第二及第五天分别于光照中心部记录梗塞侧及对侧相应部位的相对脑组织灌流量。

1.3.3 **生化指标测定** 大鼠72只,分组及给药剂量同上;对照及治疗组给药持续时间在不同亚组分别为梗塞后一、二、五天,治疗结束后当天将大鼠麻醉并迅速断头取梗塞区脑组织测定SOD及Na^+-K^+-ATP酶活性。预防组亦于对应的不同时点取脑测酶活性。

(1)SOD活性测定 采用亚硝酸盐形成法[3]。SOD活性以反应体系中吸光度抑制50%为一个亚硝酸盐单位。

(2)Na^+-K^+-ATP酶活性测定 按试剂盒所附说明书操作。ATP酶活性单位定义为每分钟每毫克蛋白分解三磷酸腺苷(ATP)所产生的无机磷(Pi)的微摩尔量。

(3)蛋白质含量测定按Lowry法进行[4],以牛血清白蛋白为标准。

以上操作除特别说明者外,均在低温(1~4℃或冰浴)下进行。测定管为复管。

1.4 **统计处理** 所得结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示;所有数据均经微机运用OXSTAT-Ⅱ数理统计软件贮存,转换及运算;各组数据采用完全随机设计的方差分析并进行q检验。检验水准$\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 **EGL对梗塞后rCBF影响** 见表1。光化学诱导局灶性脑皮质梗塞前各组rCBF之间无差异;梗塞后第一天各组rCBF明显下降,仅及梗塞前的59%,各组之间亦无差异;之后各组均有恢复,梗塞

* 男,1959-04出生,主治医师

维普资讯 http://www.cqvip.com

后第五天时，对照组恢复至梗塞前的66%，治疗组为72%，预防组为76%。预防组与对照组相比有显著差异。这说明，预防性使用EGL不能改善梗塞第1、2天的血液灌流，但可使第五天的血供改善。梗塞后使用EGL对rCBF无明显影响。

2.2 EGL对梗塞区SOD及Na^+-K^+-ATP酶活性的影响 见表2.3。

从表2可以看出，光化学诱导脑皮质梗塞后各组SOD活性明显下降，第二天降至最低。EGL对梗塞后第一天的SOD活性无影响；梗塞后第二天，预防组、治疗组SOD活性均较对照组高，预防组亦较治疗组高；梗塞后第五天，预防组仍较对照组高。从各组梗塞后不同时点分析可以看出，梗塞后第二天SOD降至最低值，之后有恢复趋势。在梗塞后第二天，预防组较对照组高出约58%；而在治疗组此值为32%。

表3结果显示，梗塞后第一天Na^+-K^+-ATP酶活性明显下降($P<0.001$)，第二天降至最低值。在这两天内，预防组与其余两组相比，该酶活性的下降明显较轻。而治疗组与对照组相比无差异。梗塞后第五天，结果趋于一致，但仍未恢复至正常水平。就对照及治疗组的不同时点而言，与SOD值变动趋势相似，Na^+-K^+-ATP酶活性亦于第二天降至最低点，于梗塞后第五天回升并超过梗塞后第一天($P<0.05$)，但未达梗塞前水平；在预防组，梗塞后Na^+-K^+-ATP酶活性虽较梗塞前明显降低，但各个时点酶活性并无大的波动。

3 讨 论

根据我们先前的研究，预防性使用EGL确能使梗塞体积及组织学损害得到改善。本文的结果显示了EGL对局灶性脑皮质梗塞后的rCBF及SOD、Na^+-K^+-ATP酶活性均有一定影响，而这种影响可能与其发挥保护作用的机制有关。

3.1 EGL对鼠脑皮质梗塞时rCBF的影响及其与早期脑保护的关系 有人在急性胰腺微循环障碍的动物实验中发现，EGL可以通过加快胰腺毛细

表1 EGL对大鼠rCBF的影响($\bar{x}\pm s$，下表同)

组 别	梗塞前	梗塞后1d	梗塞后2d	梗塞后5d
对照组	109.00±7.10	64.00±4.90	66.83±6.49	71.33±7.78
治疗组	104.00±5.10	64.17±6.62	67.33±4.36	74.67±4.68
预防组	106.33±6.50	64.83±8.18	70.83±7.94	81.00±5.66$^{\Delta\Delta}$

Δ与对照组比较$P<0.05$；Δ与治疗组比较$P=0.06$

表2 EGL对大鼠脑组织SOD活性的影响(u/mgpr.)

