

大蓟提取物联合抗生素对分枝杆菌的协同抗菌作用

李武^{1,2*}, 汪燕¹, 艾雪峰¹

¹内江师范学院生命科学学院; ²四川省高等学校特色农业资源研究与利用重点实验室, 内江 641100

摘要: 本文探索了大蓟提取物联合抗生素对分枝杆菌属模式菌株耻垢分枝杆菌的协同抗菌作用, 以期从药用植物中鉴定新型抗分枝杆菌活性天然产物或新型抗菌增效剂。通过水煮法、索氏提取法、超声波法获取大蓟粗提物, 采用管碟法、96 微孔板二倍稀释法对三种粗提物进行体外分枝杆菌药敏试验, 观察大蓟粗提物的抗分枝杆菌活性及与抗生素的协同抗菌活性。结果显示大蓟粗提物单独作用时, 饱和浓度的大蓟水提物未表现出抗菌活性; 索氏提取物和超声波提取物表现出一定的抗菌活性 (MIC 值均为 8 mg/mL)。大蓟超声波提取物与抗生素联合作用时, 与氯霉素、卡那霉素、庆大霉素和红霉素均表现出协同作用, 其中与氯霉素、红霉素表现为明显协同。本文首次发现大蓟中存在与抗生素有协同作用的抗菌增效剂, 为从药用植物中鉴定天然抗菌产物及抗菌增效剂奠定了一定基础。

关键词: 大蓟; 耻垢分枝杆菌; 抗菌; 抗菌增效剂

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.12.015

Synergistic Antibacterial Effect of *Cirsium japonicum* DC. Combined with Antibiotics towards Mycobacterial

LI Wu^{1,2*}, WANG Yan¹, AI Xue-feng¹

¹College of Life Sciences, Neijiang Normal University; ²Key Laboratory of Regional Characteristic Agricultural Resources, Department of Education, Neijiang 641100, China

Abstract: In order to identify new anti-mycobacterial active natural products or new antibacterial synergists from medicinal plants, the anti-mycobacterial activity and synergetic antimicrobial effect of crude extract of *Cirsium japonicum* DC. was evaluated in this study. Boiled method, Soxhlet extraction method and ultrasonic method were used to extract whole plant of *C. japonicum*. Three kinds of extracts were subjected to antibacterial test *in vitro* by tube dish method and 96 microtiter plate dilution method. The results showed that when *C. japonicum* extract was used alone, the saturated concentration of *C. japonicum* water extract had no antimicrobial activity; and the MIC values of the Soxhlet extract and ultrasonic extract of *C. japonicum* were 8 mg/mL. The results showed that the antibacterial effect of ultrasonic extract of *C. japonicum* combined with the antibiotics was enhanced. Among them, ultrasonic extract of *C. japonicum* combined with chloramphenicol and erythromycin had obvious synergistic antibacterial effect against *Mycobacterium smegmatis* with the FIC index below 0.5. For the first time, this study has been found that there are antibacterial synergists in *C. japonicum*. It has laid a foundation for the identification of natural antibacterial products or antibacterial synergists from medicinal plants.

Key words: *Cirsium japonicum* DC.; *Mycobacterium smegmatis*; antibacterial; synergists

大蓟为菊科管状花亚科蓟族蓟属植物, 我国南北地区均有分布。研究表明, 大蓟具有抗菌、降压、止血、抗肿瘤、促产卵、杀线虫等作用^[1-7]。体外实验显示, 大蓟的根煎剂或全草蒸馏液和酒精浸剂对人型结核分枝杆菌均有抑制作用, 酒精浸剂的抑菌效

果好于水煎剂^[8]。但大蓟抗结核菌活性单体化合物的分离仍未见报道。结核分枝杆菌具有传染性, 在实验室安全方面存在着一定的威胁; 而耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) 与结核分枝杆菌属于同一个属, 且无毒, 可以作为结核分枝杆菌的替代模型^[9]。故本文以野生型耻垢分枝杆菌 (*M. smegmatis*-wild type, 下文简称为 MS-WT, 下同) 为作用对象, 研究大蓟的抗分枝杆菌活性, 以期为进一步分离大蓟中抗分枝杆菌活性单体奠定基础。

