

银杏叶制剂治疗肺间质纤维化的实验研究*

陈 建 何 冰 刘新民 王海斌 章 巍 张 英

内容提要 目的:探讨银杏叶制剂(百路达)对博莱霉素 A₅ 所致大鼠肺间质纤维化的治疗作用及机制。方法:以博莱霉素 A₅ 所致大鼠肺间质纤维化为模型,观察百路达治疗后病理、胶原蛋白、核因子 kB 活性、转化生长因子-β(TGF-β)mRNA 表达及蛋白水平的变化。结果:百路达治疗组肺泡炎、纤维化病变均较博莱霉素模型组减轻($P < 0.05$),其胶原蛋白含量较模型组减少($P < 0.01$),百路达治疗组 1 周肺泡巨噬细胞核因子 kB(NF-kB)活性明显降低(47.3%),TGF-β mRNA 表达及其蛋白水平均有所降低($P < 0.05$)。结论:百路达治疗肺间质纤维化确有疗效。其机制可能通过抑制核因子 kB 活性,减少了 TGF-β mRNA 表达及蛋白产生,使炎症及纤维化病变减轻。

关键词 肺纤维化 银杏叶 核因子

Experimental Study on Effect of Folium Ginkgo Biloba in Treating Pulmonary Interstitial Fibrosis in Rats
CHEN Jian, HE Bing, LIU Xinmin, et al *Department of Pulmonary Medicine, The First Hospital of Beijing Medical University, Beijing (100034)*

Objective: To evaluate the therapeutic effect and mechanism of folium Ginkgo biloba (FGB) in treating pulmonary interstitial fibrosis (PIF) induced by bleomycin in rats. **Methods:** PIF models of bleomycin-A₅-induced pulmonary fibrosis were established in rats, they were treated by Bailuda, a preparation of FGB, and the pathological changes, collagen protein level, nuclear factor kB(NF-kB) activity, transforming growth factor β (TGF-β) mRNA expression and protein level of the lung tissue were measured. **Results:** In the Bailuda treated group after treatment, amelioration of the pulmonary alveolitis and fibrosis were shown in pathological section ($P < 0.05$) and collagen protein content was lesser ($P < 0.01$) as compared with those in the model control group. After 1 week of Bailuda treatment, the NF-kB activity of pulmonary alveola macrophage lowered by 47.3%, and levels of TGF-β mRNA expression and protein were all decreased ($P < 0.05$). **Conclusions:** Bailuda has definite effect in treating PIF. The mechanism may be through inhibiting the activity of NF-kB, decreasing TGF-β mRNA expression and protein, so as to ameliorate the inflammation and fibrosis.

Key words pulmonary fibrosis, folium Ginkgo biloba, nuclear factor

肺间质纤维化目前发病机制尚未完全明了,近年该病发生有增多趋势,临床疗效差,患者往往因呼吸衰竭而死亡。近年研究表明,银杏叶制剂具有抗炎作用,还可以防止或逆转各组织的纤维变性^[1],笔者在大鼠肺纤维化模型中观察了银杏叶制剂(百路达)疗效并探讨其部分机理,现将结果报告如下。

材料和方法

1 动物 雄性 Wistar 大鼠,体重 200~250g,由北京医科大学实验动物中心提供,按清洁级标准饲养。

2 药物 博莱霉素 A₅:每支 8mg,天津太河制药有限公司生产,批号 970403。百路达:主要成分银杏叶,每粒 0.2g(相当于总黄酮醇甙 9.6mg),上海信谊药厂生产,批号 D980405。

3 试剂及仪器 NF-kB 探针:Promega 公司产品;TGF-β ELISA 试剂盒:由深圳晶美公司提供;DYY-3A 型电泳槽购自北京六一仪器厂;恒压恒流 DF-D 电泳仪购自北京东方仪器厂;CHS 型显微镜购自 OLYMPUS OPTICAL CO. LTD;511 型酶标分析仪购自上海第三分析仪器厂;IBAS-2000 图像分析系统购自美国 Pharmacia 公司。

