

冠心病患者外周血单核细胞源性巨噬细胞清道夫受体活性变化及银杏叶提取物的干预作用

朱贵月¹ 朱兴雷¹ 耿庆信² 张兴华¹ 邵建华¹

摘要 **目的** 观察冠心病患者外周血单核细胞(peripheral blood monocyte, PBMs)转化为巨噬细胞清道夫受体活性及血清炎症因子的变化及银杏叶提取物(Ginkgo biloba extract, GBE)对清道夫受体活性的影响,探讨炎症因子水平与清道夫受体活性关系及 GBE 稳定粥样硬化斑块的可能机制。**方法** 97 例血脂正常的冠心病患者分为稳定性心绞痛组、不稳定性心绞痛组、急性心肌梗死组,29 名健康人作为对照组。测定所有观察对象血清 C 反应蛋白(CRP)、可溶性细胞间黏附分子-1(soluble intercellular adhesion molecule-1 sICAM-1)、可溶性血管细胞黏附分子-1(soluble vascular cell adhesion molecule-1, sVCAM-1)水平;并在体外分离培养 PBMs 转化为巨噬细胞,观察 GBE 对其表达清道夫受体的影响。**结果** 巨噬细胞清道夫受体活性及血清 CRP、sICAM-1、sVCAM-1 水平,急性心肌梗死组>不稳定性心绞痛组>稳定性心绞痛组>对照组。GBE 能下调冠心病患者 PBMs 源性巨噬细胞清道夫受体活性。**结论** 冠心病患者 PBMs 源性巨噬细胞清道夫受体活性与 CRP、sICAM-1、sVCAM-1 呈正相关,PBMs 源性巨噬细胞清道夫受体活性可作为易损斑块活动程度的监测指标;GBE 可抑制冠心病患者血 PBMs 源性巨噬细胞清道夫受体活性。

关键词 冠心病;单核细胞源性巨噬细胞;清道夫受体;C-反应蛋白;细胞间黏附分子;银杏叶提取物

Change of Peripheral Blood Monocytes Derived Macrophage Scavenger Receptors Activity in Patients with Coronary Heart Disease, and the Intervention Effect of Ginkgo Biloba Extract ZHU Gui-yue, ZHU Xing-lei, GENG Qing-xin, et al *Department of Cardiology, Shandong Provincial Hospital, Shandong University, Jinan (250021)*

Objective To observe the activity of peripheral blood monocytes (PBMs) derived macrophage scavenger receptors (MSR) and changes of serum inflammatory factor in peripheral blood in patients with coronary heart disease (CHD), and to evaluate the effect of Ginkgo biloba extract (GBE) on the MSR activity, to explore the relationship between inflammatory factor and scavenger receptors activity as well as the possible mechanism of GBE in stabilizing the atheromatous plaque. **Methods** Ninety-seven CHD patients with normal blood lipids were classified into the stable angina group, the unstable angina group and the acute myocardial infarction group, and 29 healthy persons were taken as control. Levels of C-reactive protein (CRP), soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) in all subjects were determined. And their PBMs were isolated, cultured *in vitro*, and transferred into macrophage to observe the effect of GBE on the expression of scavenger receptors. **Results** The levels of MSR activity, CRP, sICAM-1 and sVCAM-1 in patients with acute myocardial infarction > unstable angina > stable angina > control. **Conclusion** GBE could down-regulate the MSR activity in CHD patients, which was positively correlated with levels of CRP, sICAM-1 and sVCAM-1. MSR activity could be taken as a monitoring criteria for active degree of vulnerable atherosclerosis plaque. GBE has the effect of suppressing MSR activity.

Key words coronary heart disease; monocyte derived macrophage; scavenger receptors; C-reactive protein; intercellular adhesion molecule; Ginkgo biloba extract

基金项目:山东省自然科学基金课题(No. Y2002C27)

作者单位:1. 山东大学山东省立医院心内科(济南 250021);2. 山东省济南市中心医院

通讯作者:朱贵月, Tel: 0531-6657756, E-mail: zhuguiyue@126.com 或 zgymd@163.com

血液中单核细胞黏附、迁移至内皮下分化为巨噬细胞,通过其表面的大量的“清道夫受体”吞噬 OX-LDL 形成泡沫细胞是早期动脉粥样硬化形成的关键环节^[1,2]。巨噬细胞清道夫受体的活性与动脉粥样硬化斑块易损性关系如何?临床报道银杏叶提取物(ginkgo biloba extract, GBE)具有减轻氧化应激、拮抗血小板激活因子作用^[3],该类物质是否抑制巨噬细胞清道夫受体的活性而预防动脉粥样硬化形成?笔者前瞻性研究 97 例冠心病患者外周血单核细胞体外衍化为巨噬细胞,观察其清道夫受体表达及 GBE 干预情况,现报道如下。