收稿日期: 2017-07-07 接受日期: 2017-09-20

基金项目: 四川省教育厅项目 (16ZB0299); 内江师范学院博士科研启动项目

* 通信作者 E-mail: liwu0503@njtc.edu.cn

1 实验材料

1.1 菌种

耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis* mc²155 ATCC 700084)保存于内江师范学院生命科学学院微生物学实验室。

1.2 药物与试剂

大蓟全草中药饮片购于四川省内江市中医医院,产自四川省隆昌县黄土坡工业园区。氨苄青霉素、卡那霉素、万古霉素、氯霉素、诺氟沙星、红霉素、庆大霉素等均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。Middlebrook 7H9 和 7H10 购自美国 BD 公司。其它试剂均为国产分析纯。

2 实验方法

2.1 大蓟粗提物的制备

2.1.1 水煮法。参照文献^[10]进行,略作改动。具体如下:精确称取大蓟干燥全草 100 g,加 600 mL 蒸馏水浸泡 1 h,煮沸,再用文火煎煮 30 min。过滤得到滤液,分别再加 1200、800 mL 的蒸馏水于药渣中混匀,重复上述煎煮操作。合并三次滤液,过滤备用。

2.1.2 索氏提取法。参照文献^[11]进行,略作改动。具体如下:精确称取干燥大蓟粉末 100 g,置于索氏提取器的滤纸筒,加 500 mL 70% 的乙醇溶液于圆形烧瓶中,回流 5 h,直至充分提取,得到大蓟粗提液。

2.1.3 超声波提取法。参照文献^[12]进行,略作改动。具体如下:精确称取干燥大蓟粉末 100 g,加入 1000 mL 70% 乙醇,40 °C 超声提取 25 min。40 °C 水浴提取 5 h,再用 40 °C 超声提取 10 min,过滤备用。

将上述三种方法得到的大蓟粗提液均做如下处理:经真空抽滤、旋转蒸发浓缩、冷冻干燥,得到大蓟粗提物干燥粉末(水煮法提取物 16.7 g,索氏提取法提取物 14.5 g,超声波提取法提取物 15.6 g),置于-20 °C 备用。使用时,分别溶于 10% DMSO,配成饱和浓度的溶液。

2.2 菌悬液的制备

将供试菌种从保种管中转接入 7H9 液体培养基,37 °C 振荡培养 48 h,得一级种。按 1% 的接种量转接新的液体培养基,37 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ = 0.8 ~ 1.0,得到二级种;洗涤一次,稀释成 OD₆₀₀ = 0.5 的菌悬液,备用。

2.3 管碟法

参照文献^[13]的方法进行,略作改动。具体操作

如下:取 3 个灭好菌的培养皿,将琼脂培养基倒入,制得下层琼脂。待 0.7% 水琼脂冷却至 40 °C 左右,吸取 300 μL 菌液于 15 mL 水琼脂中,混匀,迅速倒入三个平板中,制得上层琼脂。用镊子从离心管中夹取 5 个已灭菌的牛津杯,分别放于指定区域。对应加入 200 μL 药品。37 °C 静置培养 40 h,观察,拍照记录。

2.4 单一药敏抑菌试验测定药物的 MIC 值

利用 96 微孔板稀释法测定最小抑菌浓度(Minimal inhibitory concentration, MIC)。根据文献^[14]报道,设置抗生素对 MS-WT 药敏实验浓度如下(单位:μg/mL):卡那霉素:32,16,8,4,2,1,0.5,0.25,0.125,0.0625,0.03125;诺氟沙星:32,16,8,4,2,1,0.5,0.25,0.125,0.0625,0.03125;庆大霉素:32,16,8,4,2,1,0.5,0.25,0.125,0.0625,0.03125;红霉素:64,32,16,8,4,2,1,0.5,0.25,0.125,0.0625;氯霉素:512,256,128,64,32,16,8,4,2,1,0.5;万古霉素:32,16,8,4,2,1,0.5,0.25,0.125,0.0625,0.03125。37 °C 培养 3 d 后,经肉眼观察,微孔内没有明显的菌株生长的浓度即为该待测药液的 MIC 值。

2.5 协同药敏实验测定联合药物的 FIC 值

参考文献^[15,16]的方法进行。参考单一药敏抑菌试验测得的药物 MIC 值,协同药物抑菌浓度设计如下:

2.5.1 抗生素浓度梯度设计(单位:μg/mL):卡那霉素:32,16,8,4,2,1,0.5,0.25,0.125;诺氟沙星:32,16,8,4,2,1,0.5,0.25,0.125;庆大霉素:32,16,8,4,2,1,0.5,0.25,0.125;红霉素:64,32,16,8,4,2,1,0.5,0.25;氯霉素:512,256,128,64,32,16,8,4,2;万古霉素:32,16,8,4,2,1,0.5,0.25,0.125。

2.5.2 药用植物粗提物浓度梯度设计(单位:mg/mL):大蓟超声波提取物:16,8,4,2,1,0.5,0.25。分别加好抗生素、大蓟粗提物及细菌菌悬液,37 °C 培养 3 d 后,观察菌体生长情况。将分级抑菌浓度 FIC(fractional inhibitory concentration)作为联合作用的判断指标。计算方式为: $FIC = (MIC_{a联合} / MIC_{a单独}) + (MIC_{b联合} / MIC_{b单独})$ 。具体判断标准为: FIC < 1, 协同关系; FIC = 1, 相加关系; FIC > 1, 拮抗关系。若 FIC ≤ 0.5, 可认为是明显协同^[15]。

2.6 杀菌曲线的测定

为研究大蓟醇提物和抗生素对细菌的杀菌动力学,首先将野生耻垢分枝杆菌培养至对数期(OD₆₀₀ = 0.8 ~ 1.0),菌液稀释至 OD₆₀₀ = 0.5。然后分别使用 5 × MIC 的大蓟醇提物或抗生素单独作用于 MS-

WT;使用 $5 \times \text{MIC}$ 的大蓟醇提物与 $5 \times \text{MIC}$ 的抗生素共同处理 MS-WT。37 °C 振荡培养 24 h,在指定时间点取适量菌液,10 倍浓度梯度稀释后,取 10 μL 滴于 7H10 固体培养基上,37 °C 培养 3 ~ 4 d 后,根据菌落形成单位(CFU)绘制时间-杀菌曲线。

2.7 统计学分析

本研究数据采用 Student's two-tailed t-test 法分析。P 值小于 0.05 时我们认为差异是显著的。误差棒表示标准偏差(standard deviation,SD)。

3 实验结果

3.1 管碟法无法测量大蓟粗提物对耻垢分枝杆菌的抗菌活性

本实验采用管碟法探索了水煮法、索氏提取法、超声波提取法三种方法提取到的大蓟粗提物分别对野生型耻垢分枝杆菌的抑菌作用。结果如图 1:饱和浓度的大蓟水提物、大蓟索氏提取物、大蓟超声波提取物对野生型耻垢分枝杆菌均无明显抑菌作用。

3.2 抗生素及大蓟粗提物对耻垢分枝杆菌 MIC 值的确定

本文测得 6 种抗生素及三种方法提取的大蓟

表 1 抗生素及大蓟粗提物对 MS-WT 的 MIC

Table 1 MIC of antibiotics and crude extract of *C. japonicum* against MS-WT

	卡那霉素 Kanamycin	诺氟沙星 Norfloxacin	庆大霉素 Gentamycin	红霉素 Erythromycin	氯霉素 Chloromycetin	万古霉素 Vancomycin	大蓟提取物 Crude extract of <i>C. japonicum</i>		
							水煮法 Boiled method	索氏提取法 Soxhlet extraction method	超声波提取法 Ultrasonic method
最小抑菌浓度 MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	2	2	2	4	32	2	-	8000	8000

3.3 抗生素与大蓟的超声波提取物对 MS-WT 的联合抗菌活性

大蓟的超声波提取物与 6 种抗生素分别组合作用,对 MS-WT 的联合抗菌活性结果见表 2。结果

表 2 大蓟-超声波提取物与抗生素对野生型耻垢分枝杆菌的协同抗菌 FIC 值

Table 2 FIC of ultrasonic extract of *C. japonicum* combined with antibiotics

	卡那霉素 Kanamycin	诺氟沙星 Norfloxacin	庆大霉素 Gentamycin	红霉素 Erythromycin	氯霉素 Chloromycetin	万古霉素 Vancomycin
大蓟-超声波提取物 Crude extract of <i>C. japonicum</i> by ultrasonic method	0.625	2.031	0.625	0.375	0.5	1.25

