

# 银杏叶提取物对急性缺血再灌注后视网膜神经节细胞的保护作用

李月华 马科 徐亮

## The neuroprotective effect of extract of ginkgo biloba on retinal ganglion cells after retinal ischemia-reperfusion

Li Yuehua, Ma Ke, Xu Liang. Department of Ophthalmology, Beijing Tongren Hospital, Beijing 100005, China

**Abstract Objective** Loss of retinal ganglion cells (RGCs) is a dominant pathological feature after elevation of intraocular pressure (IOP). Our previous study showed that ginkgo biloba extract has a neuroprotective effect on RGCs. Present study was to investigate the effect of extract of ginkgo biloba on RGCs survival after acute ocular hypertension-induced retinal ischemia-reperfusion injury. **Methods** Retinal ischemia-reperfusion models were induced by infusing normal saline solution into anterior chamber to elevate IOP to 110mmHg for one hour and then reducing the IOP to normal reading to allow reperfusion in the right eyes of 60 SD rats. The normal fellow eyes were as controls. 5ml/kg of normal saline solution (NS), 1% erigeron breviscapus (EB), 0.25% EGb761, 1% EGb761, 4% EGb761 was administered via lavaging at 2 hour after injury and once a day after operation for 28 days respectively in different groups. RGCs were retrogradely labeled by injection of 3% fluorogold into both side of superior colliculus at the 23th day after injury. The rats were sacrificed and retinas were collected at the 28th day after injury. Survival rate of RGCs was calculated at the ratio of RGCs density between right eyes and left eyes. Animal experiment followed the Standard of Association for Research in Vision and Ophthalmology. **Results** The mean survival rate of RGCs was  $66.58\% \pm 6.83\%$ ,  $75.62\% \pm 6.9\%$ ,  $74.92\% \pm 6.78\%$ ,  $76.57\% \pm 7.86\%$ ,  $79.87\% \pm 7.49\%$  in NS group, 1% erigeron breviscapus group, 0.25%, 1% and 4% EGb761 group respectively, indicating significant difference among different groups ( $F = 5.13, P = 0.001$ ). Compared with NS group, the survival rate of RGCs was significantly elevated in 1% erigeron breviscapus (EB) group, 0.25% EGb761 group, 1% EGb761 group and 4% EGb761 group ( $P < 0.05$ ). No significant difference was found among different doses of EGb761 groups ( $P > 0.05$ ) or between 1% EB group and different doses of EGb761 groups ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** EGb761 has neuroprotective effect on RGCs in acute IOP induced retinal ischemia-reperfusion injury.

**Key words** retinal ganglion cells; ginkgo biloba extract; erigeron breviscapus; intraocular pressure; retinal ischemia-reperfusion

**摘要 目的** 探讨银杏叶提取物(EGb761)对大鼠急性高血压诱导缺血再灌注模型中视网膜神经节细胞(RGCs)的保护作用。**方法** 60只SD大鼠随机分为5组,右眼为损伤眼,行前房穿刺灌注形成110 mmHg的眼压维持60 min,左眼未损伤,作为空白对照。损伤后2 h及此后每日1次灌胃给药,各组分别给予生理盐水5 mg/kg、1%灯盏细辛5 mg/kg、0.25% EGb761 5 mg/kg、1% EGb761 5 mg/kg和4% EGb761 5 mg/kg。动物损伤后第23天用荧光金行双上丘逆行标记,第28天取眼球标本做视网膜铺片并拍摄照片,计数RGCs并计算其的存活率。**结果** 生理盐水组、1%灯盏细辛组、0.25% EGb761、1% EGb761和4% EGb761组RGCs存活率分别为66.58%、75.62%、74.92%、76.57%、79.87%。生理盐水组与各EGb761组之间差异均有统计学意义( $q = 0.00, q = 0.19, q = 0.10, P < 0.01$ ),不同质量浓度EGb761组之间差异均无统计学意义( $q = 0.22, q = 0.13, q = 0.45, P > 0.05$ );1%灯盏细辛组与生理盐水对照组比较差异有统计学意义( $q = 0.16, P = 0.02$ ),与0.25% EGb761组、1% EGb761组、4% EGb761组比较差异均无统计学意义( $q = 0.20, q = 0.01, q = 0.50, P > 0.05$ )。**结论** 在急性高血压诱导缺血再灌注模型中,银杏叶提取物能有效地保护RGCs。

