

Nauck 等在午夜给 T2DM 患者注射 NN2211,第 2 天清晨使用胰岛素诱发低血糖后测定胰高糖素、皮质醇、儿茶酚胺和生长激素等低血糖的对抗调节激素,发现除了生长激素反应略有下降外,其他激素水平不受影响,NN2211 不影响胰高糖素对低血糖的反应。

4 结论

GLP-1 作为一种肽类肠道激素,除促进胰岛素分泌和保护胰岛细胞外,还具有胰外的多种生物学作用,其葡萄糖依赖性促胰岛素分泌机制使低血糖的发生率大大减低,优于胰岛素,使其成为糖尿病治疗研究的热点。中医药是否对 GLP-1 表达也有作用呢?已有个案报道:刺五加皂甙能使糖尿病模型大鼠空腹及口服葡萄糖 30 min 后的 GLP-1 分泌升高;陶枫^[11]等的研究发现:健脾清化方促进 Wistar 大鼠 GLP-1 分泌,提高血清 GLP-1 浓度。这为我们的研究开辟一个新的领域。

参考文献

- [1] Leon DD, Crutchlow MF, Ham JY, et al. Role of glucagon-like peptide-1 in the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38: 845-859.
- [2] Nauck MA, Klein N, Orskov C, et al. Normalization of fasting hyperglycemia by exogenous glucagons-like peptide 1 (7-36 amide) in type 2 (non-insulin dependent) diabetic patients[J]. Diabetologia, 1993, 36: 741-744.
- [3] Gromada J, Brock B, Schmits O, et al. Glucagon-like peptide-1: regulation of insulin secretion and therapeutic potential[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2004, 95: 252-262.
- [4] 王毅飞,汪吉仪,王国华.胰高糖素样肽-1(7-36)NH₂引起胰岛β细胞内游离钙的变化[J].广东医学,2000,21(4):286-288.
- [5] Dunning BE, Foley JE, Ahren B. Alpha cell function in health and disease: influence of glucagons-like peptide-1 [J]. Diabetologia, 2005, 48: 1700-1713.
- [6] 巩秋红,楼晋宁,叶丽亚,等.重组人胰高糖素样肽 1(7-36)促进 INS-1 细胞胰岛素释放与合成[J].中华内分泌代谢杂志,2004,20:559-560.
- [7] 王川,严励,杨川,等.胰高糖素样肽 1 长期作用对 RIN-m 细胞胰岛素分泌功能的影响[J].中华内分泌代谢杂志,2006,22:75-76.
- [8] Farilla L, Bolotta A, Hirschberg B et al. Glucagon-like peptide-1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets [J]. Endocrinology, 2003, 144 (12): 5149-5158.
- [9] DeFronzo RA, Ratner RE, Han J, et al. Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control and weight over 30 weeks in metformin-treated patients with type 2 diabetes [J]. Diabetes Care, 2005, 28 (5): 1092-1100.
- [10] Degn KB, Juhl CB, Sturis J, et al. One week's treatment with the long-acting glucagons-like peptide 1 derivative liraglutide (NN2211) markedly improves 24h glycemia and alpha-and beta-cell function and reduces endogenous glucose release in patients with type 2 diabetes [J]. Diabetes, 2004, 53 (5): 1187-1194.
- [11] 陶枫,朱蕴华,姚政,等.健脾清化汤对糖尿病模型大鼠 GLP-1 表达的影响[G].第十次全国中医糖尿病大会论文集.2007:663-668.

线栓法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤研究概况

★ 王林林 (天津中医药大学 天津 300193)

关键词: 脑缺血;再灌注损伤;线栓法

研究缺血性脑血管疾病发生发展机制,需要复制简便有效的脑缺血动物模型。大鼠局灶性脑缺血模型(Middle cerebral artery occlusion MCAO)有多种制备方法,其中线栓法是目下脑缺血再灌注损伤常用的模型复制方法,具有不开颅,损伤小,栓塞部位确定等特点,但此模型制作成功率受到一定因素影响。现综合相关文献资料对这些影响因素概述如下:

1 研究背景

1981 年 Tamura 采用开颅电凝法阻断 MCA 建立局灶性脑缺血模型,1986 年 Bederson 对此模型加以改进,梗死率达 100%^[1],缺点:开颅引起颅内压波动,创伤大,死亡率高。1986 年, Koizumi 等首次采用不开颅法经颈总动脉栓入尼龙线致大脑中动脉闭塞,采用头端硅化的 4-0 尼龙线,缺点:线栓僵硬,易刺破血管^[2]。随后在 1989 年,学者 Longa 对这种方法加以改良,将尼龙线头端烧成光滑圆球^[3]。近来一些学者将 Longa 法加以改进,效果更好。目前, Koizumi 和 Longa 法已成为制备此模型的典型代表方法。

2 实验动物

2.1 动物品系

诸晓凡等^[4]认为 Lewis 大鼠的局灶性脑缺血模型优于 SD 大鼠。markgraf 等^[5]认为 Wistar 大鼠脑梗死灶体积较小,但梗死灶变异较大, Fischer-334 大鼠梗死灶体积较大且一致性较好,变异性较小,SD 大鼠梗死灶的体积、变异性、一致性居二者之间。由于 SD 大鼠和 Wistar 大鼠在国内较容易买到,因此常作为制备此模型的动物。

2.2 动物性别

由于雌性激素可减轻脑缺血时脑组织损伤,舒张血管,增加脑血流量,对脑神经有保护作用^[6],由此影响造模成功率,因此以雄性大鼠为主。

2.3 动物体重

多数研究认为随着大鼠体重增加,动脉直径相应增加,体重 > 350 g,颅内血管增粗,难以充分阻断中动脉血流,体重 < 240 g,有时线栓插入较为困难^[7]。李小凤等^[8]研究后总结出体重 261 ~ 280 g,插线直径约 0.24 mm,体重 281 ~ 300 g,插线直径约 0.26 mm 的规律。因此,我们实验中采用 300 g 左右的大鼠,便于控制线栓直径以及插入深度,保证造模成

功率。

2.4 动物年龄

许多学者认为研究脑血管疾病的发生发展过程,选用老龄大鼠最为理想,但有研究认为^[9]老龄大鼠脑动脉血管扭曲或官腔狭窄难以将线栓插入,以及老龄鼠抵抗力和耐受能力差,因此,除非特别要求,鼠龄以青壮年为宜。

3 关于线栓

3.1 线栓的选择

目前,用于局灶性脑缺血模型的线栓有以下几种:(1)尼龙线:研究发现^[3]4-0 尼龙线不易导致蛛网膜下腔出血,因此大多选用 4-0 尼龙线;(2)进口渔线:直径为 0.20~0.25 mm 的白色进口渔线,其柔韧度和硬度都优于尼龙线,因此推荐用此材料作线栓。

3.2 线栓的制备

线栓传统制备方法是 Koizumi 法和 Longa 法。Koizumi 法是将 4-0 尼龙线前段 5 mm 部分覆以硅胶,使其变粗变硬,直径不超过 0.3 mm,以便于推入血管和栓塞大脑中动脉孔。但覆以硅胶后线栓僵硬,易刺破血管,且均匀涂抹硅胶较为困难,易形成阶段性球体,易导致脑缺血不均匀。Longa 法是将 4-0 单股尼龙线顶端烫成光滑圆球,直径在 0.28~0.3 mm 之间,可减少刺破血管机率,但其柔韧度较差不易推入血管。

近年来许多学者将 Koizumi 法和 Longa 法加以改进,效果更好。马常升^[10]等在显微镜下用控温电烙铁控温,制作出头端光滑、大小合适的线栓。黄斌^[11]等人则将渔线的头端 5 mm 部分覆以多聚赖氨酸,风干 3 天以上,显微镜下筛选出直径为 0.25 mm 的渔线备用。李克明^[12]等人将直径 0.205 mm 的渔线,头端烫成光滑圆球,达到近 0.3 mm,闭塞成功率较高。也有学者^[13]将直径 0.25 mm 的尼龙线头端用极细磨砂纸磨圆钝后,在距头端 19 ± 0.5 mm 处做一标记,插入 5 号半静脉针头中,脑栓塞成功后退出针头。朱继等^[14]将 3 cm 长的鱼线,60~70℃ 加热 2 小时将鱼线塑呈弧形,弧形外切角为 30° 时最佳,可确保线栓弧度与大鼠颈内动脉走行一致,自然冷却后,头端约 5 mm 涂上聚胺酯。

