

银杏叶提取物对肝纤维化大鼠 I、Ⅲ型胶原及 TIMP-1 mRNA、MMP-1 mRNA 表达的影响

华彩成 万远太

摘要 **目的** 观察银杏叶提取物对肝纤维化大鼠 I、Ⅲ型胶原及 TIMP-1 mRNA、MMP-1 mRNA 表达的影响,并探讨其抗肝纤维化的作用机制。**方法** 30 只大鼠随机分为 3 组(对照组,模型组和治疗组),每组各 10 只。A 组为正常对照组,不做特殊处理,B、C 两组制备大鼠肝纤维化模型,同时 C 组给予银杏叶提取物治疗;采用免疫组化和 RT-PCR 方法分别检测 3 组大鼠肝脏组织 I、Ⅲ型胶原及 TIMP-1 mRNA、MMP-1 mRNA 的表达情况。**结果** 模型组及治疗组肝脏组织 I、Ⅲ型胶原表达水平明显高于对照组($P < 0.01$),经银杏叶提取物(GbE)灌胃处理后,治疗组肝脏组织 I、Ⅲ型胶原表达水平明显低于模型组($P < 0.01$);模型组及治疗组肝脏组织 TIMP-1 mRNA、MMP-1 mRNA 表达水平较对照组均显著增高($P < 0.01$),且治疗组 TIMP-1 mRNA 表达水平明显低于模型组($P < 0.01$),治疗组 MMP-1 mRNA 表达水平明显高于模型组($P < 0.01$)。**结论** 银杏叶提取物可能通过抑制 TIMP-1 表达和提高 MMP-1 表达而促进 I、Ⅲ型胶原降解并发挥抗肝纤维化的作用。

关键词 银杏叶提取物 肝纤维化 胶原 基质金属蛋白酶 基质金属蛋白酶组织抑制因子

Effect of Ginkgo Biloba Extract (GbE) on the Expression of Collagen I, Collagen Ⅲ, TIMP-1 mRNA and MMP-1 mRNA in Hepatic Fibrosis Rats. Hua Caicheng, Wan Yuntai. Medical College, Wuhan University of Science and Technology, Hubei 430065, China

Abstract **Objective** To observe the effect of Ginkgo biloba extract (GbE) on the expression of I, Ⅲ collagen and TIMP-1 mRNA, MMP-1 mRNA in hepatic fibrosis rats, and to explore the mechanism of anti-fibrosis. **Methods** Thirty rats were divided into 3 groups (control group, model group and treatment group), and every group had 10 rats. A group was normal control group, with no special treatment; B, C groups were made into rat liver fibrosis model. At the same time, Rats in C group were treated with Ginkgo biloba extract. The expression of I, Ⅲ collagen were detected by immunohistochemistry and the expression of TIMP-1 mRNA, MMP-1 mRNA were detected by RT-PCR. **Results** The expression of I, Ⅲ collagen in model group and treatment group were significantly higher than that of control group ($P < 0.01$). After treated by GbE orally, the expression of I, Ⅲ collagen in treatment group was significantly lower than that of model group ($P < 0.01$). The expression of TIMP-1 mRNA, MMP-1 mRNA in model group and treatment group were significantly increased than that of control group ($P < 0.01$). The expression of TIMP-1 mRNA in treatment group was significantly lower than that of model group ($P < 0.01$), but the expression of MMP-1 mRNA in treatment group was significantly higher than that of model group ($P < 0.01$). **Conclusion** Ginkgo biloba extract may promote the degradation of I, Ⅲ collagen and play the role of anti-fibrosis by inhibiting the expression of TIMP-1 and increasing the expression of MMP-1.

Key words Ginkgo biloba extract; Liver fibrosis; Collagen; Matrix metalloproteinase; Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase

银杏叶提取物(ginkgo biloba extract, GbE)是从银杏叶中分离纯化而提取的一种药物,既往在临床中多用于治疗心、脑血管疾病及癌症等^[1,2]。近些年来,此药物已在较多动物实验和临床应用中证明具有抗肝纤维化的作用^[3,4]。本研究拟观察 GbE 对肝纤维化大鼠 I、Ⅲ型胶原及 TIMP-1 mRNA、MMP-1 mRNA 表达的影响,并探讨其抗肝纤维化的作用机制。

