

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.27.006

## 银杏叶提取物对肠炎小鼠肠黏膜屏障的保护作用研究\*

赵红伟<sup>1</sup>,和丽丽<sup>2</sup>,韩华<sup>3</sup>,岳月红<sup>4</sup>,康薇<sup>5</sup>,朱叶珊<sup>6</sup>,刘建平<sup>7△</sup>

(1.河北省人民医院消化内科,石家庄 050051;2.河北省人民医院老年病科,石家庄 050051;3.河北省人民医院妇科,石家庄 050051;4.河北省人民医院神经内科,石家庄 050051;5.河北省新乐市医院消化内科 050700;6.河北省唐山市中医院脾胃科 063000;7.河北省中医院脾胃科,石家庄 050071)

**[摘要]** **目的** 探索银杏叶提取物(EGB 761)对肠炎模型小鼠结肠黏膜屏障的保护作用。**方法** 将 30 只小鼠分为正常对照组、模型组、EGB 761 组,建立动物模型;每天观察小鼠的一般情况、体质量变化、粪便隐血及结肠组织病理学的表现,免疫组织化学荧光染色测定结肠组织中 occludin-1 等紧密连接蛋白的变化。**结果** 模型组小鼠体质量下降,饮水和进食明显减少,EGB 761 干预治疗后小鼠的体质量回升明显;EGB 761 组可见炎症细胞浸润少,炎症程度较模型组明显减轻。模型组结肠黏膜组织紧密连接蛋白-1(claudin-1)、occludin 和 zo-1 荧光分布较正常对照组分散,荧光强度减弱,边缘粗糙;经 EGB 761 干预后 EGB 761 组荧光仍沿细胞膜分布,强度较正常对照组稍减弱,但仍强于模型组。**结论** EGB 761 能有改善肠炎模型小鼠结肠组织炎症反应,其机制可能与加强其肠黏膜屏障的保护作用有关。

**[关键词]** 银杏叶提取物;溃疡性结肠炎;急性期动物模型;肠黏膜屏障**[中图分类号]** R574.62**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)27-3763-04**Protective role of Ginkgo Biloba extract in intestinal mucosal barrier of intestinal inflammation mouse\***Zhao Hongwei<sup>1</sup>, He Lili<sup>2</sup>, Han Hua<sup>3</sup>, Yue Yuehong<sup>4</sup>, Kang Wei<sup>5</sup>, Zhu Yeshan<sup>6</sup>, Liu Jianping<sup>7△</sup>

(1. Department of Gastroenterology; 2. Department of Gerontology; 3. Department of Gynecology; 4. Department of Neurology, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050051, China; 5. Department of Gastroenterology, Xinle Municipal Hospital, Xinle, Hebei 050700, China; 6. Department of Spleen and Stomach, Tangshan Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Tangshan, Hebei 063000, China; 7. Department of Spleen and Stomach, Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang, Hebei 050071, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the protective role of Ginkgo Biloba extract (EGB 761) in intestinal mucosal barrier of intestinal inflammation model mouse. **Methods** Thirty mice were randomly divided into the control group, model group and EGB 761 group; the animal model was established; the general condition, body mass change, fecal occult blood and colon histopathological changes were observed, the expressions of occludin-1 proteins in colon tissue were detected by immunofluorescence. **Results** The body mass in the model group appeared to decrease, drinking water and eating food were significantly decreased compared with that in the control group. However after the EGB 761 intervention, the body mass of the model mice was significantly risen again; little inflammatory cells infiltration could be seen in the EGB 761 group, the inflammatory degree was significantly alleviated compared with the model group. The fluorescence distribution of the claudin-1, occludin and zo-1 in colonic tissues of the model group was more disperse compared with the normal group, the fluorescence intensity was weakened with rough edge; after EGB 761 intervention, the fluorescence in the EGB 761 group was distributed along with the cellular membrane, the intensity was slightly weakened compared with the normal control group, but was still stronger than that in the model group. **Conclusion** EGB 761 can improve the inflammatory reaction in mouse colonic tissue, its mechanism may be related with its strengthening the protective effect of intestinal mucosal barrier.

