

银杏内酯 B 对豚鼠腹腔神经节神经元 Fast-EPSP 的抑制效应

胡金兰^① 孔淼^① 许奇^① 王烈成^① 柯道平^① 马嵘^② 孔德虎^{①*}

(^①安徽医科大学生理学教研室神经生理研究室 合肥 230032;

^②美国德州北方大学卫生科学中心生理学系 德克萨斯州 76107)

摘要: 应用细胞内记录技术, 观察并分析了银杏内酯 B (GB) 对豚鼠 (*Cavia porcellus*) 离体腹腔神经节 (CG) 神经元快兴奋性突触后电位 (fast EPSP) 的影响及可能机制。用 4×10^{-6} mol/L 的 GB 灌流 CG, fast EPSP 的幅值均明显降低, 与对照组相比有显著性差异 ($n = 12, P < 0.05$); 用低 Ca^{2+} /高 Mg^{2+} Krebs 液灌流, fast EPSP 被完全抑制 ($n = 3$); 用高 Ca^{2+} Krebs 液灌流, fast EPSP 幅度则增大 ($n = 12, P < 0.05$), 而用 4×10^{-6} mol/L GB 与高 Ca^{2+} Krebs 液联合灌流, fast EPSP 幅度则减小 ($n = 12, P < 0.05$)。结果提示, GB 对 CG 神经元 fast EPSP 的抑制效应可能与减少或抑制 CG 神经元的外 Ca^{2+} 内流有关。

关键词: 银杏内酯 B; 快兴奋性突触后电位; 腹腔神经节; 钙离子; 豚鼠

中图分类号: Q424 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2008)05-31-06

The Inhibitory Effect of Ginkgolide B on Fast EPSP in the Celiac Ganglion Neurons of Guinea Pig

HU Jir-Lan^① KONG Miao^① XU Qi^① WANG Lie-Cheng^①

KE Dao Ping^① MA Rong^② KONG De-Hu^{①*}

(^①Laboratory of Neurophysiology, Department of Physiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China;

^②Department of Integrative Physiology, University of North Texas Health Science Center, Texas 76107, USA)

Abstract: The present study was carried out to determine the regulation of ginkgolide B (GB) on fast excitatory postsynaptic potential (fast EPSP) in the neurons of celiac ganglion (CG) and the mechanisms involved in the GB-induced responses. Intracellular recording was employed to measure the fast EPSP in the neurons of CG freshly isolated from Guinea Pigs (*Cavia porcellus*). We found that perfusion of GB (4×10^{-6} mol/L) significantly decreased the amplitude of fast EPSP in the CG neurons ($n = 12, P < 0.05$). The fast EPSP was completely inhibited by a low Ca^{2+} /high Mg^{2+} Krebs solution ($n = 3$), but significantly enhanced by a high Ca^{2+} Krebs solution ($n = 12, P < 0.05$), suggesting a contribution of extracellular Ca^{2+} to the generation of the fast EPSP. The high Ca^{2+} Krebs solution induced augmentation of the fast EPSP was significantly attenuated by GB ($n = 12, P < 0.05$). These results indicate that GB negatively regulates fast EPSP in CG neurons in Guinea pigs through an inhibition on external Ca^{2+} entry.

Key words: Ginkgolide B; Fast excitatory postsynaptic potential; Celiac ganglion; Calcium; Guinea Pig

基金项目 安徽省教育厅自然科学基金项目(No. 2006kj362b), 安徽医科大学引进人才基金项目(2004年);

* 通讯作者, E-mail: dehukong@hotmail.com;

第一作者介绍 胡金兰, 女, 讲师; 研究方向: 神经电生理与药理; E-mail: hjlan1872@163.com.