**关键词** 视网膜神经节细胞; 银杏叶提取物; 灯盏细辛; 眼压; 视网膜缺血再灌注

**分类号** R 774.05 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)08-0660-04

视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 的慢性进行性丢失是青光眼最主要的病理生理学特性,青光眼的视神经损害分为原发性损伤:高眼压、缺血导致的 RGCs 丢失;继发性损伤:丢失的 RGCs 产生毒性物质,进一步引起周围细胞的丢失。由此可见,继发性损伤是青光眼患者视神经病变进展的重要原因,因此提出视神经保护的概念。近年来,马科等<sup>[1]</sup>以 SD 大鼠视神经夹伤模型为研究对象,发现银杏叶提取物 (extract of ginkgo biloba, EGb761) 具有保护 RGCs 的作用。为进一步说明该药对高眼压状态下的 RGCs 保护作用,本研究以 SD 大鼠急性高眼压诱导缺血再灌注模型为研究对象,以 RGCs 存活率为观察指标进行研究,报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SD 大鼠 60 只 (北京维通利华动物繁育中心提供),眼部检查均无异常,用随机数字表法将实验动物随机分为 5 组。所有大鼠右眼为急性高眼压诱导缺血再灌注模型,左眼为空白对照。动物实验遵循 ARVO 标准。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 急性高眼压诱导缺血再灌注模型的制作<sup>[2]</sup>

自制加压装置,将生理盐水灌入大鼠右眼前房,生理盐水瓶升高至距离实验眼 150 cm 处,此高度可在眼内形成 110 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) 的眼压,维持 60 min,停止灌注后可见视网膜动脉及静脉立即恢复高眼压前的充盈状态,待大鼠清醒后回笼。

**1.2.2 给药方法** 生理盐水组于损伤后 2 h 及此后每日分别给予生理盐水 5 mL/kg 灌胃。同样方法,1% 灯盏细辛组给予 1% 灯盏细辛 (云南玉溪万方天然药物有限公司,030101) 5 mL/kg, EGb761 (上海信谊百路达药物公司) 3 个用药组分别给予 0.25%、1% 和 4% EGb761 5 mL/kg,实验持续时间为 28 d。

**1.2.3 逆行标记及视网膜铺片** 实验第 23 天,采用双上丘注射法逆行标记 RGCs。同上注射方法使动物麻醉,将其固定在脑立体定位仪上,牙科钻钻开颅骨,每侧上丘注射 2 点 (前囟后 5.9 mm 及 6.4 mm,旁开 1.4 mm,深 4.0 mm),每点注射 3% 荧光金 1.5  $\mu$ L。实验第 28 天,实验动物在深度麻醉下,摘除眼球并处死动物,将眼球置于 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液中固定 2 h,分离视网膜并将其定向铺片,自然干燥后,滴加 Vectashield H-100 荧光增强剂并加盖玻片,封片。

**1.2.4 图像分析** 荧光显微镜下 (AH-2, 日本 Olympus 公司),选用 V 激发自动档拍摄,滤过镜为 UV/L435,放大 125 倍。在距离视盘中心 2 mm 上下左右各拍摄 1 张照片。使用联想 Mustek 扫描仪将照片以 100 dpi 扫入计算机,使用颗粒分析软件 CPAS 进行 RGCs 计数,每个视网膜的 4 张照片累计 RGCs 数,并计算 RGCs 密度。RGCs 存活率 = 右眼 RGCs 密度 / 左眼 RGCs 密度  $\times$  100%。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计学处理。5 个组 RGCs 生存率的总体比较采用单因素方差分析,组间的两两比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

