

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.26.001

文章编号: 1005-8982(2017)26-0001-06

基础研究·论著

银杏叶提取物对 COPD 大鼠肺组织超微结构的影响*

潘玲, 邓祯, 谭玉萍, 杨红梅, 杨益宝, 梁炜, 李瑞祥

(广西中医药大学附属瑞康医院, 广西 南宁 530011)

摘要:目的 研究银杏叶提取物(GBE)对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠肺组织超微结构的影响。**方法** 将清洁级 7 周龄雄性 Wistar 大鼠 90 只称重,随机分组为正常对照组(A组)、COPD 对照组(B组)、银杏叶提取物早期干预组(C组)、银杏叶提取物后期干预组(D组)、红霉素早期干预组(E组)、红霉素后期干预组(F),并复制模型。每组随机选取 6 只,利用透射电镜,观察各组大鼠肺组织超微结构改变,计算线粒体病变率。**结果** B、C、D、E、F 组有 COPD 特征性改变,但程度不同。电镜下观察各组较 B 组结构更完整,线粒体各种病变发生率降低($P < 0.05$),提示各治疗组对 COPD 大鼠有积极治疗作用。**结论** GBE 能够延缓和改善 COPD 大鼠模型的形成。

关键词: 慢性阻塞性肺疾病;银杏叶提取物;超微结构;线粒体病变率

中图分类号: R541.5

文献标识码: A

Effect of *Ginkgo biloba* extract on pulmonary ultrastructures of rats with chronic obstructive pulmonary disease*

Ling Pan, Zhen Deng, Yu-ping Tan, Hong-mei Yang,

Yi-bao Yang, Wei Liang, Rui-xiang Li

(Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine,
Nanning, Guangxi 530011, China)

Abstract: Objective To study the intervention effect of *Ginkgo biloba* extract (GBE) on the pulmonary ultrastructural changes in rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** Ninety Wistar rats were randomly divided into normal control group (group A), COPD control group (group B), early-stage GBE treatment group (group C), late-stage GBE treatment group (group D), Erythromycin early-treatment group (group E), and Erythromycin late-stage treatment group (group F). Six rats were randomly selected from each group, ultrastructural changes of the lungs were observed by transmission electron microscopy, and the rates of pathological changes of mitochondria were calculated. **Results** The groups B, C, D, E and F all showed characteristic pathological changes of COPD to different extent. Under the transmission electron microscope, the ultrastructures in the groups C, D, E and F were more complete than those in the group B, and the rates of mitochondrial lesions were conspicuously lowered in the treatment groups, suggesting that GBE had a positive therapeutic effect. **Conclusions** GBE has inhibitory effects on airway and vascular remodeling in rat model of COPD.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease; *Ginkgo biloba* extract; ultrastructure; rate of mitochondrial lesion

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种累及气道、肺实质及

收稿日期: 2017-01-11

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81260005)

[通信作者] 谭玉萍, Tel: 0771-2326770; E-mail: tanlaoshi1226@126.com

肺血管的常见慢性疾病。其特征是慢性炎症的发展引起气道重塑,导致气流受限和肺组织破坏^[1-2]。其高发率与吸烟及空气污染密切相关。前期研究证实,银杏叶提取物(ginkgo biloba extract, GBE)能抑制肺气肿的形成及肺血管重塑,早期干预效果更好^[3-4]。本研究在前期研究的基础上,设红霉素早、晚期对照组,分别与 GBE 早、晚期干预组对比,在电镜下观察 GBE 和红霉素对 COPD 大鼠肺组织超微结构的影响,研究两者对 COPD 大鼠的疗效及其区别。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 主要试剂、材料及仪器 脂多糖(美国 Sigma 公司),过滤嘴香烟(南宁卷烟厂真龙牌香烟,尼古丁 1.2 mg/支,焦油 19 mg/支)。自制有机玻璃密闭箱(规格:80 cm × 60 cm × 50 cm,上方有一通气孔,半径为 0.6 cm),透射电镜(广西医科大学电镜室提供,机型:日立 HITACH H-7650),舒血宁注射液主要成分为 GBE,规格:5 ml/支,GBE 17.5 mg/支,河北神威药业有限责任公司生产,注射用乳糖酸红霉素 30 万 u/瓶(大连美罗大药厂生产)。