收稿日期: 2008-03-10, 修回日期: 2008-06-30

银杏内酯 B (ginkgolide B, GB) 是银杏叶提取物中的特有成分, 它作为专一高效的血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF) 受体拮抗剂, 自 1986 年 Braquet^[1] 报道有关 GB 的这方面作用以来, 一直受到人们广泛的重视。研究表明 GB 除具有对心肌、脑缺血损伤的保护作用^[2-5], 还具有通过拮抗 PAF 而增强对神经元的抑制^[1] 以及对中枢神经元的保护等作用^[6,7]。

腹腔神经节 (celiac ganglion, CG) 属交感神经系统的重要组成部分, 既接受来自高位中枢下传的信息, 作为中枢神经系统控制外周效应器活动的中继站和节后神经元的聚合体, 又接受源于外周效应器官的传入活动, 参与对内脏活动传入信息的整合, 视为中枢神经系统之外的“内脏神经节-内脏”反射中枢, 并有“腹脑”之称^[8], 在中枢与外周效应器的信息传递过程中发挥重要作用。虽然 GB 对中枢神经元的保护作用, 国内外均多有研究, 而对外周神经节神经元是否也同样具有相似作用, 作用机制如何, 至今未见报道。鉴于此, 我们以豚鼠 (*Cavia porcellus*) 内脏大神经-腹腔神经节为研究对象, 应用细胞内生物电记录技术探讨 GB 对豚鼠 CG 神经元突触传递的影响, 以进一步阐明 GB 在此方面的作用, 为临床治疗由 CG 所支配的效应器官如肝、胰、脾、肾和结肠左曲以上的消化器官或组织因结构及功能异常所致的疾病、癌性腹痛等提供电生理和药理学的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 健康成年豚鼠, 体重 250~350 g, 雌雄不拘, 普通级, 由安徽医科大学实验动物中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 神经节标本制备 实验用健康成年豚鼠 20 只, 击后脑致昏迷, 经颈总动脉放血致死, 固定四肢, 剖开腹腔, 于体视显微镜下, 摘取右侧 CG 及其相连的右侧内脏大神经, 并迅速移至灌流浴槽内。在连续变倍体视显微镜下 (XTS-20, 北京泰克仪器有限公司) 将其固定在浴槽内的硅胶块上。与 CG 相连的内脏大神经

穿入吸引电极内, 用于电刺激引导兴奋性突触后电位 (fast excitatory postsynaptic potential, fast EPSP)。用 95% 的 O₂ 和 5% 的 CO₂ 充分饱和的 Krebs 液 (35~36℃, pH 7.4) 持续、恒速 (3~4 ml/min) 灌流 CG。在此条件下标本可存活 12 h 以上^[9]。实验中所用的低 Ca²⁺/高 Mg²⁺ Krebs 液, 是将 Krebs 液中的 CaCl₂ 和 MgCl₂ 的浓度分别重新调整为 0.25 和 12 mmol/L, 高 Ca²⁺ Krebs 液是将 Krebs 液中 CaCl₂ 调整为 5.0 mmol/L, 其余成分及浓度均同普通 Krebs 液。

1.2.2 细胞内生物电记录 在连续变倍体视显微镜下, 将内充 3 mol/L KCl 溶液, 尖端阻抗为 30~60 MΩ 的玻璃微电极 (FHC, USA) 通过微电极操纵仪 (MP-2, Narishige, Japan) 推进至神经节表面, 再改用步进式微推进器 (MO-81, Narishige, Japan) 穿刺细胞。所引导的生物电信号经微电极放大器 (Intra 767, WPI, USA) 放大并送至生物信号采集分析系统 (Powerlab/4sp, Australia) 进行处理, 同时通过计算机监测和记录。由三通道电子刺激器 (SEN-7203, Nihon Kohden, Japan) 并通过隔离器 (SS-202J, Nihon Kohden, Japan) 提供电刺激, 经吸引电极刺激内脏大神经, 在神经节神经元引导突触后电位^[9]。

1.2.3 药物及试剂 银杏内酯 B 购于 sigma 公司, 其余试剂为国产分析纯。使用时分别用 Krebs 液配成所需的浓度经恒流泵 (BF-100, 上海沪西分析仪器厂) 灌流给药。

1.2.4 统计学处理 实验数据用 Mean ± SE 表示, 采用重复测量设计的方差分析进行统计处理, 所有数据均由分析软件 SPSS 11.5 完成。

2 结 果

2.1 电刺激内脏大神经在 CG 神经元诱发快兴奋性突触后电位 连续电刺激 (2.0~8.0 V, 1.0 ms, 1.0 Hz) 内脏大神经, 在 CG 神经元可诱发 fast EPSP (图 1), 所记录的 fast EPSP 幅值和时程分别为 (12.55 ± 0.91) mV 和 (32.70 ± 1.43) ms, 潜伏期为 (13.10 ± 0.86) ms (*n* = 44)。这些神经元的静息电位值为 (66.60 ± 1.84) mV (*n* = 44)。