材料与方法

1. 实验动物:雄性 Wistar 大鼠 30 只,普通级,体重 180 ± 40 g,购自华中科技大学同济医学院实验动物中心。

2. 实验试剂及药物:GbE 购自西安中鑫生物技术有限公司,CCl₄ 购自北京精细化工厂,I、Ⅲ型胶原抗体购自北京中山生物技术有限公司,二抗、DAB 显色试剂盒均购自武汉博士德生物技术有限公司,反转录酶、Taq 酶、dNTP 均为 Promega 公司生产。TIMP-1 及 MMP-1 上下游引物由上海博亚公司合成。

3. 实验分组和处理:实验大鼠随机分为 3 组,每组各 10 只。模型组:40% CCl₄ 溶液背部皮下注射,注射剂量 0.3ml/100g,2 次/周,共注射 8 周,同时予以治疗组灌胃相同剂量生理盐水处理;治疗组:造模方法同模型组,同时给予银杏叶提

作者单位:430065 武汉科技大学医学院(华彩成);430064 武汉科技大学附属天佑医院(万远太)

通讯作者:万远太,电子信箱:wanyuantai088@126.com

取物悬浊液灌胃,剂量 3g/100g,1 次/天,共灌胃 8 周;对照组,给予等量生理盐水背部皮下注射,并予以相同剂量生理盐水灌胃处理 8 周。

4. 常规病理学检查:8 周后处死全部大鼠,取部分肝脏组织在 4% 多聚甲醛溶液固定处理 24h,石蜡包埋,连续切片,切片厚度为 4μm,常规做 HE 染色,在光镜下行常规病理学检查,按相关标准判断肝纤维化程度分级(0~Ⅳ级)^[5]。

5. 免疫组织化学染色:采用免疫组织化学染色方法半定量检测各组肝脏组织 I、Ⅲ型胶原表达水平。I、Ⅲ型胶原实验浓度为 1:100,均设有空白对照(磷酸盐缓冲液)和阴性对照(正常兔血清)。以细胞质、膜或间质等部位出现棕黄色颗粒或线状沉积为表达阳性。采用免疫组化图像分析软件在低倍镜下计算阳性面积百分比(%),每张切片随机选取 5 个视野,取其平均值。

6. RT-PCR 方法:称取每只大鼠 50~100mg 重量的肝组织,Trizol 提取液提取肝脏组织总 RNA,测定 A260/A280 值。取 2μg 总 RNA,42℃ 温度下反转录处理 90min。PCR 条件为:95℃ 变性 40s,52℃ 退火 40s,74℃ 延伸 60s,共 30 个循环,最后 74℃ 彻底延伸 7min。内参照 GAPDH PCR 方法相同。取 5μl 体积的 PCR 产物 2% 琼脂糖凝胶电泳。凝胶图像分析系统检测其 PCR 条带灰度,TIMP-1/GAPDH 及 MMP-1/GAPDH 比值依次表示 TIMP-1 mRNA 和 MMP-1 mRNA 的相对表达水平。引物序列见下:TIMP-1 (393bp),上游引物:5'-CATG-

GAGAGCCTCTGTGGAT-3',下游引物:5'-GTTTCAGGCTTCAGCTTTTGC-3';MMP-1 (649bp),上游引物:5'-TCAGTTTCGTCCTCACTCCAG-3',下游引物:5'-TTGGTCACCTGTCATCTTC-3';GAPDH (300bp),上游引物:5'-GAGGACCAGGTTGTCTCTCTG-3',下游引物:5'-GGATGGAATTGTGAGGGAGA-3'。

7. 统计学方法:SPSS 10.0 统计软件进行数据分析,采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 肝脏组织常规病理学检查:各组大鼠肝组织行 HE 染色,普通显微镜下观察,可见模型组门管区纤维结缔组织增生明显,肝小叶分界清楚,被纤维间隔分隔,有假小叶形成;治疗组可见纤维程度较轻,肝小叶结构基本正常,细胞气球样变仍明显,无假小叶和纤维间隔组织结构形成。肝纤维化程度分级可知模型组肝纤维化程度明显高于治疗组(表 1 及图 1)。

表 1 各组肝纤维化程度分级

分组	<i>n</i>	肝纤维化分级				
		0 级	I 级	Ⅱ级	Ⅲ级	Ⅳ级
对照组	10	10	0	0	0	0
模型组	10	0	0	1	3	6
治疗组	10	0	1	4	3	2

