

· 基础研究 ·

银杏叶提取物对慢性阻塞性肺疾病大鼠
T 细胞亚群的影响杨益宝¹ 冯玉清² 梁爱武¹ 潘 玲¹ 梁 炜¹ 杨红梅¹ 罗美群¹ 谭玉萍¹

摘要 **目的** 探讨银杏叶提取物(*Ginkgo biloba* Extract, GBE)对慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)大鼠血清、肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中 T 淋巴细胞亚群的影响。**方法** 将 90 只雄性 Wistar 大鼠按照随机数字表法分为正常对照组(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)及红霉素后期干预组(F 组),每组 15 只。对 B、C、D、E 和 F 组采用烟雾吸入、冷空气刺激等复合因素对大鼠进行 28 d COPD 造模,C 和 D 组分别在 1~14 d 和 29~42 d 用 GBE 干预,E 和 F 组分别在 1~14 d 和 29~42 d 用红霉素干预,检测各组血清、BALF 前后 CD4⁺、CD8⁺ 含量,并计算 CD4⁺/CD8⁺ 比值。**结果** B 组血清与 BALF 中 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比值明显低于 A 组($P < 0.05$),CD8⁺ 的含量明显高于 A 组($P < 0.05$)。C、D 两组血清与 BALF 中 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比值明显高于 B 组($P < 0.05$),CD8⁺ 含量明显低于 B 组($P < 0.05$);C、D、E 和 F 组之间 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比值进行两两比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),C 组 BALF 中 CD4⁺ 的含量明显高于 E、F 组($P < 0.05$)。**结论** GBE 可通过增加 COPD 大鼠血清及 BALF 中 CD4⁺ 含量,提高 CD4⁺/CD8⁺ 比值,降低 CD8⁺ 含量,实现对免疫功能的调节,从而增强机体免疫力。

关键词 银杏叶提取物;慢性阻塞性肺疾病;T 淋巴细胞亚群

Effects of *Ginkgo biloba* Extract on T Cell Subsets in Rats with Chronic Obstructive Pulmonary Disease YANG Yi-bao¹, FENG Yu-qing², LIANG Ai-wu¹, PAN Ling¹, LIANG Wei¹, YANG Hong-mei¹, LUO Mei-qun¹, and TAN Yu-ping¹ 1 Department of Respiratory Medicine, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning (530001); 2 Department of Clinical Laboratory, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning (530001)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of *Ginkgo biloba* Extract (GBE) on T lymphocyte subsets in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) rats. **Methods** Totally 90 male Wistar rats were randomly divided into the normal control group (Group A), the COPD control group (Group B), GBE early intervention group (Group C), GBE late intervention group (Group D), erythromycin early intervention group (Group E), and erythromycin late intervention group (group F), according to random number table method, 15 in each group. COPD rat modeling was induced by smog inhalation, cold air stimulation, etc. complex factors in rats of Group B, C, D, E, and F for 28 days. GBE was intervened to rats in Group C and D respectively at day 1–14 and day 29–42. Erythromycin was intervened to rats in Group E and F respectively at day 1–14 and day 29–42. Contents of CD4⁺ and CD8⁺ in serum and BALF were detected before and after intervention, and CD4⁺/CD8⁺ ratio was calculated. **Results** The contents of CD4⁺ and ratio of CD4⁺/CD8⁺ in serum and BALF were significantly lower in Group B than in Group A ($P < 0.05$), and the content of CD8⁺ was significantly higher in Group B than in Group A ($P < 0.05$). The contents of CD4⁺ and ratio of CD4⁺/CD8⁺ in serum and BALF in Group C and D

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(No. 81260005)

作者单位:1. 广西中医药大学附属瑞康医院呼吸内科(南宁 530001);2. 广西中医药大学附属瑞康医院检验科(南宁 530001)

通讯作者:谭玉萍, Tel: 13517710850, E-mail: tanlaoshi1226@126.com

DOI: 10. 7661/j.cjim. 20180411. 128

were significantly higher than those in Group B ($P < 0.05$), and the content of $CD8^+$ was significantly lower than that in Group B ($P < 0.05$). The contents of $CD4^+$, $CD8^+$, and ratio of $CD4^+/CD8^+$ showed no statistical significance among Group C, D, E, and F ($P > 0.05$). And the content of $CD4^+$ in BALF was significantly higher in Group C than in Group E and F ($P < 0.05$). Conclusion GBE could increase the content of $CD4^+$ in serum and BALF of COPD rats, elevate the ratio of $CD4^+/CD8^+$, reduce the content of $CD8^+$, thus regulating immune function and enhancing the immunity of the body.