**[Key words]** EGB 761; ulcerative colitis; acute stage animal model; intestinal mucosal barrier

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种反复发作的肠道炎症性疾病,严重影响患者的生活质量,目前对于 UC 的发病机制尚不十分清楚,但更多的研究更倾向于有害物质或病毒穿过肠道的黏膜屏障,与机体本身的免疫系统反复接触及刺激,使机体免疫发生异常变化,从而产生大量的免疫炎症因子,使肠道发生炎症反应<sup>[1-3]</sup>。银杏叶提取物(ginkgo biloba extract, GBE 761)的活性成分包括银杏内酯、白果内酯,这些银杏

黄酮-糖甙成分具有强大的清除自由基、抗氧化能力,但其是否对肠黏膜屏障有调节作用仍需进一步研究。

**1 材料与方**

**1.1 动物与试剂** 30 只 C57BL/6 雄性小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司,体质量 20~22 g; 9~12 周龄; EGB 761(金钠多注射液,德国威玛舒培药厂);右旋葡聚糖硫酸钠(DSS,美国 Sigma);兔抗 zo-1 抗体(Invitrogen)、鼠抗 occludin

\* 基金项目:河北省中医药管理局科研计划项目(2016180)。 作者简介:赵红伟(1979—),博士,主治医师,主要从事临床医学研究。

△ 通信作者, E-mail:13603396653@163.com。

抗体(美国 Santa Cruz)、HRP 抗鼠 IgG、HRP 抗兔 IgG(北京中杉有限公司);将 10 g DSS(相对分子质量 36 000~50 000)溶于 500 mL 蒸馏水中后配成了 2% 浓度的液体,放入 4 °C 冰箱保存备用。

**1.2 造模方法** 30 只 C57BL/6 雄性小鼠按随机数字表法分为正常对照组(10 只)、模型组(10 只)、EGB 761 组(10 只);模型组、EGB 761 组、自由饮用 2% DSS 7 d;正常对照组、自由饮用蒸馏水 7 d,EGB 761 组每天予 EGB 761 1 mL(200 mg/kg)灌肠,正常对照组和模型组给予 PBS 灌肠,时间均为 1 周,第 8 天处死所有动物。

**1.3 动物的一般情况及疾病活动指数(disease activity index, DAI)** 实验开始时,需要每天观察动物的饮食、饮水、精神状态、体质量、毛发光泽度、活动情况、大便秘状等。按照 DAI 评分标准评估各组小鼠 DAI 的变化,DAI=(体质量指数+大便形状+出血情况)/3。

**1.4 结肠组织大体评分及结肠病理组织染色(HE 染色)** 在实验结束后,取部分结肠组织,固定、包埋、切片、HE 染色,在光镜下观察肠组织的病理学改变。

**1.5 结肠组织免疫组织荧光染色** 将新鲜结肠组织切片、固定、封闭,室温放置 1 h,加小鼠抗紧密连接蛋白-1(claudin-1)和 occludin 单克隆抗体,兔抗 zo-1 多克隆抗体,4 °C 过夜,洗涤液冲洗,滴加标记绿色荧光的抗兔 FITC 或标记红色荧光的抗小鼠 Cy3,室温放置 1 h 显示红色荧光或绿色荧光为阳性表达。用 PBS 替代一抗作阴性对照,其余步骤同上。

**1.6 统计学处理** 采用 SPSS13.1 软件进行统计分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),其中组间比较应用 SNK 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 实验动物 DAI 变化情况** 模型组小鼠体质量、饮食、大便情况的变化:实验第 1 天,饮用了 2% DSS 后,观察小鼠的进食及饮水均较多,体质量增加;实验第 3 天,饮用了 2% DSS 的模型组小鼠出现体质量有所下降,大便偏松散且量有所增加,但无黏液及脓血,动物的进食和饮水均明显减少;实验第 5 天,模型组出现小鼠的体毛较凌乱,毛发无光泽,精神萎靡,进食及饮水较之前明显减少,体质量较之前有所下降,同时可见大便

