

银杏内酯 B 对动脉粥样硬化大鼠炎症细胞因子的影响

刘艳茹 镜建军 雷如意 王长娥 张博爱

摘要 目的 探讨银杏内酯 B 对动脉粥样硬化(AS)大鼠血清炎症细胞因子的影响。**方法** 采用高脂饲料喂养和维生素 D₃腹腔注射的方法建立大鼠 AS 模型, 分为正常组、模型组、阳性组(辛伐他汀 5mg/kg)、银杏内酯 B 3 个剂量组(8、4、2mg/kg), 每组 10 只。灌胃给药 4 周后, 各组取主动脉, 光镜下观察病理改变, 进行病变分级评分; 取血清, ELISA 法测定 TNF-α、IL-1 和 IL-6 水平。**结果** 银杏内酯 B 能改善 AS 大鼠的主动脉病变, 高剂量组与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。银杏内酯 B 各剂量可明显降低血清 TNF-α 和 IL-6 水平, 与模型组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。银杏内酯 B 高、中剂量可降低血清 IL-1 水平, 与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 银杏内酯 B 对大鼠 AS 具有一定的治疗作用, 可能与抑制炎症因子的表达有关。

关键词 银杏内酯 B 动脉粥样硬化 TNF-α IL-1 IL-6

[中图分类号] R541

[文献标识码] A

Effects of Ginkgolide B on Inflammatory Cytokines in Rats with Atherosclerosis. Liu Yanru, Suo Jianjun, Lei Ruyi, et al. Department of Internal Neurology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Henan 450052, China

Abstract Objective To investigate the effects of ginkgolide B (GB) on inflammatory cytokines in rats with atherosclerosis (AS).

Methods Rats model of AS was established by administration of high - fat diet and vitamin D₃ (i. p.). Rats were divided into 6 groups ($n = 10$) at random, namely normal, model, positive (simvastatin, 5mg/kg) and GB high, medium and low dose groups (8, 4 and 2mg/kg, respectively). After 4 weeks of oral treatment, the aortic pathologic changes were observed under microscope and graded. The sera of all rats were collected to determine the levels of TNF - α, IL - 1 and IL - 6 by ELISA. **Results** Administration of GB improved the severity of aortic pathology in AS rats, and the pathologic grade of GB high dose group showed a significant difference compared with that of model group ($P < 0.05$). GB (8, 4 and 2mg/kg) markedly decreased the TNF - α and IL - 6 levels in serum of AS rats ($P < 0.01$). Meanwhile, the levels of IL - 1 in GB (8 and 4mg/kg) groups were significantly lowered than the model group ($P < 0.05$).

Conclusion GB shows certain therapeutic effect on AS rats, and the mechanisms may be involved in inhibiting the expression of inflammatory cytokines.

Key words Ginkgolide B; Atherosclerosis; TNF - α; IL - 1; IL - 6

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是引起多种心脑血管疾病的病理生理基础, 其病因病机复杂, 涉及损伤、炎症、免疫功能障碍等方面, 目前尚未见根治 AS 方法的报道^[1]。银杏内酯 B(ginkgolide B, GB)是中药银杏叶的主要活性成分之一, 具有抗过敏、抗炎、抗移植排斥反应及神经保护等作用^[2, 3]。研究表明, 银杏内酯 B 可用于防治脑血管疾病, 其作用机制主要与拮抗血小板活化因子、抑制血栓形成、清除自由基等有关^[4]。已有报道证实银杏内酯 B 可用于防治家兔 AS, 能有效减轻 ApoE 基因敲除小鼠的 AS 损

伤, 本研究建立 AS 大鼠模型, 从炎症细胞因子方面探讨银杏内酯 B 对 AS 的作用, 以期为临床用药提供实验依据^[5-7]。

材料与方法

1. 动物和饲料: SD 大鼠, 雄性, 体重 200 ± 20 g, 由河南省实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK(豫) 2010-0002。高脂饲料配方: 0.2% 丙基硫氧嘧啶、0.5% 胆酸钠、2.5% 胆固醇、10% 猪油、10% 蛋黄粉、76.8% 普通饲料。

