

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.01262

• 短篇论著 •

## 银杏苦内酯 B 对创伤性脑损伤大鼠脑组织病理形态学的影响

韩瑞璋, 苏国军, 于 烽, 赵 保, 盛文国, 李 斌, 叶晶亮, 马 强, 张建忠\*

解放军 98 医院神经外科, 湖州 313000

**[摘要]** **目的** 探讨银杏苦内酯 B(BN52021)对创伤性脑损伤大鼠脑组织病理形态学的影响。**方法** 48 只 SD 大鼠随机分为 4 组: 假手术组、模型组、低剂量 BN52021 组和高剂量 BN52021 组, 每组 12 只。后 3 组制作液压打击脑损伤模型。低剂量 BN52021 组和高剂量 BN52021 组于模型制作当天开始分别腹腔注射 1 mg/kg 和 5 mg/kg BN52021, 每天 1 次, 连续 7 d。第 7 天治疗后取脑组织进行形态学及免疫组织化学检测和超微结构观察。**结果** 与假手术组相比, 模型组大鼠脑组织神经元相对数量减少( $P<0.05$ ), OX-42 阳性小胶质细胞和星形胶质细胞数量增加( $P<0.05$ ), caspase-3 阳性细胞数增多( $P<0.05$ ); 电镜下可见神经元染色质边集, 部分出现核碎裂、核溶解, 线粒体变圆变大, 空泡形成, 嵴消失, 内质网增宽, 溶酶体增多, 核膜皱褶。低剂量和高剂量 BN52021 组与模型组比较, 小胶质细胞和星形胶质细胞比例减少( $P<0.05$ ), caspase-3 阳性细胞数减少( $P<0.05$ ), 超微结构明显改善; 高剂量组较低剂量组改善更加明显。**结论** BN52021 对创伤性脑损伤大鼠脑组织具有保护作用。

**[关键词]** 银杏苦内酯 B; 脑损伤; 病理学; 免疫组织化学

**[中图分类号]** R 651.15 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)11-1262-05

### Effect of ginkgolide B on histopathology of brain tissue after traumatic brain injury in rats

HAN Rui-zhang, SU Guo-jun, YU Feng, ZHAO Bao, SHENG Wen-guo, LI Bin, YE Jing-liang, MA Qiang, ZHANG Jian-zhong\*

Department of Neurosurgery, No. 98 Hospital of PLA, Huzhou 313000, Zhejiang, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the neuroprotective effect of ginkgolide B (BN52021) on the histopathology of brain tissue after traumatic brain injury in rats. **Methods** Forty-eight healthy SD rats, weighing 250 g, were evenly randomized into 4 groups: sham control group, model group, low dose BN52021 group and high dose BN52021 group. Rats in the latter 3 groups were made into fluid percussion brain injury models. After operation, the rats in the low and high dose BN52021 groups were treated with BN52021 (low dose: 1 mg/kg, ip, high dose: 5 mg/kg, ip, once daily for 7 days). On the 7<sup>th</sup> day after treatment, cerebral tissues were harvested from each group, and the histopathological changes of brain tissue were observed by Fast blue, electron microscope and immunohistochemical method. **Results** Compared with sham control group, model group had significantly decreased neurons ( $P<0.05$ ), increased OX-42 immunoreactive microglial cells and astrocytes ( $P<0.05$ ), and cells positive for caspase-3 ( $P<0.05$ ). Electron microscope found chromatin aggregation, nuclear fragmentation, rounder and larger mitochondria, void formation and disappeared cristae of mitochondria, endoplasmic reticulum hypertelorism, increased lysosomes, and nuclear membrane folding. Compared with model group, the low and high dose BN52021 groups had significantly decreased proportions of microglial cells and astrocytes ( $P<0.05$ ), significantly decreased caspase-3 positive cells ( $P<0.05$ ), and improved ultrastructure, with the improvement in the high dose group being more notable than that in the low dose group. **Conclusion** BN52021 has protective effect on the morphology of brain tissue in rats with traumatic brain injury.