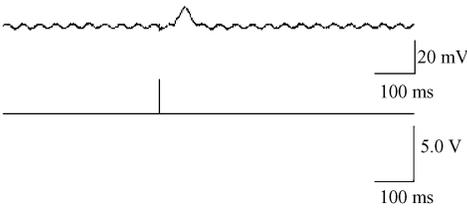


图 1 电刺激豚鼠内脏大神经在 CG 神经元诱发的 fast EPSP

Fig. 1 A fast EPSP induced by stimulating the greater splanchnic nerve

上线: 电刺激内脏大神经在 CG 神经元上诱发的 fast EPSP;

下线: 一个方波电刺激 (4.0 V, 1.0 ms, 1.0 Hz)。

Upper trace: A fast EPSP was induced by

stimulating the great splanchnic nerve; Lower trace:

An electronic stimulus (4.0 V, 1.0 ms, 1.0 Hz).

2.2 GB 对豚鼠 CG 神经元 fast EPSP 的影响

4×10^{-6} mol/L 的 GB 10 ml 灌流 CG 3 min, fast EPSP 幅度呈现明显的降低, 与正常对照组比较, 差异有显著性 ($n = 12, P < 0.05$; 图 2, 表 1), Krebs 液冲洗约 3 min 后逐渐恢复至正常。

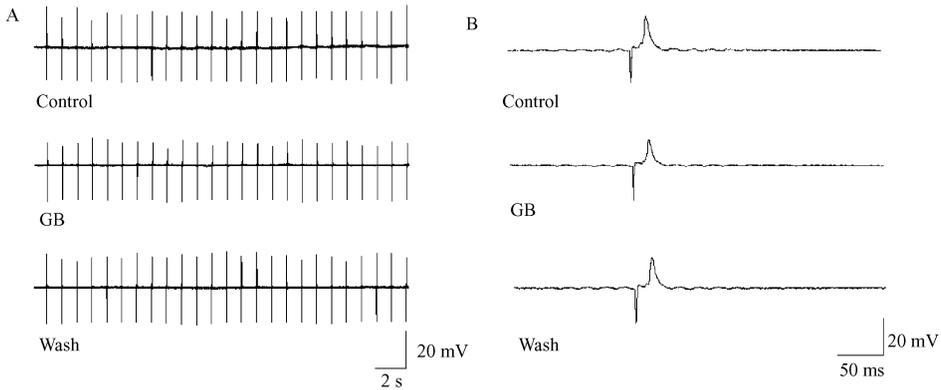


图 2 GB 对豚鼠 CG 神经元 fast EPSP 幅度的影响

Fig. 2 The effect of GB on the amplitude of fast EPSP in CG neurons of Guinea Pig

A: 一串电刺激 (4.0 V, 1.0 ms, 1.0 Hz) 刺激内脏大神经在 CG 神经元, 诱发一串 fast EPSP (上线), 用 GB (4×10^{-6} mol/L, 10 ml) 灌流 CG, fast EPSP 幅度降低 (中线), 冲洗 3 min 后恢复 (下线); B: 对 A 中单个 fast EPSP 的快速记录。

A: A series of fast EPSPs were induced by stimulating the great splanchnic nerve (4.0 V, 1.0 ms, 1.0 Hz) (upper trace).

Perfusion of GB (4×10^{-6} mol/L, 10 ml) decreased the amplitude of fast EPSP (middle trace), which recovered after 3 min washout (lower trace); B: One time expanded fast EPSP shown in A.