2. 药品和试剂: 银杏内酯 B(纯度 $\geq 90\%$), 由 Sigma-Aldrich 公司提供, 用 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)配成适当浓度的混悬液。辛伐他汀片, 由鲁南贝特制药有限公司提供, 药片粉碎后, 以生理盐水配成所需浓度。维生素 D₃ 注射液, 由上海通用药业股份有限公司提供。大鼠肿瘤坏死因子 - α(TNF-α)、白介素 - 1(IL-1)、IL-6 酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒均购自中生北控生物科技股份有限公司。

3. 主要仪器: 酶标仪、全自动脱水机、石蜡包埋机、石蜡切

作者单位: 450052 郑州大学第一附属医院神经内科(刘艳茹、雷如意、王长娥、张博爱); 472143 河南省三门峡市第三人民医院神经内科(镜建军)

通讯作者: 张博爱, 电子信箱: zhangboaidoctor@163.com

片机、光学显微镜。

4. 方法:(1)建立模型^[8]、分组及给药:取大鼠60只,随机分为:正常组、模型组、阳性组(辛伐他汀5mg/kg)、GB高剂量组(8mg/kg)、GB中剂量组(4mg/kg)、GB低剂量组(2mg/kg),每组10只。正常组给予普通饲料,其他组均给予高脂饲料喂养,连续8周。给药前除正常组外,其他各组腹腔注射维生素D₃(7×10⁵U/kg),每天1次,连续3天。之后开始灌胃给药,给药体积按20ml/kg,每天1次,正常组和模型组给予等体积的0.5%CMC-Na溶液。连续给药4周,期间继续给予高脂饲料喂养,并观察动物的一般情况。(2)指标的检测:末次给药后禁食不禁水12h,腹主动脉采血,3500r/min离心5min分离血清,采用双抗体夹心ELISA法上酶标仪检测TNF-α、IL-1和IL-6的表达水平,操作按试剂盒说明书进行。(3)病理组织学观察:动物处死后,分离主动脉周围的结缔组织,剥离全长动脉,将其固定于4%多聚甲醛液中,常规脱水、石蜡包埋、切片,行HE染色,光镜下观察主动脉病变,并进行分级评分^[9]。分级标准:0级,结构正常;I级,内膜有少量泡沫细胞积聚,无明显的凸起斑块;II级,内膜呈节段性病变,可见大量泡沫细胞积聚,有明显的粥样斑块,部分斑块融合成片;III级,内膜表面几乎全被粥样斑块覆盖,斑块内可见组织坏死、钙化,斑块底部肌层萎缩变薄。

5. 统计学方法:采用SPSS 18.0软件进行统计分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料采用两独立样本间t检验,主动脉病变分级采用秩和检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. 银杏内酯B对主动脉病变分级的影响:高脂饲料喂养12周,各组动物均存活。正常组主动脉结构正常,模型组大部分动物的主动脉病变在II级以上。与模型组比较,各给药组的主动脉病变均有所改善,其中银杏内酯B高剂量组与模型组的差异有统计学意义($P < 0.05$,表1)。

表1 各组主动脉病变分级($n = 10$)

组别	剂量 (mg/kg)	分级				平均秩
		0级	I级	II级	III级	
正常组	-	10	0	0	0	11.0 **
模型组	-	1	1	3	5	42.8
GB高剂量组	8	2	5	1	2	30.5 *
GB中剂量组	4	3	2	3	2	31.5
GB低剂量组	2	2	1	4	3	37.1
阳性组	5	3	2	4	1	30.1 *

与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2. 银杏内酯B对血清细胞因子的影响:AS模型组血清TNF-α、IL-1和IL-6水平显著升高,与正常组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。银杏内