资料与方法

1 临床资料 97 例均为 2002 年 6 月—2004 年 3 月在山东省立医院、齐鲁医院、山东省千佛山医院心内科住院临床诊断为冠心病且血脂正常患者,均经冠状动脉造影证实有 1 支或 1 支以上冠状动脉主要分支狭窄率 > 50%。根据冠心病分型诊断标准^[4]分为 3 组:急性心肌梗死(AMI)组 33 例,男 19 例,女 14 例;年龄 41~73 岁,平均(55.8±16.9)岁;病程 0.5~12 年,平均(2.6±4.8)年。不稳定性心绞痛(UAP)组 32 例,男 17 例,女 15 例;年龄 43~74 岁,平均(57.4±15.1)岁;病程 1~15 年,平均(4.6±6.7)年。稳定性心绞痛(SAP)组 32 例,男 16 例,女 16 例;年龄 45~70 岁,平均(55.8±14.9)岁;病程 2~10 年,平均(4.1±3.9)年。以同期住院行冠状动脉造影排除冠心病者为正常对照组,共 29 名,男 19 名,女 10 名;年龄 46~72 岁,平均(57.7±16.4)岁。所有受试者近期均无感染性疾病和肿瘤新生物,未用过类固醇类药物,且无肝、肾及其他心血管疾病。

2 方法

2.1 血清 C 反应蛋白(CRP)、可溶性细胞间黏附分子-1(sICAM-1)、可溶性血管细胞黏附分子-1(sVCAM-1)的测定 于冠状动脉造影的同时,在股动脉内取动脉血 5ml,采用 ELISA 双抗体夹心法,按试剂盒(美国 AMRESCO 公司提供)说明书测定 CRP、sICAM-1 和 sVCAM-1 含量,分析仪器为 SPECTRA-MAX250 全自动酶标仪(波长为 450~690nm,美国 Sigma 公司产品),具体方法按操作说明书进行。

2.2 外周血单核细胞的分离、培养及转化为巨噬细胞 于行冠状动脉造影的同时,在股动脉内取动脉血 10~20ml,肝素抗凝,立即置 4℃ 冰箱降温,以抑制血中单核细胞的活性,30min 后用密度梯度离心法分离单个核细胞,根据单核细胞贴壁的特性,分离出单核

细胞,贴壁的单核细胞置含 10% 人 AB 血清的 RPMI 1640 培养液中培养,Giemsa 染色纯度 90% 以上,2% 台盼蓝染色示细胞活力 > 95%。实验前用 50ng/ml 组织纤维蛋白溶酶原激活物(TPA)刺激 72h,使单核细胞分化为巨噬细胞,再用无 TPA 的 RPMI 1640 培养 48h。所有转化获得的巨噬细胞均分为两份:一份只加培养基,另一份加 2.5μg/L GBE(贵州益佰制药公司产品),于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中继续培养 24h 后用于检测。

2.3 巨噬细胞清道夫受体活性测定 取 1×10⁹/L 巨噬细胞,在培养基中加入 10μg/ml 的 Dil-AC-LDL 孵育 3h 后,胰蛋白酶-EDTA 消化,用含 5% 甲醛 PBS 液固定,PBS 洗涤,在流式细胞仪上检测 555~600nm 范围内的荧光信号,以 Dil 标记阳性的细胞比例和平均荧光强度为参数,并观察巨噬细胞 SR-A 与特异性配体 AC-LDL 的结合能力。以与特异性配体 AC-LDL 的结合能力代表巨噬细胞清道夫受体活性。

3 统计学方法 使用 SPSS 10.0 T 统计软件进行分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验及直线相关分析。

结 果

1 各组患者血清 CRP、sICAM-1 和 sVCAM-1 水平比较 见表 1。UAP、SAP、正常对照组 CRP、sICAM-1 和 sVCAM-1 水平均较 AMI 组为低,差异均有显著性(均 *P* < 0.01),UAP 组较 SAP、正常对照组显著升高(均 *P* < 0.01),SAP 组又较正常对照组显著升高(*P* < 0.01)。表明急性冠脉综合征患者不稳定斑块破裂导致炎症反应较稳定型心绞痛及正常对照组明显。