1.1.2 动物选择及分组 7 周龄健康清洁级雄性 Wistar 大鼠(广西医科大学动物实验中心供给,动物编号:SCXK20090002)90 只,称重后随取分为正常对照组(A 组)、COPD 对照组(B 组)、GBE 早期干预组(C 组)、GBE 后期干预组(D 组)、红霉素早期干预组(E 组)、红霉素后期干预组(F 组)。

1.2 方 法

1.2.1 动物模型的复制 A 组无需复制模型,于第 1 和第 14 天向大鼠气管内注入 0.9%氯化钠溶液(2 ml/kg)。B、C、D、E、F 组采取烟雾吸入、气管内注入脂多糖、冷空气刺激复制 COPD 模型。28 d 后,随机处死 B、C、D、E、F 组大鼠各 2 只,以确认模型复制成功。

1.2.2 COPD 动物模型评估 光镜下观察大鼠肺组织有以下 COPD 病理特征:各级支气管周围有炎症细胞浸润,气道重塑,部分肺泡融合,甚至形成肺大泡。电镜下可见支气管纤毛柱状上皮细胞胞浆肿大,呈大泡样突起,部分纤毛脱落,未脱落的变短;Ⅱ型肺泡上皮细胞明显变性,结构不清,核膜破坏,核染色质边聚,板层小体减少,线粒体肿胀、空泡化、嵴破坏甚至消失,内质网扩张。血管内皮细胞肿胀变形,见大量成纤维细胞,提示 COPD 模型复制成功。

1.2.3 药物干预 实验第 1~14 天,C 组用 GBE 干预,E 组用红霉素干预;A、B、D、F 组用生理盐水对照。实验第 29~42 天,D 组用 GBE 干预,F 组用红霉素干预;A、B、C、E 组用生理盐水对照。用药量:C、D 组 0.4 ml/(kg·d)(根据成人标准量 0.29 ml/kg,采取体表面积比值法:大鼠用药量 = 成人量 × 70/56);E、F 组红霉素用药量根据体表面积换算为 10 mg/kg²;A、B 组用生理盐水(1 ml/只,1 次/d)对照。采用腹腔注射给药。

1.2.4 标本采集及制作 实验完成后(即第 43 天),6 组大鼠用 10%乌拉坦麻醉,随后每组随机选 6 只剖取右肺下支气管和肺组织 1 mm × 1 mm × 1 mm,置于 2.5%戊二醛固定液,1%锇酸固定,醋酸双氧铀块染,脱水,EUP 812 包埋剂包埋。用钻石刀切 500 A 超薄片,200 目铜网捞起,醋酸双氧铀滴染,柠檬酸铅复染,再进行投射电镜观察。

1.2.5 电镜检测 采用电子透射电镜观察,并且随机拍摄全貌、局部及细胞器图像,观测并对比各组Ⅱ型肺泡上皮细胞、血管内皮细胞及成纤维细胞的超微结构变化。并计算线粒体和线粒体嵴的数量,计算每组每幅图像里有病变征象的线粒体和线粒体嵴所占百分比。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SAS 9.3 统计软件,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较用方差分析,方差齐则两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠一般情况

实验中因麻醉意外导致 E 组大鼠死亡 1 只。实验前后 6 组大鼠体重比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)(见表 1)。实验后 B 组与其余 5 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),E 组与 C、D 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),其他各组相互比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)(见表 1)。精神状况:A 组良好,B 组较差,C、E 组一般,D、F 组稍差;进食情况:A 组良好,B 组较差,C、E 组一般,D、F 组稍好。