酯B各剂量(8、4、2mg/kg)可明显降低血清TNF-α和IL-6水平,与模型组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。银杏内酯B高、中剂量可降低血清IL-1水平,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),细胞因子水平与药物并未呈明显的剂量依赖性(表2)。

表2 银杏内酯B对AS大鼠血清炎症细胞因子的影响($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{ng/L}$)

组别	剂量 (mg/kg)	TNF-α	IL-1	IL-6
正常组	-	7.5 ± 1.0	4.2 ± 0.8	30.2 ± 4.5
模型组	-	39.4 ± 8.3 **	19.8 ± 3.6 **	148.8 ± 40.3 **
GB高剂量组	8	20.1 ± 4.2 △△	15.3 ± 4.2 △	89.0 ± 26.1 △△
GB中剂量组	4	25.8 ± 4.9 △△	16.0 ± 3.3 △	80.6 ± 17.5 △△
GB低剂量组	2	28.5 ± 8.1 △△	21.0 ± 6.9	102.9 ± 29.8 △△
阳性组	5	19.6 ± 6.4 △△	17.1 ± 2.5	86.5 ± 20.7 △△

与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

讨 论

采用高脂饲料喂养和维生素D₃腹腔注射方法建立的大鼠AS模型,是目前研究AS应用较为广泛的动物模型之一^[10]。本研究中,光镜下观察到典型的早期AS的病理形态改变,提示模型建立成功。

作为AS过程中一系列病理生理改变的共同基础,炎症反应贯穿于AS发生、进展及斑块破裂血栓形成的全过程,“炎症学说”已成为AS发病机制的主流学说之一^[11]。在AS早期阶段,单核-吞噬细胞、血管内皮细胞和平滑肌细胞会分泌多种炎症细胞因子(TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8等),这些细胞因子又可诱导平滑肌细胞的凋亡,促进AS的发生和发展^[12]。TNF-α具有抑制内皮细胞增殖、促进凋亡、诱导细胞间黏附分子表达等功能,在AS、代谢紊乱和炎症反应中发挥重要的介导作用,可诱导其他炎症因子的表达和释放^[13]。IL-1可刺激血管内皮细胞增殖,促进中性粒细胞对血管壁的黏附,引起平滑肌细胞增生,在AS的炎症进程中,导致血管壁损伤、增厚、血栓形成^[14]。IL-6是机体对炎性刺激做出反应时分泌的多功能细胞因子,是炎性介质网络的关键成分,参与内皮细胞损伤、单核细胞内膜下迁移和促凝性质的改变,并可与其他炎性因子起协调作用^[15]。Nishida等^[16]临床研究表明,早期AS患者的血清IL-6水平与动脉内膜增厚和动脉弹性功能有一定相关性。

本研究采用银杏内酯B对大鼠早期AS模型进行干预,观察银杏内酯B对炎症细胞因子表达的影响,探讨银杏内酯B对AS大鼠防治作用的可能机

制。结果表明,模型组血清 TNF- α 、IL-1 和 IL-6 水平比正常组明显升高,证实上述炎性介质与 AS 的病情进展密切相关,这与文献报道结论一致^[12, 17]。经药物干预后,银杏内酯 B 各剂量(8、4、2mg/kg)能抑制 TNF- α 和 IL-6 的表达,高、中剂量也能抑制 IL-1 的释放,提示银杏内酯 B 通过降低炎症细胞因子的含量,达到保护血管内皮细胞、延缓细胞因子介导的 AS 进程的作用。这与陈昕琳等^[18]关于丹参多酚酸 B 影响 AS 大鼠炎症因子的研究结果相似。此外,本研究的主动脉病理学观察也证实,银杏内酯 B 能够抑制 AS 大鼠的主动脉粥样病变。