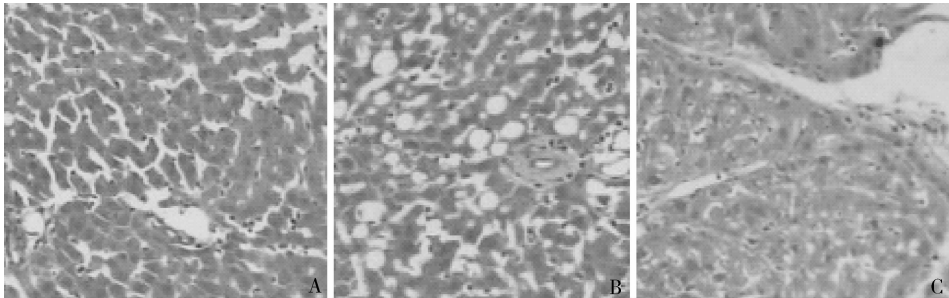


图 1 各组大鼠肝组织 HE 染色(×200)
A. 对照组;B. 治疗组;C. 模型组

2. I、Ⅲ型胶原表达情况:模型组及治疗组肝脏组织 I、Ⅲ型胶原表达水平明显高于对照组,差异有统计学意义(*P* < 0.01);经 GbE 灌胃处理后,治疗组肝脏组织 I、Ⅲ型胶原表达水平明显低于模型组(*P* < 0.01,表 2 及图 2)。

表 2 各组 I、Ⅲ型胶原表达情况(%)

分组	<i>n</i>	I 型胶原	Ⅲ型胶原
对照组	10	4.63 ± 1.73	5.13 ± 1.01
模型组	10	28.74 ± 6.32 [#]	25.96 ± 7.48 [#]
治疗组	10	16.18 ± 5.12 ^{#*}	14.63 ± 5.07 ^{#*}

与对照组比较,[#]*P* < 0.01;与模型组比较,^{*}*P* < 0.01

3. TIMP-1 mRNA 和 MMP-1mRNA 表达情况:模型组及治疗组肝脏组织 TIMP-1 mRNA、MMP-1 mRNA 表达水平较对照组均显著增高(*P* < 0.01),且治疗组 TIMP-1 mRNA 表达水平明显低于模型组(*P* < 0.01),治疗组 MMP-1 mRNA 表达水平明显高于模型组(*P* < 0.01,表 3)。

讨 论

肝脏组织纤维化是慢性肝病共同的病理过程,其主要是各种致病因素导致肝脏出现慢性损伤,细胞外基质(ECM)合成量明显增多和(或)降解明显减少,从而使得 ECM 尤其 I、Ⅲ、Ⅳ型胶原在肝组织中过度

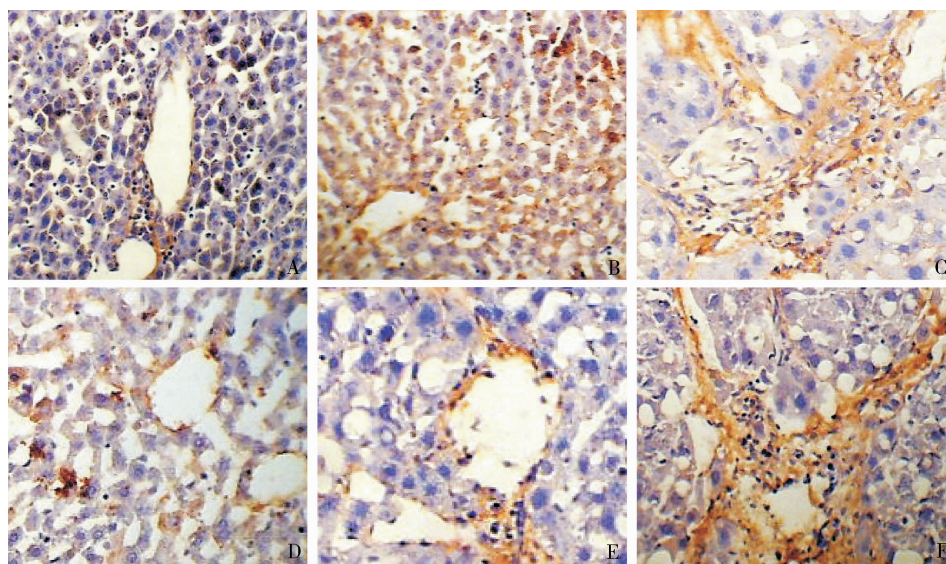


图2 各组大鼠肝组织 I、Ⅲ型胶原染色(×200)