生理盐水组 RGCs 的存活率为 53.97% ~ 74.85%,平均  $(66.58 \pm 6.83)\%$ 。1% 灯盏细辛组、0.25% EGb761 组、1% EGb761 组和 4% EGb761 组 RGCs 的存活率分别为  $75.62\% \pm 6.9\%$ 、 $74.92\% \pm 6.78\%$ 、 $76.57\% \pm 7.86\%$ 、 $79.87\% \pm 7.49\%$ ,各组 RGCs 存活率的比较见图 1,2。生理盐水组与各 EGb761 组之间差异均有统计学意义 ( $q = 0.00, q = 0.19, q = 0.10, P < 0.01$ ),表明 3 种质量浓度的 EGb761 均能有效地保护 RGCs。不同质量浓度 EGb761 组之间差异均无统计学意义 ( $q = 0.22, q = 0.13, q = 0.45, P > 0.05$ );随着药物剂量的增加,其保护作用逐渐增强。1% 灯盏细辛组与生理盐水组比较差异有统计学意义 ( $q = 0.16, P = 0.02$ ),与 0.25% EGb761 组、1% EGb761 组和 4% EGb761 组之间比较差异均无统计学意义 ( $q = 0.20, q = 0.01, q = 0.50, P > 0.05$ )。

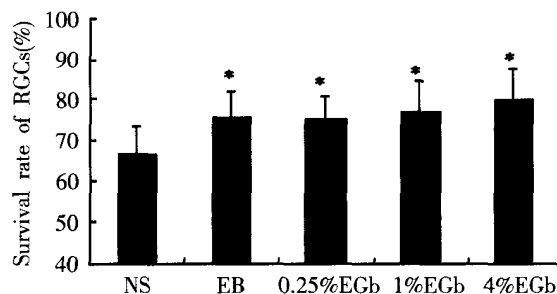


图 1 实验各组 RGCs 存活率

Fig.1 Survival rate of RGCs in different groups  $F = 5.13, P = 0.001; * P < 0.05$  vs NS group (One-way ANOVA, SNK-*q* test)