3.4 大蓟醇提物与红霉素联用时的杀菌特征

由于红霉素在 $1 \times \text{MIC}$ 时对耻垢分枝杆菌无抑

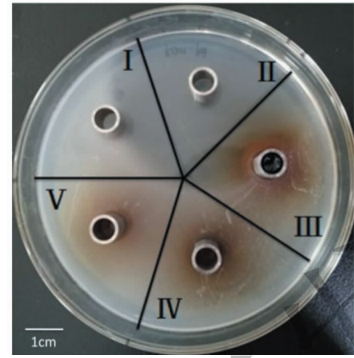


图 1 管碟法对大蓟粗提物抗耻垢分枝杆菌活性测定
Fig. 1 Determination of anti-mycobacterial activity of crude extract of *C. japonicum* by tube dish method

注: I : DMSO, II : 卡那霉素, III : 饱和浓度的大蓟水提物, IV : 饱和浓度的大蓟索氏提取物, V : 饱和浓度的大蓟超声波提取物
Note: I : DMSO, II : Kanamycin, III : Saturated concentration of *C. japonicum* water extract, IV : Saturated concentration of *C. japonicum* Soxhlet extract, V : Saturated concentration of *C. japonicum* ultrasonic extract

粗提物对 MS-WT 的 MIC 值见表 1。结果表明大蓟水提物对 MS-WT 没有抑菌作用,两种乙醇提取物对 MS-WT 有一定的抑菌效果,但其 MIC 值均偏大。因此,我们进一步探究大蓟中是否存在抗生素的增效剂。

表明大蓟超声波提取物与卡那霉素、庆大霉素、红霉素、氯霉素四种抗生素有协同作用;并且,与红霉素、氯霉素表现为明显协同作用。

制作用,而在 $5 \times \text{MIC}$ 时有较好的抑菌作用^[17],因此我们选择 $5 \times \text{MIC}$ 的药物浓度进行时间-杀菌曲线的

制作。由图 2 可知,大蓟醇提取物与红霉素联用时,对 MS-WT 的杀伤作用明显强于红霉素单独对细菌的杀灭作用,且抗菌活性能保持一定的强度而不减弱。因此,该实验进一步确定了大蓟醇提取物与红霉素联用具有明显的协同抗菌作用,药物作用时间越长,这种协同作用就越明显。

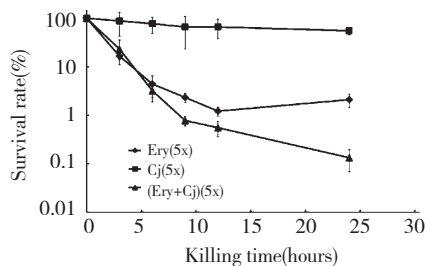


图 2 大蓟醇提取物、红霉素及二者共同处理时对野生耻垢分枝杆菌的时间-杀菌曲线

Fig. 2 Time-killing curves of MS-WT in different samples under $5 \times \text{MIC}$ conditions

注: Ery: 红霉素; Cj: 大蓟

Note: Ery: erythromycin; Cj: *Cirsium japonicum*

4 讨论与结论

结核病已经连续两年超越艾滋病成为全球致死人数第一的传染病。同时,耐药结核日趋严重,2015 年全球耐多药结核病 (MDR-TB) 患者达 48 万例,死亡病例达 25 万;与前一年相比,激增 6 万例^[18]。开发新的抗痨药物成本高、周期长;于是人们试图从药用植物中提取抗菌活性物质或抗菌增效剂。从天然药用植物中筛选抗菌物质有三点优势:副作用小;不容易产生耐药性;来源广泛,资源丰富。

本文首先采用管碟法对大蓟粗提物的抗耻垢分枝杆菌活性进行一个初步的评价。实验结果发现,三种方法提取得到的大蓟粗提物均未表现出抗菌作用。扩散抑菌实验操作简单、成本低廉,被广泛应用于各种抑菌实验。但对于极性较小、微溶或不溶于水的化合物来说,由于其扩散速度缓慢,因此可能观察不到抑菌圈^[19]。鉴于文献报道大蓟具有抗菌活性,因此该方法不适合对大蓟粗提物进行抑菌实验。