**[Key words]** ginkgolide B; brain injuries; pathology; immunohistochemistry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(11):1262-1266]

创伤性脑损伤后继发性脑损伤是导致患者死亡和功能障碍的重要原因之一<sup>[1]</sup>, 创伤性脑损伤发生后脑内或蛛网膜下隙出血可导致脑组织多种细胞因子、氧自由基和补体表达增加, 从而对神经元及胶质细胞产生毒性作用<sup>[2]</sup>, 导致其形态和功能发生改变,

是引起继发性脑损伤的主要原因<sup>[3]</sup>。血小板活化生长因子(platelet-activating factor, PAF)在继发性脑损伤后表达增高, 给予 PAF 拮抗剂可以减轻继发性脑损伤发生<sup>[4-5]</sup>。银杏苦内酯 B (ginkgolide B, BN52021)是 PAF 受体的特异性拮抗剂, 具有抗炎、抗

**[收稿日期]** 2013-02-11 **[接受日期]** 2013-10-23

**[作者简介]** 韩瑞璋, 硕士, 主任医师. E-mail: 196671693@163.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0572-3269632, E-mail: ghost919@126.com

休克、改善脑缺血、保护心肌和中枢神经系统等重要作用<sup>[6]</sup>。本研究以创伤性脑损伤大鼠为研究对象,观察腹腔注射 BN52021 后大鼠脑组织病理形态学的变化,探讨 BN52021 对继发性脑损伤的防治作用。

## 1 材料和方法

1.1 动物、试剂与仪器 体质量 250 g 左右的 SD 大鼠 48 只,清洁级,雌雄不限,购于上海交通大学医学动物中心[许可证号 SYXK(沪)2008-0050]。BN52021(上海龙河生物制品公司),上海江湾 I 型大鼠立体定向仪,液压损伤打击仪(美国弗吉尼亚大学医学工程部),Leica DM 2500 电子显微镜,Image-ProPlus 专业图像分析系统(Roper Scientific)。

1.2 实验分组与模型制备 将大鼠随机分为 4 组:假手术组、模型组、低剂量 BN52021 组和高剂量 BN52021 组,每组 12 只。后 3 组按照 Shojo 等<sup>[7]</sup>的方法制作液压打击脑损伤模型,步骤如下:用 3%戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,固定头部于大鼠立体定向仪。取头皮正中 3 cm 切口,用骨膜剥离器剥离骨膜,在正中矢状缝偏右 4 mm 处用环钻钻孔,形成直径约 4.8 mm 骨窗,暴露完整硬脑膜,于骨窗前后置颅骨固定螺丝两枚,骨窗内置入内径 2.6 mm 打击管,用即干胶粘合于颅骨连接处,再用牙科骨水泥牢固固定,然后缝合头部切口。使用液压损伤打击仪,压力约 141.86 kPa,造成中度颅脑损伤。假手术组不予撞击,其余操作相同。模型制作当天开始给药。给药方法:将 BN52021 溶解于 DMSO,然后稀释于 0.01 mol/L PBS;低剂量组每日 1 mg/kg,高剂量组每日 5 mg/kg,腹腔注射;假手术组和模型组每日给予等量稀释于 0.01 mol/L PBS 的 DMSO 溶液。治疗持续 7 d。

1.3 脑组织形态学及免疫组织化学检测 治疗结束后,大鼠经戊巴比妥钠麻醉,行心脏灌注处死,先用 4℃冷盐水灌注,再用 4%多聚甲醛/磷酸钠缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.3)固定。充分灌注固定后,开颅取下完整脑组织,置于 4%多聚甲醛/磷酸钠缓冲液(0.1 mol/L)中固定 1 h,随后转移到含 20%蔗糖的 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液中并于 4℃冰箱中保存,24 h 后转移到异戊烷(-50℃)中速冻并存储于-70℃冰箱中。每个脑组织标本均用冰冻切片机取冠状面进行切片(层厚 15 μm),进行组织学观察。

1.3.1 Fast blue 染色 制备石蜡切片,行 Fast blue 染色(试剂购自 Sigma 公司),并在光镜下观察。

1.3.2 Caspase-3、OX-42 免疫组织化学染色 每只大鼠取两张切片进行 OX-42(1:400)和 caspase-3 多克隆抗体(1:200)免疫组化染色(试剂盒购自 Abcam 公司),显微镜下观察。每张切片中嗅球、海马、齿状回、斜角带、杏仁核和隔核各观察 2 个视野,利用 Image-ProPlus 图像分析软件对细胞数量进行分析。