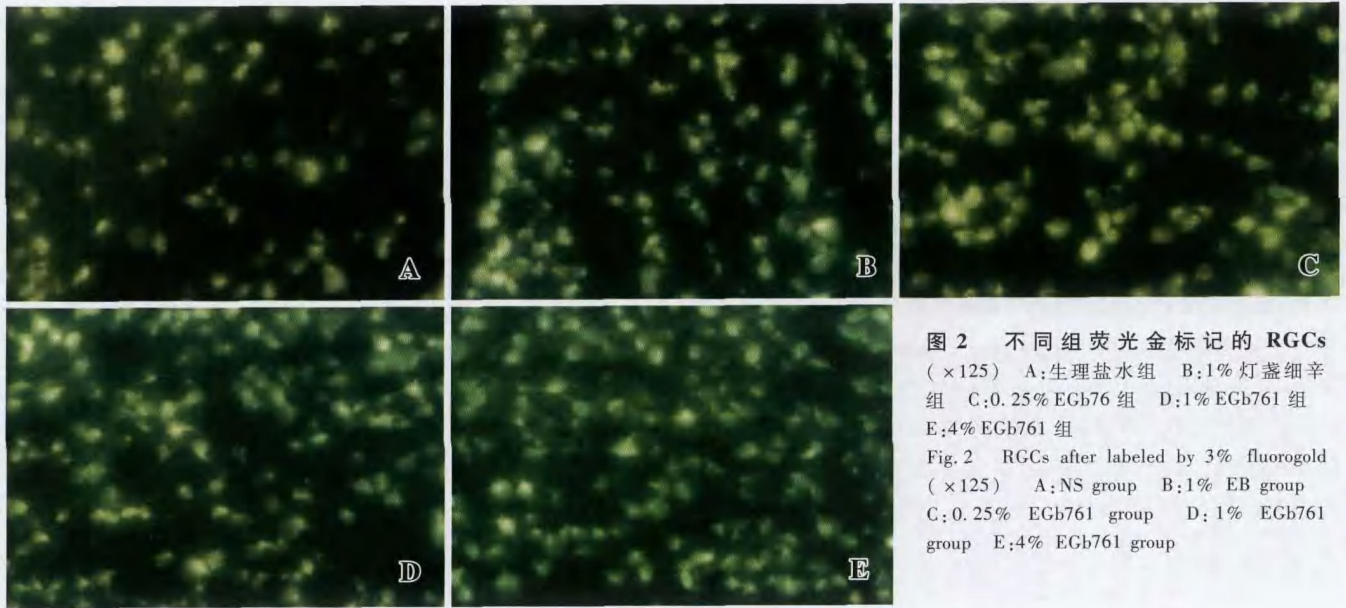


图 2 不同组荧光金标记的 RGCs (×125) A:生理盐水组 B:1% 灯盏细辛组 C:0.25% EGb761 组 D:1% EGb761 组 E:4% EGb761 组  
 Fig. 2 RGCs after labeled by 3% fluorogold (×125) A: NS group B: 1% EB group C: 0.25% EGb761 group D: 1% EGb761 group E: 4% EGb761 group

### 3 讨论

#### 3.1 急性高眼压诱导缺血再灌注模型

目前还没有一种理想的动物模型来模拟青光眼的发病过程及其视神经损伤过程,许多种类的 RGCs 损伤模型用于青光眼的研究。缺血再灌注损伤模型可通过结扎眼动脉、急性高眼压来诱导。Stefánsson 等<sup>[3]</sup>采用的缺血再灌注模型结扎眼动脉、眼静脉及视神经,该模型容易引起视神经损伤,不易控制模型的一致性。而急性高眼压诱导缺血再灌注模型不需测量眼压,操作简单,容易控制。急性高眼压诱导缺血再灌注模型的 RGCs 损伤包括 2 个阶段<sup>[2]</sup>:首先是缺血的 RGCs 进入损伤可恢复阶段;随缺血时间的延长,RGCs 逐渐进入不可逆损伤阶段。Selles-Navarro 等<sup>[4]</sup>研究大鼠眼压维持 110 mmHg 30~45 min 不会导致大鼠 RGCs 的死亡,超过 45 min 可致 RGCs 成比例的死亡。缺血 60 min 约有 45% 的 RGCs 死亡,与正常对照眼比较差异有统计学意义。缺血 90 min 至 30 d 有约 95% 的 RGCs 死亡。RGCs 死亡过少或过多都不利于对 RGCs 具有保护作用药物的筛选,因此国内外学者大多采用维持动物眼压在 110~120 mmHg 45~60 min<sup>[5-7]</sup>。

本研究将大鼠眼压升高至 110 mmHg,并持续 60 min,通过荧光金双上丘注射标记 RGCs,结果表明 RGCs 存活率为 53.97%~74.85%,平均(66.58±6.83)%,与 Harris 等<sup>[8]</sup>的研究结果相近。此模型表现 RGCs 丢失稳定,可重复性强。本研究发现视网膜周边 RGCs 丢失相对不稳定,而后极部细胞丢失相对稳定,与 Leidig 等<sup>[9]</sup>观察结果相近。Netland 等<sup>[10]</sup>报

道大鼠视网膜缺血 60 min,再灌注 5、7、14 d RGCs 存活率分别为 67%、63%、51%,3 组之间差异无统计学意义;而 30 d RGCs 存活率(45%)差异有统计学意义,且再灌注 30 d 后,RGCs 丢失处于相对稳定阶段,因此本研究选择 28 d 作为实验周期。