2.3 低 Ca^{2+} / 高 Mg^{2+} Krebs 液对 fast EPSP 的影响 电刺激 (2.0~ 8.0 V, 1.0 ms, 1 Hz) 内脏大神经, 在诱发出 fast EPSP 后, 用低 Ca^{2+} / 高

fast EPSP 的时程与对照组比较差异无显著性。12 个神经元分别在正常对照、GB 处理和 Krebs 液冲洗 3 个时间段的 fast EPSP 幅度的变化趋势见图 3。由于不能保证每次电刺激都在内脏大神经的同一位置, 对潜伏期只做数值统计。

表 1 GB 对刺激豚鼠内脏大神经诱发的 CG 神经元 fast EPSP 的影响 (Mean \pm SE, $n = 12$)

Table 1 The effect of GB on fast EPSP caused by stimulating greater splanchnic nerve in CG neurons of Guinea Pig

快兴奋性突触后电位 Fast EPSP	幅度 Amplitude (mV)	时程 Duration (ms)	潜伏期 Latency (ms)
正常对照 Control	12.91 \pm 1.74	35.80 \pm 1.80	9.73 \pm 1.18
GB 处理 GB	8.67 \pm 1.35*	37.40 \pm 1.94	12.70 \pm 2.60
Krebs 液冲洗 Wash	11.87 \pm 1.54	36.70 \pm 1.78	11.65 \pm 2.23
<i>F</i>	23.866	1.537	—
<i>P</i>	0.000	0.242	—

与正常对照组比较: * $P < 0.05$ 。

Compared with the control group: * $P < 0.05$.

Mg^{2+} Krebs 液 10 ml 灌流 CG, fast EPSP 被完全抑制 ($n = 3$, 图 4)。可见 fast EPSP 的产生依赖于细胞外液中的 Ca^{2+} 。

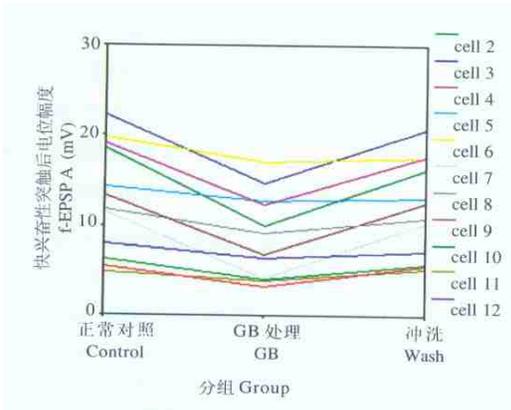


图 3 12 个神经元在正常对照、GB 处理和 Krebs 液冲洗 3 个时间段的 fast EPSP 幅度的变化趋势

Fig. 3 The changes in amplitude of fast EPSP in control, GB, and wash groups

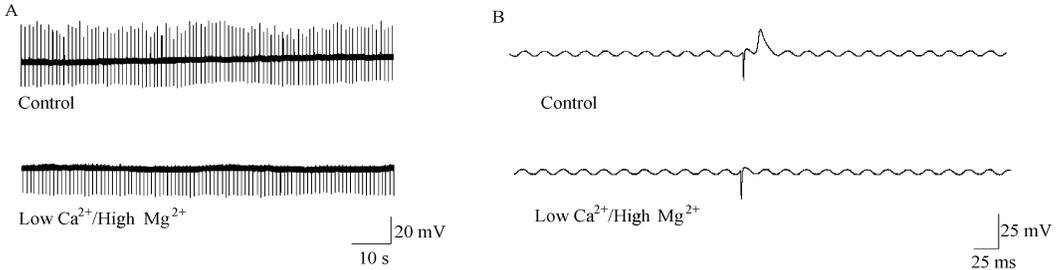


图 4 低 Ca²⁺ / 高 Mg²⁺ Krebs 液对 fast EPSP 的影响

Fig. 4 The effect of low Ca²⁺ / high Mg²⁺ Krebs solution on amplitude of fast EPSP

A: 一串电刺激 (4.0 V, 1.0 ms, 1.0 Hz) 内脏大神经在 CG 神经元上诱发一串 fast EPSP (上线), 用低 Ca²⁺ / 高 Mg²⁺ Krebs 液灌流 CG, fast EPSP 被完全抑制 (下线); B: 对 A 中单个 fast EPSP 的快速记录。
A: A series of fast EPSPs were induced by stimulating the great splanchnic nerve (4.0 V, 1.0 ms, 1.0 Hz) (upper trace). The fast EPSPs were completely blocked by perfusing a low Ca²⁺ / high Mg²⁺ Krebs solution (lower trace);
B: A time expanded fast EPSP shown in A.

