

· 论 著 ·

动脉粥样硬化大鼠主动脉 IL-1β、TNFα、IL-10 及 IL-10R 的表达及银杏叶提取物的作用

焦亚斌, 芮耀诚*, 杨鹏远, 李铁军, 邱彦
(第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:**研究动脉粥样硬化(AS)大鼠主动脉 IL-1β、TNFα、IL-10 及 IL-10R 的表达及观察银杏叶提取物(EGB)对它们的作用。**方法:**建立 AS 大鼠模型,动物分成 3 组,即对照组、AS 组和 EGB 组,每组 6 只。EGB 组每天灌胃给予 EGB 100 mg/kg,对照组、AS 组每日给予同体积水。8 周后,采用 ELISA、RT-PCR 方法检测 IL-1β、TNFα、IL-10 及 IL-10R 水平及 mRNA 表达。**结果:**AS 大鼠主动脉 IL-1β、TNFα、IL-10、IL-10R 水平及 mRNA 表达均显著高于对照组($P < 0.01$),EGB 组主动脉 IL-1β、TNFα 水平及 mRNA 表达均低于 AS 组,IL-10、IL-10R 水平及 mRNA 表达均高于 AS 组($P < 0.01$)。**结论:**EGB 对致炎细胞因子 IL-1β、TNFα 表达的显著抑制作用,对抗炎细胞因子 IL-10 及 IL-10R 表达的显著上调作用可能是其抗 AS 的机制之一。

[关键词] 动脉粥样硬化;细胞因子;白细胞介素 10;银杏叶提取物

[中图分类号] R 541.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)02-0158-03

Expression of IL-1β, TNFα, IL-10 and IL-10R in aorta of atherosclerotic rats and effects of *Ginkgo biloba* extract on their expression

JIAO Ya-bin, RUI Yao-cheng*, YANG Peng-yuan, LI Tie-jun, QIU Yan (Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the expressions of IL-1β, TNFα, IL-10 and IL-10R in aorta of atherosclerotic (AS) rat and the effects of *Ginkgo biloba* extract (EGB). **Methods:** The experimental model of AS was established in rats. Rats were divided into 3 groups: control, AS and EGB. EGB (100 mg/kg) was administered through intra-gastric pathway in EGB group every day; the same volume of water was administered in control group and in AS group. After 8 weeks, the expressions of IL-1β, TNFα, IL-10 and IL-10R were detected by ELISA and RT-PCR methods. **Results:** The protein and mRNA expressions of IL-1β, TNFα, IL-10 and IL-10R in aorta were markedly higher in AS groups than that in control groups ($P < 0.01$). The protein and mRNA expressions of IL-1β and TNFα in aorta were markedly lower in EGB groups than that in AS groups; the protein and mRNA expressions of IL-10 and IL-10R in aorta were markedly higher in EGB groups than that in AS groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** EGB has significant inhibitory effects on proinflammatory cytokine IL-1β and TNFα; upregulation of anti-inflammatory cytokine IL-10 and IL-10R by EGB may be partially responsible for its anti-AS effects.

[KEY WORDS] atherosclerosis; cytokine; interleukin-10; extract of *Ginkgo biloba*

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(2): 158-160]

动脉粥样硬化(AS)是心脑血管疾病的主要病理基础。Ross 提出的“损伤-反应学说”^[1,2]是为多数学者所接受的 AS 发生机制之一。近年来发现抗炎细胞因子如 IL-10 参与了 AS 的发生和发展,并发挥了重要的保护作用^[3]。银杏叶提取物(EGB)是当前国内外广泛应用于治疗心、脑血管疾病包括冠心病、脑供血不全等症的药物^[4,5]。但其防治 AS 的作用机制尚未十分明确。本文旨在研究大鼠 AS 模型主动脉致炎因子 IL-1β、TNFα 和抗炎因子 IL-10 及 IL-10R 的表达,并观察具有抗 AS 作用的药物 EGB 对内源性 IL-10 及 IL-10R 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物、药品和试剂 雄性 Wistar 大鼠,体质量 200~220 g,购自中国科学院上海实验动物中心,合格证号 SCXK(沪)2002-0010。EGB(含黄酮苷 24%,银杏内酯 6%),上海绿源实业有限公司出品,中国科学院上海药物所陈维洲教授惠赠;维生素 D₃注射液购于上海第九制药厂;大鼠 IL-1β、TNFα

[基金项目] 国家自然科学基金(30271509)。

[作者简介] 焦亚斌(1970-),女(汉族),博士。

* Corresponding author. E-mail: ycrui@smmu.edu.cn

和 IL-10 ELISA 试剂盒, Biosource 公司生产; 小量柱离心式组织/细胞/植物(叶)总 RNA 抽提试剂盒, 上海华舜生物工程有限公司生产; RNA PCR kit(AMV) Ver2. 1, TaKaRa 宝生物工程有限公司产品。

1.2 仪器 Multiskan MK3 酶标分析仪, Lab-systems Dragon 公司; 梯度 PCR 扩增仪, Biometra 公司; 电泳仪和电泳槽, 上海康达电子仪器厂; 紫外透射反射分析仪, 上海长明光学电子仪器厂。

