

· 基础研究 ·

银杏黄酮减轻大鼠蛛网膜下腔出血后脑水肿和神经元损伤

张桂茹 刘玺昌 孙保亮

【摘要】 目的 探讨银杏黄酮对大鼠蛛网膜下腔出血(SAH)后脑水肿、海马神经元超微结构及凋亡基因 Fas 配体(FasL)表达的影响。**方法** 成年雄性 Wistar 大鼠 80 只随机分为 5 组:正常对照组、SAH 组、SAH + 生理盐水组、SAH + 50 mg/kg 银杏黄酮组(Gf₅₀组)、SAH + 200 mg/kg 银杏黄酮组(Gf₂₀₀组)。采用枕大池内新鲜自体动脉血二次注入法建立大鼠 SAH 模型。于 SAH 模型建立后, 24 h 和 72 h 测定脑组织含水率;72 h 后用透射电镜观察神经元超微结构;免疫荧光法检测 FasL 蛋白的表达。**结果** SAH 组脑组织含水率较正常对照组增加。与 SAH 组比较,脑组织含水率在银杏内酯不同剂量组均明显降低,其中 200 mg/kg 银杏黄酮组脑组织含水率降低最为显著($P < 0.01$)。与正常对照组比较,其余 4 组大鼠神经元超微结构均有不同程度的损伤,其中 SAH 组损伤最为严重。SAH 组 FasL 蛋白的表达较正常对照组增多($P < 0.01$),两个银杏黄酮剂量组较 SAH 有不同程度减少($P < 0.05$)。**结论** 银杏黄酮可降低 SAH 大鼠的脑组织含水率,对海马神经元具有保护作用。银杏黄酮可抑制 SAH 后大鼠 FasL 表达水平增高,高剂量组效果更明显。

【关键词】 银杏黄酮;蛛网膜下腔出血;脑水肿;Fas 配体

Effect of Ginkgoflavones against brain edema and neuron ultrastructural injury on subarachnoid hemorrhage rats ZHANG Gui-ru, LIU Xi-chang*, SUN Bao-liang. * Department of Neurology, Penglai People's Hospital, Penglai 265600, China
Corresponding author: LIU Xi-Chang, E-mail: liuxichang@126.com

【Abstract】 Objective To determine the effect of Ginkgoflavones on brain water content and neuron ultrastructure secondary to subarachnoid hemorrhage (SAH). **Methods** 80 mature male Wister rats were randomly divided into six groups: negative control group, SAH group, SAH + normal saline (NS) group, SAH +

作者单位:265600 山东省蓬莱市人民医院神经内科(张桂茹);泰山医学院国际教育学院(刘玺昌);泰山医学院基础所(孙保亮)

通讯作者:刘玺昌, E-mail: liuxichang@126.com

50 mg/kg Ginkgoflavones group (Gf_{50}) and SAH + 200 mg/kg Ginkgoflavones group (Gf_{200}). Cistern magna injection twice of freshly autologous arterial blood was used to induce SAH in rats. 24 h and 72 h after induction of SAH, brain water content was detected. Electron microscope was used to observe neuronal ultrastructure 72h after SAH model inducted. The expressions of FasL protein in cerebral tissue were determined by immunohistochemistry. **Results** SAH increased brain water content. Compared with SAH group, brain water content in Ginkgoflavones groups were decreased; especially in Ginkgoflavones 200 mg/kg groups ($P < 0.01$), brain water content were a remarkable drop. The neuronal ultrastructures of the rats except negatived control group were different extent destruction. The destruction of neuronal ultrastructures were more severe in SAH group. neuronal ultrastructures in Ginkgoflavones groups were better than one of in SAH group. The expression of FasL protein in cerebral of SAH rats were significantly higher than normal control ($P < 0.01$), that of ginkgolides groups were lower than that of SAH groups, ginkgolides high dose groups were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** Ginkgolides may relieve brain edema and injury of neuronal ultrastructure in SAH rats. Ginkgolides can inhibit expression of FasL protein in SAH rat, especially in high dose group.