4 实验方法 Wistar 雄性大鼠 36 只,经乙醚麻醉,气管插管,气管内一次性注入博莱霉素 A₅ (5mg/kg)制成肺间质纤维化模型。随机分为 2 组,模型组

* 卫生部基金资助课题(No. 96-1-266)

北京医科大学第一医院呼吸科(北京 100034)

18 只,动物分别于 1、2、4 周处死;治疗组 18 只,模型制备 2h 后,经胃管注入百路达 0.05g(经注射用水稀释),以后每日 1 次胃管注入此剂量百路达,动物分别于 1、2、4 周处死;另设对照组 6 只;不造模,气管插管内注入生理盐水 0.5ml,1 周后处死。各组动物处死后提取肺组织行病理观察、胶原蛋白测定及 Northern 杂交;支气管肺泡灌洗液(BALF)5ml 行 ELISA 测定;肺泡巨噬细胞(约 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$)行 NF- κ B 活性测定。

5 观察项目和检测方法

5.1 病理观察 各组动物取右肺上叶标本行 HE 染色,MASSON 染色,根据 Szapiel 等^[2]提供的方法,确定肺泡炎(HE 染色)及肺纤维化(MASSON 染色)程度,进行病理半定量分析。

5.2 胶原蛋白测定 据刘菱芬方法^[3]测定肺组织羟脯氨酸含量,并计算肺组织胶原蛋白含量。

5.3 NF- κ B 活性测定 按凝胶迁移率法^[4]。结果用 IBAS-2000 图像分析系统测定杂交带的积分吸光度(IA)来反映 NF- κ B 活性。

5.4 TGF- β mRNA 表达 按异硫氰双胍一步法^[5]提取肺组织总 RNA。mRNA 表达用 Northern 杂交法^[6]测定,设 β -actin 为内参照。结果用 IBAS-2000 图象分析系统测定杂交带的积分吸光度(IA)来反映 mRNA 水平。

5.5 TGF- β 蛋白水平测定 采用酶联免疫检测法(ELISA),根据试剂盒提供的方法进行反应,终止反应后用酶联仪测 450nm 光密度(OD),结果与标准曲线比较确定 TGF- β 含量。

6 统计学方法 采用计算机 SPSS 软件系统进行 F 检验和 t 检验,病理半定量结果采用非参数秩和检验。

结 果

1 病理观察 见表 1。病理标本经 HE 染色及 MASSON 染色分别显示肺泡炎及肺间质纤维化程度。对照组肺泡结构正常,未见肺泡炎及肺纤维化病变。

表 2 各组肺组织胶原蛋白量、TGF- β mRNA、肺泡巨噬细胞 NF- κ B 活性及肺泡灌洗液 TGF- β 蛋白测定比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	胶原蛋白量 (mg/g 组织)	肺泡巨噬细胞 NF- κ B 活性(IA)	肺组织 TGF- β mRNA(IA)	肺泡灌洗液 TGF- β 蛋白(μ g/L)
对照	6	94.7 $\pm$ 6.7	4.61 $\pm$ 2.10	—	88.21 $\pm$ 35.92
模型 1 周	6	101.5 $\pm$ 8.6	29.37 $\pm$ 6.41 [△]	21.51 $\pm$ 2.28	286.05 $\pm$ 77.35 [△]
2 周	6	116.2 $\pm$ 6.1	5.66 $\pm$ 3.09	16.86 $\pm$ 3.13	219.71 $\pm$ 38.78 [△]
4 周	6	152.4 $\pm$ 12.3 [△]	3.19 $\pm$ 3.22	—	106.09 $\pm$ 34.26
治疗 1 周	6	98.5 $\pm$ 10.1	15.48 $\pm$ 5.61 [*]	16.78 $\pm$ 1.62 [*]	138.83 $\pm$ 34.98 [*]
2 周	6	100.7 $\pm$ 4.3	3.18 $\pm$ 0.84	13.83 $\pm$ 1.80	110.81 $\pm$ 21.24 [*]
4 周	6	98.6 $\pm$ 13.6 [*]	3.56 $\pm$ 1.22	—	119.09 $\pm$ 51.63