偏稀,带有黏液及脓血;实验第 8 天,模型组小鼠精神差,毛较凌乱,进食及饮水减少,体质量下降,同时肛周可见肉眼血便。正常对照组小鼠的饮食、体质量、大便情况的变化:正常对照组从第 1~8 天小鼠毛发、精神、活动、大便,体质量持续增加。EGB 761 组小鼠的饮食、体质量、大便情况的变化:应用 EGB 761 1 mL(200 mg/kg)灌肠干预实验小鼠治疗的第 2 天,小鼠的精神尚可,进食及饮水正常,体质量未下降,可见排稀便;EGB 761 干预 UC 小鼠的第 5 天,小鼠精神状态好,毛发有光泽,饮食及饮水量增加,小鼠的体质量较模型组也有明显增加,大便较稀且量较多;EGB 761 干预 UC 小鼠第 7 天,EGB 761 组小鼠进食及饮水较模型组明显增多,同时体质量也明显上升,动物的精神状态良好,毛发有光泽,大便量多,无黏液及脓血。实验结束后,综合计算各组动物的大便潜血、大便秘状、体质量等情况进行 DAI 评分;在实验第 5 天,与正常对照组动物 DAI 评分(0.00±0.00)比较,模型组动物 DAI 评分明显升高(1.30±0.65,  $P < 0.01$ ),至实验第 8 天模型组 DAI 评分升高最为明显(3.00±0.41,  $P < 0.01$ ),见图 1。

**2.2 各组动物结肠黏膜组织病理学表现** 实验结束后,蜡块切片行 HE 染色,可见模型组小鼠结肠组织上皮破损或缺损,黏膜层及结肠黏膜下层可见大量炎性细胞浸润,同时伴有隐窝增生。正常对照组结肠病理切片可见结肠组织上皮完整且黏膜光滑,黏膜层及黏膜下层无充血、水肿等表现;EGB 761 组可见结肠组织上皮的破损不明显,黏膜层及黏膜下层的炎症细胞浸润较少,隐窝增生形成不明显,其炎症程度较模型组明显减轻,且 EGB 761 组结肠病理表现较模型组隐窝破坏、病变深度、炎症浸润均有不同程度的减轻,见图 2。

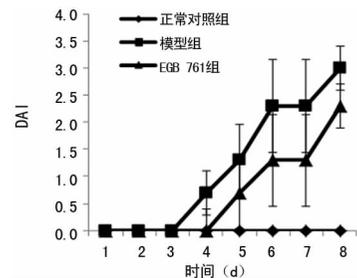
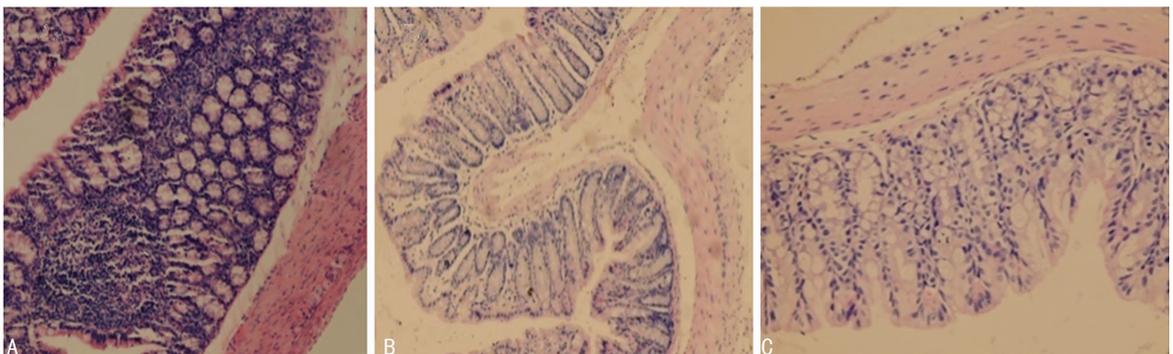