【Key words】 Ginkgolides; Subarachnoid hemorrhage; Brain edema; Fas ligand

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)可以损害血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的完整性,使一些正常生理状态下不能进入脑组织的大分子物质在脑组织中聚集,造成相应脑区神经元凋亡^[1]。银杏黄酮具有自由基清除剂特性,大量研究证实自由基连锁反应在脑缺血损伤中起到重要作用,以往对SAH作用的研究较少,本实验探讨了银杏黄酮对大鼠SAH脑水肿和神经元超微结构变化的影响。

材料与amp;方法

1. 动物与分组:成年雄性Wistar大鼠80只,体重250~300 g,清洁级,由山东鲁抗实验动物中心提供(动物许可证号SCXK鲁20050017)。将动物随机分为5组:正常对照组;SAH组;SAH+生理盐水组;SAH+50 mg/kg银杏黄酮组(Ginkgoflavones, Gf_{50} 组);SAH+200 mg/kg银杏黄酮组(Gf_{200} 组)。每组15只。

2. 模型制作:大鼠10%水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射麻醉后,头部固定于立体定位仪上,保持约30°的头低位。实验过程中保持室温在26℃左右,利用红外线灯维持肛温37℃。项部备皮,碘伏消毒。在左右耳根连线中点找到枕外隆

凸,其下约0.5 cm有凹陷,此即小脑延髓形成的夹角。沿中间线纵行剪开长约3 cm的项部皮肤,上至枕外隆凸。钝性分离皮肤、肌肉和骨膜,暴露枕骨及寰枕膜。止血后,用无菌纱布覆盖。翻转大鼠并固定其左下肢。股部剔毛,碘伏消毒,在股根部股动脉搏动处,做一长约1.0 cm的切口。钝性分离股动脉,在其远端穿一细线,稍提起,充分暴露股动脉。用1 ml注射器配4号针头,抽取少量肝素冲洗针管,在线近端缓慢刺入股动脉,抽取0.3 ml新鲜动脉血,用动脉夹夹闭股动脉。接好注射器头(上有自制套管),在环枕膜垂直进针2 mm左右进入小脑延髓池,以0.1 ml/min的速度缓慢将自体血注入小脑延髓池,缝合切口,消毒。注射过程中可见动物烦躁不安,呼吸加深加快,甚至出现肢体抽动。部分大鼠在注血过程中出现呼吸抑制,迅速回抽0.05 ml血液后可以恢复自主呼吸。将大鼠放回笼中,保持卧位,头低30°维持30 min,让注入血液在重力作用下进入基底池,以造成SAH。48 h后同样方法再次注血。

3. 干预药物:实验所用银杏黄酮为棕黄色粉末,纯度 $\geq 40\%$,由上海傲拓信息科技有限公司提供。临用前在粉剂中加入适量吐温80有机助溶剂(tween 80),在研钵中研磨数分钟,然后加入生理盐水使之成3%和6%的溶液(含0.2% tween 80)。银杏黄酮治疗组分为50 mg/kg和200 mg/kg两个剂量组。两组动物所用生理盐水及银杏黄酮容量相同^[8]。银杏黄酮、生理盐水均在初次枕大池注血后0.5 h腹腔注射给予,以后每12 h以半量重复,直至处死。

4. 脑组织含水率的测定:每组动物各取10只。在第2次注血24 h和72 h后,分别取5只快速断头处死,迅速取脑。用滤纸小心拭去表面血迹,分离出皮层和双侧海马组织,在1/1000 g电子分析天平上精确称出湿重(wet weight, wW)后,放入110℃电烤箱内烘干24 h至恒重。然后,用电子分析天平精确称出干重(dry weight, dW)。脑组织含水率用下述公式计算:

$$\text{脑组织含水率}(\%) = \frac{\text{湿重} - \text{干重}}{\text{湿重}} \times 100\%$$

5. 电镜标本的制作:在第二次注血后72 h(对照组除外)用10%水合氯醛(0.36 mg/100 g)将大鼠麻醉。剪开胸腔暴露心脏,将圆头针从大鼠心尖处插入至升主动脉,同时从右心耳处剪开心脏放血。先向心脏内快速灌注生理盐水灌洗液30~50 ml,再向心脏内灌注4℃的4%多聚甲醛-2%戊二醛固定液(pH 7.4)100~150 ml,灌注速度5~10 ml/min。灌注完毕后立即断头,迅速取出双侧海马,在CA₃区取1 mm³组织块,置入3%戊二醛中,迅速送电镜室制作进行常规透射电镜检测。