2.2 肺组织外观

解剖各组大鼠,A 组大鼠两肺形态正常,色淡粉,触之光滑,质地柔软,气管及支气管未见明显分泌物;余各组均发现大鼠两肺体积不同程度地增大,颜色较暗且略带苍白,触之粗糙,质地偏韧硬,气道

黏膜红肿,有较多的黏性分泌物。其中以 B 组情况最为严重。

表 1 各组大鼠实验前后体重比较 ($n=13, g, \bar{x} \pm s$)

组别	实验前大鼠体重	实验后大鼠体重
A 组	270.503 ± 14.423	294.426 ± 24.448
B 组	234.889 ± 17.003	264.811 ± 23.333
C 组	239.064 ± 15.519	315.813 ± 33.701
D 组	234.943 ± 11.527	308.462 ± 25.976
E 组	248.496 ± 20.971	288.418 ± 17.257
F 组	239.814 ± 15.504	292.687 ± 23.351
F 值	9.326	6.452
P 值	0.000	0.000

2.3 电镜观察结果

2.3.1 肺泡上皮细胞改变 A 组大鼠支气管上皮细胞纤毛排列整齐,基本无脱落、紊乱;肺组织 I、II 型肺泡上皮细胞无异常,血管内皮细胞膜完整。其中, I 型肺泡上皮细胞胞浆内细胞器较少, II 型肺泡上皮细胞胞浆内富含板层小体及线粒体,板层小体结构正常,平行分布,线粒体嵴完整,未见肿胀或变形。B 组支气管上皮细胞纤毛脱落、紊乱; I、II 型肺泡上皮细胞结构严重异常,血管内皮细胞膜变性,微绒毛减少、断裂甚至脱落;肺泡内可见上皮细胞坏死、脱落,并部分腔内可见渗出物; I 型上皮细胞出现增生, II 型上皮细胞可见损害性变化,部分板层小体明显溶解,呈排空状,肺泡腔内可见较多表面活性物质。部分线粒体肿胀明显,嵴断裂或消失,内皮外基膜多处不完整,部分并有内质网扩张和肺泡壁纤维组织弥漫性增生。肺气-血屏障有损伤,基底膜较 A 组变薄,部分有断裂,肺泡隔毛细血管腔内凝血。C 组与 E 组类似,大鼠支气管纤毛排列较整齐,有少量脱落、紊乱;大鼠肺组织细胞微绒毛减少、断裂情况少见;肺泡上皮细胞中的巨噬上皮细胞有所增多,体积较大,细胞浆丰富;板层小体空泡化少;肺泡腔内脱落的如巨噬细胞等炎症细胞较少,渗出物较少。并可见成纤维细胞少量增生。D 组与 F 组类似,大鼠支气管纤毛较紊乱,可见脱落及紊乱,情况较 B 组轻,肺组织细胞微绒毛减少、断裂情况较 C 组和 E 组稍严重;肺泡上皮细胞中的巨噬上皮细胞增多;板层小体空泡化较多;肺泡腔内脱落的如巨噬细胞等炎症细胞及渗出物较多。见图 1。

2.3.2 血管内皮细胞改变 A 组大鼠血管内皮细胞膜未发生破裂,内质网无扩张。B 组血管内皮细胞肿

胀变形,甚至有细胞核染色质高度致密,呈核固缩表现。C 组和 E 组血管内皮细胞肿大变形。D 组和 F 组血管内皮细胞肿胀变形,程度较 C 组和 E 组加重。见图 2。

2.3.3 成纤维细胞改变 A 组大鼠电镜下可见成纤维细胞数量少,胞体较小。B 组大鼠电镜下可见成纤维细胞数量明显增多。C 组和 E 组电镜下可见成纤维细胞有增多,但不明显。D 组和 F 组可见成纤维细胞增多,程度较 C 组和 E 组稍严重。见图 3。