图 1 各组小鼠 DAI 评分比较



A:模型组;B:正常对照组;C:EGB 761 组

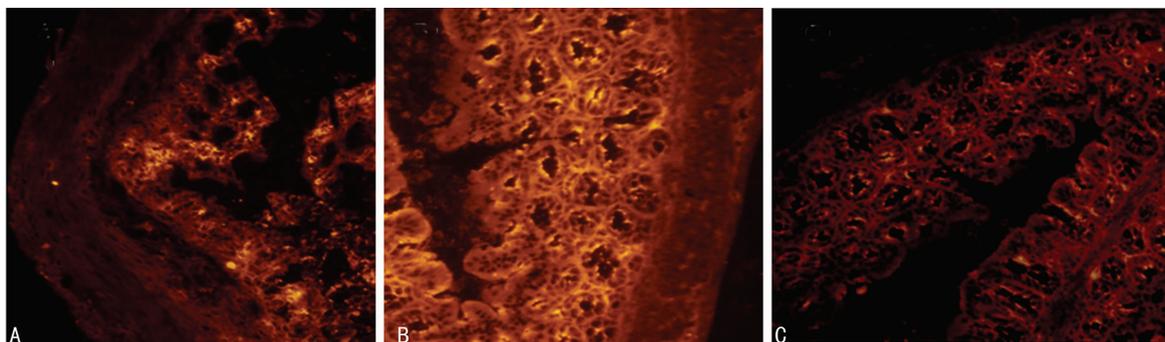
图 2 各组动物结肠黏膜组织病理学的表现(HE 染色×200)

**2.3 免疫荧光染色检测结肠黏膜 claudin-1、occludin、zo-1 蛋白的定位分布** 实验结束后,行冰冻切片荧光染色,claudin-1、

occludin、zo-1 等紧密连接蛋白的抗体均带有荧光标记物,claudin-1、occludin 抗体带有红色荧光标记物,zo-1 抗体带有绿色

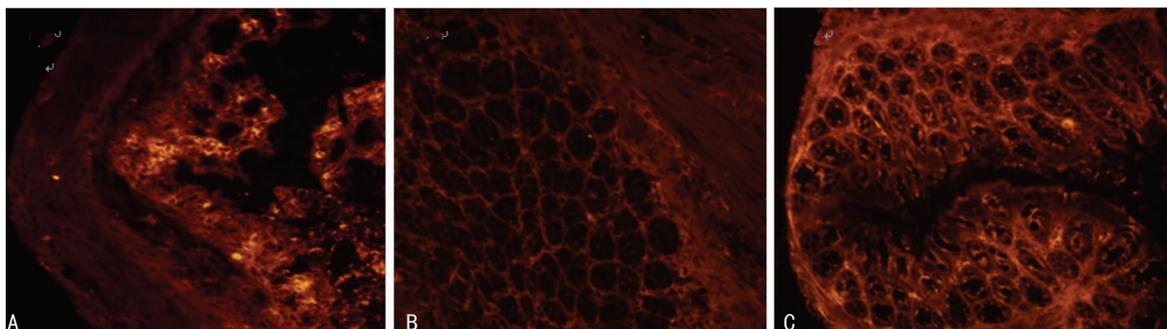
标记物,通过荧光显微镜可见模型组结肠组织荧光染色后 claudin-1、occludin 阳性蛋白表达呈现红色显像,结肠组织细胞与细胞紧密连接处红色荧光分布不连续、不整齐且较零乱,边缘粗糙呈锯齿状;同时红色显色面积减少,且荧光强度减弱;正常对照组结肠黏膜 claudin-1、occludin 阳性蛋白红色荧光在结肠细胞与细胞连接处呈连续性分布、边缘光滑,红色显色面积较大,荧光强度增强;EGB 761 组 claudin-1、occludin 阳性蛋白红色荧光在结肠细胞与细胞连接处沿胞膜分布,呈连续性分布、边缘较光滑,红色显色面积较模型组大,红色荧光强度较正常对照组稍减弱,但仍强于模型组。通过荧光显微镜可见模型

组结肠组织荧光染色后 zo-1 阳性蛋白表达呈现绿色显像,结肠组织细胞与细胞紧密连接处红色荧光分布不连续、不整齐且较零乱,边缘粗糙呈锯齿状;同时绿色显色面积减少,且荧光强度减弱;正常对照组结肠黏膜 zo-1 阳性蛋白绿色荧光在结肠细胞与细胞连接处呈连续性分布、边缘光滑,绿色显色面积较大,荧光强度增强;EGB 761 组 zo-1 阳性蛋白绿色荧光在结肠细胞与细胞连接处沿细胞膜分布,呈连续性分布、边缘较光滑,绿色显色面积较模型组大,绿色荧光强度较正常对照组稍减弱,但仍强于模型组,见图 3~5。