6. FasL蛋白检测:每组5只大鼠于第二次SAH术后3 d,麻醉后先用4℃的4%多聚甲醛溶液灌注固定。固定脑组织后迅速断头取脑,进行后固定并用OCT

包埋。在液氮中速冻约 1 min 后移到 -70°C 冰箱冻存,制作冰冻切片,厚度约 $8\ \mu\text{m}$ 。用 SP 免疫荧光染色法,按照试剂盒说明书操作。阴性对照用 PBS 代替一抗。激光共聚焦观察扫描 FITC 标记的阳性反应物。FasL 阳性细胞为胞膜胞浆着绿色,胞核不着色。用 Lasershp2000 图像处理系统摄像,每片随机观察并计数大脑皮质 10 个不同视野 FasL 阳性细胞数,计算平均值。

5. 统计学方法:实验数据用 Excel 2003 建立数据库,用 SPSS12.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,组间比较用 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 脑淋巴引流阻滞对脑组织含水率的影响及银杏内酯的保护作用(表 1)。

表 1 各组大鼠脑组织含水率测定结果($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	24 h	72 h
正常对照组	0.7751 \pm 0.0006	0.7751 \pm 0.0006
SAH 组	0.8194 \pm 0.0081 ^a	0.8172 \pm 0.0056 ^a
SAH + 生理盐水组	0.8176 \pm 0.003	0.8203 \pm 0.0024
SAH + 50 mg/kg 银杏黄酮组	0.7988 \pm 0.0051 ^b	0.7899 \pm 0.0022 ^b
SAH + 200 mg/kg 银杏内酯组	0.7925 \pm 0.0054 ^{bc}	0.7872 \pm 0.0039 ^{bc}

注:SAH:蛛网膜下腔出血组; SAH + NS:蛛网膜下腔出血 + 生理盐水组; SAH + Gf₅₀:蛛网膜下腔出血 + 50 mg/kg 银杏黄酮组; SAH + Gf₂₀₀:蛛网膜下腔出血 + 200 mg/kg 银杏内酯组。与正常组比较^a $P < 0.01$;与 SAH 组比较^b $P < 0.01$;与 SAH + Gf₅₀组比较^c $P < 0.05$

SAH 后 24 h、72 h, SAH 组脑组织含水率显著高于非 SAH 组($P < 0.01$); SAH + NS 组与 SAH 组比较无明显差异。两个 Gf 组与 SAH + NS 组比较脑组织含水率明显降低。其中 SAH + Gf₅₀ 组与 SAH 组比较 24 h 后($P < 0.05$), 72 h 后($P < 0.01$); SAH + Gf₂₀₀ 组与 SAH 组比较 24 h 和 72 h 后均差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。SAH + Gf₅₀ 组大鼠脑组织含水率显著高于 SAH + Gf₂₀₀ 组($P < 0.05$)。

2. 海马神经元超微结构的观察:正常对照组脑神经细胞核膜清晰完整,双层结构清楚。细胞核呈椭圆形,核仁居中,大而明显(图 A);细胞质内可见完整的细胞器,排列有序。内质网与高尔基体排列较整齐,线粒体比较完整,大小、形态正常,基质均匀。粗面内质网散在分布,表面均匀分布核蛋白体(图 B)。SAH 组神经元损伤明显,核膜破坏不完整,水肿变宽。线粒体肿胀,线粒体膜被破坏。内质网水肿,甚至空泡化(图 C)。SAH + NS 组与 SAH 组对比神经无结构无明显改善,核膜破坏,水肿变宽。线粒体膜被破坏,内质网仍有肿胀(图 D)。SAH + Gf₅₀ 组与 SAH 组比较神经元结构较好,可见高尔基体水肿,线粒体核膜变化不大,内