1.4 脑组织超微结构观察 每组各取 2 只大鼠断头取脑,切成 2 mm 厚的组织块,置于 2%戊二醛二甲砷酸盐缓冲液(pH 7.4)中固定 6 h,然后用蔗糖缓冲液冲洗,用 1%四氧化锇磷酸缓冲液(OsO<sub>4</sub>, pH 7.4)固定,再用丙酮脱水、Epon-812 环氧树脂包埋;使用平面模具及超薄切片机半薄切片,甲苯胺蓝溶液染色后于光学显微镜下观察;选定区域制备超薄切片,醋酸铀乙醇溶液染色,高浓度次硝酸铋固化,最后用电子显微镜观察并拍照。

1.5 统计学处理 统计数据变量以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 SPSS 11.5 统计软件对变量进行完全随机设计资料的方差分析,检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 Fast blue 染色结果 由图 1 可见,假手术组细胞形态正常,神经元胞体大,细胞核深蓝色、清晰,细胞质淡蓝色,突起明显;神经胶质细胞相对较小,呈圆形,数量少,散在神经元之间,胶质细胞比例为  $0.26 \pm 0.07$ 。模型组神经元相对数量减少,细胞大小不均,胶质细胞数量增加,胶质细胞比例为  $0.52 \pm 0.12$ 。低剂量 BN52021 组和高剂量 BN52021 组胶质细胞比例分别为  $0.43 \pm 0.11$ 、 $0.31 \pm 0.09$ ,均比模型组有所减少( $P < 0.05$ );高剂量组较低剂量组亦有明显减少( $P < 0.05$ )。

2.2 Caspase-3 免疫组化染色结果 假手术组 caspase-3 阳性表达极少,模型组 caspase-3 阳性表达较多,低剂量 BN52021 组和高剂量 BN52021 组介于两者之间(图 2);模型组 caspase-3 阳性细胞计数与假手术组比较差异有统计学意义[(36 ± 9) vs (7 ± 3) 个/视野,  $P < 0.05$ ],低剂量和高剂量 BN52021 组分别为(27 ± 6)、(16 ± 7)个/视野,与模型组比较差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ ),且高剂量 BN52021 组与低剂量 BN52021 组间差异亦有统计学意义( $P < 0.05$ )。

2.3 小胶质细胞和星形胶质细胞 OX-42 免疫组化染色结果 在假手术组,小胶质细胞和星形胶质细

胞数量少[分别为(8±3)和(9±4)个/视野],胞体相对较小,突起相对胞体较长,呈静息型。而在模型组,两种细胞数量明显增多[分别为(27±8)和(24±7)个/视野],体积变大,突起变短,染色加深,向激活型转变。在低剂量 BN52021 组和高剂量 BN52021 组,两种细胞数量较模型组减少[低剂量组分别为(21±6)和(19±7)个/视野,高剂量组分别为(13±5)和(14±6)个/视野],胞体较模型组变小,突起介

于模型组和对照组之间(图 3、4)。统计分析显示,OX-42 阳性的小胶质细胞数目在高剂量 BN52021 组与模型组之间及高剂量 BN52021 组与低剂量 BN52021 组之间差异均存在统计学意义( $P < 0.05$ ); OX-42 阳性的星形胶质细胞数目在高剂量 BN52021 组与模型组之间差异存在统计学意义( $P < 0.05$ ),但在高剂量 BN52021 组与低剂量 BN52021 组之间差异无统计学意义。