1.3 大鼠 AS 模型的建立 参照文献^[6]方法, 大鼠在腹腔注射维生素 D₃ (60 万单位/kg) 后, 给予高脂饲料(3% 胆固醇, 0.5% 胆酸钠, 0.2% 丙基硫氧嘧啶, 5% 白糖, 10% 猪油, 81.3% 基本饲料) 喂养 8 周, 可形成典型的 AS 病变。

1.4 分组及给药方法 将雄性 Wistar 大鼠按体重随机分成 3 组, 即对照组、AS 组和 EGB 组, 每组 6 只。除对照组喂饲基础饲料外, 其余各组均在腹腔注射维生素 D₃ 后给予高脂饲料, 同时给药组每天灌胃给予 EGB 100 mg/kg, 对照组、AS 组给予同体积水。8 周后, 腹腔注射水合氯醛麻醉, 取主动脉, 进行指标测定。

1.5 IL-1 β 、TNF α 和 IL-10 水平的测定 按 4 ml/g 组织的比例加入生理盐水, 用玻璃匀浆器匀浆, 匀浆液 3 000 r/min 离心 10 min 后吸取上清, 采用 ELISA 法测定, 按试剂盒说明进行。

1.6 IL-1 β 、TNF α 、IL-10 和 IL-10R mRNA 表达的测定 采用 RT-PCR 法, 按试剂盒说明进行。TNF α 上游引物 5'-CAT GAT CCG AGA TGT GGA ACT GGC-3', 下游引物 5'-CTG GCT CAG CCA CTC CAG C-3', 扩增产物 315 bp; IL-1 β 上游引物 5'-GAC CTG TTC TTT GAG GCT GAC-3', 下游引物 5'-TCC ATC TTC TTC TTT GGG TAT TGT T-3', 扩增产物 578 bp; IL-10 上游引物 5'-TAA GGG TTA CTT GGG TTG CCA AGC C-3', 下游引物 5'-AGG GGA GAA ATC GAT GAC AGC G-3', 扩增产物 174 bp; IL-10R 上游引物 5'-CCA ACT GGA CCA TCA CTG AAA CTC-3', 下游引物 5'-GCC TTG TTA ATT CGG GAT TCC AC-3', 扩增产物 319 bp; β -actin 上游引物 5'-AAG GCC AAC CGT GAA AAG ATG A C-3', 下游引物 5'-GGG TAC ATG GTG GTG CCA CCA GAC-3', 扩增产物 587 bp。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 45 s; 50 $^{\circ}$ C 45

s; 72 $^{\circ}$ C 2 min; 35 个循环后 PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 5 V/cm, 紫外照相。

1.7 统计学处理 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并进行 ANOVA 检验分析。

2 结果

2.1 IL-1 β 、TNF α 和 IL-10 测定结果 与对照组比较, AS 组主动脉中 IL-1 β 、TNF α 及 IL-10 水平均升高 ($P < 0.01$), EGB 可显著降低主动脉中 IL-1 β 、TNF α 水平, 显著增加 IL-10 水平 ($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 EGB 对 AS 大鼠主动脉 IL-1 β 、TNF α 及 IL-10 的影响

Tab 1 Effects of EGB on IL-1 β , TNF α and IL-10 in aorta of AS rats

Group	(n=6, $\bar{x} \pm s$, ng \cdot g ⁻¹)		
	IL-1 β	TNF α	IL-10
Control	4.82 \pm 0.24	0.63 \pm 0.13	0.31 \pm 0.02
AS	11.19 \pm 0.39**	1.53 \pm 0.06**	0.41 \pm 0.05**
AS+EGB	6.38 \pm 0.48 $\Delta\Delta$	1.03 \pm 0.05 $\Delta\Delta$	0.66 \pm 0.07 $\Delta\Delta$

** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ vs AS group

2.2 IL-1 β 、TNF α 、IL-10 和 IL-10R mRNA 的表达结果 RT-PCR 结果表明, 各泳道上的 β -actin 含量接近, 表明每条泳道的上样量基本一致。对照组主动脉有少量 IL-1 β 、TNF α 、IL-10 和 IL-10R mRNA 表达, AS 组主动脉 IL-1 β 、TNF α 、IL-10 及 IL-10R mRNA 表达均增加, EGB 组 IL-1 β 、TNF α mRNA 表达弱于 AS 组, IL-10、IL-10R mRNA 表达强于 AS 组。结果见图 1。

3 讨论

近年来发现单核/巨噬细胞、平滑肌细胞在一定条件下可产生并分泌抗炎细胞因子 TGF β 、IL-10、IL-4、IL-11 等, 其中 IL-10 是一种具有强免疫调节作用的抗炎细胞因子^[7]。Mallat 等^[8]用野生小鼠作对照, 观察 IL-10 缺乏的小鼠给予致 AS 饮食后, 脂质沉积升高, 对饮食诱导的 AS 易感性显著增加, 产生的斑块损伤也显著大于野生鼠, 而在体内转染含小鼠 IL-10 的 cDNA 质粒后损伤面积降低 60%, 说明了 IL-10 对 AS 具有保护作用。不稳定型心绞痛患者血清 IL-10 水平降低, 也间接说明了 IL-10 在 AS 中的保护作用^[9]。