#### 3.2 EGb761 对 RGCs 的保护作用

本实验显示生理盐水组与 0.25% EGb761 组、1% EGb761 组和 4% EGb761 组之间差异均有统计学意义,说明 3 种质量浓度的 EGb761 均能有效地保护 RGCs,随着药物质量浓度的提高,EGb761 对 RGCs 的保护作用呈现不断增强的趋势,这与以往的研究相似<sup>[11]</sup>。有研究<sup>[11-12]</sup>报道视神经保护药物应该具备以下条件:(1)动物实验已经证实该药具有视神经保护作用。(2)分子生物学研究已经证实其作用机制。(3)该药能到达靶细胞。(4)经多中心临床对照试验所证实。鉴于此及本研究结果初步认为 EGb761 具备视神经保护药物的条件。首先,通过动物实验能够证实它对 RGCs 具有保护作用,本研究利用大鼠视神经夹伤模型和大鼠急性高眼压模型,证实了该药物确切的 RGCs 保护作用。从目前的研究看,EGb761 的众多成分中起主要作用的有银杏黄酮和内酯成分 2 类,分别发挥抗氧化和扩张血管的作用。此外,它能够抑制谷氨酸导致的 NMDA 受体毒性兴奋<sup>[13]</sup>;抑制 PAF 受体兴奋导致的细胞损伤<sup>[14]</sup>;抑制淀粉样物质的前体向淀粉样物质转化;能维持线粒体的代谢,对抗线粒体老化带来的形态学改变<sup>[15]</sup>;抑制氮氧化物的产生<sup>[16]</sup>,从而保护 RGCs。这些均从分子生物学水平上阐述了 EGb761 作为视神经保护剂的可行性。近年来的研究

表明,银杏叶提取物对实验性糖尿病视网膜病变具有良好作用,这从另一个侧面反映出它能够在视网膜上发挥作用。Moreau 等<sup>[17]</sup>用放射性同位素标记后,给动物口服银杏叶提取物,发现在视网膜上有足够的该药物及其代谢产物,说明银杏叶提取物能够通过血-视网膜屏障,到达视网膜发挥药物作用。Quaranta 等<sup>[18]</sup>在正常眼压性青光眼的研究中发现 EGb761 可改善患者的视野,与安慰剂组相比差异有统计学意义。

### 3.3 灯盏细辛对 RGCs 的保护作用

灯盏细辛为菊科飞蓬属植物短葶飞蓬的干燥全草,含黄酮和内酯,其有效成分主要为 4-羟基黄酮素。药理研究发现灯盏细辛具有抗凝、改善微循环的作用,能明显降低大脑中动脉的血管张力,增加冠脉流量,增加组织的耐缺氧能力;灯盏细辛与 EGb761 一样具有保护 RGCs 的作用,与以往的研究结果一致<sup>[19]</sup>。

通过该实验证实银杏叶提取物具有保护 RGCs 的作用,银杏叶提取物属于植物药范畴,它的作用很可能是多侧面、多靶点的,进一步对其作用机制的探讨,应从多个侧面着手,并对其临床疗效进行多中心观察。