KEYWORDS *Ginkgo biloba* Extract; chronic obstructive pulmonary disease; T lymphocyte subsets

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种以不完全可逆的气流受限为特征的慢性肺部疾病,其气流受限呈进行性加重,与反复吸入烟雾、烟草等有害颗粒或有害气体对气道和肺组织的慢性炎症刺激有关,主要表现为肺功能的进行性下降和肺组织的病理改变^[1]。COPD 的形成与多种机制参与有关,其中促炎-抗炎失衡、氧化-抗氧化失衡、蛋白酶-抗蛋白酶失衡以及免疫功能失调为其主要发病机制, COPD 患者存在多种炎症细胞因子的改变,免疫学机制在 COPD 的发生和发展中占有重要地位^[2]。细胞免疫是人体免疫系统的重要组成部分,细胞免疫以 T 淋巴细胞免疫为主。 $CD4^+/CD8^+$ 表示诱导下 T 淋巴细胞与抑制性 T 淋巴细胞之间的功能平衡状态,是机体免疫内环境稳定最重要的指标。通过对外周血及肺泡灌洗液的 T 淋巴细胞亚群数目或比例的检测,判断机体的细胞免疫功能,对临床认识疾病,探讨发病机制,判断预后等方面具有重要意义^[3]。

银杏叶提取物 (*Ginkgo biloba* Extract, GBE) 是从银杏的干燥叶中提取的含有多种有效药用成分的混合物,近年来的药理研究结果表明,GBE 中主要含有黄酮类、萜类内酯、有机酸、氨基酸、微量元素等多种化学成分。研究表明,GBE 不仅可以增强正常机体的免疫功能,还可调节异常机体的免疫功能^[4]。本实验旨在观察 GBE 对 COPD 大鼠血清、肺泡灌洗液中 T 淋巴细胞亚群的影响,比较 GBE 及红霉素的干预效果,探索 GBE 对 COPD 气道、肺血管重塑作用及其机制,为防治 COPD 带来新思路,为 GBE 防治 COPD 提供实验依据。

材料与方法

1 动物 90 只健康 SPF 级 7 周龄雄性 Wistar 大鼠,体重 (234.50 ± 20.42) g,由广西医科大学动物实验中心提供[使用许可证编号:SYXK(桂)2010-0001,动物编号:SCXK20090002],实验期间饲养于广西中医药大学动物实验中心,饲养间恒温恒湿,定期

清洁,通风良好。本实验通过广西医科大学理论委员会核准同意[许可证号:SCXK(桂)2014-0002]。

2 试剂及药物 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 由美国 Sigma 公司提供,10 mg/支,2~8℃ 冷藏保存,批号:1010A032;过滤嘴香烟为南宁卷烟厂生产真龙牌香烟(焦油含量 19 mg,尼古丁 1.2 mg); $CD4$ 、 $CD8$ 单克隆抗体为 eBioscience 公司产品;银杏叶提取物选用舒血宁注射液(规格 5 mL/支,银杏叶提取物 17.5 mg/支,含总黄酮醇苷 4.2 mg/支,银杏内酯 0.70 mg/支,河北神威药业有限责任公司生产,批号:150227C1)。注射用乳糖酸红霉素(0.3 g/瓶,批号:H21021679,大连美罗大药厂生产)。

3 动物分组 90 只健康 SPF 级同龄(7 周龄)雄性 Wistar 大鼠称取体重后,随机分为 A、B、C、D、E、F 组,每组 15 只,A 组为正常对照组,B、C、D、E、F 6 组进行 COPD 造模,B 组为 COPD 对照组,C 组为银杏叶提取物早期干预组,D 组为银杏叶提取物后期干预组,E 组为红霉素早期干预组,F 组为红霉素后期干预组。

4 COPD 模型的建立 参照汪珊珊等^[5]方法烟雾吸入、LPS 气管内注入、冷空气刺激复合因素对大鼠进行 COPD 造模。在造模的第 1 天,第 14 天向大鼠气管内注入 LPS 100 U(1 mg/mL),第 2~13 天,15~28 天,每天在有机玻璃密闭箱持续吸入新鲜的香烟烟雾 30 min,15 支/天,每天熏烟后立刻用低于环境温度(20℃)5℃冷空气刺激 1 h,造模 28 天结束。28 天后 B、C、D、E、F 各组随机处死大鼠 2 只,取肺组织行光镜下病理学检查,符合 COPD 病理特征:炎症细胞浸润各级支气管周围,有气道重塑表现,肺泡融合,部分形成肺大泡。支气管纤毛柱状上皮细胞胞浆肿大,呈大泡样突起,纤毛部分脱落;Ⅱ型肺泡上皮细胞变性明显,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。