表 1 各组患者血清 CRP、sICAM-1 和 sVCAM-1 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CRP(mg/L)	sICAM-1(μg/L)	sVCAM-1(μg/L)
正常对照	29	3.82±1.05* [△]	123.2±21.1* [△]	277.4±37.5* [△]
SAP	32	8.35±2.19* [△]	198.4±33.2* [△]	400.9±51.3* [△]
UAP	32	15.22±2.64*	368.3±43.6*	618.9±52.9*
AMI	33	19.21±3.09	430.7±46.8	791.0±55.7

注:与 AMI 组比较,**P* < 0.01;与 UAP 组比较,[△]*P* < 0.01;与 SAP 组比较,[▲]*P* < 0.01

表 2 各组患者巨噬细胞清道夫受体活性(荧光阳性细胞的百分比)比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	单纯培养基	加入银杏叶提取物
正常对照	29	3.3±0.5* [△]	2.7±0.6* [°]
SAP	32	6.9±1.2* [△]	3.5±0.7* [°]
UAP	32	10.7±1.7*	3.9±0.6* [°]
AMI	33	12.5±2.2	4.1±0.8 [°]

注:与 AMI 组比较,**P* < 0.01;与 UAP 组比较,[△]*P* < 0.01;与正常对照组比较,[▲]*P* < 0.01;与单纯培养基比较,[°]*P* < 0.01

2 各组患者巨噬细胞清道夫受体活性比较 见表 2。UAP、SAP、正常对照组巨噬细胞清道夫受体活性均比 AMI 组为低,差异均有显著性($P < 0.01$),UAP 组较 SAP、正常对照组均显著升高($P < 0.01$),SAP 组较正常对照组显著升高($P < 0.01$)。加入 GBE 后各组清道夫受体活性均比未加时明显降低($P < 0.01$)。

3 清道夫受体活性与血清 CRP、sICAM-1 和 sVCAM-1 水平的相关性 采用直线回归与相关分析,126 例研究对象(冠心病 97 例与正常对照 29 例)巨噬细胞清道夫受体活性与 CRP、sICAM-1 和 sVCAM-1 水平呈正相关(相关系数分别为 0.873、0.801、0.774,均 $P < 0.01$),表明与血清 CRP、sICAM-1 和 sVCAM-1 一样,清道夫受体活性可作为冠心病患者炎症反应指标。

讨 论

炎症反应在冠状动脉粥样硬化性心脏病发病事件中的作用越来越受到重视,研究表明血清 CRP、细胞黏附分子(如 sICAM-1、sVCAM-1 等)水平与冠状动脉不稳定粥样斑块活动性呈正相关^[2],可作为急性冠状动脉综合征的重要预测指标。CRP 在经冠状动脉造影证实的冠心病患者中血清含量是健康人的两倍,心肌梗死患者是健康人的 4 倍,与文献报道一致^[5,6]。

但炎症反应与动脉粥样硬化关系如何?是炎症反应促进动脉粥样斑块形成,还是动脉粥样斑块活动引发的炎症反应,或者是二者互为因果尚未定论。

随着研究深入,越来越多的与炎症相关的细胞(如单核/巨噬细胞、T 淋巴细胞)和细胞因子(如 IL-1 和 TNF- α)在动脉粥样硬化斑块中被发现,炎症学说受到学者关注。但炎症反应是如何促进动脉粥样硬化形成、发展的仍未明了。

巨噬细胞通过清道夫受体吞噬脂质演变为泡沫细胞,是动脉粥样硬化形成的关键环节。已有体外试验研究表明,上调清道夫受体(SR)的因素包括 IL-4、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、血小板衍化生长因子(PDGF)、转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)、蛋白激酶 C 激动剂等^[7,8];在冠心病患者体内,炎症因子包括 CRP、细胞黏附因子是否通过促进清道夫受体表达、增强清道夫受体活性,促进动脉粥样硬化斑块发展未见报道。本研究表明,清道夫受体活性与 CRP、细胞黏附分子 sICAM-1、sVCAM-1 具有显著相关性,推测炎症因子可能通过某种分子激活通路增强清道夫受体活性。

从另外一个方面分析,既然血清 CRP、细胞黏附

分子(如 sICAM-1、sVCAM-1 等)水平可作为急性冠状动脉综合征的重要预测指标,而清道夫受体活性与 CRP、sICAM-1、sVCAM-1 呈正相关,故清道夫受体活性亦可以作为急性冠状动脉综合征的重要预测指标。