### 参考文献

- 1 马科,张海娟,李月华,等.银杏叶提取物对视网膜神经节细胞保护作用的实验研究[J].眼科,2007,16:418-420
- 2 Szabo ME, Droy-Lefaix MT, Doly M, et al. Ischemia and reperfusion-induced histologic changes in the rat retina[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991, 32: 1471-1478
- 3 Stefánsson E, Wilson CA, Schoen T, et al. Experimental ischemia induces cell mitosis in the adult rat retina[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1988, 29: 1050-1055
- 4 Selles-Navarro I, Villegas-Perez MP, Salvador-Silva M, et al. Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. A quantitative in vivo study[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996, 37(10): 2002-2014
- 5 Marmor MF, Dalal R. Irregular retinal and RPE damage after pressure-induced ischemia in the rabbit[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1993, 34(8): 2570-2575
- 6 Lagreze WA, Knorle R, Bach M, et al. Memantine is neuroprotective in a rat model of pressure-induced retinal ischemia[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39(6): 1063-1066
- 7 Ettaiche M, Fillacier K, Widmann C, et al. Riluzole improves functional recovery after ischemia in the rat retina[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(3): 729-736
- 8 Harris A, Evans DW, Cantor LB, et al. Hemodynamic and visual function effects of oral nifedipine in patients with normal-tension glaucoma[J]. Am J Ophthalmol, 1997, 124: 296-302
- 9 Leidig S, Michelson G. Influence of the calcium antagonist nimodipine on the vasoconstrictive effect of breathing 100% oxygen on retinal blood flow[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39: S272
- 10 Netland PA, Erickson KA. Calcium channel blockers in glaucoma management[J]. Ophthalmol Clin North Am, 1995, 8: 327-334
- 11 Tendi EA, Bosetti F, Dasgupta SF, et al. Ginkgo biloba extracts EGb761 and bilobalide increase NADH dehydrogenase mRNA level and mitochondrial respiratory control ratio in PC12 cells[J]. Neurochem Res, 2002, 27: 319-323
- 12 Fital G, Welt K, Wassilew G, et al. The influence of hypoxia on the myocardium of experimentally diabetic rats with and without protection by Ginkgo biloba extract. III. Ultrastructural investigations mitochondria[J]. Exp Toxicol Pathol, 2001, 52: 557-568
- 13 Ritch R. Effect of Ginkgo biloba extract on preexisting visual field damage in normal tension glaucoma. Discussion[J]. Ophthalmology, 2003, 110: 362-364
- 14 Lenoir M, Pedrucci E, Rais S, et al. Sensitization of human neutrophil defense activities through activation of platelet-activating factor receptors by ginkgolide B, a bioactive component of the Ginkgo biloba extract EGB 761[J]. Biochem Pharmacol, 2002, 63: 1241-1249
- 15 Chandrasekaran K, Mehrabian Z, Spinnewyn B, et al. Neuroprotective effects of bilobalide, a component of Ginkgo biloba extract (EGb761) in global brain ischemia and in excitotoxicity-induced neuronal death[J]. Pharmacopsychiatry, 2003, 36: S89-94
- 16 Yang XF, Wang NP, Lu WH, et al. Effects of Ginkgo biloba extract and tanshinone on cytochrome P-450 isozymes and glutathione transferase in rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24: 1033-1038
- 17 Moreau JP, Eck J, McCabe J, et al. Absorption distribution et elimination de l'extrait marqué de Ginkgo biloba chez le rat[J]. Presse Med, 1996, 15: 1458-1463
- 18 Quaranta L, Bettelli S, Uva MG, et al. Effect of Ginkgo biloba extract on preexisting visual field damage in normal tension glaucoma[J]. Ophthalmology, 2003, 111: 359-364
- 19 吕琳,金毅,朱宇明,等.灯盏细辛的研究进展[J].中草药,1996,27: 238-240

(收稿:2008-12-20 修回:2009-06-16)

(本文编辑:高红)

消息

## 眼科基础研究培训班

为提高广大眼科工作者基础研究的实际操作技术,为眼科工作者提供眼科基础研究的大方向及具有迫切性的研究目标,天津医科大学眼科中心与 Overseas Chinese Association for Vision and Eye Research 将于 2009 年 8 月 31 日—9 月 1 日举办眼科基础研究培训班。本次培训班主要针对研究生、年轻的临床医生及研究人员,会议邀请美国南加州大学 Doheny 眼科研究所、美国瑞吉那研究所以及天津医科大学眼科中心有着丰富经验的教授进行演讲并现场给予指导,并为眼科工作者及研究生提供交流及学习机会。希望通过培训班达到“聚焦眼科进展,推动眼科基础研究,追踪国内外眼科领域先进技术、理论”的目标。此次活动为眼科基础教育增添了新的内容,将积极推动眼科继续教育事业。参会者请于 2009 年 8 月 15 日前注册,免收取注册费,统一安排食宿,费用自理,授予省市级继续教育学分 4 分。请于 [www.tmucc.com](http://www.tmucc.com) 下载注册表。

联系人:王新 地址:天津医科大学眼科中心 天津市和平区同安道 64 号 邮编 300070  
电话:022-23540610 022-23346430 传真:022-23346434 Email: [iiitc1989@163.com](mailto:iiitc1989@163.com)

(天津医科大学眼科中心)