5 药物干预 根据分组为腹腔注射给药,疗程:

14 天,用量: C、D 组银杏叶提取物用量为每天 0.4 mL/kg(按照成人标准量 0.29 mL/kg,采用体表面积比值法:成人量×70/56=大鼠用量来换算); E、F 组红霉素用量根据体表面积换算方法为 10 mg/kg²; A、B 组用生理盐水(1 mL/只,1 次/天)。用药分两阶段给药。第一阶段为早期干预组:在实验第 1~14 天,C 组用银杏叶提取物干预,E 组用红霉素干预;A、B、D、F 组用生理盐水对照。第二阶段为后期干预组:在实验第 29~42 天,D 组用银杏叶提取物干预,F 组用红霉素干预;A、B、C、E 组用生理盐水对照。

6 取材 各组于全部实验结束后即第 43 天,各组大鼠用 10% 乌拉坦麻醉,肺动脉采血 5 mL,-20℃ 保存;切开胸部,暴露气管及肺部。结扎右主支气管,在隆突上用套管针穿刺至左主支气管,以 2 mL 生理盐水灌洗左肺,每次回收约 1.5 mL(回收率 75%),反复灌洗 3 次,总回收量约为 4.5 mL,将收集到的肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)离心(2000 r/min,10 min),吸取上清液保存于-20℃ 的冰箱中待检。

7 血浆和肺泡灌洗液 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 检测 应用 ELISA 法进行检测。

8 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,并进一步用 LSD 法进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠血清中 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比较(表 1) B 组血清中 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 明显低于 A 组($P < 0.05$),CD8⁺ 含量明显高于 A 组($P < 0.05$);C、D 两组血清中 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 明显高于 B 组($P < 0.05$),CD8⁺ 含量明显低于 B 组($P < 0.05$);E、F 组大鼠血清中 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 明显高于 B 组($P < 0.05$),CD8⁺ 含量无统计学意义($P > 0.05$);C、D、E 和 F 组之间进行两两比较,各组大鼠血清中

表 1 各组大鼠血清 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD4 ⁺ (μg/L)	CD8 ⁺ (ng/L)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
A	13	16.65 ± 4.29 *	117.06 ± 35.86 *	0.14 ± 0.05 *
B	13	13.97 ± 8.68	125.34 ± 31.68	0.11 ± 0.06
C	13	16.54 ± 3.36 *	119.51 ± 26.44 *	0.13 ± 0.04 *
D	13	15.73 ± 4.14 *	120.82 ± 24.41 *	0.15 ± 0.05 *
E	13	15.69 ± 4.61 *	122.71 ± 36.44	0.13 ± 0.06 *
F	13	16.33 ± 5.03 *	124.67 ± 28.66	0.13 ± 0.05 *

注:与 B 组比较,* $P < 0.05$

CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2 各组大鼠 BALF 中 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比较(表 2) B 组 BALF 中 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 明显低于 A 组($P < 0.05$),CD8⁺ 含量明显高于 A 组($P < 0.05$);C、D 两组 BALF 中 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 明显高于 B 组($P < 0.05$),CD8⁺ 含量明显低于 B 组($P < 0.05$);E、F 组与 B 组比较,CD4⁺ 含量差异无统计学意义($P > 0.05$),E、F 组 BALF 中 CD8⁺ 明显低于 B 组($P < 0.05$),CD4⁺/CD8⁺ 明显高于 B 组($P < 0.05$);C 组 BALF 中 CD4⁺ 含量明显高于 E、F 组($P < 0.05$),而各组间 CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 相比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);D、E 和 F 组之间进行两两比较,各组大鼠 BALF 中 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 的含量差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠 BALF 中 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD4 ⁺ (μg/L)	CD8 ⁺ (ng/L)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
A	13	37.86 ± 5.08 *	104.59 ± 29.68 *	0.36 ± 0.10 *
B	13	32.97 ± 7.65	117.14 ± 17.01	0.28 ± 0.09
C	13	38.09 ± 4.87 *	92.77 ± 25.90 *	0.41 ± 0.11 *
D	13	37.76 ± 4.36 *	93.66 ± 18.87 *	0.40 ± 0.10 *
E	13	34.18 ± 6.96 Δ	92.95 ± 19.01	0.37 ± 0.08 *
F	13	35.42 ± 2.98 Δ	100.60 ± 32.54	0.35 ± 0.09 *