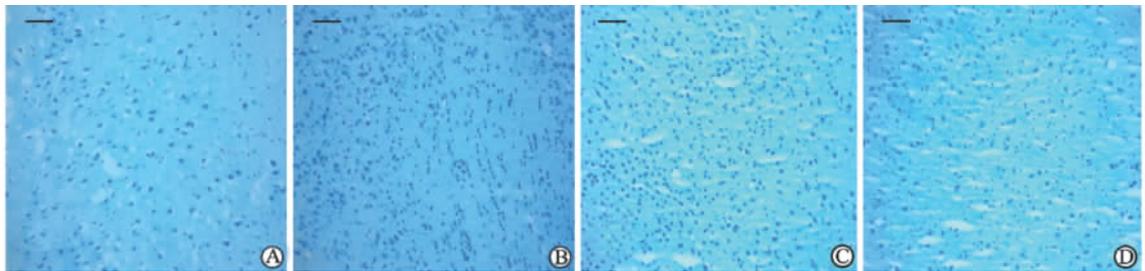


图 1 Fast blue 染色结果

A: 假手术组; B: 模型组; C: 低剂量 BN52021 组; D: 高剂量 BN52021 组. Bar=100  $\mu\text{m}$

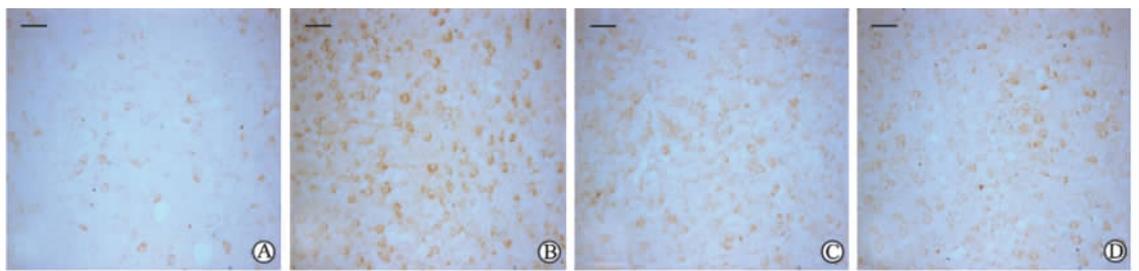


图 2 Caspase-3 免疫组化染色结果

A: 假手术组; B: 模型组; C: 低剂量 BN52021 组; D: 高剂量 BN52021 组. Bar=100  $\mu\text{m}$

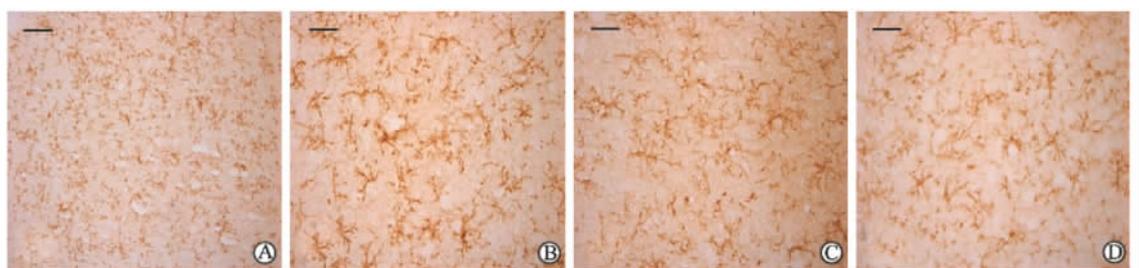


图 3 小胶质细胞 OX-42 染色结果

A: 假手术组; B: 模型组; C: 低剂量 BN52021 组; D: 高剂量 BN52021 组. Bar=100  $\mu\text{m}$

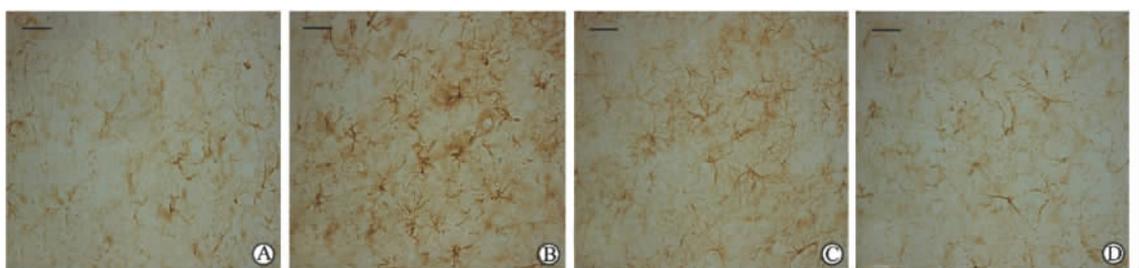


图 4 星形胶质细胞 OX-42 染色结果

A: 假手术组; B: 模型组; C: 低剂量 BN52021 组; D: 高剂量 BN52021 组. Bar=100  $\mu\text{m}$

2.4 神经元超微结构观察 假手术组神经元中染色体形态正常,呈棒状或杆状,线粒体内嵴清晰,内质网和核糖体均匀、量多,核膜清晰。模型组细胞染色质边集,部分出现核碎裂、核溶解,线粒体变圆变大,线粒体内空泡形成、嵴消失,内质网增宽,溶酶体