2.3.4 各组大鼠肺组织线粒体病变率比较 B 组较 A 组的线粒体肿胀肥大、空泡变及嵴突病变的病变率均增高,而 C、D、E、F 组的线粒体各种病变率较 A 组增高,而较 B 组降低。其中 C、D、E、F 组中,C、E 组较 D、F 组的病变率低,C、D 组较 E、F 组有所降低($P < 0.05$)。可见药物干预能一定程度降低 COPD 大鼠肺组织的线粒体病变率,以 GBE 早期干预的效果最佳。见表 2。

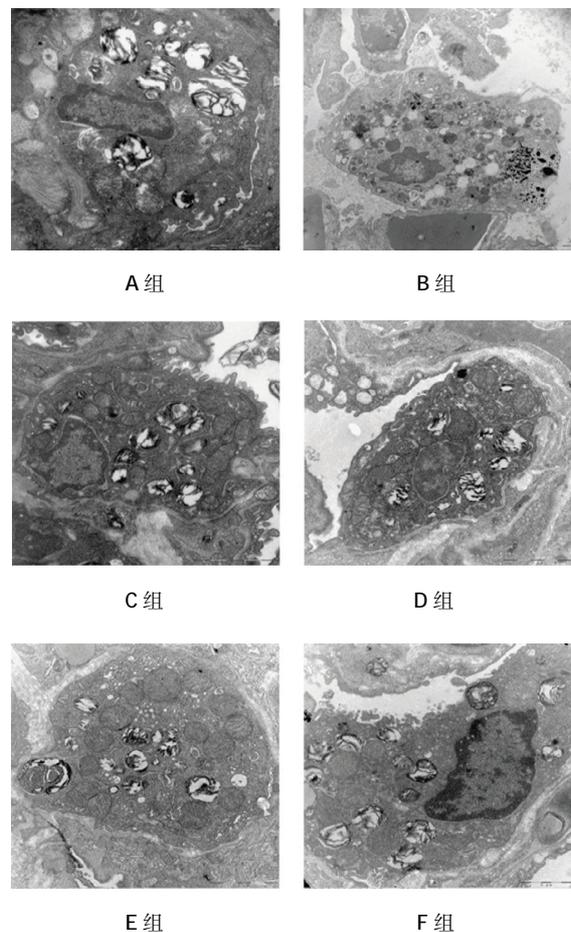


图 1 各组 II 型肺泡上皮细胞 (电镜 × 20 000)

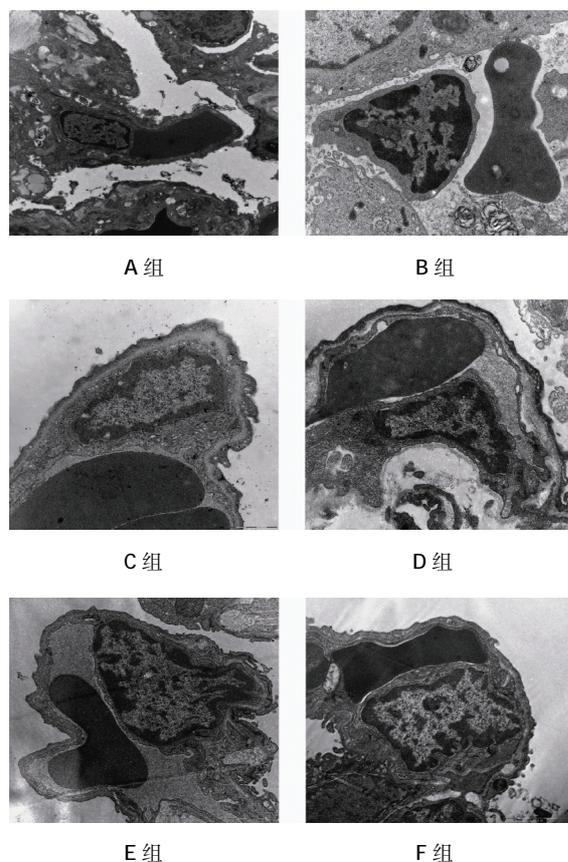


图 2 各组血管内皮细胞 (电镜×30 000)