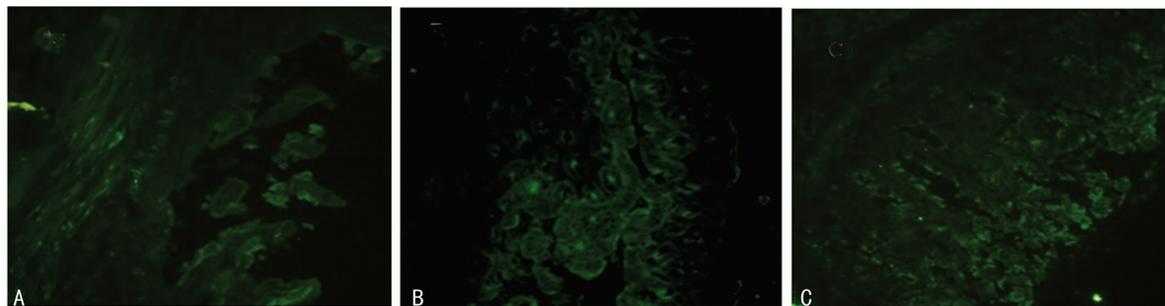
A:模型组;B:正常对照组;C:EGB 761 组

图 3 各组小鼠结肠黏膜组织 claudin-1 的表达(免疫荧光染色×200)



A:模型组;B正常对照组;C:EGB 761 组

图 4 各组小鼠结肠组织 occludin 的表达(免疫荧光染色×200)



A:模型组;B正常对照组;C:EGB 761 组

图 5 各组小鼠结肠组织 zo-1 的表达(免疫荧光染色×200)

### 3 讨 论

随着生活水平的提高,人们的饮食结构也随之改变,多方的调查研究发现,UC 的发病率较以前明显上升,严重影响患者的生活质量,所以 UC 的治疗成为亟待解决的问题。目前对于 UC 的发病机制尚不十分清楚,但是多数研究认为更多的有害物质或病毒穿过肠道的黏膜屏障,与机体本身的免疫系统反

复地接触及刺激,使机体的免疫发生异常变化,从而产生大量的免疫炎性因子,不断刺激肠道,使肠道发生炎症反应,造成肠道的黏膜水肿、出血、糜烂等症状。由此可见肠道的黏膜屏障起到了关键性的作用。

肠黏膜屏障在正常情况下是肠道的保护性屏障,它把有害物质与机体分开,避免机体受到侵害,完整的肠道黏膜屏障是

由肠道上细胞连接而成的,细胞与细胞之间有紧密连接蛋白,这种蛋白之间的紧密连接是其主要的连接方式,对细胞的连接及屏障形成的完整性起着决定性的作用<sup>[4-5]</sup>。在正常情况下,结肠组织黏膜能有效阻止有害菌穿透黏膜进入深部组织,肠道黏膜上皮的完整性是肠道黏膜屏障的结构基础,有利于机体的内环境稳定,是机体健康的保证<sup>[6-9]</sup>。如果有害物质对细胞与细胞之间的紧密连接蛋白造成损害,使细胞与细胞之间的连接不紧密、不连贯,有破损、裂缝,使屏障的保护作用降低,此时有害物质能穿过细胞之间连接的屏障对机体的免疫系统不断地进行刺激,引起机体免疫紊乱,炎症产生,最终导致 UC 的发生。由此可见,紧密连接蛋白的连贯性、黏膜屏障的完整性,在肠道保护方面起着重要的作用。