将制备好的线栓浸入酒精中消毒,使用前在肝素生理盐水中浸泡,以避免再灌注时线栓周围形成血栓,而无法实现血管再通。

4 手术操作

4.1 线栓插入方法

颈部手术切口位置分为颈部正中切口法和颈部外侧切口法。目前许多学者采用颈部外侧切口法,认为手术视野暴露好,便于分离肌肉和血管,对气管和腺体无机械性刺激,出血少。

4.2 线栓的插入位置

颈外动脉(ECA)插入和颈总动脉(CCA)插入。

颈外动脉插入法:(1)分离暴露左侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉,结扎翼腭动脉,电凝颈外动脉所有分支,暂时夹闭 CCA 和 ICA,在 ECA 近心端备一丝线打松结,切断 ECA,将线栓插入 ECA,收紧丝线,拉下 ECA 使之与 ICA 成直线,移去夹闭 ICA 动脉夹,使线栓由颈总动脉分叉处进入颈内动脉,再进入颅内大脑前动脉起始部,如遇阻力停止^[15]。(2)分离左侧颈总、颈内动脉,探查颈外动脉第一分支,在其远心端(偏嘴侧)约 0.2 cm 处结扎并切断 ECA,游离、凝闭并切断 ECA 与 ICA 之间的交通支。暂时阻断 CCA 及 ICA 血流,在

ECA 残端作一纵行小切口,将线栓从 ECA 残端插入 ICA,牵拉 ECA 残端,使其与 ICA 成一条直线,线栓弧度水平向外,与颈前正中线呈 45° 夹角,移去夹闭 ICA 动脉夹,轻轻将线栓送入颅内^[14]。颈外动脉插入法特点是再灌注完全,但穿线过程比较繁琐,分离颈外动脉对动物损伤较大。

颈总动脉插入法:(1)分离暴露左侧颈总动脉并结扎颈总动脉近心端,向上分离 ECA 和 ICA,沿 ICA 向上分离翼腭动脉,分离后不结扎。在 CCA 分叉处结扎 ECA,暂时夹闭 CCA 远心端,在此处放一打单结细线,不扎紧,在细线下端用 5-0 头皮针刺一小口导入线栓,扎紧备用细线,松开动脉夹,调整好插线方向和角度,线栓经 CCA 顺利进入 ICA,直至大脑前动脉起始处,遇阻力即可停止^[16]。(2)分离右侧 CCA、ECA、ICA 和翼腭动脉,结扎 CCA 近心端和 ECA,将带有尼龙线的 5 号半静脉针头插入 CCA,将线栓经 ICA 送入颅内,遇阻力停止。退出静脉针头,收紧线结^[13]。颈总动脉插入法特点是操作简单,但结扎了 CCA,通过前、后交通动脉实现血流再通,属于非生理流向血流,因此无法保证再灌后正常供血。

许多学者认为,无论是颈总动脉还是颈外动脉插入法,在动脉切口处都应备一细线,当插入线栓后收紧备线,起到固定线栓的作用,且松开动脉夹后可防止大量失血。对于翼腭动脉结扎与否一直存有争议,如结扎可提高造模成功率,线栓不易误入翼腭动脉,但结扎翼腭动脉易导致 ICA 内形成血栓,对动物损伤大,因此多采用短暂关闭翼腭动脉或不结扎。

5 注意事项

5.1 麻醉剂的选择

5.1.1 吸入式麻醉法 国际通行麻醉方法是氟烷诱导麻醉,人工辅助机械通气维持呼吸麻醉,整个过程接近人类手术麻醉过程,能良好控制术中麻醉深度,但价格昂贵。国内也有学者用吸入乙醚法麻醉,认为便于控制麻醉时间,适用于短暂性手术。