质网仅有轻度水肿(图E), SAH + Gf₂₀₀组神经元结构较好,核膜线粒体结构均较好,只有小部分稍不完整,内质网无明显水肿(图F)。

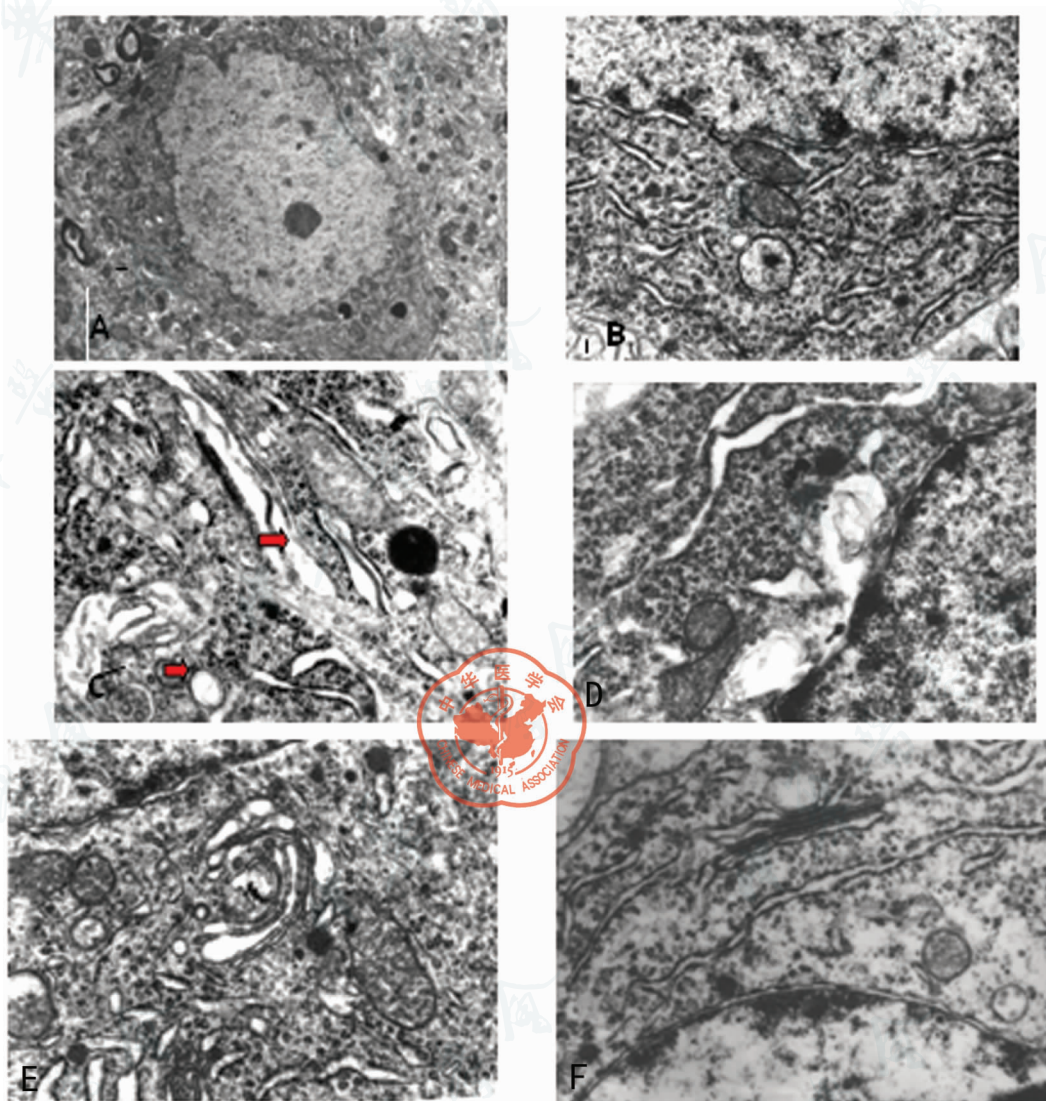


图1 各组神经元超微结构的变化

图1-A(×5000)正常神经元全貌,核膜完整,核仁居中。图1-B(×25000)正常神经元,核膜/线粒体/内质网均结构较好。图1-C(×25000)SAH组可见内质网水肿,线粒体破坏。图1-D(×25000)SAH + NS组可见核膜被破坏,内质网明显肿胀。图1-E(×25000)SAH + Gf₅₀组,高尔基体水肿,只见内质网轻度水肿。图1-F(×25000)SAH + Gf₂₀₀组核膜/线粒体/内质网结构较好

3. 各组 FasL 蛋白阳性表达结果(表2,图2)。

表2 各组大鼠大脑皮质 FasL 蛋白表达($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	FasL(阳性)细胞数/视野
正常对照组	0
SAH 组	28.21 ± 6.23 ^a
SAH + 生理盐水组	27.76 ± 4.97 ^a
SAH + 50 mg/kg 银杏黄酮组	18.67 ± 7.67 ^b
SAH + 200 mg/kg 银杏内酯组	10.35 ± 6.34 ^{cd}

注:与正常组比较^a $P < 0.01$;与 SAH 组比较^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$;与 SAH + Gf₅₀组比较^d $P < 0.01$