西医主要采用糖皮质激素、免疫抑制剂、生物制剂治疗 UC,但是同时也会伴发严重的不良反应,给患者带来了痛苦。在中医方面关于 UC 的研究也较多,取得的成果也较显著,银杏是中国较为古老的一种植物,银杏叶中含有苦内酯、天然活性黄酮等对人体健康有益的多种成分,在 UC 的研究中也显示了很大的作用。GBE 761 具有扩张血管、溶解胆固醇、改善血液循环、清除自由基、清除过氧化脂质、保护组织等作用。也有研究表明,GBE 761 可抑制炎症细胞因子的表达,对大鼠实验性结肠炎具有抑制肠道炎症,保护肠道作用,但在 GBE 761 治疗 UC 的紧密连接蛋白的连贯性、黏膜屏障的完整性方面的研究较少。

综上所述,应用 GBE 761 干预 UC 小鼠可以使 UC 小鼠血便减少,腹泻减轻,进食增加,精神萎靡症状减轻,病理结果及免疫荧光检查显示,GBE 761 干预 UC 小鼠可以恢复紧密连接蛋白的连贯性、减少紧密连接蛋白破损,使肠黏膜完整性增加,减少肠道出血,小鼠的进食及体质量逐渐增加,UC 症状首先获得改善。

## 参考文献

[1] Dupont A, Kaconis Y, Yang I, et al. Intestinal mucus affinity and biological activity of an orally administered anti-

bacterial and anti-inflammatory peptide[J]. *Gut*, 2015, 64(2):222-232.

- [2] Long TM, Nisa S, Donnenberg MS, et al. Enteropathogenic escherichia coli inhibits type I interferon and RNase I-mediated host defense to disrupt intestinal epithelial cell barrier function[J]. *Infect Immun*, 2014, 82(7):2802-2814.
- [3] Michielan A, D'incà R. Intestinal permeability in inflammatory bowel disease: pathogenesis, clinical evaluation, and therapy of leaky gut[J]. *Mediators Inflamm*, 2015(2015):628157.
- [4] Mccole DF. IBD candidate genes and intestinal barrier regulation[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2014, 20(10):1829-1849.
- [5] Coskun M. Intestinal epithelium in inflammatory bowel diseases[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2014(1):24.
- [6] Sun T, Gao GZ, Li RF, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation ameliorates oxidative stress and restores intestinal mucosal permeability in chemically induced colitis in mice[J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(5):891-901.
- [7] Liu XC, Xu JM, Mei Q, et al. Myosin light chain kinase inhibitor inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice[J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(1):107-114.
- [8] Langhorst J, Wiedler A, Michalsen A, et al. Activated innate immune system in irritable bowel syndrome? [J]. *Gut*, 2007, 56(9):1325-1326.
- [9] Kotakadi VS, Jin Y, Hofseth AB, et al. Ginkgo biloba extract EGB 761 has anti-inflammatory properties and ameliorates colitis in mice by driving effector T cell apoptosis [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(9):1799-1806.

(收稿日期:2016-11-08 修回日期:2017-04-10)

(上接第 3762 页)

[J]. *Paediatr Anaesth*, 2006, 16(8):846-859.

- [10] Jessberger S, Clark RE, Broadbent NJ, et al. Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats[J]. *Learn Mem*, 2009, 16(2):147-154.
- [11] Coras R, Siebzehrubl FA, Pauli E, et al. Low proliferation and differentiation capacities of adult hippocampal stem cells correlate with memory dysfunction in humans [J]. *Brain*, 2010, 133(11):3359-3372.
- [12] Bagri A, Tessier-Lavigne M. Neuropilins as semaphorin receptors: in vivo functions in neuronal cell migration and axon guidance[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2002(515):13-31.
- [13] Barry DS, Pakan JM, McDermott KW, Radial glial cells:

key organisers in CNS development[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014(46):76-79.

- [14] Kempermann GH, Kuhn G, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. [J] *Nature*, 1997, 386(6624):493-495.
- [15] Sun B, Halabisky B, Zhou Y, et al. Imbalance between GABAergic and glutamatergic transmission impairs adult neurogenesis in an animal model of alzheimer's disease [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(6):624-633.
- [16] Kruglyakova EP, Khovryakov AV, Shikhanov NP, et al. Nestin-expressing cells in the human hippocampus[J]. *Neurosci Behav Physiol*, 2005, 35(9):891-897.

(收稿日期:2016-11-03 修回日期:2017-06-11)