现代药理学方法研究 GBE 发现其含有多种活性物质如:银杏黄酮苷、银杏内酯和白果内酯等;文献报道 GBE 具有清除有毒性氧自由基,防止心、脑细胞老化和脂质过氧化对细胞膜损伤;减轻脑、心肌缺血再灌注损伤,保护血管内皮,拮抗血小板活化因子(PAF)和改善微循环等作用^[3,9,10],提示 GBE 可能有抗动脉粥样硬化作用。但其具体作用机制尚不明确。有关 GBE 对巨噬细胞清道夫受体活性影响国内少见报道。本研究显示:GBE 可显著抑制外周血单核细胞分化的巨噬细胞清道夫受体活性,提示 GBE 可以通过抑制巨噬细胞清道夫受体的活性而预防动脉粥样硬化形成。

参 考 文 献

- 1 Krieger M, Herz J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptor: Macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* 1994; 63(5):601—637.
- 2 Van Eck M, De Winther MP, Herijgers N, et al. Effect of human scavenger receptor class A overexpression in bone marrow-derived cells on cholesterol levels and atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(12):2600—2606.
- 3 Chen X, Chen WZ. Recent pharmacological progress of Ginkgo biloba extract for cardiovascular and neuronal diseases. *Clin J Integr Tradit West Med* 1996;12(2):300—304.
- 4 陈灏珠主编.实用内科学.第 11 版.北京:人民卫生出版社, 2001:1367—1395.
Chen HZ, editor. Practice of internal medicine. 11th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001:1367—1395.
- 5 Fazio S, Linton MF. The inflamed plaque: cytokine production and cellular cholesterol balance in the vessel wall. *Am J Cardiol* 2001;88(2-A):12E—15E.
- 6 Anderson JL, Carlquist JF, Muhlestein JB, et al. Evaluation of C reactive protein, an inflammation marker, and infectious serology as risk factors for coronary artery disease and myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1998;32(1):35—41.
- 7 Cornicelli JA, Butteiger D, Rateri DL, et al. Interleukin-4 augments acetylated LDL-induced cholesterol esterification in macrophages. *J Lipid Res* 2000;41(3):376—383.
- 8 Gong Q, Pitas RE. Synergistic effects of growth factors on the regulation of smooth muscle cell scavenger receptor activity. *J Biol Chem* 1995;270(37):21672—21678.
- 9 Dorman DC, Cote LM, Buck WB. Effects of an extract of

Ginkgo biloba on bromethalin-induced cerebral lipid peroxidation and edema in rats. *Am J Vet Res* 1992;53(1):138—142.

10 Ferrante RJ, Klein AM, Dedeoglu A, et al. Therapeutic efficacy of EGb761 (Ginkgo biloba extract) in a transgenic mouse

model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Neurosci* 2001; 17(1):89—96.

(收稿:2004-07-02 修回:2004-08-31)

宫糜平治疗乳头型宫颈糜烂的临床观察

赵可新¹ 宋旭霞² 杜 涛¹

宫颈糜烂为已婚妇女的常见病,根据糜烂程度的不同可分为 3 型:单纯型、颗粒型及乳头型,其中乳头型为较难治的一型。目前尚未发现理想的药物,治疗此型宫颈糜烂大多用物理疗法,但损伤较大,治愈后宫颈弹性差,妊娠分娩过程中,易造成宫颈裂伤及产后大出血。笔者自 1997 年 8 月—2004 年 5 月应用宫糜平 I、II 号联合应用治疗乳头型宫颈糜烂 100 例,取得满意疗效,现报告如下。

资料与方法

1 诊断标准 参照《中药新药治疗宫颈糜烂的临床研究指导原则》中宫颈炎诊断标准,并经组织病理学和阴道镜检查确诊。

2 临床资料 符合诊断标准,就诊前 2 周内未进行有关治疗,已婚或有性生活的患者 100 例,均为本院门诊患者,年龄 21~28 岁,平均(24.5±3.2)岁;病程 0.5~2 年,平均(1.1±0.8)年;其中轻度糜烂 22 例,中度糜烂 46 例,重度糜烂 32 例。

3 方法

3.1 宫糜平组成:宫糜平 I 号:大黄 10g 蟾酥 30mg 乳香 4g 轻粉 0.2g PVA(05—88)14g 药用甘油 1g 蒸馏水适量,制备成面积 40mm×40mm,厚度(0.08±0.02)mm 的膜剂,重量(248±30)mg,含生药约 5.7%;宫糜平 II 号:大黄 8g 黄连 5g 黄柏 8g 血竭 10g 乳香 3g 没药 3g 甘油 200g 甘油明胶基质 200g,制成栓剂 100 枚,每枚相当于生药 0.37g。