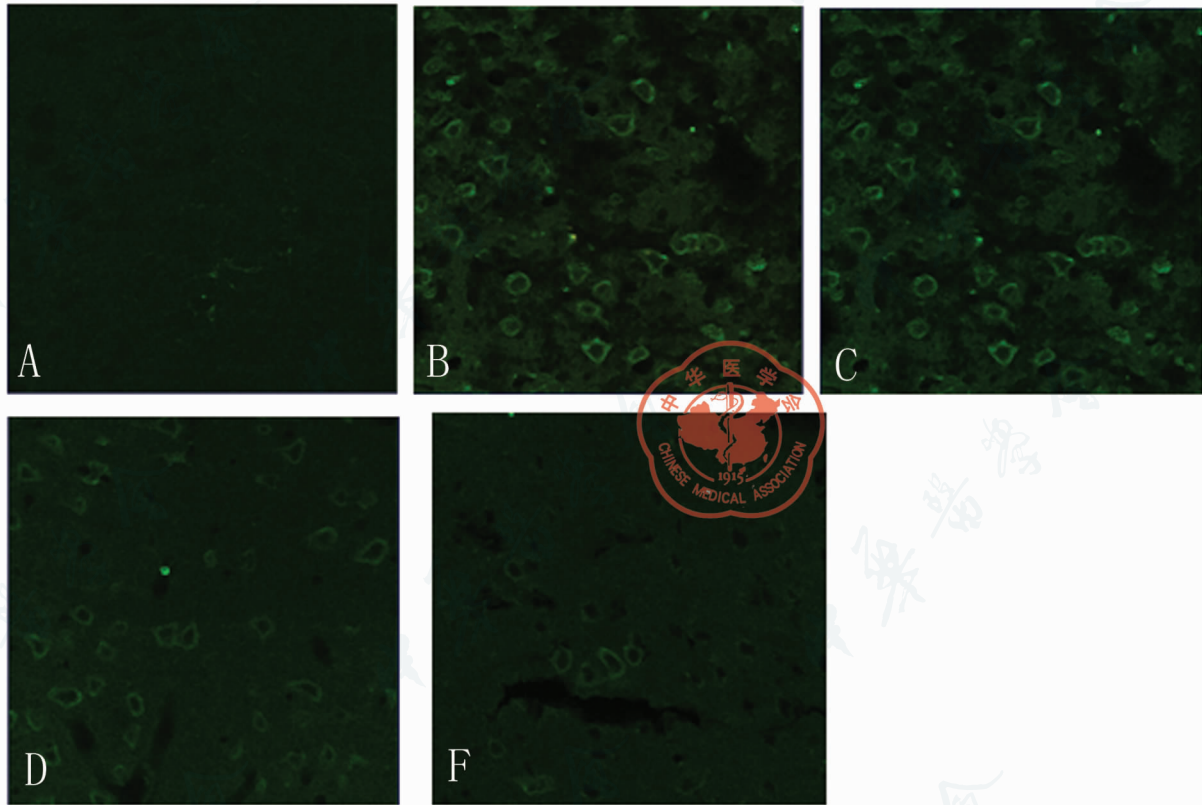


图2 A:正常对照组;B:SAH组;C:SAH+NS组;D:SAH + Gf50组;E:SAH + Gf200组

正常对照组大鼠脑组织未见 FasL 蛋白阳性表达,其他各组均有不同程度的 FasL 蛋白阳性表达,与正常对照组比较均差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。与 SAH 组比较,银杏黄酮低剂量组, FasL 蛋白阳性表达细胞数有所降低($P < 0.05$)。与 SAH 组和正常对照组比较,银杏黄酮高剂量组 FasL 蛋白阳性细胞数显著降低($P < 0.01$)。

讨 论

以往学者们一直认为,SAH 继发脑缺血所致神经元死亡的形式为坏死。但是最近的研究证明,凋亡所致迟发性神经元死亡对其具有十分重要的作用。Fas 主要以膜受体形式存在,与配体 FasL 结合后可向细胞传递死亡信号。Fas 和