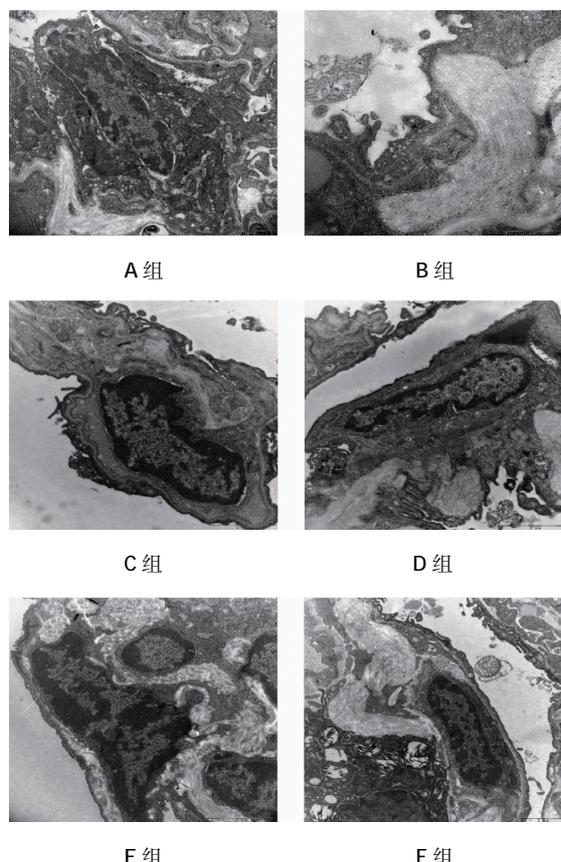


图 3 各组成纤维细胞 (电镜×30 000)

表 2 各组大鼠肺组织线粒体病变率比较 (n=13, $\bar{x} \pm s$)

组别	病变线粒体 / 个	肿胀肥大 / %	空泡变 / %	嵴突病变 / %
A 组	21.133 ± 1.192	20.745 ± 1.481	20.604 ± 1.476	21.561 ± 1.994
B 组	78.296 ± 3.453	85.862 ± 5.643	77.952 ± 1.101	80.184 ± 3.621
C 组	42.508 ± 3.967	41.809 ± 3.064	25.986 ± 1.593	30.993 ± 2.681
D 组	52.891 ± 4.143	48.744 ± 1.231	38.981 ± 2.768	24.882 ± 1.041
E 组	44.554 ± 4.156	43.417 ± 2.949	27.011 ± 1.682	33.731 ± 2.706
F 组	56.013 ± 4.193	50.134 ± 1.832	40.041 ± 2.924	28.232 ± 1.334
F 值	156.318	282.929	625.127	496.008
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

3 讨论

COPD 发病的普遍性及危害性,给社会造成巨大危害,给患者造成巨大的经济负担。目前认为 COPD 发病的中心环节是气道炎症,在气道、肺实质及肺血管都存在肺泡巨噬细胞和中性粒细胞增加,激活的炎症细胞可释放 TNF- α 、IL-8、IFN- γ 等多种炎症介质,以上多种炎症介质能使肺组织的结构产生毁损,并有促进粒细胞炎症反应的作用^[9]。有文献表明,气道、肺血管的慢性炎症反应导致结构变化,在 COPD 发病机制中发挥重要的作用,产生该作用可

能与氧化应激的线粒体功能障碍有关^[6-7]。经常吸烟或处在污染空气中易引起内皮功能受损,内皮细胞功能异常被认为是血管增殖和血管结构异常的最主要因素之一^[8]。有学者电镜下观察,暴露于烟草、烟雾及脂多糖可造成肺组织毛细血管内皮细胞线粒体减少、水肿,饮泡增多,与基底膜连接处增厚,肺小动脉内弹力膜菲薄、断裂,管壁大量胶原纤维增生,而预防性使用红霉素可干预上述的超微结构变化,电镜下可见内皮细胞无明显脱落,管壁平滑肌增殖,但胶原纤维增生明显减少^[9-11]。邵有和^[12]和欧莉梅等^[13]研