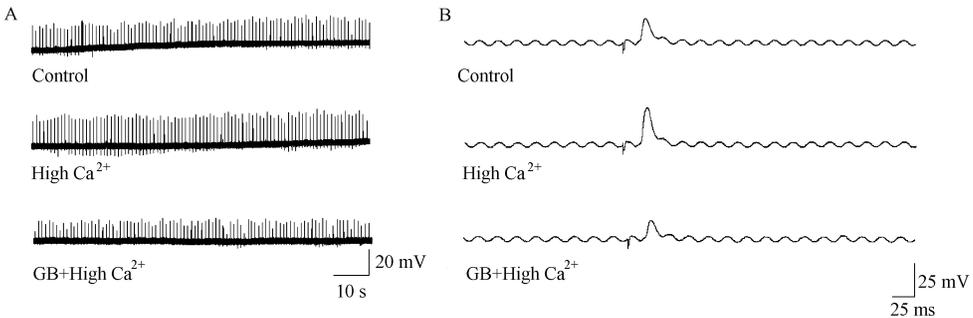


图 5 GB 与高 Ca²⁺ Krebs 液联合灌流对 fast EPSP 的影响

Fig. 5 The amplitude of fast EPSP affected by perfusing GB with high Ca²⁺ Krebs solution

A: 用高 Ca²⁺ Krebs 液灌流, fast EPSP 幅度增大 (中线); 用 GB 和高 Ca²⁺ Krebs 液联合灌流, fast EPSP 幅度减小 (下线); B: 对 A 中单个 fast EPSP 的快速记录。
A: The fast EPSPs were increased by perfusion of a high Ca²⁺ Krebs solution (middle trace). However, this increase was not observed by inclusion of GB in the high Ca²⁺ Krebs solution (lower trace); B: A time expanded fast EPSP in A.

2.4 高 Ca²⁺ Krebs 液与 GB 联合灌流对 fast EPSP 的影响 电刺激 (2.0~ 8.0 V, 1.0 ms, 1 Hz) 内脏大神经, 诱发出 fast EPSP 后, 用高 Ca²⁺ Krebs 液灌流 CG, fast EPSP 的幅度增大; 再用 4 × 10⁻⁶ mol/L 的 GB 10 ml 与高 Ca²⁺ Krebs 液联合灌流, fast EPSP 的幅度则减小 (n = 12, P < 0.05; 图 5, 表 2)。12 个神经元分别在正常对照、高 Ca²⁺ Krebs 液灌流和 GB + 高 Ca²⁺ Krebs 液灌流 3 个时间段的 fast EPSP 幅度的变化趋势见图 6。

3 讨论

CG 是交感神经节突触后神经元的聚合体, 它不仅是中枢与外周信息传递的中继站, 而且

表 2 GB 与高 Ca^{2+} Krebs 液联合灌流对 fast EPSP 的影响 (Mean \pm SE, $n = 12$)

Table 2 The effect of GB with high Ca^{2+} Krebs solution on fast EPSP

快兴奋性突触后电位 Fast EPSP	幅度 Amplitude (mV)	时程 Duration (ms)
正常对照 Control	13.30 \pm 0.83	35.01 \pm 1.51
高钙 Krebs 液灌流 High Ca^{2+}	18.04 \pm 0.84 [*] Δ	35.19 \pm 1.56
GB+ 高钙 Krebs 液灌流 GB+ High Ca^{2+}	10.54 \pm 0.61	34.95 \pm 1.53
<i>F</i>	138.17	3.227
<i>P</i>	0.000	0.059

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与 GB+ 高钙 Krebs 液灌流组比较: $\Delta P < 0.05$ 。

Compared with the control group: * $P < 0.05$; Compared with the GB + High Ca^{2+} group $\Delta P < 0.05$

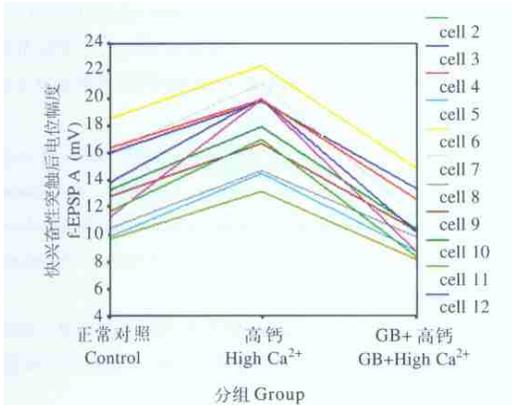


图 6 12 个神经元在正常对照、高 Ca^{2+} Krebs 液灌流和 GB+ 高 Ca^{2+} Krebs 液灌流 3 个时间段的 fast EPSP 幅度的变化趋势