A. 对照组 I 型; B. 治疗组 I 型; C. 模型组 I 型; D. 对照组 Ⅲ型; E. 治疗组 Ⅲ型; F. 模型组 Ⅲ型

表3 各组 TIMP-1 mRNA 和 MMP-1 mRNA 表达情况

分组	n	TIMP-1/GAPDH	MMP-1/GAPDH
对照组	10	0.547 ± 0.073	0.387 ± 0.052
模型组	10	0.956 ± 0.121 [#]	0.475 ± 0.114 [#]
治疗组	10	0.778 ± 0.104 ^{#*}	0.584 ± 0.099 ^{#*}

与对照组比较, [#] $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.01$

增生和沉积最终造成的病理性结果^[6]。已有大量研究结果表明某些条件下肝纤维化可发生逆转,但目前临床治疗方面仍缺乏疗效显著的抗纤维化药物^[7]。

GbE 主要药理成分为黄酮甙,该分子中含有一种具有还原性羟基功能的基团,可捕捉各种类型的自由基,其作用机制是对上述自由基发挥氢原子供体的药理性作用,进而终止细胞内自由基的连锁反应链,避免引起氧自由基和脂质过氧化等反应的加剧,最终减轻氧自由基和脂质过氧化所导致的损害严重程度^[8-10]。此外还有相关研究发现,GbE 具有保护肝窦状内皮细胞的药理作用,可明显改善因慢性肝脏组织受到损伤后所产生的微循环紊乱状态^[11]。因此笔者推测 GbE 对 CCl₄ 所致肝纤维化大鼠具有一定的保护作用。

本研究采用 CCl₄ 制作肝纤维化大鼠模型,同时予以 GbE 进行干预,结果显示,造模 8 周后模型组大鼠肝脏组织观察可见有大量胶原纤维沉积于汇管区,有假小叶出现,证实肝纤维化模型成功建立。治疗组予以 GbE 处理后,可见肝小叶结构基本正常,虽然仍存在细胞气球样变,但未发现明显假小叶和纤维间隔组织结构形成。肝纤维化程度分级结果也显示,治疗

组肝脏纤维化程度较模型组明显减轻。免疫组化染色结果显示,对照组和治疗组 I、Ⅲ型胶原仅在汇管区有所表达,而模型组中,除汇管区外 I、Ⅲ型胶原主要弥漫性分布在肝纤维隔内,经 GbE 灌胃处理后,治疗组肝脏组织 I、Ⅲ型胶原表达水平明显低于模型组($P < 0.01$)。上述结果证实 GbE 对 CCl₄ 所致肝纤维化具有明显的防治作用,可明显减轻 I、Ⅲ型胶原在肝脏组织中的大量沉积。

国内外研究发现肝纤维化的实质是 ECM 合成与代谢失衡,ECM 合成过多或降解减少而在肝内过度沉积引起的,主要是 I、Ⅲ型胶原的沉积。在肝内参与 ECM 降解的主要是基质金属蛋白酶(MMPs),其中间质胶原酶(MMP-1)在降解肝纤维化肝脏 ECM 的主要成分-I、Ⅲ型胶原的降解过程中起重要作用,而对 MMP-1 的活性起重要作用是基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1),TIMP-1 通过 MMPs(主要是 MMP-1)的活性的抑制促进肝纤维化的形成和发展^[12]。正常生理状态下,MMPs 与 TIMPs 处于一种动态平衡状态,共同调节肝脏组织中 ECM 的生成和降解过程,并维持 ECM 的稳定状态。而在病理状态下,MMPs 和 TIMPs 之间失去平衡,从而导致 I、Ⅲ型胶原在肝脏组织内出现过度沉积现象,最终引起肝纤维化^[13]。

本研究结果显示模型组及治疗组肝脏组织 TIMP-1 mRNA、MMP-1 mRNA 表达水平较对照组均显著增高($P < 0.01$),且治疗组 TIMP-1 mRNA 表达水

平明显低于模型组 ($P < 0.01$), 治疗组 MMP-1 mRNA 表达水平明显高于模型组 ($P < 0.01$)。结果显示, GbE 可通过提高 MMP-1 表达和抑制 TIMP-1 表达的作用。

综上所述, 抑制 TIMP-1 表达和增强 MMP-1 表达并进一步促进 I、III 型胶原的降解是 GbE 抗肝纤维化的作用机制之一。本研究为 GbE 应用于肝纤维化的临床防治提供了理论依据。