增多,核膜皱褶。低剂量 BN52021 组和高剂量 BN52021 组介于两者之间,核碎裂、核溶解细胞明显减少,多数染色体形态接近正常,呈棒状,线粒体内空泡数量少而小,嵴清晰可见,核膜皱褶较模型组有明显改善(图 5)。

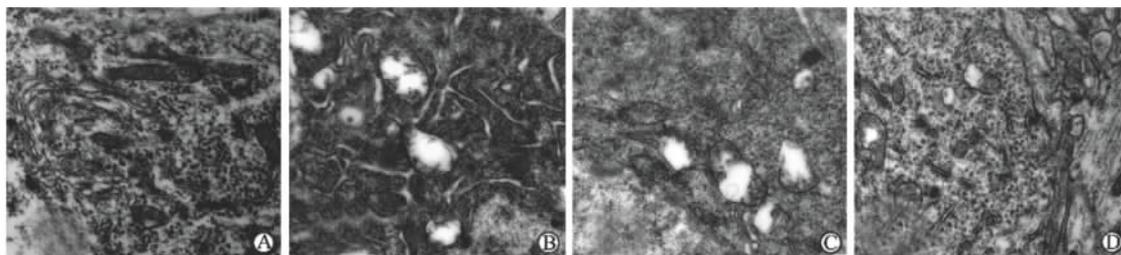


图 5 神经元电镜观察

A: 假手术组; B: 模型组; C: 低剂量 BN52021 组; D: 高剂量 BN52021 组. Original magnification:  $\times 30\ 000$

### 3 讨论

继发性脑损伤是指颅脑创伤后数小时至数天内发生的损伤。创伤性脑损伤后可诱导神经细胞产生多种细胞因子,如白介素家族(IL-1、IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )和 PAF 等<sup>[8]</sup>,对神经元及胶质细胞产生毒性作用<sup>[2]</sup>。PAF 可由神经元和神经胶质细胞产生,其过表达可引起血脑屏障的破坏<sup>[9]</sup>和神经元的毒性反应<sup>[10]</sup>。本研究对脑损伤大鼠模型给予 PAF 拮抗剂 BN52021,观察各脑区神经元及胶质细胞形态学变化情况,进而探讨其对继发性脑损伤的防治作用。

继发性脑损伤后会产生炎症反应和一系列细胞病理变化,包括神经元的坏死、小胶质细胞活化和星形胶质细胞的增殖,并严重影响患者的预后<sup>[11]</sup>。活化的星形胶质细胞和小胶质细胞组织抗原表达上调,可应用 OX-42 单克隆抗体免疫组化标记。本研究结果提示:与正常对照组比较,模型组脑损伤后 7 d 大鼠脑组织中 OX-42 阳性的星形胶质细胞和小胶质细胞数目增多,胞体变大,突起变短,而在低剂量 BN52021 组和高剂量 BN52021 组,小胶质细胞和星形胶质细胞数目减少,胞体形态改善。Dressler 等<sup>[12]</sup>在创伤性脑损伤患者尸检中发现,在原发损伤后 4 d 以上死亡者受损区域脑组织中星形胶质细胞和小胶质细胞增殖明显,这与我们的动物实验结果相似。小胶质细胞和星形胶质细胞数量的增多,是

中枢神经系统对脑损伤的功能性反应,而应用 BN52021 可有效减轻小胶质细胞和星形胶质细胞增殖,从病理形态学上说明 BN52021 对继发性脑损伤具有防治作用。另外,电镜观察可见,假手术组神经元中染色体形态正常,呈棒状或杆状,线粒体内嵴清晰,内质网和核糖体均匀、量多,核膜清晰;模型组神经元细胞染色质边集,部分出现核碎裂、核溶解,线粒体变圆变大,空泡形成,嵴消失,内质网增宽,溶酶体增多,核膜皱褶;低剂量 BN52021 组和高剂量 BN52021 组神经元染色体形态介于两者之间,线粒体内空泡数量少而小,嵴清晰可见,核膜皱褶较模型组有明显改善,也说明 BN52021 对继发性脑损伤具有一定的治疗作用。