Fig. 6 The changes in amplitude of fast EPSP in control, high Ca^{2+} , and GB+ high Ca^{2+} groups

是一个突触传递过程较为复杂的整合机构, 与所支配的内脏器官之间有着广泛的形态与机能联系, 在调节由它所控制的靶器官的反射活动中, 通过整合来自中枢和外周的突触信息, 控制交感传出活动使内脏反射协调统一。

直接参与传导中枢下行冲动的交感节前神经元来源于脊髓 T_{8-10} 节段灰质中间带外侧核, 其节前神经纤维随内脏大神经走行, 于 CG 的上部进入该节, 并在节内呈广泛性分布^[10]。我

们通过电刺激豚鼠内脏大神经, 引起节前神经纤维的兴奋, 在 CG 神经元上通过微电极可清楚地记录到 fast EPSP。这经历了一次兴奋性突触传递的过程: 首先电刺激 (2.0~ 8.0 V, 1.0 ms, 1 Hz) 引起节前神经纤维的兴奋, 接着兴奋传导到突触前膜, 引起突触前膜上电压门控式 Ca^{2+} 通道开放, Ca^{2+} 内流, 递质 (主要为 ACh) 释放并与后膜上相应受体结合^[9], 引起突触后膜上的化学门控式的 Na^{+} 、 K^{+} 、 Ca^{2+} 等离子通道开放, 使突触后膜去极化而产生 fast EPSP, 即实验中在 CG 神经元上记录到的 fast-EPSP。

研究表明, 当电刺激内脏大神经诱发 CG 神经元产生 fast-EPSP 时, 用 4×10^{-6} mol/L GB 灌流, 能使 CG 神经元产生的 fast-EPSP 幅度降低 ($P < 0.05$), 提示 GB 对豚鼠 CG 神经元突触后膜的兴奋性具有一定的抑制效应, 这可能与直接或间接降低前膜对 Ca^{2+} 的通透性, 减少或抑制 Ca^{2+} 内流, 从而减少 ACh 释放有关, 或与减少或抑制突触后膜 Ca^{2+} 内流有关。为证明上述推测, 我们首先用低 Ca^{2+} / 高 Mg^{2+} Krebs 液灌流 CG, 电刺激内脏大神经, fast-EPSP 完全被抑制, 说明 fast-EPSP 的产生必需细胞外液中的 Ca^{2+} 参与; 再用高 Ca^{2+} Krebs 液灌流 CG, 电刺激内脏大神经, fast EPSP 幅度明显增大, 说明进入细胞内的 Ca^{2+} 量对 fast-EPSP 的幅度有调控作用; 最后在高 Ca^{2+} Krebs 液中用 GB 灌流 CG, 电刺激内脏大神经, fast-EPSP 的幅度要比单用高 Ca^{2+} Krebs 液灌流时减小, 差异有显著性, 提示 GB 对 CG 神经元 fast-EPSP 的抑制效应可能与其调控或抑制进入 CG 神经元内的 Ca^{2+} 量有关, 导致 CG 神经元在传入冲动不变的情况下, 由于 GB 使进入 CG 神经元内的 Ca^{2+} 量减少, 从而使 CG 神经元兴奋性降低, 表现出一定的抑制效应。已有研究表明, GB 能通过竞争 PAF 受体而抵抗 PAF 诱导的神经细胞内的 Ca^{2+} 内流, 从而拮抗 PAF 的作用而增强神经元的抑制活动^[11], Olivera 等^[11] 也已证实 GB 可抑制肾系膜细胞的 Ca^{2+} 内流, 仰礼真等^[12] 认为 GB 缩短豚鼠心肌细胞动作电位时程 (APD) 的原因可能与 GB 抑制了心肌细胞膜上的 L-型 Ca^{2+} 通道