参考文献

- 1 邵海云, 盛延良, 李颖, 等. 银杏叶提取物的药理作用及临床应用[J]. 中医中药, 2007, 34(4): 43-44
- 2 李海龙, 李红. 银杏叶提取物的神经保护作用机制的研究进展[J]. 中医药导报, 2007, 13(7): 111-112
- 3 罗燕军, 于皆平, 罗和生, 等. 银杏叶提取物对四氯化碳诱发大鼠肝纤维化的预防作用[J]. 中华消化杂志, 2004, 24(5): 307-309
- 4 陈炎, 陈亚蓓, 陶荣芳, 等. 银杏叶对慢性乙型肝炎肝纤维化的治疗作用[J]. 世界感染杂志, 2004, 4(3): 225-227
- 5 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(2): 324
- 6 张春兰, 石亚玲. 肝纤维化指标与病毒含量及病理的关系[J]. 肝

- 脏病学杂志, 2000, 16(4): 15
- 7 贾乐陶, 邓素兰, 潘金水. 银杏叶提取物保肝降酶作用的实验研究[J]. 江苏中医药, 2002, 23(3): 39-40
- 8 Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, *et al.* Molecular mechanism of the reversibility of hepatic fibrosis; with special reference to the role of matrix metalloproteinase [J]. J Gastroenterology Hepatology, 2000, 15(suppl): 26-32
- 9 卢忠明. 银杏叶提取物药理作用的生理基础及其临床应用[J]. 广西中医学院学报, 2001, 4(1): 131-133
- 10 Bridi R, Crossetti FP, Steffen VM, *et al.* The antioxidant activity of standardized extract of ginkgo biloba (EGb 761) in rats [J]. Phytother Res, 2001, 15(5): 449-451
- 11 Zhang C, Zu J, Shi H, *et al.* The effect of ginkgo biloba extract (EGb 761) on hepatic sinusoidal endothelial cells and hepatic microcirculation in CCl₄ rats [J]. Am J Chin Med, 2004, 32(1): 21-31
- 12 蕲艾提取液对免疫性肝纤维化大鼠 I、III 型胶原及基质金属蛋白酶抑制因子-1 表达的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2009, 19(4): 227-228
- 13 帅峰. 中药小柴胡汤对肝纤维化大鼠 MMPs 与 TIMPs mRNA 的影响[J]. 安徽医药, 2009, 13(2): 139-141

(收稿: 2011-06-20)

(修回: 2011-07-07)

替莫唑胺对胶质母细胞瘤化疗的临床观察

王 樑 李 刚 李宝福 冯富强 冀培刚 高国栋

摘要 **目的** 探讨胶质母细胞瘤应用替莫唑胺化疗的疗效。**方法** 回顾性分析接受替莫唑胺化疗的 31 例胶质母细胞瘤患者的临床疗效。**结果** 所有患者均接受超过 3 个周期的替莫唑胺治疗, 6 个月有效率 29.0%, 无进展生存率 64.5%。仅 1 例出现 III 度骨髓抑制。**结论** 胶质母细胞瘤手术和放射治疗后可以应用替莫唑胺化疗。

关键词 胶质母细胞瘤 替莫唑胺 化疗

Clinical Observation of Chemotherapy with Temozolomide in Glioblastoma Multiforme. Wang Liang, Li Gang, Li Baofu, Feng Fuqiang, Ji Peigang, Gao Guodong. Glioma Research and Therapy Center, Department of Neurosurgery, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Shaanxi 710038, China

Abstract Objective To discuss clinical results of chemotherapy with temozolomide in glioblastoma multiforme. **Methods** The clinical results of 31 patients underwent chemotherapy with temozolomide in glioblastoma multiforme were retrospective analyzed. **Results** All of patients completed more than 3 circle chemotherapy with temozolomide. 6-mon effective rate was 29.0%, and 6-mon progression-free survival rate was 64.5%. Only one case appeared myelosuppression. **Conclusion** Chemotherapy with temozolomide is a good choice in glioblastoma multiforme after surgical and radical therapy.

Key words Glioblastoma; Temozolomide; Chemotherapy

胶质瘤是神经系统最常见的肿瘤, 其中恶性程度

最高的胶质母细胞瘤约占胶质瘤的半数左右。胶质瘤的治疗主要以手术以及术后辅助放疗为主, 但是对于恶性程度较高的胶质母细胞瘤需要联合化疗才能得到更好的效果。替莫唑胺是目前应用最广泛的胶质瘤化疗药物之一, 笔者回顾性分析应用替莫唑胺化

作者单位: 710038 西安, 第四军医大学唐都医院神经外科胶质瘤研究治疗中心

通讯作者: 高国栋, 电子信箱: ggudong@fmmu.edu.cn