注:与模型组同期比较,^{*} $P < 0.05$;与对照组比较,[△] $P < 0.01$

模型组 1 周时,肺泡腔及肺间质内大量炎性细胞浸润,肺泡上皮细胞脱落,出现严重的肺泡炎改变;模型组 4 周时肺间质成纤维细胞聚集,胶原沉积增多,肺泡结构破坏,形成肺纤维化,模型组 2 周病变介于 1 周与 4 周之间。治疗组与同期模型组比较,病变程度减轻,病变范围减小。病理半定量结果经非参数秩和检验示:模型组 1、2、4 周与对照组比较,有显著性差异 ($P < 0.01$),说明肺间质纤维化模型制备是成功的;治疗组 2、4 周分别与模型组同期比较,亦有显著性差异 ($P < 0.05$);在模型组 1 周,其主要病理改变为肺泡炎,无明显纤维化,故治疗组 1 周与模型组比较,肺泡炎有显著性差异 ($P < 0.05$),而纤维化阶段两者无显著性差异。

2 肺组织胶原蛋白测定 见表 2。模型组 4 周与对照组比较,胶原蛋白水平明显增高,有显著性差异 ($P < 0.01$)。治疗组 4 周后胶原蛋白水平有所降低,与模型组同期比较,有显著性差异 ($P < 0.01$)。

3 肺泡巨噬细胞 NF- κ B 活性 见表 2。模型组 1 周后肺泡巨噬细胞 NF- κ B 活性较对照组明显升高,有显著性差异 ($P < 0.05$);2 周后降至正常,4 周后低于正常,但与对照组比较均无显著性差异;治疗组 1 周后 NF- κ B 活性比模型组 1 周明显降低(47.3%),有显著性差异 ($P < 0.05$)。

4 肺组织 TGF- β mRNA 表达 见表 2。North-表 1 3 组肺泡炎分级及肺间质纤维化分级

病理半定量结果比较 (例)

组别	n	肺泡炎分级				肺间质纤维化分级			
		0 级	1 级	2 级	3 级	0 级	1 级	2 级	3 级
对照	6	6	0	0	0	6	0	0	0
模型 1 周	6	0	0	1	5 [△]	3	2	1	0 [△]
2 周	6	0	0	2	4 [△]	1	3	1	1 [△]
4 周	6	0	2	3	1 [△]	0	0	2	4 [△]
治疗 1 周	6	0	2	3	1 [*]	4	1	1	0
2 周	6	0	2	3	1 [*]	3	2	1	0 [*]
4 周	6	0	4	2	0 [*]	0	2	2	2 [*]

注:与模型组同期比较,^{*} $P < 0.05$;与对照组比较,[△] $P < 0.01$

em 杂交显示:正常肺组织基本不表达 TGF- β , 在模型组 1、2 周 TGF- β mRNA 表达明显增高, 高峰位于 1 周后, 治疗组 1 周肺组织 TGF- β mRNA 表达比模型组 1 周降低 22%, 有显著性差异 ($P < 0.05$), 比 2 周降低 18%, 无显著性差异。

5 支气管肺泡灌洗液 TGF- β 蛋白水平测定 见表 2。模型组 1、2 周肺泡灌洗液 TGF- β 蛋白水平较对照组明显增高, 经 F 检验, 有显著性差异 ($P < 0.05$), 其高峰位于 1 周后。治疗组 1、2 周 TGF- β 蛋白水平与模型组同期比较均有所降低, 两组比较, 有显著性差异 ($P < 0.05$)。