注:与 B 组比较,* $P < 0.05$;与 C 组比较,Δ $P < 0.05$

讨 论

COPD 的病理特征主要包括不可逆的肺组织损伤、气道重塑、黏液分泌过多和多种炎症细胞浸润^[6]。而免疫功能低下是造成 COPD 病理损伤的主要原因,其中由 T 淋巴细胞介导的细胞免疫在全身和肺组织局部的免疫功能中均发挥重要作用^[7]。成熟的 T 淋巴细胞根据识别抗原肽与主要组织相容性复合体分子能力的不同可分 CD3⁺CD4⁺CD8⁻ 和 CD3⁺CD4⁻CD8⁺ 两大亚群,简称为 CD4⁺ 淋巴细胞和 CD8⁺ 淋巴细胞。CD4⁺ 淋巴细胞又被称为辅助性 T 淋巴细胞,若含量降低则会使其功能相应减弱,进而导致机体免疫功能下降;CD8⁺ 淋巴细胞又被称为抑制性 T 淋巴细胞,可利用其细胞毒性分子杀死被病原体或已分化为肿瘤细胞的宿主细胞,若含量增高则会使其功能强化,反而会对机体造成损伤。淋巴细胞亚群 CD4⁺/CD8⁺ 是反映机体免疫功能的一项敏感指标,而且 CD4⁺/CD8⁺ 比值降低往往提示机体免疫功能的下降,且下降程度与疾病严重程度和预后不良呈正相关性^[8]。

吸烟是引起 COPD 的主要发病因素,环境暴露或有机粉尘(活性成分是脂多糖)也是 COPD 的重要致病因素。动物模型烟熏法和人类 COPD 的疾病特征最为接近,吸烟模型动物可以建立起诸多病理特征,如慢性炎症肺气肿肺动脉高压及气道重塑等^[9]。动物实验也表明脂多糖的慢性暴露可复制出符合 COPD 相同的病理生理学改变的大鼠模型^[10]。本研究采用气管内注入 LPS、烟雾吸入、冷空气刺激等复合因素对大鼠进行 COPD 造模,实验结束后取各组大鼠肺动脉血及 BALF,并检测各组血清、BALF 中 CD4⁺、CD8⁺的含量,计算 CD4⁺与 CD8⁺的比值。

本次实验结果发现 GBE 可提高 COPD 大鼠血清及 BALF 中 CD4⁺含量,提高 CD4⁺/CD8⁺比值,降低 CD8⁺含量;GBE 干预组与红霉素组比较,对大鼠血清及 BALF 中 CD8⁺含量及 CD4⁺/CD8⁺比值的影响无明显差异,而早期 GBE 干预组在提高 BALF 中 CD4⁺含量上优于早期和后期红霉素干预组。说明 GBE 可通过增加 COPD 大鼠血清及 BALF 中 CD4⁺含量,提高 CD4⁺/CD8⁺比值,降低 CD8⁺含量,实现对免疫功能的调节,从而增强机体免疫力,以期延缓 COPD 大鼠的疾病进展。希望本研究能为临床中应用 GBE 防治 COPD 提供一定的实验理论依据。

利益冲突:无。

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]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2014, 6(2): 67-79.
- [2] 杨华. 慢性阻塞性肺疾病的免疫治疗进展[J]. 山东医药, 2014, 54(45): 104-106.
- [3] 姜素丽, 李亚, 田燕歌, 等. 调补肺肾三法对 COPD 大鼠 T 淋巴细胞亚群及 CD4⁺CD25⁺的影响及远后效应[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(11): 1538-1544.
- [4] 黄其春, 何玉琴, 李焰, 等. 银杏叶提取物的免疫调节作用研究进展[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(2): 278-280.
- [5] 汪珊珊, 汪电雷, 陶秀华, 等. 脂多糖诱导的慢性阻塞性肺病模型大鼠肺支气管上皮 MRP1 功能分析[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(3): 30-34.
- [6] Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (updated 2014)[EB/OL]. (2014-08-04). http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report2014_Feb07.pdf.
- [7] Eppert BL, Wortham BW, Flury JL, et al. Functional characterization of T cell populations in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease[J]. J Immunol, 2013, 190(3): 1331-1340.
- [8] Lu W, Mehraj V, Vyboh K, et al. CD4:CD8 ratio as a frontier marker for clinical outcome, immune dysfunction and viral reservoir size in virologically suppressed HIV-positive patients[J]. J Int AIDS Soc, 2015, 18(11): 20052.
- [9] 范励侦. 慢性阻塞性肺疾病动物模型研究进展[J]. 福建医药杂志, 2011, 33(1): 139-141.
- [10] 宋一平, 崔德健, 茅培英. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立及药物干预的影响[J]. 中华内科杂志, 2000, 39(8): 56.

(收稿: 2017-02-23 在线: 2018-05-21)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