5.1.2 腹腔注射麻醉法 国内常用的麻醉剂有 10% 水合氯醛 0.3 ml/100g、苯巴比妥钠、乌拉坦、2% 戊巴比妥钠 40 mg/kg。研究^[17]认为苯巴比妥钠和乌拉坦可降低脑温和脑代谢,减轻脑组织损伤,影响造模结果;据学者报道^[18],水合氯醛能使动物呼吸频率降低一半,动物在手术过程中可能出现酸中毒和二氧化碳潴留,使死亡率增加;戊巴比妥钠对动物各项生理指标影响最小,因此实验中尽量选用影响较小的麻醉剂。此外,戊巴比妥钠水溶液易分解,分解后毒性增大,适宜现用现配。

为实现安全再灌注,如动物已苏醒,为避免其挣扎引起颅内出血,应再次麻醉,注射剂量宜为原总量一半,达到麻醉效果即可。

5.2 术前准备

有研究证实^[19]高血糖可使脑梗死面积明显增加,因此要控制动物血糖水平,实验前禁食 12~24 小时,不禁水,再灌注结束后予以食物。

5.3 术中操作 手术过程中动作要轻柔、准确,顿性分离肌肉时要尽量保护腺体,避免刺激气管和损伤血管,分离颈总动脉时要将迷走神经剥离干净,避免牵拉迷走神经。

温度对脑损伤有一定作用,低温对脑组织有保护作用,同时麻醉期间保温不当,动物死亡率会大幅增加,因此在术

中和术后对环境温度予以监控。胡氏提出,室温控制在 $25^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$, 在手术中应监控动物肛温, 适时灯泡保温和冰块降温, 使肛温维持在 $(37 \pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ [20]。同时还应观察动物呼吸情况, 呼吸道分泌物增多时, 应及时给予吸痰防止窒息, 如有条件检测脑温、血压和血糖更佳。

为防止动物伤口感染, 可在术后腹腔注射 0.2 ml 庆大霉素, 并在伤口处涂以云南白药, 防止因伤口出血而出现动物之间相互撕咬。

参考文献

- [1] Bederson JB, Pitts LH, Davis R1, et al. Rat Middle Cerebral Artery Occlusion: Evaluation of the Model and Development of Neurologic Examination[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472-476.
- [2] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental Studies of Ischemia Brain Edema, A New Experimental Model of Cerebral Embolism in Rats in the ischemia area[J]. Stroke, 1986, 8:1.
- [3] Zea-Longa Z, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [4] 诸晓凡, 董家政, 吴军, 等. 颈内动脉线栓与环扎建立大鼠局灶性缺血再灌注模型[J]. 中风与神经疾病杂志, 2000, 17(3): 152-154.
- [5] Markgraf CG, Kraydieh S, Prado R, et al. Comparative histopathologic consequences of photothrombotic occlusion of the distal middle cerebral artery in Sprague-Dawley and Wistar rats[J]. Stroke, 1993, 24(9): 286-293.
- [6] 么冬爱, 张晓琴. 雌激素对脑缺血的保护作用[J]. 中华神经科杂志, 2000, 33(4): 247-249.
- [7] Roos MW, Sperber Go, Johansson A, et al. An Experimental Model of Cerebral Microischemia in Rabbits[J]. Experimental Neurology, 1996, 137(1): 73-280.
- [8] 李小凤, 孙圣刚, 童萼塘, 等. 大鼠可逆性脑缺血模型复制方法的改进[J]. 华中医学杂志, 2000, 24(4): 192-193.
- [9] wang LJC, Futrell N, Wang DJ, et al. A Reptroducible model of middle cerebral infarcts compatible with long-term survival in aged rats[J]. Stroke, 1995, 26(11): 2087-2090.
- [10] 马常升, 马文领, 戴维国, 等. 插线法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的研究[J]. 解剖学杂志, 1999, 22: 209-211.
- [11] 黄斌, 王兴勇, 匡凤梧, 等. 线栓法制备 Wistar 大鼠局灶性脑缺血模型的实验研究[J]. 现代医药卫生, 2005, 21(15): 1935-1937.
- [12] 李克明, 武继彪, 隋左云, 等. 线栓法制备大鼠大脑中动脉闭塞模型手术操作探讨[J]. 河南中医学院学报, 2007, 22(3): 22-24.
- [13] 张永, 周少华, 席刚明, 等. 大鼠大脑中动脉缺血再灌注动物模型制作体会[J]. 神经疾病与精神卫生, 2006, 6(3): 241-242.
- [14] 朱继, 万东, 唐文渊, 等. 改良线栓法制备大鼠局灶性脑缺血模型[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(8): 685-687.
- [15] 唐琳, 刘红, 胡香杰, 张贵卿, 等. 大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤模型的研究[J]. 河南职工医学院学报, 2001, 13(1): 1-2.
- [16] 谢惠芳, 徐如祥, 陈中灿, 等. 线栓法制作大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型的改进[J]. 中华神经医学杂志, 2007, 6(4): 340-342.
- [17] 王伟. 严格控制实验条件建立标准化脑缺血动物模型[J]. 中华神经科杂志, 1998, 31(5): 261-263.
- [18] 卜碧涛, 王伟, 张苏明, 等. 大鼠脑缺血模型制作过程中麻醉方法的选择与应用[J]. 同济医科大学学报, 1998, 27(3): 203.
- [19] 王伟. 严格控制试验条件, 建立标准化脑缺血动物模型中华神经科杂志, 1998, 31(5): 261.
- [20] 胡凌, 高培毅, 线栓法制备大鼠局灶性脑缺血模型影响因素的探讨[J]. 中国医学影像技术, 2004, 20(10): 1624-1626.