3.2 用法 用窥器暴露宫颈,干棉球拭去宫颈表面分泌物,将宫糜平 I 号药膜平贴于宫颈糜烂面,隔日 1 次,连续用药 3 次,继之,自行每晚睡前将宫糜平 II 号栓剂置于阴道宫颈部位,每日 1 枚,连续 6 次,两药共用 9 日为 1 个疗程,隔两日再进行下 1 个疗程,连续治疗 3 个月经周期,判定疗效。

3.3 观察项目

3.3.1 宫颈炎症改善情况 炎症积分评分标准:白带量多 1 分,明显量多 2 分;有异味 1 分;血性带下 2 分;性交出血 1 分;宫颈轻度糜烂 1 分,中度糜烂 2 分,重度糜烂 3 分。

3.3.2 电子阴道镜检查 检查前 2h 禁止妇科检查及性生活,进行醋酸白实验及碘着色试验。

3.3.3 宫颈组织病理学观察 将治疗前后所有的活检组织用 10% 甲醛溶液固定,经脱水、透明、石蜡包埋、切片、HE 染色,于光镜下观察治疗前后组织形态学的特征变化(试剂盒由北京中山生物技术有限公司提供)。

4 统计学方法 采用 *t* 检验及 *Ridit* 分析。

结 果

1 疗效判定标准 参照《中药新药治疗宫颈糜烂的临床研究指导原则》制定。痊愈:糜烂面由鳞状上皮覆盖,完全愈合,涂碘液全部着色,炎症消失,临床症状消退;显效:宫颈糜烂面较治疗前缩小 1/3~2/3,宫颈炎症积分较治疗前下降 66.7%;有效:宫颈糜烂面较治疗前缩小 1/3,宫颈炎症积分较治疗前下降 33.3%;无效:治疗前后宫颈糜烂面及宫颈炎症积分无变化,症状无改善者。

2 治疗结果 100 例患者轻度 22 例,痊愈 20 例,有效 1 例,无效 1 例,总有效率 95.45%;中度 46 例,痊愈 19 例,显效 6 例,有效 16 例,无效 5 例,总有效率 89.13%;重度 32 例,显效 12 例,有效 11 例,无效 9 例,总有效率 71.88%。治疗前宫颈炎症积分为(7.13±2.03)分,治疗后为(2.75±1.83)分,两者比较,差异有显著性($P<0.01$)。

3 治疗前后阴道镜检查情况 100 例患者治疗前宫颈表面多发(>2 个)散在或融合的乳头状突起,灰白色呈菜花状,涂 5% 醋酸后,突起苍白水肿,变得更明显。治疗后乳头突起完全消失 39 例,体积明显缩小 46 例,突起体积无变化 15 例。

4 病理形态学改变 100 例患者治疗后,乳头状结构消失者 39 例,较治疗前减少>2/3 者 18 例,较治疗前减少 1/3~2/3 者 28 例,无明显变化者 15 例。29 例中度非典型增生者,治疗后减轻为轻度 18 例,正常 2 例,无效 9 例;35 例轻度增生者,消失 10 例,无改善 25 例。

讨 论 宫颈糜烂以宫颈局部病变为主,本病的发病是由于“毒邪侵袭,结聚于子门”,治疗以辨病为主,抓住“毒邪结聚”这一病机关键,以攻毒散结,祛腐生肌,活血化腐为治则,以宫糜平 I、II 号联合用药外治宫颈糜烂,使药物直接作用于病变部位,药力直达病变所在。宫糜平中大黄有逐瘀活血之功;蟾酥有解毒消肿之功效,用于疔毒痈肿,近年来有用于癌症治疗的报道;轻粉有毒,对皮肤黏膜具有腐蚀作用,功效为解毒杀虫,外用于疥癣、疮疡,对真菌有抑制作用;没药能散瘀活血、消肿生肌,偏行瘀;以上诸药合用,以毒攻毒,散瘀活血。另外,宫糜平 I 号为膜剂,集中有效成分直接作用于宫颈局部;宫糜平 II 号为栓剂,用药方便,以大黄、黄柏、黄连散热解毒,祛瘀消肿,为消散乳头结节的重要药,配伍乳香、血竭增强活血化瘀、生肌之功效,使腐烂创面及早愈合。通过临床观察可知,宫糜平对乳头型宫颈糜烂有较好疗效。

(收稿:2004-08-30 修回:2004-09-20)

作者单位:1. 中国石油天然气集团公司中心医院(河北廊坊 065000);2. 河北省廊坊市中医院