神经元凋亡也是继发性脑损伤的重要特征,而创伤性脑损伤发生后细胞凋亡蛋白酶 caspase-3 则是诱导凋亡发生的最终通路<sup>[13]</sup>。本研究结果表明,在假手术组大鼠脑组织内 caspase-3 阳性细胞数目少,而模型组大鼠脑组织出现大量 caspase-3 阳性凋亡细胞,低剂量 BN52021 组和高剂量 BN52021 组 caspase-3 阳性细胞数相对模型组明显减少。说明 BN52021 对创伤性脑损伤后神经元的凋亡具有抑制作用。

本实验结果从病理形态上说明 BN52021 可有效抑制创伤性脑损伤后神经元凋亡和小胶质细胞及星形胶质细胞的增殖,对预防和减轻继发性脑损伤具有积极作用,值得进一步研究。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Huh J W, Widing A G, Raghupathi R. Differential effects of injury severity on cognition and cellular pathology after contusive brain trauma in the immature rat[J]. *J Neurotrauma*, 2011, 28: 245-257.
- [2] Yu C H, Yhee J Y, Kim J H, Im K S, Kim N H, Jung D I, et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine expression and histopathological characteristics in canine brain with traumatic brain injury[J]. *J Vet Sci*, 2011, 12: 299-301.
- [3] Graham D I, McIntosh T K, Maxwell W L, Nicoll J A. Recent advances in neurotrauma[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2000, 59: 641-651.
- [4] Tokutomi T, Sigemori M, Kikuchi T, Hirohata M. Effect of platelet-activating factor antagonist on brain injury in rats[J]. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*, 1994, 60: 508-510.
- [5] Frerichs K U, Lindsberg P J, Hallenbeck J M, Feuerstein G Z. Platelet-activating factor and progressive brain damage following focal brain injury[J]. *J Neurosurg*, 1990, 73: 223-233.
- [6] 赵志伶, 夏时海, 陈虹. 银杏苦内酯 B 的临床和药理学研究进展[J]. *武警医学*, 2006, 17: 132-135.
- [7] Shoji H, Kaneko Y, Mabuchi T, Kibayashi K, Adachi N, Borlongan C V. Genetic and histologic evidence implicates role of inflammation in traumatic brain injury-induced apoptosis in the rat cerebral cortex following moderate fluid percussion injury [J]. *Neuroscience*, 2010, 171: 1273-1282.
- [8] Ray S K, Dixon C E, Banik N L. Molecular mechanisms in the pathogenesis of traumatic brain injury[J]. *Histol Histopathol*, 2002, 17: 1137-1152.
- [9] Fang W, Geng X, Deng Y, Li Y, Shang E, Cen J, et al. Platelet activating factor induces blood brain barrier permeability alteration *in vitro* [J]. *J Neuroimmunol*, 2011, 230(1-2): 42-47.
- [10] Ryan S D, Harris C S, Carswell C L, Baenziger J E, Bennett S A. Heterogeneity in the sn-1 carbon chain of platelet-activating factor glycerophospholipids determines pro- or anti-apoptotic signaling in primary neurons[J]. *J Lipid Res*, 2008, 49: 2250-2258.
- [11] Chen J, Wu X, Shao B, Zhao W, Shi W, Zhang S, et al. Increased expression of TNF receptor-associated factor 6 after rat traumatic brain injury[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2011, 31: 269-275.
- [12] Dressler J, Hanisch U, Kuhlisch E, Geiger K D. Neuronal and glial apoptosis in human traumatic brain injury [J]. *Int J Legal Med*, 2007, 121: 365-375.
- [13] Umschwief G, Shein N A, Alexandrovich A G, Trembovler V, Horowitz M, Shohami E. Heat acclimation provides sustained improvement in functional recovery and attenuates apoptosis after traumatic brain injury [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30: 616-627.

[本文编辑] 孙岩