有关。目前已证实在交感神经节上存在 N-型 Ca^{2+} 通道和 L-型 Ca^{2+} 通道^[13], 至于 GB 究竟抑制哪一种 Ca^{2+} 通道, 是否通过拮抗 PAF 受体而发挥作用, 还需进一步研究。

腹腔神经节位于胰腺腺体后部或后上部, 支配胰腺的神经来自于右侧腹腔神经节。胰腺炎症或肿瘤均可刺激或压迫该部位神经丛, 而引起腹胀、腹痛, 造成顽固剧烈的腰背疼痛, 是临床治疗的一大难题, 目前多采用腹腔神经节阻滞^[14]或内脏大神经切断^[15]以缓解或抑制癌性腹痛, 但这却给病人带来许多痛苦。本研究结果表明, GB 能抑制突触前膜或后膜 Ca^{2+} 内流, 影响神经节的突触传递而降低 CG 突触后神经元的兴奋性, 因此是否可以考虑应用 GB 来缓解或抑制癌性腹痛? 这一设想还有待于在动物实验和临床实验中得到证实。

致谢 本研究中相关数据的统计学分析得到安徽医科大学流行病与卫生统计学系王静副教授/博士的热情帮助, 谨此谢忱!

参 考 文 献

- [1] Braquet P. Proofs of involvement of PAF-acether in various immune disorders using BN 52021 (ginkgolide B): a powerful PAF-acether antagonist isolated from *Ginkgo biloba* L. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*, 1986, **16**: 179~ 198.
- [2] 管孝鞠. 银杏内酯药理作用研究进展. 国外医学药学分册, 1995, **22**(3): 129~ 133.
- [3] Oken B S, Storzbach D M, Kaye J A. The efficacy of *Ginkgo biloba* on cognitive function in Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 1998, **55**(11): 1 409~ 1 415.
- [4] Hu B, Sun S, Mei G. Protective effects of *Ginkgo biloba* extract on rats during cerebral ischemia/reperfusion. *Chin Med J (Engl)*, 2002, **115**(9): 1 316~ 1 320.
- [5] 吴雪丰, 王秋娟, 楼凤昌. 银杏内酯对大鼠局灶性脑缺血的保护作用. 中国药科大学学报, 2001, **32**(2): 141~ 145.
- [6] DeFeudis F V, Drieu K. *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) and CNS functions: basic studies and clinical applications. *Curr Drug Targets*, 2000, **1**(1): 25~ 58.
- [7] Ahlemeyer B, Mowes A, Krieglstein J. Inhibition of serum deprivation and staurosporine induced neuronal apoptosis by *Ginkgo biloba* extract and some of its constituents. *Eur J Pharmacol*, 1999, **367**(2-3): 423~ 430.
- [8] Dalsgaard C J, Elfvin L G. Structural studies on the connectivity of inferior mesenteric ganglion of the guinea pig. *J Auton Nerv Syst*, 1982, **5**(3): 265~ 278.
- [9] 胡金兰, 孔森, 孔德虎等. 豚鼠离体腹腔神经节神经元自发 fEPSP 和 AP. 动物学杂志, 2007, **42**(5): 14~ 19.
- [10] 佟晓杰, 于频, 野条良彰. 大鼠腹腔 肠系膜上神经节内交感节前神经纤维的来源、走行和分布. 中国医科大学学报, 2000, **29**(2): 88~ 90.
- [11] Olivera A, Caramelo C, Arriba G, et al. Effect of atrial natriuretic peptide and calcium antagonists on platelet activation factor induced contraction and intracellular calcium mobilization in rat mesangial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1994, **24**(3): 388~ 393.
- [12] 仰礼真, 张翼, 李进禧等. 银杏苦内酯 B 对豚鼠心肌细胞动作电位及 L-型钙通道的影响. 中国药理学通报, 2000, **16**(2): 195~ 198.
- [13] 韩济生主编. 神经科学原理 第二版. 北京: 北京医科大学出版社, 1999, 222~ 239.
- [14] 周正丽, 明登富, 范宏. 行腹腔神经丛阻滞术治疗上腹部癌性疼痛. 局解手术学杂志, 2006, **15**(1): 53~ 54.
- [15] 黄建, 李刚, 谢伟. 左侧内脏大神经切断对晚期胰腺癌镇痛的作用分析. 临床外科杂志, 2006, **14**(6): 390.