组 别	梗塞前	梗塞后1d	梗塞后2d	梗塞后5d
对照组	269.34±9.25	228.08±39.27	140.33±16.67	222.37±25.53
治疗组	266.96±9.43	230.35±26.77	185.34±25.77$^{\Delta}$	241.01±12.14
预防组	274.63±13.28	240.92±16.87	222.05±13.22$^{\Delta\Delta}$	274.27±15.51$^{\Delta\Delta}$

Δ与对照组比较$P<0.05$；Δ与治疗组比较$P<0.05$

表3 EGL对大鼠脑组织Na^+-K^+-ATP酶活性的影响(μ molP$_i$/mg pr.·min)

组 别	梗塞前	梗塞后1d	梗塞后2d	梗塞后5d
对照组	182.69±4.04	103.66±8.40	93.23±5.12	121.52±8.03
治疗组	183.09±4.93	101.99±7.01	99.72±11.05	120.83±16.22
预防组	188.72±12.02	118.66±6.80$^{\Delta}$	112.03±5.82$^{\Delta}$Δ	115.36±11.66

Δ与对照组比较$P<0.05$；Δ与治疗组比较$P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

血管内的血流速度和增加毛细血管开放数,对胰腺起保护作用[6]。我们的结果显示,EGL并不能增加梗塞后早期的rCBF。尽管梗塞后第五天时rCBF有所增加,光镜下亦可见大量新生毛细血管[1],但梗塞体积缩小先于rCBF升高这一事实,说明EGL的保护机制至少在早期并非通过增加rCBF发挥作用。至于rCBF升高对梗塞后期组织与功能恢复的影响尚待进一步研究。

3.2 对SOD及Na^+-K^+-ATP酶活性的保护作用

3.2.1 抗自由基作用 正常脑组织代谢过程中伴有一定量的自由基形成。由于内源性清除系统的作用,自由基被及时清除,不至于对机体构成危害,但脑组织化学组成具有特殊性,缺血后特别易受自由基攻击而造成严重损伤[6]。从SOD测定结果可以看出,EGL可以减小缺氧使SOD活性下降的幅度,而且在梗塞后较长时间内,使SOD活性的恢复潜力增大。我们推测,EGL对治疗及预防组SOD的影响可能有以下几个因素参与:1.EGL的清除自由基作用,使内源性SOD消耗减少;2.EGL具有保护SOD结构免受缺氧性损伤,从而维持其活性的作用;3.EGL可以易化SOD活性;4.组织中测得的SOD活性的升高可能合并有EGL的类SOD效应[7]。这些假设不但可以说明为何治疗及预防组SOD活性较高,而且可以解释预防组较治疗组的增高及恢复更明显的现象。

3.2.2 保护Na^+-K^+-ATP酶免受缺血性损害 在脑梗塞的发生发展过程中,细胞性水肿是早期的重要病理学改变之一[8]。缺血状态下,能量供应的减少,自由基的攻击,神经递质的异常释放及兴奋性氨基酸的神经毒作用,都在不同方面与不同程度上损害着细胞膜的正常结构。其中Na^+-K^+-ATP酶的损害,在水肿形成的过程中发挥着重要作用。本文的结果表明,尽管缺血后局部Na^+-K^+-ATP酶活性明显下降,但与对照组不同,缺血后前五天其活性在预防组仍保持在较高水平而无大的波动。鉴于EGL对SOD的保护效应,脂类在Na^+-K^+-ATP酶结构及活性的维持中的重要作用以及脂类对自由基攻击的易感性,因而在对Na^+-K^+-ATP酶的保护作用中,EGL的抗氧化能力可能发挥着重要作用。

缺血性脑损害的发生及发展是各种原发与继发性病理因素相互促进、相互制约的过程。作为天然药物的灵芝由于其成份、结构及生物活性的多样性而可能在缺血性病理过程启动前后的不同通路、不同水平上发挥效应,因而具有脑保护作用。本文的结果为预防性脑保护理论及实践上的可能性提供了有力证据,因而值得对其相关问题进行深入研究。

参考文献

1. 夏一鲁,等.临床神经病学杂志 1999;12:12
2. 胡常林,等.中华医学杂志 1991;71:627
3. Elstner EF,et al. Anal Biochem 1976;70:616
4. Lowry OH, et al. J Biol Chem 1951;193:265
5. 彭华民,等.中草药 1986;17:165
6. Krause GS, et al.Can J Physiol Pharmacol 1987; 60:1415
7. 桂兴芬,等. 中医研究 1993;6: 31
8. Yang GY, et al.Stroke1992; 23:1331

(收稿日期 1998-10-12)

Prophylactic protective mechenism of EGL on ischemic damage in rat brain

Xia Yilu, et al
Department of neurology,college of clinical medicine

To investigate the prophylactic protective mechanism of the water soluble extract of *Ganoderma Lucidum*(EGL) on ischemic cerebral damage in rats,the rats were fed with EGL prior and posterior to cerebral ischemia induced by photochemical technique.SOD and $Na^+-K^+-ATPase$ activity in brain homogenate were measured,and rCBF was recorded.The results showed that the ascension of rCBF presented only at the 5th day,and so,was not related with the diminished infarction volume and the histomorphological recovery in rat brains at early stages.SOD activity of the pretreated group was higher than those of control and treat groups,as was $Na^+-K^+-ATPase$ activity.The results suggest that EGL administered before cerebral infarction in rats may have cerebral protective effects at eraly stages by maintaining SOD and $Na^+-K^+-ATPase$ activity in ischemic tissue.

KEY WORDS Ganoderma Lucidum; Cerebral ischemia; Superoxide dismutase; $Na^+-K^+-ATPase$; Neuroprotection,prophylactic