究证实,红霉素治疗 COPD 稳定期能降低痰白细胞总数和中性粒细胞比例,急性发作次数明显减少,说明红霉素对控制 COPD 急性发作是有积极意义的。张军等^[14]的研究进一步说明,红霉素不但能预防 COPD 患者的急性发作,而且能降低 COPD 急性发作的严重程度。

积极探索应用中医中药治疗 COPD 对于控制发病次数、降低病死率、减轻社会负担有重要的意义。银杏叶治疗肺系疾病在我国有着十分悠久的历史,最早载于《神农本草经》,有润肺、止咳、平喘的功效。GBE 是银杏树干燥叶的提取物,成分主要为黄酮类、萜内酯类,以及少量的多酚类、生物碱、长链醇、酮类及微量元素等。近年来国内外研究表明,GBE 具有抗氧化,清除自由基,拮抗 PAF,抑制细胞凋亡,调节细胞间黏附分子-1 表达及兴奋性氨基酸释放,改善微循环等多种作用^[15]。

本实验参照刘鑫等^[16]的烟雾吸入、气道内注入脂多糖联合冷空气刺激的方法复制 COPD 模型,分别用 GBE 和红霉素进行早、晚期干预。用足疗程后观察大鼠一般情况,电镜下观察气管和肺血管的变化情况。结果显示,造模未治疗组存在 COPD 急性加重的症状,经过治疗后各组症状有所减轻,其中 C 组和 E 组情况最好。解剖各组大鼠发现,造模组颜色较暗且带有苍白色,触之粗糙,质地偏韧硬,气道黏膜肿胀,可见有较多的黏性分泌物。治疗组情况较造模组改善。电镜下观察 GBE 干预组和红霉素干预组大鼠支气管纤毛排列较整齐,有少量脱失、紊乱;大鼠肺组织细胞微绒毛减少、断裂情况少见;肺泡上皮细胞中的巨噬上皮细胞增多,体积较大,细胞浆丰富;板层小体空泡化少;肺泡腔内脱落的如巨噬细胞等炎症细胞较少,渗出物较少;且 GBE 干预组和红霉素干预组大鼠肺组织线粒体的病变率较造模组减少。以上说明 GBE 能一定程度上减轻支气管和小动脉周围的炎症反应,从而抑制其结构重塑。这与红霉素的作用效果类似。有研究证实,红霉素不仅具有抗菌作用,在治疗 COPD 时其免疫调节作用可能比抗菌作用更为重要^[17]。早期研究证实 GBE 能抑制肺泡融合等肺泡结构改变,还对减少腺泡内肺血管壁周围的炎症细胞、肺动脉血管平滑肌细胞增殖,抑制肺血管重塑有较好的效果。刘忠等^[18-19]研究表明,GBE 可降低 AE-COPD 血清中 IL-8 和 TNF- α 浓度,抑制 COPD 大鼠 ET-1、TGF- β_1 水平,对 AE-COPD 气道炎症具有抑制作用。GBE 对 COPD 模型大鼠的

肺脏具有治疗作用,可能是其重要作用机制。楼黎明等^[20]的研究结果表明,GBE 可降低 AE-COPD 患者血清 E-selectin 和 VCAM-1 水平,改善肺功能,与本研究结果一致。

综上所述,GBE 能在一定程度上延缓和改善大鼠肺组织及肺血管周围炎症,抑制支气管、肺血管结构重塑,延迟肺间质纤维化的进展,降低线粒体的病变率。其作用与红霉素类似,并有可能优于红霉素,进一步研究 GBE 的具体抗炎机制将是笔者接下来的研究方向。

参 考 文 献:

- [1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013年修订版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2013, 36(4): 255-264.
- [2] VESTBO J, HURD S S, AGUSTI A G, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 187(4): 347-365.
- [3] 谭玉萍, 王朝晖, 蒙定水, 等. 银杏叶提取物可抑制慢性阻塞性肺疾病大鼠气道及肺血管重塑[J]. 中国呼吸与危重杂志, 2008, 7(4): 274-276.
- [4] 谭玉萍, 王朝晖, 蒙定水, 等. 银杏叶提取物对肺气肿大鼠血管内皮生长因子的影响[J]. 广西医科大学学报, 2010, 27(2): 208-210.
- [5] 郑大炜. 氨溴索对慢性阻塞性肺疾病患者血清 IFN- γ 、IL-8 及 CRP 的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(15): 51-53.
- [6] 付东伟, 崔吉宏, 涂钰林. 沙美特罗替卡松与氨茶碱联合治疗对慢性阻塞性肺疾病急性加重期疗效和氧化应激的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27(2): 119-122.
- [7] WIEGMAN C H, MICHAELOUDES C, HAJI G, et al. Oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction drives inflammation and airway smooth muscle remodeling in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. J Allergy Clin Immunol, 2015, 136(3): 769-780.
- [8] DOYLE M F, TRACY R P, PARIKH M A, et al. Endothelial progenitor cells in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema[J]. PLoS One, 2017, 12(3): DOI: 10.1371/journal.pone.0173446.
- [9] ZHANG M, XIE Y, YAN R, et al. Curcumin ameliorates alveolar epithelial injury in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Life Science, 2016, 164: 1-8.
- [10] 张健全, 陈珣珣, 梁毅, 等. 吸烟肺功能正常者及吸烟 COPD 患者肺小动脉超微结构的研究[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2010, 9(5): 465-470.
- [11] 周广, 梁毅, 钟小宁, 等. 红霉素对烟草烟雾暴露致肺气肿大鼠肺血管超微结构的影响[J]. 广西医科大学学报, 2014, 31(6): 926-928.
- [12] 邵有和, 陈昌枝, 覃淑娟, 等. 小剂量红霉素对慢性阻塞性肺疾病稳定期患者免疫功能的干预研究[J]. 中华肺部疾病杂志: 电子

- 版, 2015, 8(4): 431-435.
- [13] 欧莉梅, 钟小宁, 何志义, 等. 小剂量红霉素治疗稳定期慢性阻塞性肺疾病临床效果的研究[J]. 中国实用内科杂志, 2010, 30(12): 1097-1100.
- [14] 张军, 赵菲, 卢翔, 等. 小剂量红霉素治疗减少 COPD 患者急性加重作用[J]. 中国医学工程, 2014, 22(4): 16-19.
- [15] DIAMOND B J, BAILEY M R. Ginkgo biloba: indications, mechanisms, and safety[J]. Psychiatr Clin North Am, 2013, 36(1): 73-83.
- [16] 刘鑫, 王小莉, 胡耀明, 等. FIZZ1 在 COPD 大鼠肺组织中的动态表达[J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(4): 9-13.
- [17] WAN R F, HUANG Z H, JING K, et al. Azithromycin attenuates pulmonary inflammation and emphysema in smoking-induced COPD model in rats [J]. Respiratory Care, 2015, 60(1): 128-134.
- [18] 刘忠, 刘馨, 许国岩, 等. 银杏叶提取物对慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者白细胞介素 -8 和肿瘤坏死因子 - α 的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2011, 32(6): 482-484.
- [19] 刘忠. 银杏叶提取物对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠 ET-1、TGF- β_1 的影响[J]. 中国药房, 2011, 22(43): 4051-4053.
- [20] 楼黎明, 胡丹丹, 董浙清, 等. AECOPD 患者细胞黏附分子变化及其临床意义的研究[J]. 现代实用医学, 2011, 23(5): 501-506.

(童颖丹 编辑)