综上所述,银杏内酯 B 对大鼠早期 AS 具有一定的治疗作用,其作用环节可能与保护血管内皮细胞、抑制炎症因子表达有关。

参考文献

- 1 Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis [J]. Nature, 2011, 473(7347): 317–325
- 2 Maclennan KM, Darlington CL, Smith PF. The CNS effects of *Ginkgo biloba* extracts and ginkgolide B [J]. Prog Neurobiol, 2002, 67(3): 235–257
- 3 王旋, 顾振纶, 秦振红, 等. 银杏内酯 A 和 B 混合物对大鼠永久性局灶性脑缺血的保护作用 [J]. 中草药, 2007, 38(2): 241–244
- 4 Xia SH, Fang DC. Pharmacological action and mechanisms of ginkgolide B [J]. Chin Med J, 2007, 120(10): 922–928
- 5 马轶文, 马东明, 卢斌, 等. 银杏内酯 B 对动脉粥样硬化家兔模型血清 CRP 和主动脉 VCAM-1 mRNA 的影响 [J]. 天津中医药大学学报, 2010, 29(2): 84–86
- 6 刘熹昀, 赵革新, 鲍利, 等. 银杏内酯 B 对 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的影响 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(1): 81–84
- 7 Liu X, Zhao G, Yan Y, et al. Ginkgolide B reduces atherogenesis and vascular inflammation in ApoE(-/-) mice [J]. PLoS One, 2012, 7(5): e36237
- 8 Zhou BR, Pan Y, Zhai ZM. Fibrinogen and P-selectin expression in atherosclerosis model of Sprague Dawley rat [J]. Chin Med J, 2011, 124(22): 3768–3772
- 9 王伟, 杨滨, 王岚, 等. 丹参山楂药对对大鼠动脉粥样硬化的影响 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 784–789
- 10 周红, 吴晓燕, 袁艺标, 等. 三种剂量维生素 D₃ 结合高脂饲料建立大鼠动脉粥样硬化模型的比较 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(11): 995–998
- 11 Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis [J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27: 165–197
- 12 Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice [J]. Cardiovasc Res, 2008, 79(3): 360–376
- 13 Sbarsi I, Falcone C, Boiocchi C, et al. Inflammation and atherosclerosis: the role of TNF and TNF receptors polymorphisms in coronary artery disease [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2007, 20(1): 145–154
- 14 Rader DJ. IL-1 and atherosclerosis: a murine twist to an evolving human story [J]. J Clin Invest, 2012, 122(1): 27–30
- 15 Saremi A, Anderson RJ, Luo P, et al. Association between IL-6 and the extent of coronary atherosclerosis in the veterans affairs diabetes trial (VADT) [J]. Atherosclerosis, 2009, 203(2): 610–614
- 16 Nishida M, Moriyama T, Ishii K, et al. Effects of IL-6, adiponectin, CRP and metabolic syndrome on subclinical atherosclerosis [J]. Clin Chim Acta, 2007, 384(1–2): 99–104
- 17 Björkbacka H, Fredrikson GN, Nilsson J. Emerging biomarkers and intervention targets for immune modulation of atherosclerosis – a review of the experimental evidence [J]. Atherosclerosis, 2013, 227(1): 9–17
- 18 陈昕琳, 顾仁樾, 章怡伟. 丹参多酚酸 B 对动脉粥样硬化大鼠炎症细胞因子的影响 [J]. 上海中医药大学学报, 2011, 25(1): 63–66
(收稿日期: 2014-01-20)
(修回日期: 2014-02-13)

增加静脉输液预防椎管内阻滞分娩镇痛产时发热的效果观察

符白玲 李 煜 胡顺平 刘惠英 毕 佳

摘要 目的 探讨分娩过程中增加静脉输液预防椎管内阻滞分娩镇痛产时发热的临床效果及对分娩结局的影响。**方法** 纳入研究 ASA I ~ II 级的产妇 780 例, 随机分为实验组 388 例和对照组 392 例, 两组均于宫口开至 2~3cm 时实施椎管内阻滞分

作者单位: 510623 广州市妇女儿童医疗中心

通讯作者: 李煜, 电子信箱: lytbl@163.com