本文接着采用 96 微孔培养板倍比稀释法对三种方法提取的大蓟粗提物进行了抗耻垢分枝杆菌的药敏试验。实验结果发现,大蓟水提物未表现出抗菌作用,索氏提取法和超声波提取法所得的大蓟粗提物均表现出一定的抗菌作用,但效果并不理想,其 MIC 值均为 8 mg/mL。这和文献报道的大蓟水提取

物无抑菌作用,醇提取物有抑菌作用的结果一致^[20,21]。研究显示,同种植物使用不同溶剂获取的活性成分大不相同:一般水可提取鞣质、糖和盐类等成分;乙醇可提取皂苷、黄酮及生物碱等成分^[22]。因此,抑菌活性成分很可能是溶于乙醇而不溶于水的物质。总而言之,大蓟粗提物中存在抗耻垢分枝杆菌的活性物质,但是有效成分活性或浓度太低。

鉴于抗菌增效剂具有逆转细菌耐药、减少联用抗生素使用量从而减轻副作用和不易产生耐药菌株等优点^[23],我们进一步对大蓟中的抗菌增效剂进行了挖掘。本文在单一药敏抑菌试验的基础上对大蓟的超声波提取物和 6 种抗生素进行了协同药敏实验。对 MS-WT 的协同药敏实验结果表明:大蓟的超声波提取物与 4 种抗生素有协同作用,分别是氯霉素、卡那霉素、庆大霉素和红霉素。其中,与氯霉素、红霉素表现出明显协同作用。本研究首次发现大蓟中存在抗生素的增效剂。

本文仅对大蓟的粗提物进行了一个初步的研究,本课题组目前正对大蓟进行进一步的分离提取,以期分离出大蓟中具有抗菌增效的单体化合物,为治疗结核病提供另一种有效途径。

参考文献

- 1 Fan JW (范君文), Yu L (于录), Ma LZ (马兰芝), et al. Antimycobacterial activity of 29 plants extracts. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2009, 25 (24): 1-7.
- 2 Ma FJ (马峰峻), Zhao YZ (赵玉珍), Zhang JH (张建华), et al. Effects of thistle on animal blood pressure. *Heilongjiang Med Pharm* (黑龙江医药科学), 1991, 1: 10-11.
- 3 Tu XD (屠锡德), Yang Q (杨琦), Weng LZ (翁丽正), et al. Study on the anti-hypertensive effect of thistle. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1982, 8: 86.
- 4 Ishida H, Umino T, Tsuji K, et al. Studies on antihemorrhagic substances in herbs classified as hemostatics in Chinese medicine. VII. On the antihemorrhagic principle in *Cirsium japonicum* DC. *Chem Pharm Bull*, 1987, 35: 861-864.
- 5 Liu S, Luo X, Li D, et al. Tumor inhibition and improved immunity in mice treated with flavone from *Cirsium japonicum* DC. *Int Immuno pharm*, 2006, 6: 1387-1393.
- 6 Miyazawa M, Yamafuji C, Tabata J, et al. Oviposition-stimulatory activity against *Ostrinia nubilalis* by essential oil of root part from *Cirsium japonicum* DC. *Nat Prod Res*, 2003, 17: 341-345.
- 7 Kawazu K, Nishii Y, Nakajima S. Two nematocidal substances from roots of *Cirsium japonicum*. *Agric Biol Chem*, 1980, 44:

- 903-906.
- 8 Ma QJ (马清钧), Wang SL (王淑玲). Commonly Used Traditional Chinese Medicine Research and Clinical (常用中药现代研究与临床). Tianjin: Tianjin Science and Technology Translation and Publishing Company, 1995.
 - 9 Long Q, Zhou Q, Ji L, *et al.* *Mycobacterium smegmatis* genomic characteristics associated with its saprophyte lifestyle. *J Cell Biochem*, 2012, 113: 3051-3055.
 - 10 Wang YY (王莹莹). 煎药机与传统手工煎煮冠心 II 号方药的质量和疗效评价的初步研究. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine (北京中医药大学), MSc. 2005.
 - 11 Wei FS (韦芳三), Li CH (李纯厚), Dai M (戴明), *et al.* Improvement of Soxhlet extraction used for determination of crude lipids content of marine microalgae. *J Shanghai Ocean Univ* (上海海洋大学学报), 2011, 20: 619-623.
 - 12 Gong WL (公维磊), Zhang X (张潇), Yang JL (杨金玲), *et al.* The ultrasonic extraction technology for the determination of zinc, iron, copper and manganese in tea. *J Jining Med Univ* (济宁医学院学报), 2010, 33: 124-126.
 - 13 Yi SL (伊守亮), Xiao L (肖林), Gu Zh (顾正华), *et al.* Determination of Nisin activity by Oxford plate assay system. *J Wuxi Univ Lig Ind* (食品与生物技术学报), 2004, 23(4): 41-45.
 - 14 Li XZ, Zhang L, Nikaido H. Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Ch*, 2004, 48: 2415-2423.
 - 15 Ye HQ (叶海青). Screening of anti-*Mycobacterium tuberculosis* compounds & the effect of transcriptome of H37Rv under the stress of plumbagin. Jilin: Jilin University (吉林大学), PhD. 2013.
 - 16 Nguta JM, Appiah-Opong R, Nyarko AK, *et al.* Antimicrobial and cytotoxic activity of selected medicinal plant extracts. *J Ethnopharmacol*, 2016, 182: 10-15.
 - 17 Li X, Li J, Hu X, *et al.* Differential roles of the hemerythrin-like proteins of *Mycobacterium smegmatis* in hydrogen peroxide and erythromycin susceptibility. *Sci Rep*, 2015, 5: 1-12.
 - 18 World Health Organization. Global tuberculosis report 2016. WHO/HTM/TB/2016.13. Geneva: World Health Organization, 2016.
 - 19 Moreno S, Scheyer T, Romano CS, *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radi Res*, 2006, 40: 223-231.
 - 20 Yang FQ (杨凤琴), Ye L (叶莉), Liang J (梁军), *et al.* 宁夏大蓟提取物不同极性部位对 4 种革兰阳性菌的体外抑菌活性研究. *J Baotou Med Coll* (包头医学院学报), 2012, 28(4): 15-16.
 - 21 Ye L (叶莉), Yang FQ (杨凤琴), Liang J (梁军), *et al.* 宁夏大蓟提取物不同极性部位对 4 种念珠菌的体外抑菌活性. *Chin J Exp Tradit Med Formul* (中国实验方剂学杂志), 2011, 19: 222-223.
 - 22 Wang MT (汪茂田). Extraction and Separation of Natural Organic Compounds and Structural Identification (天然有机化合物提取分离与结构鉴定). Beijing: Chemical Industry Press, 2004.
 - 23 Qin RX (覃容欣), Zhou H (周红). Advances in research of antibacterial sensitizers from natural products. *Chin J New Drug* (中国新药杂志), 2014, 11: 1285-1289.
- (上接第 2103 页)
- 13 Liu FY (刘芳瑞), Hu JH (胡晶红), Li J (李佳), *et al.* Analysis of influencing factors on the synthesis and accumulation of active substance in Ginkgo plants. *J Shandong Univ TCM* (山东中医药大学学报), 2011, 35: 199-202.
 - 14 Qa' dan F, Mansoor K, AL-Adham I, *et al.* Proanthocyanidins from *Ginkgo biloba* leaf extract and their radical scavenging activity. *Pharm Biol*, 2011, 49: 471-476.
 - 15 Xie HY, Wang JR, Yau LF, *et al.* Catechins and procyanidins of *Ginkgo biloba* show potent activities towards the inhibition of β -amyloid peptide aggregation and destabilization of preformed fibrils. *Cell Biochem Funct*, 2013, 31: 344.
 - 16 Park YG, Kim SJ, Kang HYM, *et al.* Variation of ginkgolides and bilobalide contents in leaves and cell culture of *Ginkgo biloba* L. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2004, 9: 35-40.
 - 17 van Beeka TA, Montorob P. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts, and phytopharmaceuticals. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 2002-2032.
 - 18 Qin B (秦兵), Zhang GB (张根葆), Chen DY (陈冬云), *et al.* Protective effects of ginkgolide B on neuron injury induced by cerebral ischemia/reperfusion. *Chin J TCM WM Crit Care* (中国中西医结合急救杂志), 2005, 12(1): 17-20.
 - 19 MacLennan KM, Darlington CL, Smith PF. The CNS effects of *Ginkgo biloba* extracts and ginkgolide B. *Progr Neurobiol*, 2002, 67: 235-257.