FasL 是重要的凋亡调节基因,很可能为一间接的早期凋亡信号^[2]。目前已证实能改善 SAH 患者预后的药物寥寥无几。我们以前的研究发现银杏叶提取物 (Extract of Ginkgo Biloba, EGb) 对 SAH 后脑血流具有改善作用^[3]。SAH 所继发脑血管痉挛 (cerebral vasospasm, CVS) 及脑缺血损害的防治非常困难。既往的研究表明,EGb 不但具有较强的血管活性,对肢体血管、冠状动脉及脑血管^[4-5];而且还能降低红细胞聚集性、全血黏度和血管脆性,并使高脂血症患者血清胆固醇含量下降从而改善血液流变学,使器官、组织的血流灌注增加^[6]。EGb 能显著改善动物脑微循环,其中主要的药物活性成分为 Gf。Gf 具有自由基清除剂特性。大量的研究证实自由基连锁反应在脑缺血损伤中起到重要作用^[7-8]。自由基清除剂可阻止再灌注损伤继发的线粒体功能障碍^[9]。孙保亮等^[10]于蛛网膜下腔出血大鼠模型进行研究,发现 Gf 治疗后血清一氧化氮 (NO) 含量升高,而脑组织 NO 含量则明显降低。研究显示,NO 在中枢神经系统具有双重作用^[11]。正常情况下,NO 作为一种神经递质参与学习记忆的过程,是中枢神经系统中不可缺少的信使分子。NO 还能松弛血管平滑肌,降低血压,抑制血小板聚集,抑制血管平滑肌细胞增殖,调节脑血流。但是 NO 在细胞内积累过多则会导致神经元坏死或凋亡,使学习记忆功能受到损害^[12]。因为神经组织富含磷脂,其主要成分为多不饱和脂肪酸,易受自由基攻击,引起脂质过氧化。TBI 后氧自由基产生增加,而 NO 的过度增多则会加剧氧自由基产生。NO 可与超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 反应生成亚硝基阴离子 ($ONOO^-$),之后也可生成羟自由基 (OH^{\cdot}) 和 NO,这种过程周而复始,对氧自由基产生起到级联放大作用^[13]。银杏黄酮可通过上述作用机制减轻脑水肿及神经元损伤,同时抑制神经细胞凋亡。我们的研究显示,银杏黄酮可以明显降低大鼠 SAH 脑组织的含水率,它不但对神经元细胞核膜、线粒体及内质网具有保护作用,同时还可使脑细胞 FasL 表达减少,抑制神经细胞凋亡。

本研究进一步证实了银杏黄酮对维持中枢神经系统内环境稳定的重要性以及对 SAH 后继发性脑损伤的预防保护作用,为临床采用银杏黄酮治疗 SAH 后继发脑组织损伤提供了一定的理论依据。

参 考 文 献

- 1 Manno EM. Subarachnoid hemorrhage. *Neurol Clin*, 2004, 22 (2) :347-366.
- 2 Cleveland JL, Ihle JN. Contenders in FasL/TNF death signaling. *Cell*, 1995, 81 (4) :479-482.
- 3 Sun BL, Xia ZL, Yang MF, et al. Effects of Ginkgo biloba extract on somato sensory-evoked potential, nitric oxide levels in serum and brain tissue in rats with cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2000, 24 (2-4) : 139-144.
- 4 Liebgott T, Miollan M, Berchadsky Y, et al. Complementary cardioprotective effects of flavonoid metabolites and terpenoid constituents of Ginkgo biloba extract (EGb 761) during ischemia and reperfusion. *Basic Res*

- Cardiol, 2000, 95(5):368-377.
- 5 Clark WM, Rinker LG, Lessov NS, et al. Efficacy of antioxidant therapies in transient focal ischemia in mice. *Stroke*, 2001, 32(4):1000-1004.
 - 6 DeFeudis FV, 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, Krieglstein J. Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract. *Cell Mol-Life Sci*, 2003, 60(9):1779-1792.
 - 8 Gertz HJ, Kiefer M. Review about Ginkgo biloba special extract EGb 761 (Ginkgo). *Curr Pharm Des*, 2004, 10(3):261-264.
 - 9 Li J, Zhou J, Shi Y. Scanning electron microscopy of human cerebral meningeal stomata. *Ann Anat*, 1996, 178(3):259-261.
 - 10 孙保亮, 张苏明, 夏作理, 等. 银杏叶提取物对蛛网膜下腔出血后氧自由基损伤的缓解效应. *中国临床康复*, 2006, 10(7):28-30.
 - 11 Bon CL, Garthwaite J. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci*, 2003, 23(5):1941-1948.
 - 12 Mollace V, Rodino P, Massoud R, et al. Age-dependent changes of NO synthase activity in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 215(3):822-827.
 - 13 Wada K, Chatzianteli K, Busto R, et al. Role of nitric oxide in traumatic brain injury in the rat. *J Neurosurg*, 1998, 89(5):807-818.

(收稿日期:2010-10-28)

(本文编辑:齐彤)

张桂茹, 刘玺昌, 孙保亮. 银杏黄酮减轻大鼠蛛网膜下腔出血后脑水肿和神经元损伤 [J/CD]. *中华脑血管病杂志:电子版*, 2011, 5(1):5-12.