讨 论

肺间质纤维化开始的病理改变为肺泡炎, 当肺泡巨噬细胞受到各种刺激物刺激活化后, 分泌 TGF- α 等多种细胞因子, 导致炎症反应并刺激成纤维细胞使其过度增生, 分泌纤维结素(Fn), 结果形成纤维化。NF- κ B 为 DNA 结合蛋白, 是真核细胞基因转录中的重要的调控因子, 具有广泛的生物活性。目前研究表明, NF- κ B 参与调节免疫反应及炎症过程, NF- κ B 促进炎症性基因及生长因子 TGF- β 基因的转录^[7], 这些细胞因子在肺泡炎中起重要作用。我们的研究发现, 在博来霉素 A₅ 致肺纤维化模型中, 肺泡巨噬细胞 NF- κ B 活性在 1 周时较对照组明显升高, 这与其调控的生长因子 TGF- β mRNA 表达及其蛋白改变的水平是一致的, 表明 NF- κ B 在肺间质纤维化中可能起重要的作用。有研究表明:从银杏叶中分离的成分 Bioparyl 对核糖核酸酶的活性有调节作用, 可以防止或逆转各组织的纤维变性, 降低免疫性疾病免疫蛋白不正常升高^[1]。目前有报道, 复方银杏叶冲剂在慢性乙型肝炎早期纤维化中具有一定疗效^[8]。而银杏叶制剂对肺间质纤维

化的疗效及其对核因子 κ B 的作用目前尚未见报道。我们观察了百路达治疗博来霉素 A₅ 致肺纤维化模型中肺炎及肺纤维化病变均有一定程度的减轻, 胶原蛋白合成减少。百路达减轻肺纤维化病变的可能机制是其抑制 NF- κ B 活性, 从而使其调控的 TGF- β mRNA 表达及其蛋白分泌降低, 而使肺炎及纤维化的程度减轻。从我们的实验结果看, 银杏叶制剂治疗肺间质纤维化将是一条中西医结合治疗肺间质纤维化的可能措施。

参 考 文 献

1. 李俊义, 成 丽. 银杏叶资源开发与应用研究概况. 华西药理学杂志 1994;9(1):39—40.
2. Szapiel SV, Elson NA, Fulmer JD, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse. Am Rev Respir Dis 1979;120:893—899.
3. 刘菱芬, 李玉瑞. 细胞外间质的生物化学及研究方法. 北京: 人民卫生出版社, 1988:165—169.
4. Anette S, Mikael S, Tomas L, et al. In vivo anergized CD₄⁺ T cells express perturbed AP-1 and NF- κ B transcription factors. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93(2):979—984.
5. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. Anal Biochem 1987;162:156—159.
6. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫译. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1989:363—371.
7. Thanos D, Maniatis T. NF-kappa B: a lesson in family values. Cell 1995;80(2):529—532.
8. 李 薇, 戴庆棠, 刘作恩, 等. 复方银杏叶冲剂治疗慢性乙型肝炎早期纤维化的初步观察. 中国中西医结合杂志 1995;15(10):593—595.

(收稿:1999-07-26 修回:2000-01-20)

第三届全国大黄学术研讨会征文通知

大黄是我国最具特色的传统中药之一。为交流近几年来国内大黄研究的学术经验, 中国中西医结合学会拟定于 2000 年 10 月在上海组织召开第三届全国大黄学术研讨会, 现向全国征集有关学术论文, 欢迎各界同行赐稿。

征文范围:有关中药大黄(含大黄属的民间药、民族药)的植物分类、药物分析质量、炮制、制剂、药理、药化、临床应用、生产管理、营销以及文献综述等不同领域的研究论文。

征文要求:(1)来稿要求全文(字数在 4000 字以内)及 800 字详细摘要各一份;(2)论文请和 B5 纸打印誊写在 400 字的方格稿纸上, 文字清晰, 论文题目下按顺序写明:作者姓名、工作单位、单位地址、邮政编码。

征文截止日期:2000 年 7 月 30 日;通讯地址:上海市香山路 28 号, 上海市香山中医医院 焦东海教授收, 邮编:200020。