银杏叶的药理及临床应用

★ 李欣 赖若梅 (江西省宜春市人民医院 宜春 336000)

关键词: 银杏叶; 药理研究; 临床应用

银杏叶具有较高的药用价值, 银杏在我国分布很广, 约占全世界银杏资源的 70%。近年欧美国家特别推崇银杏叶制品, 将其作为治疗和预防心脑血管疾病的天然药物。国内外对其研究报道较多, 其药理作用不断被认识, 临床应用范围逐步扩大。现就银杏叶的药理及临床研究作一综述。

1 药理研究

1.1 有效成分 银杏叶的有效成分主要有黄酮类和二萜内酯两类, 银杏叶黄酮类主要有槲皮素甙、山奈酚甙及双黄酮类化合物, 银杏叶中的双黄酮成份为银杏双黄酮、异银杏双黄酮及 7-去甲基银杏酮。到目前为止, 从银杏叶中共提得 6 个萜化合物: 银杏萜内酯 A、B、C、M、J 和银杏新内酯, 它们都具有二萜或半萜结构, 常见代号 BN52020、BN52021、BN52022、BN52023、BN5024, 分别代表银杏内酯 A、B、C、M、J, 其中 BN52021 在银杏中的含量为 0.2%, 它的抗 PAF(由血小板和多种炎症细胞产生和分泌的一种内源性磷脂) 选择性

和活性最强。部分黄酮类及 6 种萜内酯生物物质是全球生物体内独有的, 是数亿年前特殊自然生态环境下的产物。

1.2 对循环系统的作用

1.2.1 抗心律失常 银杏叶对氯仿诱发的小鼠心室纤颤、氯化钡或乌头碱诱发的大鼠心律失常均有保护作用, 能提高家兔的室颤阈, 并对刺激兔下丘脑所诱发的阵发性期前收缩有明显的抑制作用。银杏叶注射液能对抗哇巴因及毒毛 K 所致犬的心律失常。秦林报道大剂量银杏叶片治疗再灌注心律失常有明显疗效, 银杏叶治疗再灌注心律失常既能改善周围循环、降低外周阻力、增加心肌收缩、减慢心率、减少心肌耗氧量, 又能增加冠状动脉血流量、提高缺血心肌电的稳定性及抗心律失常、延长缺血心肌存活时间等功效。

1.2.2 抗心肌缺血性损伤 银杏叶黄酮类和二萜内酯能减轻心肌细胞缺血性损伤时细胞形态的改变和酶的释放, 提示能在细胞水平上保护心肌免遭缺血性损害。银杏叶能保护